

**ДИАГНОСТИКА
ЗАБОЛЕВАНИЙ
СИСТЕМЫ КРОВИ**

ДИАГНОСТИКА ЗАБОЛЕВАНИЙ СИСТЕМЫ КРОВИ. ПРАКТИЧЕСКОЕ РУКОВОДСТВО

Научные редакторы:

доктор медицинских наук Е. Н. Паровичникова, генеральный директор ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, главный внештатный специалист гематолог Минздрава России; доктор медицинских наук И. В. Гальцева, заведующая лабораторией иммунофенотипирования клеток крови и костного мозга, руководитель сектора иммунофенотипирования клеток крови и костного мозга ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России



Москва, 2024

ББК 53.4:54.11
Д44

Рецензенты:

Л. Ю. Гривцова — доктор биологических наук, кандидат медицинских наук, заведующая отделом лабораторной медицины МРНЦ им. А. Ф. Цыба — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России

И. С. Мартынкевич — доктор биологических наук, руководитель Научно-исследовательского Центра клеточной и молекулярной патологии ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России

Диагностика заболеваний системы крови. Практическое руководство. Под ред. Е. Н. Паровичниковой и И. В. Гальцевой. — М.: Практика, 2024. — 544 с.

Д44 Правильный диагноз — это залог успеха терапии всех заболеваний. Современные лабораторные методики сделали большой шаг в диагностике заболеваний системы крови. Благодаря иммуногистохимическим, цитогенетическим, молекулярно-генетическим, иммунофенотипическим методам исследования и лучевым методам диагностики наряду с классическими лабораторными методами появилась возможность выделять группы риска среди пациентов, подбирать риск-адаптированную терапию, в том числе таргетную, и проводить контроль остаточной опухолевой популяции в процессе выполнения новых протоколов лечения. Все вышеперечисленные методы и диагностические подходы представлены в этой книге и отражают многолетний собственный опыт работы лабораторий ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ.

Книга предназначена для студентов вузов, клинических ординаторов и аспирантов, терапевтов, гематологов, химиотерапевтов, реаниматологов, врачей клинической лабораторной диагностики, организаторов здравоохранения.

© ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, 2024 (текст)
© Издательский дом «Практика», 2024 (оформление)

ISBN 978-5-89816-199-6

Содержание

Авторы	7
Сокращения и единицы измерения	12
Предисловие	19
<i>О. В. Лазарева, Е. С. Малолеткина, О. А. Шухов</i>	
Глава 1. Значение высокотехнологичных исследований в гематологии	21
Часть I. Лабораторная диагностика и оценка эффективности терапии заболеваний системы крови	35
<i>А. М. Ковригина</i>	
Глава 2. Диагностика В- и Т-клеточных лимфом: комментарии к изменениям в классификационных схемах 2022 г.	37
<i>В. Н. Двирнык, И. Н. Наумова</i>	
Глава 3. Цитоморфологическая диагностика опухолевых заболеваний кроветворной ткани миелоидной линии дифференцировки	74
<i>Е. И. Захарько, Е. Б. Рыбкина, Д. Г. Дрокова, В. Н. Двирнык</i>	
Глава 4. Принципы диагностики острых лейкозов и лимфом методом проточной цитометрии	108
<i>И. В. Гальцева, Ю. О. Давыдова, Н. М. Капранов, К. А. Никифорова, З. В. Конова, Е. Н. Паровичникова</i>	
Глава 5. Мониторинг минимальной остаточной болезни у пациентов с острыми лейкозами методом проточной цитометрии	160
<i>Т. Н. Обухова, Е. Н. Паровичникова</i>	
Глава 6. Цитогенетическая диагностика опухолевых заболеваний системы крови	185
<i>С. Ю. Смирнова, Ю. В. Сидорова, Б. В. Бидерман, Н. А. Северина, Е. Б. Ликольд, Т. В. Макарик, Н. В. Рисинская, И. С. Февралева, Г. А. Цаур, А. Б. Сударики</i>	
Глава 7. Молекулярная диагностика опухолевых заболеваний системы крови	221
<i>С. А. Марьина, Н. П. Соболева, В. Н. Двирнык</i>	
Глава 8. Лабораторная диагностика моноклональных иммуноглобулинопатий	301
<i>И. В. Гальцева, Ю. О. Давыдова, Н. М. Капранов, К. А. Никифорова, Л. П. Менделеева</i>	
Глава 9. Диагностика и определение минимальной остаточной болезни при множественной миеломе методом проточной цитометрии	318
<i>И. В. Карпова, М. Н. Панасенко, Ю. А. Клаар, В. Н. Двирнык</i>	
Глава 10. Методы дифференциальной диагностики острых форм порфирии	330
<i>Д. С. Селиванова</i>	
Глава 11. Молекулярная диагностика порфирий	337

<i>И. В. Гальцева, Ю. О. Давыдова, Н. М. Капранов, К. А. Никифорова, Е. А. Лукина, Е. А. Михайлова, Е. Н. Паровичникова</i>	
Глава 12. Диагностика клона ПНГ методом проточной цитометрии	352
<i>Е. Ю. Шемелева</i>	
Глава 13. Молекулярно-генетические основы и диагностика гемоглобинопатий	364
<i>О. С. Пшеничникова</i>	
Глава 14. Молекулярно-генетическая диагностика гемофилии	384
<i>Д. М. Чернецкая</i>	
Глава 15. Молекулярно-генетическая диагностика болезни Виллебранда	398
Часть II. Лабораторные методы исследований при проведении сопроводительной терапии в лечении заболеваний системы крови	407
<i>А. А. Суренков, Е. Б. Орел, В. Н. Двирный</i>	
Глава 16. Скрининговые тесты оценки плазменного гемостаза в клинической практике	409
<i>О. А. Полеводова, Г. М. Галстян</i>	
Глава 17. Интегральные методы оценки гемостаза в гематологической практике	420
<i>Л. А. Горгидзе, С. Ю. Мамлеева, Г. М. Галстян</i>	
Глава 18. Экспресс-методы лабораторных исследований при неотложных состояниях в гематологии	431
<i>Д. С. Тихомиров, Е. Н. Игнатова, М. В. Демин, Т. А. Солдатова, А. Ю. Крылова, А. А. Гуляева, Т. А. Туполева</i>	
Глава 19. Лабораторная диагностика вирусных инфекций в гематологии и трансфузиологии	458
<i>И. В. Гальцева, Ю. О. Давыдова, Н. М. Капранов, К. А. Никифорова, Е. Н. Паровичникова</i>	
Глава 20. Методика подсчета CD34-положительных гемопоэтических стволовых клеток в периферической крови и трансплантате	517
<i>И. В. Гальцева, Ю. О. Давыдова, Н. М. Капранов, К. А. Никифорова</i>	
Глава 21. Методика подсчета CD3-положительных клеток в трансплантате	529
Часть III. Инструментальная диагностика в гематологии	535
<i>И. Э. Костина, М. В. Соловьев, Л. П. Менделеева</i>	
Глава 22. Алгоритм лучевого обследования пациентов с парапротеинемическими гемобластомами	537

Авторы

Бидерман Белла Вениаминовна — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной гематологии ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России

Галстян Геннадий Мартинович — доктор медицинских наук, врач анестезиолог-реаниматолог, заведующий отделением реанимации и интенсивной терапии ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России

Гальцева Ирина Владимировна — доктор медицинских наук, врач-гематолог, заведующая лабораторией иммунофенотипирования клеток крови и костного мозга, руководитель сектора иммунофенотипирования клеток крови и костного мозга ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России

Горгидзе Лана Анзоровна — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отделения реанимации и интенсивной терапии с экспресс-лабораторией ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России

Гуляева Анна Андреевна — заведующая отделением контроля крови на вирусные гепатиты, СПИД, сифилис отдела заготовки крови и ее компонентов ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России

Давыдова Юлия Олеговна — кандидат медицинских наук, врач клинической лабораторной диагностики лаборатории иммунофенотипирования клеток крови и костного мозга ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России

Двирный Валентина Николаевна — кандидат медицинских наук, врач клинической лабораторной диагностики, заведующая централизованной клинико-диагностической лабораторией ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России

Демин Михаил Валерьевич — биолог лаборатории вирусологии ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России

Дрокова Дарья Геннадьевна — врач клинической лабораторной диагностики централизованной клинико-диагностической лаборатории «НМИЦ гематологии» Минздрава России

Захарько Екатерина Игоревна — врач клинической лабораторной диагностики, руководитель группы проточной цитометрии централизованной клинико-диагностической лаборатории ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России

Игнатова Елена Николаевна — научный сотрудник лаборатории вирусологии ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России

Капранов Николай Михайлович — кандидат биологических наук, ведущий специалист лаборатории иммунофенотипирования клеток крови и костного мозга ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России

Карпова Ирина Владимировна — кандидат медицинских наук, врач клинической лабораторной диагностики, руководитель группы клинической биохимии централизованной клинко-диагностической лаборатории ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России

Клаар Юлия Александровна — врач клинической лабораторной диагностики централизованной клинко-диагностической лаборатории ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России

Ковригина Алла Михайловна — доктор биологических наук, врач-патологоанатом, заведующая отделением патологической анатомии ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России

Коновая Зоя Викторовна — кандидат медицинских наук, врач-гематолог отделения интенсивной высокодозной химиотерапии трансплантации костного мозга с круглосуточным стационаром ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России

Костина Ирина Эдуардовна — кандидат медицинских наук, врач-рентгенолог, заведующая рентгеновским отделением ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России

Крылова Анастасия Юрьевна — врач клинической лабораторной диагностики отделения инфекционной безопасности трансфузий ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России

Лазарева Ольга Вениаминовна — кандидат медицинских наук, руководитель управления межрегионального сотрудничества по профилю «гематология» ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России

Ликольд Екатерина Борисовна — научный сотрудник лаборатории молекулярной гематологии ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России

Лукина Елена Алексеевна — доктор медицинских наук, профессор, врач-гематолог, заведующая отделом орфанных заболеваний, заведующая отделением гематологии и химиотерапии орфанных заболеваний ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России

Макарик Татьяна Викторовна — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной гематологии ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России

Малолеткина Елизавета Сергеевна — начальник организационно-методического отдела по работе с субъектами Российской Федерации ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России

Мамлеева Светлана Юрьевна — заведующая экспресс-лабораторией ОРИТ, врач клинической лабораторной диагностики ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России

Марьина Салия Ахсановна — руководитель группы гуморального иммунитета централизованной клинико-диагностической лаборатории, врач клинической лабораторной диагностики ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России

Менделеева Лариса Павловна — доктор медицинских наук, профессор, руководитель управления по научной и образовательной работе, заведующая отделом химиотерапии парапротеинемических гемобластозов ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России

Михайлова Елена Алексеевна — доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник отделения химиотерапии гемобластозов и депрессий кроветворения с блоком трансплантации костного мозга и гемопоэтических стволовых клеток ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России

Наумова Ирина Николаевна — кандидат медицинских наук, руководитель группы гематологии и общей клиники централизованной клинико-диагностической лаборатории ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России

Никифорова Ксения Александровна — биолог лаборатории иммунофенотипирования клеток крови и костного мозга ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России

Обухова Татьяна Никифоровна — кандидат медицинских наук, заведующая лабораторией, врач — лабораторный генетик лаборатории кардиологии ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России

Орел Елена Борисовна — руководитель группы патологии гемостаза централизованной клинико-диагностической лаборатории, врач клинической лабораторной диагностики ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России

Панасенко Мария Николаевна — врач клинической лабораторной диагностики группы клинической биохимии централизованной клинико-диагностической лаборатории ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России

Паровичникова Елена Николаевна — доктор медицинских наук, главный внештатный специалист гематолог Минздрава России, генеральный директор ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России

Полеводова Олеся Алексеевна — кандидат медицинских наук, врач анестезиолог-реаниматолог отделения реанимации и интенсивной терапии ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России

Пшеничникова Олеся Сергеевна — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории генной инженерии ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России

Рисинская Наталья Владимировна — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной гематологии ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России

Рыбкина Елена Брониславовна — врач клинической лабораторной диагностики централизованной клинко-диагностической лаборатории ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России

Северина Наталия Александровна — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной гематологии ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России

Селиванова Дарья Сергеевна — научный сотрудник лаборатории генной инженерии ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России

Сидорова Юлия Владимировна — кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной гематологии ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России

Смирнова Светлана Юрьевна — кандидат медицинских наук, врач-гематолог клинко-диагностического отделения гематологии и химиотерапии с дневным стационаром ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России

Соболева Наталья Павловна — врач клинической лабораторной диагностики централизованной клинко-диагностической лаборатории ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России

Солдатова Татьяна Андреевна — врач клинической лабораторной диагностики отделения инфекционной безопасности трансфузий ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России

Соловьев Максим Валерьевич — кандидат медицинских наук, врач-гематолог, заведующий отделением гематологии и химиотерапии парaproteinемических гемобластозов с блоком трансплантации костного мозга и гемопоэтических стволовых клеток ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России

Судариков Андрей Борисович — доктор биологических наук, заведующий отделом молекулярной генетики, заведующий лабораторией молекулярной гематологии ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России

Суренков Алексей Алексеевич — врач клинической лабораторной диагностики группы патологии гемостаза централизованной клинко-диагностической лаборатории ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России

Тихомиров Дмитрий Сергеевич — кандидат биологических наук, заведующий лабораторией вирусологии ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России

Туполева Татьяна Алексеевна — доктор медицинских наук, заведующая отделением инфекционной безопасности трансфузий ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России

Февралева Ирина Серафимовна — кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной гематологии ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России

Цаур Григорий Анатольевич — доктор медицинских наук, заведующий лабораторией молекулярной биологии, иммунофенотипирования и патоморфологии ГАУЗ СО «Областная детская клиническая больница», доцент кафедры клинической лабораторной диагностики и бактериологии Уральского государственного медицинского университета.

Чернецкая Дарья Михайловна — кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории генной инженерии ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России

Шухов Олег Александрович — кандидат медицинских наук, начальник отдела анализа обеспечения лекарственными препаратами и обращения медицинских изделий в субъектах РФ ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России

Щемелева Екатерина Юрьевна — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории генной инженерии ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России

Сокращения и единицы измерения

АА	— апластическая анемия
АДГ	— антидиуретический гормон
АДФ	— аденозиндифосфат
АКЛ, АККЛ	— анапластическая крупноклеточная лимфома
АЛК	— δ-аминолевулиновая кислота
алло-ТГСК	— трансплантация аллогенных гемопоэтических стволовых клеток
АЛТ	— аланинаминотрансфераза
асПЦР-РВ	— аллель-специфичная ПЦР в реальном времени
АСТ	— аспаратаминотрансфераза
ауто-ТГСК	— трансплантация аутологичных гемопоэтических стволовых клеток
АЧЛ	— абсолютное число лейкоцитов
АЧТВ	— активированное частичное тромбопластиновое время
БАЛ	— бронхоальвеолярный лаваж
БВ	— болезнь Виллебранда
БГЛ	— большие гранулярные лимфоциты
БДУ	— без дополнительных уточнений
БРВ	— безрецидивная выживаемость
БТЦ	— болезнь тяжелых цепей
БХА	— болезнь холодовых агглютининов
в/в	— внутривенно (-ный)
ВА	— волчаночный антикоагулянт
ВГВ	— вирус гепатита В
ВГС	— вирус гепатита С
ВГЧ	— вирус герпеса человека
ВИЧ	— вирус иммунодефицита человека
ВКЛ	— волосатоклеточный лейкоз
ВМК	— высокомолекулярный кининоген
ВОЗ	— Всемирная организация здравоохранения
ВПС	— высокопроизводительное секвенирование
ВРР	— вероятность развития рецидива
ВЭБ	— вирус Эпштейна—Барр
г	— грамм
г., гг.	— год, годы
Г-КСФ	— гранулоцитарный колониестимулирующий фактор
ГМБ	— гидроксиметилбилан
ГП	— гликопротеин
ГСК	— гемопоэтические стволовые клетки

ГУС	— гемолитико-уремический синдром
ДВККЛ	— диффузная В-крупноклеточная лимфома
ДВС	— диссеминированное внутрисосудистое свертывание
дл	— децилитр
ДНК	— дезоксирибонуклеиновая кислота
дцДНК	— двуцепочечная ДНК
ед	— единица
ЖКТ	— желудочно-кишечный тракт
ИВЛ	— искусственная вентиляция легких
ИГХ	— иммуногистохимический
ИЛ	— интерлейкин
ИМХ	— иммунохимический
ИП	— истинная полицитемия
ИТК	— ингибиторы тирозинкиназы
иТКБ	— ингибиторы тирозинкиназы Брутона
ИФА	— иммуноферментный анализ
ИФТ	— иммунофенотип (-ический)
ИХЛА	— иммунохемилюминесцентный анализ
ИЦА	— индекс циркулирующего антикоагулянта (индекс Розен- ра)
кг	— килограмм
кДа	— килодальтон
кДНК	— комплементарная ДНК
КМ	— костный мозг
КОЕ-МГ	— колониеобразующие единицы гранулоцитарно-макрофа- гальные
КПГ	— копропорфириноген
КСГ	— клинико-статистические группы
КТ	— компьютерная томография
КФК	— креатинфосфокиназа
КЩС	— кислотно-щелочное состояние
л	— литр
ЛАИФ	— лейкоз-ассоциированный иммунофенотип
ЛБ	— лимфома Беркитта
ЛДГ	— лактатдегидрогеназа
ЛК	— лейкоконцентрат
ЛКМ	— лимфома из клеток мантии
ЛКМЗ	— лимфома из клеток маргинальной зоны
ЛЛ	— лимфоцитарная лимфома
ЛМЛ	— лимфома из малых лимфоцитов
ЛПЗ	— лимфопролиферативное заболевание
ЛХ	— лимфома Ходжкина

м	— метр
МВЛ	— моноклональный В-клеточный лимфоцитоз
мг	— миллиграмм
МГИ	— молекулярно-генетические исследования
МДС	— миелодиспластический синдром
МЕ	— международная единица
мин	— минута
МИЧ	— международный индекс чувствительности
мкг	— микрограмм
мл	— миллилитр
млн	— миллион
МЛСЗ	— медиастинальная лимфома серой зоны
мм	— миллиметр
ММ	— множественная миелома
мм рт. ст.	— миллиметр ртутного столба
мм	— миллиметр
ммоль	— миллимоль
МНК	— моноклеарные клетки
МНО	— международное нормализованное отношение
МОБ	— минимальная остаточная болезнь
МПЗ	— миелопролиферативные заболевания
МПК	— минимальная подавляющая концентрация
МПН	— миелопролиферативные новообразования
МПО	— миелопероксидаза
МПЦ	— многоцветная проточная цитофлуорометрия
мРНК	— матричная РНК (информационная РНК)
МРТ	— магнитно-резонансная томография
НК	— натуральные киллеры
НФГ	— нефракционированный гепарин
НХЛ	— неходжкинские лимфомы
ОБПДК	— опухоль из бластных плазмцитоидных дендритных клеток
ОВ	— общая выживаемость
ОИВ	— органы исполнительной власти
ОИМ	— острый инфаркт миокарда
ОКИ	— острые кишечные инфекции
ОЛ	— острый лейкоз
ОЛЛ	— острый лимфобластный лейкоз
ОЛНЛ	— острый лейкоз неясной линейности
ОЛСФ	— острый лейкоз со смешанным фенотипом
ОМЛ	— острый миелоидный лейкоз
ОМС	— обязательное медицинское страхование

ОНЛ	— острый недифференцированный лейкоз
ОПЛ	— острый промиелоцитарный лейкоз
ОПН	— острая почечная недостаточность
ОПП	— острая перемежающаяся порфирия
ОР	— отношение рисков
ОРВИ	— острая респираторная вирусная инфекция
ОРД	— однородительские дисомии
oРТПХ	— острая реакция «трансплантат против хозяина»
ОТ-ПЦР	— ПЦР с обратной транскрипцией
п. н.	— пара нуклеотидов
ПБГ	— порфобилиноген
ПВ	— протромбиновое время
ПДК	— плазмцитоподобные дендритные клетки
ПК	— плазматические клетки или прекалликреин
ПКТ	— прокальцитонин
ПЛЛ	— пролимфоцитарный лейкоз
ПМФ	— первичный миелофиброз
ПНГ	— пароксизмальная ночная гемоглобинурия
ПП	— протопорфирин
ППГ	— протопорфириноген
ПР	— полная ремиссия
ПСП	— пресепсин
ПТИ	— протромбиновый индекс
ПТКЛ	— периферическая Т-клеточная лимфома
ПЦР	— полимеразная цепная реакция
ПЦР-RV	— ПЦР в реальном времени
ПЭТ	— позитронно-эмиссионная томография
РИФ	— реакция иммунофлюоресценции
РНК	— рибонуклеиновая кислота
РОТЭМ	— ротационная тромбоэластометрия
РТПХ	— реакция «трансплантат против хозяина»
САР	— стереотипные антигенные рецепторы
СЛЦ	— свободные легкие цепи
сoДНК	— опухолевая сцДНК
сцДНК	— свободно циркулирующая ДНК
СОЭ	— скорость оседания эритроцитов
СПИД	— синдром приобретенного иммунодефицита
сут	— сутки
СЦИ	— стандартное цитогенетическое исследование
т. п. н.	— тысячи пар нуклеотидов
Т-БГЛ-лейкоз	— Т-клеточный лейкоз из больших гранулярных лимфоцитов

ТВ	— тромбиновое время
ТГСК	— трансплантация гемопоэтических стволовых клеток
ТМБ	— 3,3',5,5'-тетраметилбензидина гидрохлорид
ТПО	— тиреоидная пероксидаза
ТТП	— тромботическая тромбоцитопеническая пурпура
ТЭГ	— тромбоэластография
ТЭЛА	— тромбоэмболия легочной артерии
ТЭМ	— тромбоэластометрия
УЗИ	— ультразвуковое исследование
УПГ	— уропорфириноген
ФЛ	— фолликулярная лимфома
ФЛАЕР	— флюоресцентный аэролизин
ФНО	— фактор некроза опухоли
ФТХ	— фолликулярные Т-хелперы
ХЛЛ	— хронический лимфолейкоз
ХМЛ	— хронический миелолейкоз
ХММЛ	— хронический миеломоноцитарный лейкоз
ХПН	— хроническая почечная недостаточность
хРТПХ	— хроническая реакция «трансплантат против хозяина»
цкПЦР	— цифровая капельная ПЦР
ЦМВ	— цитомегаловирус
ЦНС	— центральная нервная система
ч	— час
ШИК	— Шифф-йодная кислота
ЩФ	— щелочная фосфатаза
ЭДТА	— этилендиаминтетрауксусная кислота
ЭКМО	— экстракорпоральная мембранная оксигенация
ЭКО	— экстракорпоральное оплодотворение
ЭТ	— эссенциальная тромбоцитемия
ЮММЛ	— ювенильный миеломоноцитарный лейкоз
7-AAD	— 7-аминоактиномицин D
ADAMTS13	— протеаза, расщепляющая фактор Виллебранда
AR	— андрогеновый рецептор
array-CGH	— микроматричная сравнительная геномная гибридизация
BCR	— В-клеточный рецептор (B-cell receptor)
ВТК	— тирозинкиназа Брутона
СРБ	— С-реактивный белок
СВФ	— основной связывающий фактор (core binding factor)
CD	— кластер дифференцировки
CDC	— Центры по контролю и профилактике заболеваний США (Centers for Disease Control and Prevention)

CGH	— сравнительная геномная гибридизация (comparative genomic hybridization)
CNA	— нарушения числа копий участков ДНК (copy number alterations)
CNV	— вариации числа копий генов (copy number variations)
DE	— двойная экспрессия (double expression)
DH	— две реаранжировки генов <i>MYC/BCL2</i> (double-hit)
DRESS-синдром	— лекарственная сыпь с эозинофилией и системными проявлениями (drug rash with eosinophilia and systemic symptoms)
EBV	— вирус Эпштейна—Барр
EGIL	— Европейская группа по иммунологическому описанию лейкозов (European Group of Immunological Classification of Leukemias)
ELN	— Европейская сеть по изучению лейкозов (European Leukemia Net)
FI—XIII	— факторы свертывания I—XIII
FISH	— флюоресцентная гибридизация in situ
FLICA	— флуоресцентно меченный ингибитор каспаз
GEP	— экспрессионный анализ (gene expression profile)
GPI	— гликозилфосфатидилинозитол
HBcAg	— ядерный антиген вируса гепатита В
HBsAg	— е-антиген вируса гепатита В
HBsAg	— поверхностный антиген вируса гепатита В
HCVcAg	— ядерный антиген вируса гепатита С
HGVS	— Общество по изучению вариаций генома человека (Human Genome Variation Society)
HHV8	— герпесвирус человека 8-го типа
HLA	— антигены главного комплекса гистосовместимости человека (human leukocyte antigens)
HMBS	— гидроксиметилбилансинтаза
ICC	— Международная консенсусная классификация (International Consensus Classification)
Ig	— иммуноглобулины
IMWG	— Международная рабочая группа по множественной миеломе (International Myeloma Working Group)
ISCN	— Международная система цитогеномной номенклатуры (International System for Human Cytogenomic Nomenclature)
ITD	— внутренняя tandemная дупликация

KSHV	— герпесвирус человека, ассоциированный с саркомой Капоши
LPD	— лимфопролиферативное заболевание
MCH	— среднее содержание гемоглобина в эритроците
MCV	— средний эритроцитарный объем
MCF _{FIBTEM}	— максимальная плотность сгустка (maximal clot firmness)
MHC	— комплекс гистосовместимости
MLPA	— мультиплексная амплификация лигазно-связанных проб (multiplex ligation-dependent probe amplification)
NGS	— высокопроизводительное секвенирование (next-generation sequencing)
NT-проBNP	— N-концевой мозговой натрийуретический пептид
pO ₂	— парциальное давление кислорода
pCO ₂	— парциальное давление углекислого газа
pH	— водородный показатель ($\text{pH} = -\lg[\text{H}^+]$)
Ph	— филадельфийская хромосома
POEMS-синдром	— полинейропатия, органомегалия, эндокринопатия, присутствие моноклональных белков и изменений кожи и ее придатков
sO ₂	— насыщение кислородом гемоглобина
SSC	— боковое светорассеяние (side scatter)
STR	— короткие tandemные повторы
TCR	— Т-клеточные рецепторы
VAF	— частота аллельных вариантов
vWF	— фактор фон Виллебранда
vWF:Ag	— антиген фактора Виллебранда
vWF:RCo	— ристоцетин-кофакторная активность фактора Виллебранда

Предисловие

Двадцать пять лет назад академиком В. Г. Савченко были перечислены основные слагаемые успеха в лечении заболеваний системы крови. Это прецизионная диагностика, целенаправленное цитостатическое и таргетное воздействие, мониторинг эффективности лечения, в частности минимальной остаточной болезни, адекватная сопроводительная терапия, четкое выполнение современных протоколов, включая трансплантацию стволовых гемопоэтических клеток как этапа лечения в рамках кооперативного многоцентрового взаимодействия, научные исследования, опыт команды.

На первом месте этого списка — прецизионная диагностика. Что же подразумевает этот термин? Прежде всего — это подробная морфологическая, иммунофенотипическая, гистологическая, иммуногистохимическая, цитогенетическая, молекулярно-генетическая характеристика субстрата болезни. Помимо этого необходима оценка тяжести, распространенности заболевания, объема поражения, оценка функции различных органов, что выполняется с помощью разных методов визуализации (лучевых, ультразвуковых, ангиографических и других). Хотелось бы отметить, что гематолог должен не только направлять материал на необходимые исследования, он должен понимать сущность, а порой и детали выполняемых диагностических методов, чтобы критично оценить их результаты и собрать воедино все детали диагноза. Не имея «в руках» полной картины болезни, не представляется возможным выбрать адекватный для каждого конкретного пациента терапевтический подход, тот, что сейчас привыкли относить к так называемой персонифицированной медицине. В современной гематологии все лечение исключительно персонифицировано. При этом совершенно очевидно, что удаление из перечня необходимых исследований даже одного компонента уже негативно сказывается на конечном результате.

Но выбором оптимальной терапевтической стратегии дело не заканчивается — нужно диагностировать осложнения, по возможности их профилактировать, идентифицировать возбудителей инфекционных осложнений, определять их функциональные и генетические особенности, мониторировать множество ключевых маркеров как самого заболевания, так и его осложнений. Нужно планировать заранее трансплантационные методы лечения, опираясь на детектируемые ранее и в ходе мониторинга факторы риска, искать потенциальных доноров, типировать, подбирать пару донор-реципиент по многим параметрам,

заготавливать стволовые гемопоэтические клетки... ведь в 99% случаев алло-ТГСК выполняют пациентам с заболеваниями системы крови.

Все пациенты гематологического профиля требуют пожизненного наблюдения и регулярного обследования. С каждым годом объем наших знаний о патогенезе заболеваний, об этиологических причинах, о тонких молекулярных механизмах, вовлеченных в патологический процесс, увеличивается. В арсенале гематологов появляются новые лекарственные препараты с новыми механизмами действия, расширяющие спектр наших воздействий и, соответственно, увеличивающие вероятность излечения или длительного бессобытийного течения конкретного заболевания.

«Серые книги» стали для гематологов нашей страны настольными руководствами, навигатором среди огромного количества нозологий, специфических синдромов, осложнений и того, что необходимо при этом выполнить. В этом томе мы предлагаем читателям, если не в абсолютно полном, то в достаточном объеме, описание и принципы выполнения различных методов диагностики и мониторинга заболеваний системы крови, осложнений и их лечения.

Е. Н. Паровичникова

Глава 1.

Значение высокотехнологичных исследований в гематологии

Изучение биологии заболеваний системы крови оказало большое влияние на выявление специфических маркеров, имеющих ключевое значение на всех этапах ведения пациентов с заболеваниями системы крови, включая прогноз жизни пациента, что делает современную гематологию наукоемкой и передовой отраслью здравоохранения. Вместе с тем развитие высокотехнологичных методов исследований ставит серьезные задачи по их внедрению в практическое здравоохранение по всей стране, что позволит унифицировать и стандартизировать диагностику заболеваний системы крови, подходы к терапии и соответственно обеспечить эффективность медицинской помощи на современном уровне, а также искать новые тактики к ее совершенствованию.

Стратегия персонифицированного терапевтического воздействия на опухолевый клон при гемобластозах, где одним из ключевых элементов является выполнение высокотехнологичных исследований, позволяет в настоящее время добиваться излечения у большинства пациентов с лейкозами и лимфопролиферативными заболеваниями.

К высокотехнологичным методам исследований относятся:

1. Цитогенетические исследования:

- Кариотипирование.
- Флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH-анализ).

2. Молекулярно-генетические исследования:

- Полимеразная цепная реакция (качественный и количественный метод).
- Секвенирование по Сэнгеру.
- Секвенирование нового поколения (NGS).

3. Иммуноморфологические исследования:

- Иммунофенотипирование (проточная цитофлуориметрия).
- Иммуногистохимическое.

Применение всего арсенала диагностических методов позволяет устанавливать диагноз в соответствии с современными требованиями (классификация ВОЗ опухолей гемопоэтических и лимфоидных тканей) и оказывать медицинскую помощь больным согласно клиническим рекомендациям по диагностике и терапии заболеваний системы крови от момента подозрения и установления диагноза, прогнозирования исхода, в том числе выбора интенсивности терапии, назначения таргетной терапии, оценки эффективности терапии, диагностики рецидивов, определения минимальной остаточной болезни (МОБ), и до возможности отмены таргетной терапии.

Финансирование проведения высокотехнологичных исследований в гематологии

Одним из приоритетных направлений национального проекта «Здравоохранение» [1], стартовавшего в 2019 г., является реализация федерального проекта (ФП) «Борьба с онкологическими заболеваниями» [2], основная цель которого — снижение смертности от онкологических заболеваний, в том числе путем внедрения современных методов диагностики и таргетной терапии.

До 2020 г. оплата молекулярно-генетических исследований (МГИ) осуществлялась за счет различных источников, в том числе за счет пожертвований производителей лекарственных препаратов, для назначения которых необходимо проведение исследований. Однако с 2020 г. произошли серьезные изменения в подходах к финансовому обеспечению осуществления МГИ на государственном уровне, когда оплата таких исследований была включена в Программу государственных гарантий бесплатного оказания гражданам медицинской помощи [3].

Благодаря этим изменениям стало возможным осуществлять в рамках системы обязательного медицинского страхования (ОМС) лечение опухолевых заболеваний крови (в рамках разработанных клинико-статистических групп) и выполнение МГИ, необходимых для диагностики и подбора противоопухолевой терапии, так как опухолевые заболе-

вания системы крови по формальному признаку относятся к II классу «Новообразования» МКБ-10. Принятые меры были направлены на повышение доступности и качества специализированной медицинской помощи пациентам с опухолевыми заболеваниями системы крови.

Вместе с тем проведение организационно-методических мероприятий ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России в рамках реализации федерального проекта «Развитие сети национальных медицинских исследовательских центров и внедрение инновационных технологий» (ФП «Развитие сети НМИЦ») [4], направленных на внедрение высокотехнологичных методов исследований в субъектах Российской Федерации (РФ), способствовало изменению тарифной политики этого направления.

В 2021 г. для МГИ был определен новый норматив объема — один тест для отдельной опухоли в соответствии с клиническими рекомендациями, что позволило субъектам РФ устанавливать дифференцированные тарифы на оплату МГИ в зависимости от типа исследования.

Федеральным законом от 21.11.2011 № 323-ФЗ [5] предусмотрено, что медицинская помощь организуется и оказывается в соответствии с порядками оказания медицинской помощи, обязательными для исполнения на территории РФ всеми медицинскими организациями, на основе клинических рекомендаций, а также с учетом стандартов медицинской помощи, за исключением медицинской помощи, оказываемой в рамках клинической апробации.

Частью 4 статьи 35 Федерального закона от 29.11.2010 № 326-ФЗ «Об обязательном медицинском страховании в Российской Федерации» установлено, что страховое обеспечение в соответствии с базовой программой ОМС устанавливается исходя из стандартов медицинской помощи и порядков оказания медицинской помощи, установленных уполномоченным федеральным органом исполнительной власти.

В соответствии с программой государственных гарантий на 2023 г. и на плановый период 2024 и 2025 гг., утвержденной постановлением Правительства Российской Федерации от 29.12.2022 № 2497, новообразования относятся к страховым случаям базовой программы ОМС.

Согласно письму Минздрава России от 30.01.2023 № 31-2/И/2-1287 «О формировании и экономическом обосновании территориальных программ государственных гарантий бесплатного оказания гражданам медицинской помощи на 2023 — 2025 годы» (далее — Письмо) [6], субъекты РФ устанавливают территориальные нормативы объема и финансовых затрат на единицу объема в связи с проведением отдельных диагностических (лабораторных) исследований, в том числе по МГИ с целью диагностики онкологических заболеваний, в соответствии с клиническими рекомендациями по лечению онкологических заболеваний.

Кроме того, отмечается, что средний норматив объема МГИ с целью диагностики онкологических заболеваний включает в том числе исследования с применением следующих маркеров: BRAF, EGFR, KRAS, NRAS, MSI, FISH ALK, FISH HER2, ПЦР BRCA 1/BRCA 2, NGS BRCA 1/BRCA 2, FISH (биопсийный с уточнением).

Таким образом, в средний норматив объема МГИ с целью диагностики онкологических заболеваний включаются исследования с применением вышеуказанных маркеров, а также могут включаться иные маркеры, предусмотренные соответствующими клиническими рекомендациями по лечению онкологических заболеваний.

Исходя из положений частей 3 и 4 статьи 36 Федерального закона № 326-ФЗ, у регионов имеется право и возможность при необходимости дополнительно финансово обеспечивать территориальные программы обязательного медицинского страхования за счет средств бюджетов субъектов РФ, в том числе в части затрат, не предусмотренных структурой тарифа на оплату медицинской помощи в рамках базовой программы ОМС.

Несмотря на нововведения, субъекты РФ испытывают сложности с диагностикой заболеваний системы крови за счет средств ОМС, что обусловлено:

- неоднозначной трактовкой ежегодных разъяснений Минздрава России по вопросам формирования и экономического обоснования территориальных программ государственных гарантий Письма, где в приложении 7 установлен перечень МГИ для диагностики онкологических заболеваний (EGFR, BRAF, KRAS, NRAS, BRCA 1,2, патолого-анатомическое исследование с применением молекулярно-генетических методов *in situ* гибридизации FISH), но реализована возможность его расширения на усмотрение субъекта РФ (согласно п. 11 «Иные»). Однако эта неоднозначность формулировок в Письме приводит к консервации процессов разработки тарифов и в конечном счете невыполнению высокотехнологичных исследований за счет средств ОМС для пациентов с заболеваниями системы крови.
- отсутствием рекомендаций по установлению тарифов на выполнение МГИ на федеральном уровне, что приводит к установлению тарифов на уровне субъекта РФ, недостаточных для выполнения МГИ;
- отсутствием тарифов в субъекте РФ на определенные МГИ для диагностики и мониторинга эффективности терапии опухолевых заболеваний системы крови;
- несовершенством тарифов на оплату специализированной медицинской помощи в условиях круглосуточного стационара, в которых не

учтены затраты на МГИ, и, как следствие, необходимостью оплаты МГИ медицинской организацией за счет собственных средств и/или средств пациентов;

- сложностями межтерриториальных расчетов и логистикой транспортировки биообразцов;
- малым числом специализированных сертифицированных лабораторий, выполняющих необходимые высокотехнологичные исследования для диагностики и оценки эффективности терапии заболеваний системы крови.

Анализ инфраструктуры гематологической службы РФ за 2019—2021 гг. — диагностической его составляющей — показал недостаточное внимание к прецизионным методам диагностики в отношении молекулярно-генетических и цитогенетических методов исследований. По данным выездных мероприятий ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, только в 18 субъектах РФ (исключение — г. Москва, не принимает участие в реализации ФП «Развитие сети НМИЦ») имеются лаборатории (в медицинских организациях государственной формы собственности), в которых выполняют необходимые «гематологические» исследования, что составляет лишь 21% от всех субъектов РФ. Более того, в половине из этих лабораторий определяют только единичные маркеры хронических миелопролиферативных заболеваний [7].

Иммунофенотипирование клеток крови и костного мозга крайне недостаточно используется в субъектах РФ при диагностике (в том числе дифференциальной) острых лейкозов, лимфопролиферативных заболеваний, миелодиспластического синдрома, множественной миеломы, апластической анемии и пароксизмальной ночной гемоглобинурии, при мониторинге МОБ (при острых миелоидных и лимфобластных лейкозах, множественной миеломе).

Это связано с тем, что первичная диагностика часто осуществляется на амбулаторном этапе оказания медицинской помощи пациентам. Кроме того, по информации, полученной с выездных мероприятий ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, проточная цитофлуориметрия доступна в 52 субъектах РФ, но только менее чем в 30 субъектах РФ исследование выполняется на удовлетворительном методическом уровне с применением современного оборудования, а из-за отсутствия тарифов на ее проведение в большинстве субъектов РФ приводит к невозможности выполнения современного метода диагностики в гематологии.

Тарифы на проведение МГИ устанавливаются тарифными комиссиями субъектов РФ с учетом среднего норматива финансовых затрат, установленных актуальной версией программы государственных гарантий. В соответствии с Письмом субъекты РФ устанавливают тари-

фы на проведение отдельных диагностических (лабораторных) исследований, в том числе МГИ с целью выявления онкологического заболевания и подбора таргетной терапии, с учетом применения различных видов и методов исследований систем, органов и тканей человека, обусловленных заболеваемостью населения. В то же время, согласно Письму, тарифы на проведение МГИ должны быть установлены дифференцированно в зависимости от вида опухоли и необходимого количества применяемых тестов.

Анализ тарифных соглашений ОМС за 2020—2021 гг. показал, что только в 6 из 85 регионов РФ разработаны тарифы ОМС на широкий перечень цитогенетических и молекулярно-генетических исследований для пациентов с заболеваниями системы крови. В тарифные соглашения еще 16 субъектов РФ включены наиболее востребованные цитогенетические и молекулярно-генетические исследования (для диагностики Ph⁺-/ Ph⁺ миелопролиферативных заболеваний), в 9 есть только единичный молекулярно-генетический тест (определение BCR::ABL1), в 7 регионах в тарифные соглашения включены молекулярно-генетические тесты с формулировкой «иные», что позволяет только предполагать возможность проведения необходимых цитогенетических и молекулярно-генетических исследований для диагностики гемобластозов [8]. Кроме того, в ходе сбора информации о потребностях, перечне и объеме необходимых исследований в регионах страны главные внештатные специалисты гематологи органов исполнительной власти в сфере охраны здоровья субъектов РФ (далее — ОИВ) столкнулись со сложностями расчетов, что обусловлено отсутствием точных данных о популяции пациентов с заболеваниями системы крови ввиду отсутствия единой системы регистрации и учета профильных пациентов.

Дополнительно в норматив финансовых затрат на проведение МГИ включены расходы на оплату транспортных услуг в целях доставки диагностического материала к месту исследования, но в реальности вопросы оплаты транспортировки и логистики биообразцов намного сложнее и крайне редко находят решение, что связано с множеством факторов, начиная от выбора транспортной компании, сертифицированной на выполнение этих услуг, обеспечивающей соблюдение требований к преаналитическому этапу исследований: температурному режиму, срокам доставки и др., заканчивая высокой стоимостью транспортировки биообразцов, не укладывающейся в заложенные в тариф расходы (например, из Дальневосточного федерального округа).

Важным этапом работы в регионах является подача предложений медицинскими организациями по распределению объемов на выполнение отдельных диагностических и лабораторных исследований, в том числе МГИ с целью диагностики онкологических заболеваний и

подбора таргетной терапии. Порядок направления на указанные исследования устанавливается нормативным правовым актом ОИВ.

С целью систематизации и гармонизации маршрутизации пациентов и биообразцов в субъектах РФ ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России были разработаны и рекомендованы к использованию в регионах страны методические рекомендации по подготовке региональных нормативно-правовых актов об организации маршрутизации пациентов при оказании медицинской помощи взрослому населению по профилю «гематология», согласно которым следует прописать весь перечень необходимых исследований и лабораторий, их выполняющих [9].

Помимо возможности выполнения МГИ на амбулаторном этапе, согласно Письму в круглосуточном стационаре предусмотрена возможность на региональном уровне устанавливать коэффициент сложности лечения пациента в размере 1,04—1,4 в случае проведения в рамках госпитализации МГИ и/или иммуногистохимического исследования в целях диагностики злокачественных новообразований [6].

В дневном стационаре в модели клинико-статистических групп (КСГ) 2022 г. была выделена отдельная КСГ в рамках профиля «онкология» для госпитализации в диагностических целях с проведением биопсии и последующим проведением МГИ и/или иммуногистохимического исследования (ds19.033). Благодаря системной работе ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России удалось совершенствовать указанную модель КСГ, включив в него иммунофенотипирование [10]. В 2023 г. КСГ ds19.033 имеет формулировку: «Госпитализация в диагностических целях с проведением молекулярно-генетического и (или) иммуногистохимического исследования или иммунофенотипирования» [11], что позволяет осуществлять полноценную, комплексную диагностику пациентов с заболеваниями системы крови в условиях дневного стационара.

В случае отсутствия возможности у медицинской организации самостоятельного проведения МГИ, программой государственных гарантий предусмотрена возможность их выполнения в лаборатории сторонней медицинской организации, и тогда оплата осуществляется либо в рамках тарифного соглашения, если эта лаборатория включена в территориальную программу государственных гарантий, либо по межтерриториальным расчетам. Но, к сожалению, последние имеют до конца не отрегулированную систему осуществления.

Таким образом, нами представлены имеющиеся подходы к оплате высокотехнологичных методов исследований на разных этапах оказания медицинской помощи и определены причины, препятствующие внедрению прецизионных диагностических методов.

Не менее важной является причина, по которой в полной мере не развивается цитогенетическая и молекулярная диагностика заболева-

ний системы крови, — выраженный дефицит специалистов узкого профиля, для которых необходимо развитие и поддержание профессиональных компетенций как на локальном, так и международном уровне, в том числе и посредством участия в научных исследованиях.

Также низкой доступности всего перечня необходимых высокотехнологичных диагностических исследований в субъектах РФ способствует действующее нормативно-правовое регулирование их выполнения, а именно невозможность использования незарегистрированных расходных материалов (реактивов), и, следовательно, отсутствие этих исследований в номенклатуре медицинских услуг, утвержденной приказом Минздрава России от 13.10.2017 № 804 (далее — Номенклатура). В соответствии с Номенклатурой разрабатываются стандарты медицинской помощи [5, 12], тарифы на медицинские услуги [12], технологии выполнения простых медицинских услуг [13, 14]. Кроме того, Номенклатура используется при формировании баз данных обезличенной информации по отдельным нозологиям и профилям оказания медицинской помощи Единой государственной информационной системы в сфере здравоохранения (ЕГИСЗ) [15]; с учетом положений Номенклатуры реализуется право на получение социального налогового вычета налогоплательщиками в части расходов на услуги по лечению в медицинских организациях.

Помимо этого, введенные в последние годы санкции затрудняют закупки лабораторного оборудования, наборов реагентов (реактивов), а также техническое обслуживание имеющегося оборудования.

Таким образом, несовершенство нормативно-правовой базы и регуляторной системы в сфере здравоохранения требует дальнейшей работы, направленной на ее совершенствование.

Организация деятельности лабораторий высокотехнологичных методов исследований. Референс-центры

Организация оказания медицинской помощи в РФ осуществляется в соответствии с Положением об организации оказания медицинской помощи по видам медицинской помощи и утверждается уполномоченным федеральным органом исполнительной власти, а также порядком оказания медицинской помощи по отдельным профилям, заболеваниям или состояниям (группам заболеваний или состояний) [5].

Организация диагностических исследований в РФ, в соответствии с п. 19 ч. 2 ст. 14 Федерального закона от 21.11.2011 № 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации», регламенти-

рована правилами проведения лабораторных [16] [17], инструментальных [18—20], патолого-анатомических [21] и иных видов диагностических исследований.

В соответствии с п. 7 ст. 2 Федерального закона № 323-ФЗ, понятие «диагностика» определяется как «комплекс медицинских вмешательств, направленных на распознавание состояний или установление факта наличия либо отсутствия заболеваний, осуществляемых посредством сбора и анализа жалоб пациента, данных его анамнеза и осмотра, проведения лабораторных, инструментальных, патолого-анатомических и иных исследований в целях определения диагноза, выбора мероприятий по лечению пациента и (или) контроля за осуществлением этих мероприятий» [5].

Учет диагностических исследований осуществляется в соответствии с приказом Росстата от 27.12.2022 № 985 «Об утверждении форм федерального статистического наблюдения с указаниями по их заполнению для организации Министерством здравоохранения Российской Федерации федерального статистического наблюдения в сфере охраны здоровья», включая патолого-анатомические исследования биопсийного (операционного) материала, направляемые в патолого-анатомическое бюро (отделение).

Формы учетной медицинской документации для высокотехнологичных методов диагностики заболеваний системы крови не разработаны. Исключение — «Направление на прижизненное патолого-анатомическое исследование биопсийного (операционного) материала» (учетная форма № 014/у) [21], утвержденная приказом Минздрава России от 24.03.2016 № 179н.

Форма № 057/у-04 «Направление на госпитализацию, восстановительное лечение, обследование, консультацию», утвержденная приказом Минздравсоцразвития России от 22.11.2004 № 255 [22], не может быть применена для направления биологического материала на исследования, так как является направлением для пациента. Вопросы маршрутизации пациентов и биологического материала при проведении МГИ в настоящее время не урегулированы, поэтому требуется разработка правил их проведения.

Так, сроки проведения лабораторных исследований при подозрении на онкологическое заболевание, включая гемобластозы, согласно программе государственных гарантий, не должны превышать 7 рабочих дней со дня назначения исследований, что не всегда возможно соблюсти ввиду технологических особенностей проведения метода исследований.

Нередко, ввиду сложности интерпретации диагностических исследований заболеваний системы крови, требуется получение «второго

мнения» по результатам выполненных исследований, в том числе с применением телемедицинских технологий, что требует участия экспертных специализированных лабораторий — референсных центров. Создание подобных центров было заложено в паспорт ФП «Борьба с онкологическими заболеваниями» [2], в результате чего были созданы референс-центры иммуногистохимических, патоморфологических и лучевых методов исследований [23].

Но отсутствие нормативно-правовой базы, регламентирующей критерии для присвоения статуса референс-центра, организацию и функции референс-центров, сегодня приводит к неопределенности в отношении развития референс-центров, в том числе и в части расширения сферы охвата диагностическими компетенциями / создания таких центров и по другим направлениям высокотехнологичных методов исследований.

К сожалению, на сегодняшний день в нормативных документах [24] использовать МГИ и другие высокотехнологичные методы исследований не представляется возможным ввиду неготовности системы здравоохранения (несовершенство Номенклатуры медицинских услуг [25], отсутствие системности оплаты МГИ и других исследований, сложности логистики транспортировки биоматериала и другие), однако с позиции персонифицированного подхода в здравоохранении это единственно верный путь.

В настоящее время нормативно-правовое регулирование внутри лабораторного контроля и безопасности медицинской деятельности — компетенция Национального института качества Росздравнадзора. Один из его ключевых моментов — организация лабораторных процессов должна осуществляться в соответствии с существующими СанПиН.

Стандартизация в документах Росздравнадзора рассматривается как основа управления качеством с учетом биологической безопасности. Несмотря на то что сегодня лаборатории не обязывают проводить стандартизацию, существует ориентир международных стандартов ГОСТ ISO17025-2019 и действующий приказ Минздрава РФ от 21.12.1993 № 295 «Об утверждении положения об аккредитации клинико-диагностических лабораторий», который не только требует выполнения стандартов, но и может повлиять на итоги лицензирования. Поэтому вопрос о стандартах до сих пор остается открытым. ГОСТ ISO/IEC 17025—2019 укрепляет доверие к деятельности лаборатории и так или иначе связан с ГОСТ ISO 15189-2015 [26].

При этом лаборатория не обязательно должна быть аккредитована по тому или иному ГОСТу, но все же без аккредитации у нее не получится выйти на новый уровень деятельности и получить более высо-

кий статус. Стандарты, упомянутые чуть выше, рассматривают вопросы организации работы только в клиничко-диагностических лабораториях. Таким образом, система стандартизации медицинских лабораторий высокотехнологичных исследований в нашей стране пока не отлажена.

В 2022 г. ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России инициировано создание Межрегионального совета по лабораторной диагностике при опухолевых и неопухолевых заболеваниях системы крови при Ассоциации содействия развитию гематологии, трансфузиологии и трансплантации костного мозга «Национальное гематологическое общество». Целью деятельности Совета является научное и организационное содействие совершенствованию лабораторной диагностики при гематологических заболеваниях. Перед Советом стоят задачи по:

- 1) созданию единого научного, информационного и юридического пространства в области лабораторной диагностики при заболеваниях системы крови, объединяющего специалистов разных направлений данной области;
- 2) содействию кооперации и повышению профессиональной подготовки специалистов в области лабораторной диагностики заболеваний системы крови;
- 3) организации добровольного участия в процедуре контроля качества выполняемых исследований, содействию внедрению российских и международных стандартов качества в лабораторной диагностике;
- 4) стандартизации лабораторных методов исследования, участию в клинических протоколах многоцентровых исследований.

Литература

1. Паспорт национального проекта «Здравоохранение» (утв. президиумом Совета при Президенте РФ по стратегическому развитию и национальным проектам, протокол от 24.12.2018 № 16).
2. Паспорт федерального проекта «Борьба с онкологическими заболеваниями» (приложение к протоколу заседания проектного комитета по национальному проекту «Здравоохранение» от 14.12.2018 № 3).
3. Постановление Правительства РФ от 07.12.2019 № 1610 «О Программе государственных гарантий бесплатного оказания гражданам медицинской помощи на 2020 год и на плановый период 2021 и 2022 годов».
4. Приказ Минздрава России от 07.04.2021 № 309 «Об утверждении Положения о формировании сети национальных медицинских исследовательских центров и об организации деятельности национальных медицинских исследовательских центров».
5. Федеральный закон от 21.11.2011 № 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации».

6. Письмо Минздрава России от 26.01.2023 № 31-2/И/2-1075 «О методических рекомендациях по способам оплаты медицинской помощи за счет средств обязательного медицинского страхования».
7. Цаур Г. А., Ольшанская Ю. В., Обухова Т. Н. и др. Цитогенетическая и молекулярно-генетическая диагностика онкогематологических заболеваний: позиция Организации молекулярных генетиков в онкологии и онкогематологии. Гематология и трансфузиология 2023; 68(1):129—143. DOI: 10.35754/0234-5730-2023-68-1-129-143.
8. Малолеткина Е. С., Лазарева О. В., Паровичникова Е. Н. Доступность применения цитогенетических (ЦГ) и молекулярно-генетических исследований (МГИ) за счет средств обязательного медицинского страхования (ОМС) при оказании специализированной медицинской помощи (СМП) пациентам с опухолевыми заболеваниями системы. Евразийский онкологический журнал 2022; 10(S2):716—717.
9. Малолеткина Е. С., Лазарева О. В., Паровичникова Е. Н. Методические рекомендации по подготовке региональных нормативно-правовых актов об организации маршрутизации пациентов при оказании медицинской помощи взрослому населению по профилю «гематология», 2023. 28 с.
10. Постановление Правительства РФ от 28.12.2021 № 2505 «О Программе государственных гарантий бесплатного оказания гражданам медицинской помощи на 2022 год и на плановый период 2023 и 2024 годов».
11. Постановление Правительства РФ от 29.12.2022 № 2497 «О Программе государственных гарантий бесплатного оказания гражданам медицинской помощи на 2023 год и на плановый период 2024 и 2025 годов».
12. Номенклатура работ и услуг в здравоохранении (утв. Минздравсоцразвития РФ 12.07.2004).
13. ОСТ 91500.01.0004-2000. Отраслевой стандарт «Технологии выполнения простых медицинских услуг. Общие требования» (принят и введен в действие приказом Минздрава России от 31.07.2000 № 299).
14. ГОСТ Р 52623.0-2006. Национальный стандарт Российской Федерации «Технологии выполнения простых медицинских услуг. Общие положения» (утв. и введен в действие приказом Ростехрегулирования от 27.12.2006 № 341-ст).
15. Постановление Правительства РФ от 09.02.2022 № 140 «О единой государственной информационной системе в сфере здравоохранения» (вместе с «Положением о единой государственной информационной системе в сфере здравоохранения»).
16. Приказ Минздрава России от 18.05.2021 № 464н «Об утверждении Правил проведения лабораторных исследований».
17. Приказ Минздрава России от 21.04.2022 № 274н «Об утверждении Порядка оказания медицинской помощи пациентам с врожденными и (или) наследственными заболеваниями».
18. Приказ Минздрава России от 09.06.2020 № 560н «Об утверждении Правил проведения рентгенологических исследований».

19. Приказ Минздрава России от 08.06.2020 № 557н «Об утверждении Правил проведения ультразвуковых исследований».
20. Приказ Минздрава России от 06.12.2017 № 974н «Об утверждении Правил проведения эндоскопических исследований».
21. Приказ Минздрава России от 24.03.2016 № 179н «О Правилах проведения патолого-анатомических исследований».
22. Приказ Минздравсоцразвития России от 22.11.2004 № 255 «О Порядке оказания первичной медико-санитарной помощи гражданам, имеющим право на получение набора социальных услуг».
23. Приказ Минздрава России от 25.12.2020 № 1372 «Об организации функционирования референс-центров иммуногистохимических, патоморфологических и лучевых методов исследований на базе медицинских организаций, подведомственных Министерству здравоохранения Российской Федерации».
24. Приказ Минздрава России от 10.05.2017 № 203н «Об утверждении критериев оценки качества медицинской помощи».
25. Приказ Минздрава России от 13.10.2017 № 804н «Об утверждении номенклатуры медицинских услуг».
26. ГОСТ Р ИСО 15189-2015. Национальный стандарт Российской Федерации «Лаборатории медицинские. Частные требования к качеству и компетентности» (утв. и введен в действие приказом Росстандарта от 27.04.2015 № 297-ст).

Лабораторная диагностика и оценка эффективности терапии заболеваний системы крови

А. М. Ковригина

Глава 2.

Диагностика В- и Т-клеточных лимфом: комментарии к изменениям в классификационных схемах 2022 г.

Классификации ВОЗ 2001, 2008, 2017 гг. опухолей лимфоидной и гемопоэтической ткани развиваются в течение последних 20 лет на основе принципов, заложенных в REAL-классификации 1994 г. [1], и основываются на сочетании клинических, патоморфологических, иммунофенотипических/иммуногистохимических, цитогенетических и молекулярно-генетических данных. Принцип поиска предполагаемого аналога нозологической принадлежности лимфом — один из краеугольных камней классификационных схем, позволяющий обозначить лимфому как блок дифференцировки на одном из этапов В- или Т-клеточной дифференцировки с обоснованием молекулярного патогенеза и дальнейшим поиском основных молекулярно-генетических событий, что позволяет разрабатывать новые подходы к таргетной терапии. Принцип клональной эволюции лежит в основе современного представления о возникновении лимфом и миелоидных опухолей. Этим важным обстоятельством было обусловлено введение последовательно в классификационные схемы 2017 г. и затем 2022 г. термина «лимфоидные неоплазии» (аналогично «миелоидным неоплазиям»), объединяющего клональные процессы, пограничные состояния — лимфопролиферативные заболевания — и лимфомы. Так, в разделе зрелых В-клеточных лимфом появляются нозологии моноклонального В-клеточного лимфоцитоза,

моноклональной гаммапатии неопределенного значения, *in situ* мантийноклеточной неоплазии и *in situ* фолликулярной неоплазии, индолентного НК-клеточного лимфопролиферативного заболевания желудочно-кишечного тракта. Кроме того, локализация опухоли, возраст пациентов, клинические проявления заболевания нередко создают уникальный «портрет» опухоли, позволяющий обосновать выделение отдельных нозологических форм, например первичной медиастинальной В-крупноклеточной лимфомы, первичной кожной диффузной В-крупноклеточной лимфомы *leg type*, диффузной В-крупноклеточной лимфомы, ассоциированной с хроническим воспалением. В последние годы на основе углубленного изучения механизмов ответа иммунной системы на вирусные инфекции пополняются разделы В- и Т-клеточных неоплазий, ассоциированных с вирусными инфекциями, вызванными вирусом Эпштейна—Барр (EBV+ диффузная В-крупноклеточная лимфома) или герпесвирусом человека 8-го типа, ассоциированным с саркомой Капоши (KSHV/HHV8+ диффузная В-крупноклеточная лимфома, первичная лимфома серозных полостей, KSHV/HHV8+ герминотропное лимфопролиферативное заболевание). Изучение иммунопатологических процессов первичных и вторичных иммунодефицитных состояний, возрастных изменений функционирования иммунной системы позволило включить в 5-е издание классификации ВОЗ 2022 г. новые разделы: «В-клеточные лимфоидные пролиферации и лимфомы, ассоциированные с иммунодефицитом и дисрегуляцией» (в том числе лимфопролиферативные заболевания и лимфомы, ассоциированные с первичным иммунодефицитом; полиморфные лимфопролиферативные заболевания; EBV+ мукокутанную язву) и «EBV+ Т- и НК-клеточные лимфоидные пролиферации и лимфомы у детей», причем «пограничный» термин «лимфоидные пролиферации / лимфопролиферативные заболевания» введен в целях взвешенной клинической оценки и терапевтических подходов, несмотря на наличие В- и/или Т-клеточной клональности.

В 2022 г. состоялся анонс двух новых классификационных схем: Международного консенсуса по классификации лимфоидных и миелоидных неоплазий (International Consensus Classification — далее ICC) [2] и 5-го издания классификации ВОЗ гематолимфоидных опухолей [3], имеющих в целом незначительные различия. Основные принципы, заложенные в двух классификационных схемах, имеют историческую преемственность с REAL-классификацией 1994 г., включают в себя по сути общие молекулярно-генетические данные, полученные в последние 5 лет объединенными европейско-американскими коллективами исследователей, и содержат незначительные терминологические различия, в частности, в ICC сохранена рубрика предварительной (*provisional*) нозологии.

Далее изложены комментарии к основным нозологиям лимфоидных пролифераций / лимфом, с учетом дополнений или изменений в новых классификационных схемах лимфоидных неоплазий 2022 г. (табл. 1).

Таблица 1. Сопоставление классификационных схем В-клеточных лимфоидных пролифераций / лимфом: редакция 4-го издания ВОЗ 2017 г., 5-е издание ВОЗ 2022 г., Международный консенсус по классификации лимфом (ICC, 2022 г.)

ВОЗ, редакция 4-го издания, 2017 г.	ВОЗ, 5-е издание, 2022 г.	ICC, 2022 г.
Предопухолевые и опухолевые мелкоклеточные В-клеточные пролиферации		
Моноклональный В-клеточный лимфоцитоз: ХЛЛ-тип (низкое и высокое количество клональных В-клеток); не-ХЛЛ тип; атипичный ХЛЛ-тип	Моноклональный В-клеточный лимфоцитоз: низкое количество клональных В-клеток; ХЛЛ/ЛЛ-тип; не-ХЛЛ/ЛЛ тип	Моноклональный В-клеточный лимфоцитоз: ХЛЛ-тип (низкое и высокое количество клональных В-клеток); не-ХЛЛ тип; атипичный ХЛЛ-тип
Хронический лимфоцитарный лейкоз / лимфоцитарная лимфома	Хронический лимфоцитарный лейкоз / лимфоцитарная лимфома	Хронический лимфоцитарный лейкоз / лимфоцитарная лимфома
В-клеточный пролимфоцитарный лейкоз	Перенесен в категорию «Селезеночные В-клеточные лимфомы и лейкозы»	В-клеточный пролимфоцитарный лейкоз
Селезеночные В-клеточные лимфомы и лейкозы		
Лимфома селезенки из клеток маргинальной зоны	Лимфома селезенки из клеток маргинальной зоны	Лимфома селезенки из клеток маргинальной зоны
Волосатоклеточный лейкоз	Волосатоклеточный лейкоз	Волосатоклеточный лейкоз
В-клеточная лимфома/лейкоз селезенки, неклассифицированная: диффузная мелкоклеточная В-клеточная лимфома красной пульпы селезенки (предварительная нозология); вариантная форма волосатоклеточного лейкоза (предварительная нозология)	Селезеночная В-клеточная лимфома/лейкоз с выраженными ядрышками (включает вариантную форму волосатоклеточного лейкоза и случаи В-клеточного пролимфоцитарного лейкоза)	В-клеточная лимфома/лейкоз селезенки, неклассифицированная: диффузная мелкоклеточная В-клеточная лимфома красной пульпы селезенки (предварительная нозология); вариантная форма волосатоклеточного лейкоза (предварительная нозология)

Таблица 1 (продолжение). Сопоставление классификационных схем В-клеточных лимфоидных пролифераций / лимфом: редакция 4-го издания ВОЗ 2017 г., 5-е издание ВОЗ 2022 г., Международный консенсус по классификации лимфом (ICC, 2022 г.)

ВОЗ, редакция 4-го издания, 2017 г.	ВОЗ, 5-е издание, 2022 г.	ICC, 2022 г.
Лимфоплазмочитарная лимфома и IgM-моноклональная гаммапатия неопределенного значения		
Лимфоплазмочитарная лимфома	Лимфоплазмочитарная лимфома: IgM-лимфоплазмочитарная лимфома / макроглобулинемия Вальденстрема; не-IgM лимфоплазмочитарная лимфома	Лимфоплазмочитарная лимфома
Лимфома из клеток маргинальной зоны		
Экстранодальная лимфома из клеток маргинальной зоны лимфоидной ткани, ассоциированной со слизистыми оболочками / эпителием (MALT-лимфома)	Экстранодальная лимфома из клеток маргинальной зоны лимфоидной ткани, ассоциированной со слизистыми оболочками / эпителием (MALT-лимфома)	Экстранодальная лимфома из клеток маргинальной зоны лимфоидной ткани, ассоциированной со слизистыми оболочками / эпителием (MALT-лимфома)
—	Первичная кожная лимфома из клеток маргинальной зоны	Первичное кожное лимфопролиферативное заболевание из клеток маргинальной зоны
Нодальная лимфома из клеток маргинальной зоны	Нодальная лимфома из клеток маргинальной зоны	Нодальная лимфома из клеток маргинальной зоны
Педиатрическая лимфома из клеток маргинальной зоны (предварительная нозология)	Педиатрическая лимфома из клеток маргинальной зоны	Педиатрическая лимфома из клеток маргинальной зоны (предварительная нозология)
Фолликулярная лимфома		
Фолликулярная лимфома: in situ фолликулярная неоплазия; фолликулярная лимфома дуоденального типа	Фолликулярная лимфома: in situ фолликулярная неоплазия; фолликулярная лимфома дуоденального типа	Фолликулярная лимфома: in situ фолликулярная неоплазия; фолликулярная лимфома дуоденального типа
Фолликулярная лимфома, диффузный вариант (не считается отдельной нозологией)	Фолликулярная лимфома преимущественно с диффузным ростом (не считается отдельной нозологией)	CD23-позитивная лимфома без реаранжировки <i>BCL2</i> из клеток фолликулярного центра (предварительная нозология)
Первичная кожная лимфома из клеток фолликулярного центра	Первичная кожная лимфома из клеток фолликулярного центра	Первичная кожная лимфома из клеток фолликулярного центра

Таблица 1 (продолжение). Сопоставление классификационных схем В-клеточных лимфоидных пролифераций / лимфом: редакция 4-го издания ВОЗ 2017 г., 5-е издание ВОЗ 2022 г., Международный консенсус по классификации лимфом (ИСС, 2022 г.)

ВОЗ, редакция 4-го издания, 2017 г.	ВОЗ, 5-е издание, 2022 г.	ИСС, 2022 г.
Фолликулярная лимфома педиатрического типа	Фолликулярная лимфома педиатрического типа	Фолликулярная лимфома педиатрического типа
Фолликулярная лимфома яичка	—	Фолликулярная лимфома яичка
Лимфома из клеток мантии		
In situ мантийноклеточная неоплазия	In situ мантийноклеточная неоплазия	In situ мантийноклеточная неоплазия
Лимфома из клеток мантии	Лимфома из клеток мантии	Лимфома из клеток мантии
Лейкемическая ненодальная лимфома из клеток мантии	Лейкемическая ненодальная лимфома из клеток мантии	Лейкемическая ненодальная лимфома из клеток мантии
Трансформации индолентных В-клеточных лимфом		
—	Трансформации индолентных В-клеточных лимфом	—
В-крупноклеточные лимфомы		
Диффузная В-крупноклеточная лимфома, БДУ	Диффузная В-крупноклеточная лимфома, БДУ	Диффузная В-крупноклеточная лимфома, БДУ
Беркиттоподобная лимфома с аберрацией 11q (предварительная нозология)	В-клеточная лимфома высокой степени злокачественности с аберрацией 11q	В-крупноклеточная лимфома с аберрацией 11q (предварительная нозология)
В-крупноклеточная лимфома с реаранжировкой <i>IRF4</i> (предварительная нозология)	В-крупноклеточная лимфома с реаранжировкой <i>IRF4</i>	В-крупноклеточная лимфома с реаранжировкой <i>IRF4</i>
Нодулярная лимфома Ходжкина с лимфоидным преобладанием (см. в разделе «Лимфома Ходжкина»)	Нодулярная лимфома Ходжкина с лимфоидным преобладанием (см. в разделе «Лимфома Ходжкина»)	Нодулярная В-клеточная лимфома с лимфоидным преобладанием
В-крупноклеточная лимфома, богатая Т-клетками и гистиоцитами	В-крупноклеточная лимфома, богатая Т-клетками и гистиоцитами	В-крупноклеточная лимфома, богатая Т-клетками и гистиоцитами
	Первичная В-крупноклеточная лимфома иммуноприлегированных органов	
Первичная диффузная В-крупноклеточная лимфома ЦНС	Первичная диффузная В-крупноклеточная лимфома ЦНС	Первичная диффузная В-крупноклеточная лимфома ЦНС

Таблица 1 (продолжение). Сопоставление классификационных схем В-клеточных лимфоидных пролифераций / лимфом: редакция 4-го издания ВОЗ 2017 г., 5-е издание ВОЗ 2022 г., Международный консенсус по классификации лимфом (ИСС, 2022 г.)

ВОЗ, редакция 4-го издания, 2017 г.	ВОЗ, 5-е издание, 2022 г.	ИСС, 2022 г.
—	Первичная диффузная В-крупноклеточная лимфома яичка	Первичная диффузная В-крупноклеточная лимфома яичка
Первичная витреоретинальная В-крупноклеточная лимфома — описана в первичной диффузной В-крупноклеточной лимфоме ЦНС	Первичная витреоретинальная В-крупноклеточная лимфома	Первичная витреоретинальная В-крупноклеточная лимфома — включена в первичную диффузную В-крупноклеточную лимфому ЦНС
Первичная кожная диффузная В-крупноклеточная лимфома, leg type	Первичная кожная диффузная В-крупноклеточная лимфома, leg type	Первичная кожная диффузная В-крупноклеточная лимфома, leg type
Внутрисосудистая В-крупноклеточная лимфома	Внутрисосудистая В-крупноклеточная лимфома	Внутрисосудистая В-крупноклеточная лимфома
—	Крупноклеточная В-клеточная лимфома, ассоциированная с перегрузкой жидкостью (новая нозология)	HHV8- и EBV-негативная первичная выпотная В-крупноклеточная лимфома (предварительная нозология)
EBV-позитивная мукокутанная язва (предварительная нозология)	EBV-позитивная мукокутанная язва (см. в разделе «Лимфоидные пролиферации и лимфомы, ассоциированные с иммунодефицитом и дисрегуляцией иммунной системы»)	EBV-позитивная мукокутанная язва (выделена как отдельная нозология)
EBV-позитивная диффузная В-крупноклеточная лимфома, БДУ	EBV-позитивная диффузная В-крупноклеточная лимфома	EBV-позитивная диффузная В-крупноклеточная лимфома, БДУ
Диффузная В-крупноклеточная лимфома, ассоциированная с хроническим воспалением	Диффузная В-крупноклеточная лимфома, ассоциированная с хроническим воспалением	Диффузная В-крупноклеточная лимфома, ассоциированная с хроническим воспалением
Фибрин-ассоциированная диффузная В-крупноклеточная лимфома (подтип диффузной В-крупноклеточной лимфомы, ассоциированной с хроническим воспалением)	Фибрин-ассоциированная крупноклеточная В-клеточная лимфома (новая нозология)	Фибрин-ассоциированная крупноклеточная В-клеточная лимфома (подтип диффузной В-крупноклеточной лимфомы, ассоциированной с хроническим воспалением)
Лимфоматоидный гранулематоз	Лимфоматоидный гранулематоз	Лимфоматоидный гранулематоз

Таблица 1 (продолжение). Сопоставление классификационных схем В-клеточных лимфоидных пролифераций / лимфом: редакция 4-го издания ВОЗ 2017 г., 5-е издание ВОЗ 2022 г., Международный консенсус по классификации лимфом (ИСС, 2022 г.)

ВОЗ, редакция 4-го издания, 2017 г.	ВОЗ, 5-е издание, 2022 г.	ИСС, 2022 г.
—	См. в разделе «Лимфоидные пролиферации и лимфомы, ассоциированные с иммунодефицитом и дисрегуляцией иммунной системы»	EBV-позитивное полиморфноклеточное В-клеточное лимфопролиферативное заболевание (предварительная нозология)
ALK-позитивная анапластическая В-крупноклеточная лимфома	ALK-позитивная анапластическая В-крупноклеточная лимфома	ALK-позитивная анапластическая В-крупноклеточная лимфома
Плазмобластная лимфома	Плазмобластная лимфома	Плазмобластная лимфома
В-клеточная лимфома высокой степени злокачественности, с реаранжировкой генов <i>MYC</i> , <i>BCL2</i> и/или <i>BCL6</i>	Диффузная В-крупноклеточная лимфома / В-клеточная лимфома высокой степени злокачественности, с реаранжировкой генов <i>MYC</i> и <i>BCL2</i>	В-клеточная лимфома высокой степени злокачественности, с реаранжировкой генов <i>MYC</i> и <i>BCL2</i>
—	—	В-клеточная лимфома высокой степени злокачественности, с реаранжировкой генов <i>MYC</i> и <i>BCL6</i> (предварительная нозология)
В-клеточная лимфома высокой степени злокачественности, БДУ	В-клеточная лимфома высокой степени злокачественности, БДУ	В-клеточная лимфома высокой степени злокачественности, БДУ
Первичная медиастинальная В-крупноклеточная лимфома	Первичная медиастинальная В-крупноклеточная лимфома	Первичная медиастинальная В-крупноклеточная лимфома
В-клеточная лимфома, неклассифицированная, занимающая промежуточное положение между диффузной В-крупноклеточной лимфомой и классической лимфомой Ходжкина	Медиастинальная лимфома серой зоны	Медиастинальная лимфома серой зоны
KSHV/HHV8-ассоциированные В-клеточные лимфоидные пролиферации и лимфомы		
Мультицентрический вариант болезни Кастлемана	KSHV/HHV8-ассоциированный мультицентрический вариант болезни Кастлемана. (см. в разделе «Лимфоидные пролиферации и лимфомы, ассоциированные с иммунодефицитом и дисрегуляцией иммунной системы»)	Мультицентрический вариант болезни Кастлемана

Таблица 1 (окончание). Сопоставление классификационных схем В-клеточных лимфоидных пролифераций / лимфом: редакция 4-го издания ВОЗ 2017 г., 5-е издание ВОЗ 2022 г., Международный консенсус по классификации лимфом (ICC, 2022 г.)

ВОЗ, редакция 4-го издания, 2017 г.	ВОЗ, 5-е издание, 2022 г.	ICC, 2022 г.
HHV8-положительное герминотропное лимфопролиферативное заболевание	KSHV/HHV8-положительное герминотропное лимфопролиферативное заболевание	HHV8-положительное герминотропное лимфопролиферативное заболевание
HHV8-положительная диффузная В-крупноклеточная лимфома	KSHV/HHV8-положительная диффузная В-крупноклеточная лимфома	KSHV/HHV8-положительная диффузная В-крупноклеточная лимфома
Первичная лимфома серозных полостей	Первичная лимфома серозных полостей	Первичная лимфома серозных полостей
Лимфома Беркитта		
Лимфома Беркитта	Лимфома Беркитта (рекомендация выделять EBV-положительные и EBV-негативные случаи)	Лимфома Беркитта

БДУ — без дополнительных уточнений; ЛЛ — лимфоцитарная лимфома; EBV — вирус Эпштейна—Барр; HHV8 — герпесвирус человека 8-го типа; KSHV — герпесвирус, ассоциированный с саркомой Капоши.

В-клеточные лимфоидные пролиферации / лимфомы

Моноклональный В-клеточный лимфоцитоз

Моноклональный В-клеточный лимфоцитоз (МВЛ) — клональная В-клеточная лимфоидная пролиферация, предшествует развитию В-ХЛЛ / лимфоцитарной лимфоме, аналогична по патогенетическому значению клональному гемопоэзу с неопределенным потенциалом (CHIP) для миелоидных неоплазий и моноклональной гаммапатии неопределенного значения (MGUS) для множественной миеломы и лимфоплазмочитарной лимфомы / макроглобулинемии Вальденстрема. МВЛ возникает у 3—5% лиц старше 60 лет [4, 5].

Выделение 2 вариантов МВЛ включает в себя В-ХЛЛ-подобный иммунофенотип (прогрессия в В-ХЛЛ) и не-В-ХЛЛ-подобный иммунофенотип с прогрессией чаще в лимфому из клеток маргинальной зоны. Низкое количество моноклональных В-клеток ($< 0,5 \times 10^9/\text{л}$) (low count) и высокое их количество ($\geq 0,5 \times 10^9/\text{л}$) (high count) характеризуются различным риском прогрессии в В-ХЛЛ. В последние годы в литературе появляются сведения о возможности диагностики так называемого тка-

невого МВЛ, при этом размер лимфатического узла должен составлять $< 1,5$ см при отсутствии спленомегалии и абсолютного лимфоцитоза $> 5 \times 10^9/\text{л}$. При морфологическом исследовании биоптата лимфатического узла гистоархитектоника может быть сохранена, частично нарушена или иметь диффузный пролиферат, сходный по морфологии и иммунофенотипу при иммуногистохимическом (ИГХ) исследовании с лимфоцитарной лимфомой, но без пролиферативных центров [6].

При МВЛ лимфоидная инфильтрация в трепанобиоптате костного мозга чаще составляет $< 20\%$ площади среза трепанобиоптата костного мозга. МВЛ с вовлечением $< 10\%$ площади среза следует дифференцировать с новой нозологией — болезнью холодовых агглютининов (БХА). Ведущее значение при новой нозологии БХА имеют клинические (аутоиммунная гемолитическая анемия, синдром Рейно, акроцианоз, мраморность кожи — сетчатое ливедо) и лабораторные данные (проба Кумбса, определение холодовых агглютининов — антиэритроцитарных аутоантител против I/i антигенов). В трепанобиоптате костного мозга при БХА отмечается крупноочаговый четко очерченный лимфоидный инфильтрат из мелких клеток ($< 10\%$ площади среза), часто с коэкспрессией CD5, небольшое количество зрелых плазматических клеток, без лимфоплазмоцитоидных форм. При молекулярно-генетическом исследовании отсутствует мутация *MYD88* p.L265P.

Мелкоклеточные В-клеточные лимфомы

Группа мелкоклеточных В-клеточных лимфом включает в себя следующие нозологии:

1. Лимфоцитарная лимфома / В-клеточный хронический лимфолейкоз (В-ХЛЛ).
2. Лимфома из клеток мантии.
3. Фолликулярная лимфома.
4. Лимфома из клеток маргинальной зоны.
5. Лимфоплазмочитарная лимфома / макроглобулинемия Вальденстрема.

Каждый из этих вариантов может иметь среди опухолевого субстрата увеличенное количество крупных клеток. Лимфома из клеток мантии и фолликулярная лимфома могут характеризоваться бластоидной морфологией с потенциалом более агрессивного клинического течения, что подчеркивает условность выделения мелкоклеточных В-клеточных лимфом и агрессивных В-клеточных лимфом.

Лимфоцитарная лимфома / В-ХЛЛ

Морфологическая картина при лимфоцитарной лимфоме / В-ХЛЛ в ткани лимфатического узла характеризуется пролиферативными центрами. «Фаза акселерации», которая сопровождается увеличением лим-

фатических узлов с необходимостью проведения дифференциальной диагностики с синдромом Рихтера, характеризуется наличием крупных пролиферативных центров с повышенным количеством митозов, без очаговых скоплений/пластов крупных лимфоидных клеток [7].

Синдром Рихтера — терминальная стадия клональной эволюции МВЛ. Трансформация в синдром Рихтера может наступить не только в отдаленном периоде, но и в течение первых 5 лет заболевания у части пациентов с В-ХЛЛ. При синдроме Рихтера выделяют диффузную В-крупноклеточную лимфому (ДВККЛ): в 80% случаев — клонально связанную и в 20% — клонально не связанную с В-ХЛЛ / лимфоцитарной лимфомой. Клонально не связанная с В-ХЛЛ *de novo* ДВККЛ характеризуется обычным мутационным профилем для ДВККЛ, БДУ, с возможными реаранжировками *BCL2*, *BCL6*. Опухолевые клетки при клонально связанной ДВККЛ в разной степени утрачивают экспрессию CD5, CD23, но экспрессируют PD1 [8]. Вместе с тем недавно полученные молекулярно-генетические данные с использованием при NGS панели из 124 генов свидетельствуют о «химерном» мутационном профиле *de novo* ДВККЛ при синдроме Рихтера, имеющем сходные признаки с В-ХЛЛ (*mutTP53*, *ATM*, *NOTCH1*, *ID3*, *MYC*), что не исключает возможное существование общей клетки-предшественницы [9].

Среди ходжкиноподобной трансформации, которая составляет 5—10 % всех случаев синдрома Рихтера, в настоящее время выделяют два морфологических типа: с разрозненно расположенными среди субстрата лимфоцитарной лимфомы / В-ХЛЛ крупными ходжкиноподобными клетками с иммунофенотипом классической лимфомы Ходжкина, и второй тип — очаговое поражение с реактивным микроокружением, характерным для ЛХ по клеточному составу и иммунофенотипу крупных ходжкиноподобных клеток.

Относительно новый маркер LEF1 (lymphoid enhancing factor 1) используется в панели при ИГХ-исследовании для дифференциальной диагностики лимфоцитарной лимфомы / В-ХЛЛ и имеет специфичность около 95%, но может быть экспрессирован при лимфоме из клеток мантии и при лимфоме из клеток маргинальной зоны (собственные наблюдения). Таким образом, диагностика лимфоцитарной лимфомы / В-ХЛЛ основывается на гетерогенной экспрессии CD20 (низкая плотность антигена на мембране В-клеток), коэкспрессии CD5 (до 20—25% наблюдений отсутствует на парафиновых срезах) и CD23, при отсутствии яркой экспрессии CD79b и экспрессии *cyclin D1* (слабо позитивными *cyclin D1+* в части случаев могут быть клетки пролиферативных центров).

Нозология «В-клеточный пролимфоцитарный лейкоз» по версии 5-го издания классификации ВОЗ утратила самостоятельное значение,

и при количестве $> 15\%$ пролимфоцитов относится к прогрессии В-ХЛЛ. Варианты В-клеточной лимфомы селезенки, протекающей с лейкоемизацией, могут имитировать В-клеточный пролимфоцитарный лейкоз, и эти случаи отнесены в классификации ВОЗ 2022 г. к нозологии «В-клеточная лимфома/лейкоз селезенки, с выраженными ядрышками», которая включает также вариантную форму волосатоклеточного лейкоза. Вместе с тем в редакции ICC 2022 г. для редких новых случаев *de novo*, при наличии порогового значения $> 55\%$ пролимфоцитов в гемограмме, при исключении ненодальной лейкоемической мантийноклеточной лимфомы и при отсутствии анамнеза В-ХЛЛ, сохранена рубрика «В-клеточного пролимфоцитарного лейкоза».

Лимфома из клеток мантии

Лимфома из клеток мантии, как и лимфоцитарная лимфома / В-ХЛЛ, имеет два неопухолевых аналога: наивную В-клетку и В-клетку памяти с признаками соматических гипермутаций (при В-ХЛЛ — IgVH-мутированный статус).

Соответственно постулируемым неопухолевым аналогам при лимфоме из клеток мантии выделяют *индолентную ненодальную лейкоемическую мантийноклеточную лимфому* с вовлечением крови, костного мозга и селезенки, гипермутированным статусом, SOX11-негативную, с неопухолевым аналогом — В-клеткой памяти, и «обычную» нодальную мантийноклеточную лимфому с неопухолевым аналогом — наивной В-клеткой. Ненодальная лейкоемическая мантийноклеточная лимфома имеет сходные иммунофенотипические признаки с В-ХЛЛ — экспрессию CD23, CD200, характерны высокие показатели абсолютного лейкоцитоза и лимфоцитоза.

Нодальная лимфома из клеток мантии SOX11-позитивна, характеризуется четырьмя основными морфологическими вариантами: классическим, мелкоклеточным (имитирующим лимфоцитарную лимфому / В-ХЛЛ), бластоидным (напоминающим лимфобластную лимфому), плеоморфным (напоминающим диффузную В-крупноклеточную лимфому, с крупными клетками с морфологией центробластов, иммунобластов, или анапластический вариант). Эти морфологические варианты могут сменять друг друга при рецидиве заболевания или присутствовать на разных участках опухолевого роста в одном биоптате лимфатического узла / экстранодальной лимфоидной ткани.

Лимфома из клеток мантии может приобретать реаранжировку *MYC* как вторичное генетическое событие, но эти случаи не следует относить к ДН-лимфомам (то есть к лимфомам с двумя реаранжировками генов (*MYC/CCND1*)). Кроме того, в литературе появляются данные о фокальной экспрессии TdT при бластоидном/плеоморфном

SOX11-негативном варианте лимфомы из клеток мантии (до 20% позитивных опухолевых клеток), с дополнительной реаранжировкой *MYC*, что сопровождается высоким уровнем экспрессии TP53 и высокой пролиферативной активностью Ki-67 (неблагоприятные прогностические признаки). Эти случаи, по аналогии с TdT+ В-клеточной лимфомой высокой степени злокачественности DH (TdT+HGBL-DH с двумя реаранжировками генов и экспрессией TdT, чаще трансформация из фолликулярной лимфомы), характеризуют опухолевую прогрессию с признаками дедифференцировки [10].

В свою очередь, реаранжировка *CCND1* может возникать как более позднее генетическое событие при ДВККЛ с реаранжировками *BCL2*, *BCL6*, с экспрессией *cyclin D1*, но без экспрессии белка SOX11 при иммуногистохимическом исследовании. Эти случаи следует относить к ДВККЛ со сложным кариотипом, но не к мантийноклеточной лимфоме [11]. Необходимо подчеркнуть, что экспрессия SOX11 может наблюдаться при других вариантах агрессивных В-клеточных лимфом с бластной/бластоидной морфологией, а экспрессия *cyclin D1* (в части опухолевых клеток гетерогенная ядерная реакция), обнаруживаемая при ИГХ-исследовании, возможна при различных вариантах ДВККЛ, при первичной медиастиальной В-крупноклеточной лимфоме, в пролиферативных центрах при лимфоцитарной лимфоме / В-ХЛЛ, при множественной миеломе, которая сопровождается цитогенетическим нарушением t(11;14), волосатоклеточном лейкозе. При экспрессии *cyclin D1* различий в клиническом течении ДВККЛ, общей и бессобытийной выживаемости, морфологии опухолевого субстрата ДВККЛ не было обнаружено [12].

Рассмотрев сходство неопухолевых аналогов для лимфоцитарной лимфомы / В-ХЛЛ и лимфомы из клеток мантии и переходя к нозологии фолликулярной лимфомы, важно в свою очередь отметить сходство первых этапов лимфомагенеза лимфомы из клеток мантии и фолликулярной лимфомы. Так, клетки-предшественницы фолликулярной лимфомы с t(14;18) и клетки-предшественницы лимфомы из клеток мантии t(11;14) возникают на уровне костномозговой дифференцировки и затем циркулируют в кровеносном русле, попадая в центр лимфоидного фолликула, где приобретают дополнительные генетические нарушения. В лимфатическом узле выделяют *in situ* фолликулярную неоплазию и *in situ* мантийноклеточную неоплазию, обозначающие фолликулярный этап формирования опухолевого клона. Вместе с тем в настоящее время не получено доказательств облигатной трансформации *in situ* фолликулярной и *in situ* мантийноклеточной неоплазий в нодальные В-клеточные лимфомы.

Фолликулярная лимфома

Фолликулярная лимфома на протяжении нескольких лет после выхода редакции 4-го издания классификации ВОЗ 2017 г. была предметом углубленного клинико-патоморфологического сопоставления и споров. Так, в ряде случаев фолликулярной лимфомы с преобладанием диффузного роста патогномичная $t(14;18)(IGH::BCL2)$ отсутствовала, предполагался иной молекулярный патогенез. Кроме того, рекомендации в классификации ВОЗ 2017 г. относить фолликулярную лимфому 3А цитологического типа с участками диффузного роста к ДВККЛ вызвали размывание критериев диагностики и в итоге — гиподиагностику фолликулярной лимфомы 3А цитологического типа. По мере накопления клинических данных о гетерогенном течении заболевания и ответе на терапию в различных клинических исследовательских протоколах, оставался неясным вопрос о клиническом значении традиционно выделяемых цитологических типов фолликулярной лимфомы [13].

Разделы фолликулярной лимфомы в 5-м издании классификации ВОЗ 2022 г. и ICC 2022 г. основываются на исторических традициях, заложенных Кильской классификацией с детализацией морфологической картины и морфологически детерминированным неопухолевым аналогом. Исходя из постулируемых неопухолевых аналогов с морфологическими характеристиками фолликулярных В-клеток и определяемых как centrocyte/centroblast, при фолликулярной лимфоме соотношение этих клеток определяет цитологический тип.

В 5-м издании классификации ВОЗ 2022 г. выделяют 4 варианта фолликулярной лимфомы:

- in situ фолликулярная В-клеточная опухоль;
- фолликулярная лимфома;
- фолликулярная лимфома педиатрического типа;
- фолликулярная лимфома дуоденального типа.

В свою очередь, вариант «фолликулярная лимфома» подразделяется на 4 подтипа:

- В подтип «классической фолликулярной лимфомы» предложено объединить цитологические типы 1—3А. В ICC 2022 г. предложено использовать традиционное разделение на 1, 2 и 3А цитологических типов для оценки эффективности проспективных клинических протоколов с использованием таргетных препаратов. Фолликулярная лимфома 3А цитологического типа может не обладать экспрессией CD10, но демонстрирует экспрессию MUM1 при отсутствии или слабой экспрессии BCL-2. Корреляции между характером экспрессии BCL-2 и отсутствием/наличием $t(14;18)$ при

фолликулярной лимфоме, с учетом возможной мутации *BCL2* и изменения конфигурации эпитопа, не обнаружено. При недостаточном соблюдении преаналитического этапа и неотчетливой морфологической картине субстрата лимфомы с большим количеством крупных клеток с морфологией центробластов и преобладанием диффузного роста, экспрессия CD10 и реаранжировка *BCL2* служат аргументами в пользу фолликулярной лимфомы 3А цитологического типа.

- Второй подтип — «необычные» (unusual) цитологические варианты фолликулярной лимфомы, при которых опухолевый субстрат состоит из клеток с центроцитоподобными ядрами или клеток с бластоидной морфологией.
- К третьему подтипу относится фолликулярная лимфома преимущественно с диффузным ростом, без t(14;18), с коэкспрессией антигена CD23, который является суррогатным иммуногистохимическим маркером активации STAT6. В основе молекулярного патогенеза этого подтипа — *del1p36, mut CREBBP, STAT6, TNFSRF14*.
- Четвертый подтип — фолликулярная лимфома 3В цитологического типа, получила название фолликулярной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, что подчеркивает преемственность с Кильской классификацией. Важно, что при фолликулярной лимфоме 3В цитологического типа с экспрессией онкогена множественной миеломы-1 (MUM1) могут определяться участки крупноклеточной лимфомы (трансформация в диффузную В-крупноклеточную лимфому non-GCB типа). Вместе с тем сложность определения/исключения участков диффузной В-крупноклеточной лимфомы состоит в том, что фолликулярная лимфома 3В может иметь крупные фолликулоподобные структуры без четких границ, серпентовидные участки роста, визуализируемые только при ИГХ-исследовании, а на морфологическом уровне имитирующие диффузные участки крупноклеточной лимфомы.

При мономорфной интенсивной экспрессии MUM1 крупными клетками с фолликулярным ростом необходима дифференциальная диагностика с В-крупноклеточной лимфомой с реаранжировкой *IRF4*.

В отличие от 5-го издания классификации ВОЗ 2022 г. в ICC 2022 г. выделена в отдельный вариант фолликулярная лимфома яичек, которая встречается у детей и имеет общие морфологические (3-й цитологический тип) и генетические признаки с фолликулярной лимфомой педиатрического типа [отсутствует экспрессия *BCL-2* и не имеет t(14;18)].

Фолликулярная лимфома любого цитологического типа (1—3А) может сочетаться с участками диффузной В-крупноклеточной лимфомы,

характеризующейся скоплениями крупных лимфоидных клеток с морфологией центробластов/иммунобластов с большим количеством митозов, «многослойностью» опухолевых клеток, в отличие от фолликулярной лимфомы с морфологическими признаками апоптоза, гистологически в срезах фолликулярные дендритные клетки, как правило, в таких участках не определяются.

В ряде случаев при фолликулярной лимфоме с обычной морфологией наряду с реаранжировкой *BCL2* может быть обнаружена реаранжировка *MYC*, что, возможно, характеризует более агрессивное клиническое течение, потенциал быстрой трансформации [14]. Необходимо подчеркнуть особо, что морфологическая картина является основой диагноза, и в таких случаях нозология остается прежней, то есть диагностируется фолликулярная лимфома с реаранжировкой *MYC*, но не В-клеточная лимфома высокой степени злокачественности с двумя реаранжировками генов (HGBL-DH).

Фолликулярная лимфома педиатрического типа по-прежнему остается вариантом фолликулярной лимфомы в обеих классификационных схемах ICC и ВОЗ 2022 г. Накопление данных о сходстве клинических проявлений, молекулярного патогенеза, иммуногистохимических признаков с нодальной лимфомой из клеток маргинальной зоны педиатрического типа [15], формирование представлений о клональной В-клеточной пролиферации и лимфоме у подростков и молодых взрослых в ответ на антигенное воздействие с поиском возможных вирусных антигенов, вероятно, послужат в дальнейшем основанием для объединения фолликулярной лимфомы педиатрического типа и нодальной лимфомы из клеток маргинальной зоны педиатрического типа в единую нозологию.

Трансформация фолликулярной лимфомы возможна не только в ДВККЛ, но и в В-клеточную лимфому высокой степени злокачественности с двумя реаранжировками генов DH (HGBL DH). В этом случае реаранжировка *MYC* возникает как позднее генетическое событие в опухолевой В-клетке, часть таких случаев могут иметь признаки дедифференцировки с фокальной экспрессией TdT [16] и экспрессией маркеров фолликулярной дифференцировки CD10, BCL-6, HGAL, IgM при отсутствии экспрессии CD34.

В-крупноклеточная лимфома с реаранжировкой *IRF4*

В-крупноклеточная лимфома с реаранжировкой *IRF4* с фолликулярным и/или диффузным ростом приобрела самостоятельное нозологическое значение в обеих классификационных схемах 2022 г. Различия заключаются в расположении данной нозологии в перечне В-клеточных лимфом.

Так, в ICC 2022 г. данный вариант следует непосредственно после раздела фолликулярных лимфом, подчеркивая возможность фолликулярного роста лимфомы с необходимостью соответствующей дифференциальной диагностики с фолликулярной лимфомой 3В цитологического типа, а также патогенез возникновения лимфомы на поздних этапах фолликулярной дифференцировки как результат генетических нарушений *IRF4* (реаранжировка и мутация) [17]. В 5-м издании классификации ВОЗ 2022 г. данный вариант включен в раздел В-крупноклеточных лимфом.

В-крупноклеточная лимфома с реаранжировкой *IRF4* встречается чаще у подростков и молодых взрослых [18] с вовлечением периферических (чаще шейных) лимфатических узлов, кольца Вальдейера, у детей — толстой кишки, у взрослых — желудка. Реаранжировка *BCL6* допускается в сочетании с реаранжировкой *IRF4*. При обнаружении реаранжировок *BCL2*, *MYC* реаранжировка гена *IRF4* считается вторичным генетическим событием и не детерминирует нозологию В-крупноклеточной лимфомы с реаранжировкой *IRF4*. При морфологии ДВККЛ сочетание экспрессии CD10, BCL-6, MUM1 согласно алгоритму Hans у молодых взрослых до 40 лет является индикатором для скринингового исключения при FISH-исследовании В-крупноклеточной лимфомы с реаранжировкой *IRF4* [19].

Лимфома из клеток маргинальной зоны

Лимфома из клеток маргинальной зоны претерпела мало изменений по сравнению с классификацией ВОЗ 2017 г. Учитывая в ряде случаев сложность дифференциальной диагностики с фолликулярной лимфомой с маргинальноклеточной дифференцировкой, рекомендуется использование молекулярных методов исследования для обнаружения *mut KLF2*, *mut MAP2K1*, характерных для данного варианта лимфомы. При дифференциальной диагностике с лимфоплазмочитарной лимфомой дополнительно используются ИГХ-маркеры CD25, CD38, морфологически оценивается наличие/отсутствие лимфоплазмочитоидных форм, телец Датчера, гемосидероз в биоптатах лимфатических узлов и трепанобиоптатах костного мозга, признаки колонизации фолликулов (редко — при лимфоплазмочитарной лимфоме), проводится окраска на тучные клетки, определение *mut MYD88* (90% позитивных случаев при лимфоплазмочитарной лимфоме / макроглобулинемии Вальденстрема).

В табл. 2 приведены сравнительные иммуногистохимические признаки нозологий группы мелкоклеточных В-клеточных лимфом.

Таблица 2. Сравнение иммуногистохимических признаков в группе мелкоклеточных В-клеточных лимфом

Нозология	CD20	CD79b	CD5	CD10/ BCL-6	CD23	LEF1	Cyclin D1	Ki-67
ЛЛ/ВХЛЛ	Слабая/гетерогенная реакция	– (слабая реакция)	+ (до 20% случаев реакция негативна на парафиновых блоках)	–	+	+	Иногда в пролиферативных центрах слабая ядерная реакция	Повышен в пролиферативных центрах
МКЛ	+	+	+	–/+ (редко, бластоидный вариант BCL-6+)	Редко +	Очень редко +	+	Определяется только среднее значение
ФЛ	+	+	– (крайне редко позитивна)	–/+ (редко негативна, необходимо использование HGAL)	–/+ (монотипно при диффузном росте) или –/+	–	–	Равномерное распределение в фолликулоподобных структурах, повышен с признаком «зональности» при частичном замещении фолликула опухолью (коррелирует с I–II клиническими стадиями)
ЛКМЗ	+	+	–/+	–	–/+	Очень редко +	–	Иногда при колонизации фолликулов определяются «горячие точки»
ЛПЛ/МВ	+	+	–/+ (очень редко)	Редко CD10+	–/+	–	–	Иногда предсуществующие фолликулы +

«+» — интенсивная монотипная реакция; «–/+» — реакция в части опухолевых клеток; «–» — реакция отсутствует.

ЛКМЗ — лимфома из клеток маргинальной зоны; ЛЛ/В-ХЛЛ — лимфоцитарная лимфома / В-хронический лимфолейкоз; ЛПЛ/МВ — лимфоплазмоцитарная лимфома / макроглобулинемия Вальденстрема; МКЛ — мантийноклеточная лимфома; ФЛ — фолликулярная лимфома; Ki-67 — индекс пролиферативной активности.

Трансформированные В-клеточные лимфомы

Эта уникальная нозология, введенная впервые в 5-е издание классификации ВОЗ 2022 г., с одной стороны, характеризует особенности биологического поведения индолентных В-клеточных лимфом, но, с другой стороны, отражает гетерогенность группы лимфом с крупноклеточной морфологией, необходимость тщательного анализа клинико-анамнестических данных и течения заболевания. Ответ на терапию, дискордантное поражение костного мозга, высокий уровень секретиции РIg или обнаружение в биоптате лимфатического узла сочетания мелкоклеточных и крупноклеточных участков В-клеточной лимфомы являются основанием для диагностики трансформированной В-клеточной лимфомы. Наиболее часто трансформация возникает при фолликулярной лимфоме (до 14% случаев), трансформация лимфомы из клеток маргинальной зоны и лимфоплазмоцитарной лимфомы — примерно в 5—8% наблюдений, реже трансформация наблюдается при В-ХЛЛ / лимфоцитарной лимфоме (2—8% наблюдений).

Агрессивные В-клеточные лимфомы

Диффузная В-крупноклеточная лимфома, без дополнительных уточнений

ДВККЛ, БДУ, — самая частая нозология среди неходжкинских лимфом. С 2000 г. на основе профиля экспрессии генов (GER) выделяют два молекулярных подтипа — GCB (подобный В-клеткам центра фолликула) и ABC (из активированных В-клеток), однако от 10—20% случаев ДВККЛ являются неклассифицируемыми. ABC-подобный молекулярный тип ДВККЛ имеет позднее фолликулярное / постфолликулярное происхождение, характеризуется активацией BCR- и NF-κB-сигнальных путей и в отличие от GCB-типа характеризуется экспрессией MUM1, в 30% встречается реаранжировка *BCL6*. GCB-тип ДВККЛ характеризуется экспрессией CD10, *BCL-6*, в 20—30% случаев отмечается реаранжировка *BCL6* с *t(14;18)(q32;q21)*. Структурные нарушения *MYC* встречаются как при GCB-, так и ABC- типе ДВККЛ, причем в 60% — с *IgH/IgK/IgL* и примерно в 40% случаев — не с Ig-генами: *BCL6*, *BCL11A*, *IKZF1*, *PAX5*.

Алгоритм Hans (2004) признан наиболее удобным для практического использования суррогатным иммуногистохимическим алгоритмом с выделением ДВККЛ GCB- и non-GCB типов, коррелирующих

с молекулярными подтипами (в среднем совпадение 70—80%). Часть ДВККЛ, БДУ, могут быть CD5+ или CD30+, клиническое значение такого иммунофенотипа пока не определено, данные противоречивы.

С 2017 г. в классификации ВОЗ рекомендуется характеризовать ДВККЛ как лимфому с двойной экспрессией (double expressor — DE) при наличии экспрессии с-Мус в 40% и более и BCL-2 в 50% и более позитивных клеток опухолевого субстрата опухолевых клеток.

Дальнейшее изучение мутационного профиля ДВККЛ позволило выделить 4—7 кластеров молекулярных типов ДВККЛ [20—22]. Отсутствие идентичности этих данных обусловило необходимость дальнейших исследований, поэтому характеристика молекулярного подтипа, то есть молекулярная субклассификация, не является обязательной согласно 5-му изданию классификации ВОЗ 2022 г.

Диффузная В-крупноклеточная лимфома / В-клеточная лимфома высокой степени злокачественности с реаранжировками *MYC/BCL2*

В 5-м издании классификации ВОЗ 2022 г. введена отдельная нозология: ДВККЛ / В-клеточная лимфома высокой степени злокачественности с двумя реаранжировками генов *MYC/BCL2* (DH — double-hit). Этот вариант лимфомы может иметь:

- 1) крупноклеточную морфологию (морфологически — ДВККЛ из крупных клеток преимущественно с морфологией центробластов) с участками «звездного неба», высокой митотической активностью и морфологическими признаками апоптоза;
- 2) беркиттоподобную морфологию («промежуточную», согласно терминологии 5-го издания классификации ВОЗ 2022);
- 3) бластоидную морфологию — напоминает лимфобластную лимфому.

Большинство случаев с крупноклеточной морфологией являются ДВККЛ GCB-типа, DE, причем интенсивная ядерная экспрессия с-Мус > 70—80% может с большой долей вероятности указывать на ДВККЛ—DH с реаранжировками *MYC/BCL2*. Данная нозология представляет гомогенную по GER и мутационному профилю группу, возможно сочетание с реаранжировкой *BCL6*. В 5-м издании классификации ВОЗ 2022 г. рекомендуется при FISH-исследовании идентифицировать ген-партнер перестройки с участием *MYC*: при исключении локусов IG (тяжелые и легкие цепи) указывать на не-IG партнера реаранжировки *MYC*, что может иметь прогностическое значение. При иммуногистохимическом исследовании в редких случаях отсутствие экспрессии с-Мус, или ложнонегативная реакция, может быть обусловлено низким уровнем экспрессии матричной РНК или генетическим полиморфизмом.

ДН-лимфомы характеризуются агрессивным клиническим течением с массивным нодальным и/или экстранодальным поражением, высокой активностью ЛДГ, нередко с вовлечением костного мозга и ЦНС, чаще диагностируются на III—IV клинической стадии. FISH-скрининг на ДН (*MYC/BCL2*) позволяет выявлять этот агрессивный вариант В-клеточной лимфомы с крупноклеточной морфологией на ранних стадиях заболевания.

Вместе с тем ДВККЛ—ДН с двумя реаранжировками *MYC/BCL6* наиболее характерна для ДВККЛ non-GCB типа, в настоящее время это гетерогенная группа ДВККЛ [22], и, согласно концепции 5-го издания классификации ВОЗ 2022 г., пока нет достаточных оснований для сохранения выделения ДВККЛ—ДН *MYC/BCL6* как самостоятельного варианта ДН-лимфомы, однако данные различных групп исследователей противоречивы [23—25]. Результаты иммуногистохимического исследования на коэкспрессию с-Мyc/BCL-6 (DE) с полуколичественной оценкой позитивных клеток и интенсивности окрашивания, в отличие от DE при ДВККЛ—ДН *MYC/BCL2*, не позволяют предположить ДВККЛ—ДН *MYC/BCL6*. Случаи с реаранжировками *MYC/BCL6*, согласно 5-му изданию классификации ВОЗ 2022 г., следует относить к ДВККЛ, БДУ, а при бластоидной или беркиттоподобной (промежуточной) морфологии — к В-клеточной лимфоме высокой степени злокачественности, БДУ (HGBL, NOS).

Кроме того, в группе ДВККЛ молекулярный профиль В-клеточной лимфомы высокой степени злокачественности (DNH1tsigh/MHG) может встречаться в 2 раза чаще, чем ДВККЛ ДН (как правило, ДВККЛ GCB-типа) [26, 27]. Выявление этой группы пациентов с ДВККЛ — сложная задача для дальнейших клиничко-патоморфологических и молекулярных сопоставлений.

В группе ДВККЛ—ДН *MYC/BCL2* до 30% случаев представлены трансформированными фолликулярными лимфомами с реаранжировкой *BCL2* и вторичным генетическим событием на уровне герминативного центра — с реаранжировкой *MYC*. В ряде подобных случаев может отмечаться фокальная ядерная экспрессия TdT при наличии экспрессии CD20, CD10, BCL-6, CD38, IgM. Эти случаи не экспрессируют CD34, их следует относить к TdT+ В-клеточной лимфоме высокой степени злокачественности с двумя реаранжировками генов *MYC/BCL2* [16, 29—31].

В-клеточная лимфома высокой степени злокачественности, без дополнительных уточнений

К В-клеточной лимфоме высокой степени злокачественности, БДУ (HGBL, NOS), относят случаи с беркиттоподобной («промежуточной» по терминологии 5-го издания классификации ВОЗ 2022 г.) или блас-

тоидной морфологией, без / или с одной (single hit-SH) реаранжировкой *MYC* (до 50% случаев HGBL, NOS — SH *MYC*-R), *BCL2* или *BCL6*, независимо от изменений числа копийности *MYC*, *BCL2*, как правило, с признаками фолликулярной дифференцировки (CD10+, BCL-6+, LMO2+, CD38+). Клетки опухолевого субстрата В-клеточной лимфомы высокой степени злокачественности, БДУ, экспрессируют CD19, CD20, CD22, CD79a, PAX5, но примерно в 30% наблюдений может отсутствовать экспрессия CD20, а в 25% наблюдений экспрессия CD22 может быть слабой или отрицательной, и в 8% случаев может определяться экспрессия TdT при отрицательной реакции с антителами к CD34 [31]. Это сложная и редкая нозология, основанная на особенностях клеточного состава и морфологии опухолевого субстрата. В свою очередь, правильная морфологическая характеристика зависит от времени ишемии, времени фиксации в формалине биопсийного материала на преаналитическом этапе, от качества этапа микротомии и окраски срезов. Так, ложнопозитивная бластоидность и диагнозы В-клеточной лимфомы высокой степени злокачественности, БДУ, при пересмотре экспертами-гематопатологами в 48% случаев были отнесены к ДВККЛ, а в 5% — к лимфоме Беркитта [22]. Эти данные еще раз подчеркивают очевидную необходимость направления биопсийного материала в референсные центры для установления нозологий агрессивных В-клеточных лимфом опытными гематопатологами.

В целом изолированная реаранжировка *MYC* (single hit) наряду В-клеточной лимфомой высокой степени злокачественности, БДУ, может встречаться при лимфоме Беркитта, ДВККЛ, плазмобластной лимфоме.

В отличие от 5-го издания классификации ВОЗ, в ICC 2022 г. включена как отдельная предварительная нозология В-клеточная лимфома высокой степени злокачественности с реаранжировками *MYC/BCL6* (HGBL-DH) в целях накопления данных для последующего анализа и обобщения.

Лимфома Беркитта

В двух классификационных схемах 2022 г. в разделе лимфомы Беркитта морфологические, иммунофенотипические/иммуногистохимические характеристики остались прежними по сравнению с классификацией ВОЗ 2017 г. Значительные изменения коснулись молекулярного патогенеза спорадической лимфомы Беркитта. Проведенные в последние годы крупные европейско-американские исследования с использованием геномного и транскриптомного анализа при сопоставлении спорадической EBV-позитивной и EBV-негативной лимфомы Беркитта у детей и взрослых позволили обнаружить гетерогенность лимфомы

Беркитта. Выделяют по крайней мере три молекулярных типа, отражающих вероятное возникновение опухоли на различных этапах фолликулярной В-клеточной дифференцировки в «темной» и «светлой» зонах герминативного центра — на этапе соматических гипермутаций или переключения классов иммуноглобулинов, различающихся по активации сигнальных путей, что позволит разрабатывать новые терапевтические подходы. В классификации ВОЗ 2022 г. рекомендуется исследование EBV-статуса опухоли и исследование генетических нарушений в гене *TP53* (mut *TP53/del17p*), которые чаще (до 40—50% случаев) встречаются при EBV-негативной лимфоме Беркитта [32—35].

Беркиттоподобная лимфома с аберрациями 11q

Беркиттоподобная лимфома с аберрациями 11q (ampl 11q23 и del 11q24) переименована в 5-м издании классификации ВОЗ 2022 г. в В-клеточную лимфому высокой степени злокачественности (HGBL) с аберрациями 11q и выделена в самостоятельную нозологическую форму. Данный вариант лимфомы чаще встречается у подростков и молодых взрослых, может иметь нодальную и экстранодальную локализацию. Лимфома чаще возникает в области головы и шеи или в органах желудочно-кишечного тракта (желудок, толстая кишка), морфологически может иметь беркиттоподобную (промежуточную) или крупноклеточную морфологию [36]. По версии ICC 2022 данный вариант лимфомы получил название крупноклеточной В-клеточной лимфомы с аберрациями 11q. При некотором сходстве с лимфомой Беркитта данный вариант имеет устойчивые отличительные признаки: крупные включения в цитоплазме макрофагов ядерных обломков, отсутствие экспрессии BCL-2, слабая экспрессия с-Мус при отсутствии реаранжировки *MYC* при FISH-исследовании в сочетании с высокой пролиферативной активностью. Вместе с тем генетические нарушения 11q встречаются при других В-клеточных лимфомах в составе сложного кариотипа, что следует интерпретировать как вторичное генетическое событие, не влияющее на установление нозологии.

Крупноклеточная В-клеточная лимфома, ассоциированная с перегрузкой жидкостью

Это новая нозология в 5-м издании классификации ВОЗ 2022 г., встречается в старшей возрастной группе (чаще старше 70 лет). В отличие от первичной лимфомы серозных полостей опухоль не ассоциирована с HHV8, но может быть ассоциирована с EBV (до 30%), гепатитом В или гепатитом С, очень редко диагностируется у ВИЧ-инфицированных. Патогенез опухоли определяется соматической патологией с выпотом в полости, в 70% случаев вовлечена плевральная полость, реже —

перикард, брюшная полость. Опухолевый субстрат характеризуется крупноклеточной морфологией, иммуногистохимический подвариант, как правило, non-GCB типа, иногда отмечается экспрессия CD30, редко может отсутствовать CD20. Диагноз устанавливается цитологически, иммунофенотип определяется иммуноцитохимически или с помощью проточной цитометрии.

Фибрин-ассоциированная крупноклеточная В-клеточная лимфома

Фибрин-ассоциированная крупноклеточная В-клеточная лимфома стала самостоятельной нозологией в двух классификационных схемах (ранее в классификации ВОЗ 2017 г. — подвариант диффузной В-крупноклеточной лимфомы, ассоциированной с хроническим воспалением). Частота диагностики данной нозологии, вероятно, возрастет в связи с активным внедрением в медицинскую практику малоинвазивных методов оперативных вмешательств — эндоваскулярной хирургии, эндопротезирования. Опухоль возникает в кистозных полостях с хроническим отложением фибрина вблизи стентов, протезов, имплантов. Лимфома EBV-позитивна, non-GCB типа, характеризуется высокой пролиферативной активностью.

EBV-позитивная диффузная В-крупноклеточная лимфома

EBV+ ДВККЛ — моноклональная В-клеточная лимфома. В отличие от ICC 2022 г., в 5-м издании классификации ВОЗ 2022 г. данная нозология утратила дополнение «БДУ» и детерминирована определенными условиями. EBV+ ДВККЛ диагностируется у пациентов без анамнестических данных об иммунодефиците, острой или персистирующей EBV-инфекции, без предшествующих злокачественных новообразований/лимфом с соответствующей терапией. В качестве патогенетических факторов в старшей возрастной группе предполагается старение иммунной системы с формированием олигоклональной Т-клеточной популяции в ответ на вирусную инфекцию, преобладает экстранодальное поражение. Напротив, у пациентов до 45 лет с частым нодальным поражением ведущим в патогенезе лимфомы является уклонение от иммунного контроля в результате возникновения толерогенного иммунного микроокружения, среди которого расположены EBV+ крупные В-клетки, с экспрессией PDL1/PDL2 [37].

При EBV+ ДВККЛ характерен 2-й тип латентности, при иммуногистохимическом исследовании информативным является использование клона EBV (LMP1).

Опухолевый субстрат может быть разделен на мономорфноклеточный и полиморфноклеточный варианты, представлен крупными опухолевыми клетками с морфологией центробластов, иммунобластов,

могут присутствовать ходжкиноподобные клетки, характерны географические некрозы; при полиморфноклеточном варианте выражено реактивное микроокружение, представленное преимущественно мелкими лимфоидными клетками, плазмócитами, гистиоцитами. В свою очередь, полиморфноклеточный вариант EBV+ ДВККЛ обуславливает необходимость дифференциальной диагностики с полиморфноклеточным вариантом лимфопролиферативного заболевания (EBV+ LPD). Решающее значение в подобных случаях имеют клиничко-анамнестические данные.

При иммуногистохимическом исследовании опухолевый субстрат EBV+ ДВККЛ характеризуется сохранной В-клеточной программой с экспрессией CD20, CD79a, BOB.1, Oct.2, CD30; EBV-позитивны большинство крупных опухолевых клеток (предпочтительнее — более 80% клеток) [38], нередко отмечается коэкспрессия CD15. В крови может определяться ДНК EBV. Случаи лимфоматоидного гранулематоза, EBV+ мукокутанной язвы исключаются. EBV+ ДВККЛ, как правило non-GCB типа, может характеризоваться коэкспрессией с-Мус и BCL-2 (DE).

Медиастинальная лимфома серой зоны

Медиастинальная лимфома серой зоны (МЛСЗ) — этот термин, появившийся в 2005 г. [39], наиболее емкий и часто используемый в профессиональной лексике, наконец возвращен, и заменил в обеих классификационных схемах 2022 г. нозологию «В-клеточная лимфома, неклассифицируемая, занимающая промежуточное положение между диффузной В-крупноклеточной лимфомой и классической лимфомой Ходжкина».

МЛСЗ имеет неопухолевый аналог — тимическую В-клетку, «перекрестные» морфологические, иммунофенотипические/иммуногистохимические, генетические, эпигенетические признаки между нодулярным склерозом классической лимфомы Ходжкина с медиастинальной локализацией и первичной медиастинальной В-крупноклеточной лимфомой. Основными в патогенезе МЛСЗ, как и для первичной медиастинальной В-крупноклеточной лимфомы и классической лимфомы Ходжкина, считаются: реаранжировка/мутации *СНТА (C2TA)* (локус 16p13.13), структурные хромосомные нарушения с вовлечением локуса 9p24.1 и увеличением числа копий / амплификацией *JAК2/PD-L1/PD-L2*, мутации *SOCС1*, *STAT6*, нарушения в генах сигнальных путей JAК-STAT и NF-κB (амплификация *REL* и *BCL11A*, делеция *NFKB1E*, биаллельная мутация *TNFAIP3*). Генетические нарушения *СНТА*, *CD58*, *B2M*, *PD-L1*, *PD-L2* относятся к механизмам уклонения от иммунного контроля.

МЛСЗ чаще диагностируется у молодых мужчин, медиана возраста 30 лет. Морфологически опухолевый субстрат характеризуется полиморфизмом опухолевых клеток и гистоархитектоники, и разной степени выраженности реактивным микроокружением. Дифференциальная диагностика проводится между первичной медиастиальной В-крупноклеточной лимфомой, классической лимфомой Ходжкина, EBV+ диффузной В-крупноклеточной лимфомой. При МЛСЗ возможны по крайней мере два основных морфоиммуногистохимических варианта [40]:

1. Подобный классической лимфоме Ходжкина. Для установления диагноза МЛСЗ необходима интенсивная экспрессия CD20, PAX5 и дополнительно экспрессия одного В-клеточного маркера (CD19, CD79a, BOB.1, Oct.2).
2. Подобный первичной медиастиальной В-крупноклеточной лимфоме: переменная утрата В-клеточных маркеров, мономорфная экспрессия CD30.

Безусловно, помимо вышеизложенных двух морфоиммуногистохимических вариантов в повседневной диагностической работе врача-патолога при МЛСЗ встречается чрезвычайная переменность «перекреста» и сочетания морфологических и иммуногистохимических признаков — это третья «промежуточная» группа, которая, согласно данным Pittaluga S. et al., составила 45% от всех случаев [41].

МЛСЗ с экспрессией EBV — это крайне редкие случаи, требующие дифференциальной диагностики с EBV+ ДВККЛ с медиастиальной локализацией. При немедиастиальной нодальной/экстранодальной локализации случаи, ранее относившиеся к В-клеточной лимфоме, неклассифицируемой, занимающей промежуточное положение между диффузной В-крупноклеточной лимфомой и классической лимфомой Ходжкина, согласно 5-му изданию классификации ВОЗ 2022 г. рекомендуется относить к ДВККЛ, БДУ, или EBV+ ДВККЛ.

Т-клеточные лимфоидные пролиферации и лимфомы

В западных странах лимфомы из зрелых Т-клеток (русский синоним — периферические Т-клеточные лимфомы — ПТКЛ) составляют 10—15% от всех неходжкинских лимфом, в странах Азии частота их диагностики достигает 20—30%. На протяжении нескольких классификационных схем в разделе Т-клеточных лимфом нозологии группируются по признаку: преимущественно нодальное, экстранодальное, первичное кожное поражение и лейкоэмические формы. Сопоставление трех классификационных схем приведено в табл. 3.

Таблица 3. Сопоставление классификационных схем Т- и NK-клеточных лимфоидных пролифераций / лимфом: редакция 4-го издания ВОЗ 2017 г., 5-е издание ВОЗ 2022 г., Международный консенсус по классификации лимфом (ICC, 2022)

ВОЗ, 2017 г.	ВОЗ, 2022 г.	ICC, 2022 г.
—		Зрелые Т-клеточные и NK-клеточные лейкозы
Т-клеточный пролимфоцитарный лейкоз	Т-пролимфоцитарный лейкоз	Т-клеточный пролимфоцитарный лейкоз
Т-клеточный лейкоз из больших гранулярных лимфоцитов	Т-клеточный лейкоз из больших гранулярных лимфоцитов	Т-клеточный лейкоз из больших гранулярных лимфоцитов
Агрессивный NK-клеточный лейкоз	Агрессивный NK-клеточный лейкоз	Агрессивный NK-клеточный лейкоз
Т-клеточный лейкоз/лимфома взрослых	Т-клеточный лейкоз/лимфома взрослых	Т-клеточный лейкоз/лимфома взрослых
Хроническое NK-клеточное лимфопролиферативное заболевание (предварительная нозология)	NK-клеточный лейкоз из больших гранулярных лимфоцитов	Хроническое NK-клеточное лимфопролиферативное заболевание (предварительная нозология)
—	Синдром Сезари	—
EBV-положительное Т-клеточное и NK-клеточное лимфопролиферативное заболевание (LPD) у детей	EBV-положительное Т/NK-клеточное лимфопролиферативное заболевание (LPD) у детей	EBV-положительные Т-клеточные и NK-клеточные лимфопролиферации и лимфомы детей
Лимфопролиферативное заболевание (LPD) подобное световой оспе	Лимфопролиферативное заболевание (LPD) подобное световой оспе	Лимфопролиферативное заболевание (LPD), подобное световой оспе
Тяжелая аллергическая реакция на укусы комаров	Тяжелая аллергическая реакция на укусы комаров	Тяжелая аллергическая реакция на укусы комаров
Хроническая активная EBV-инфекция Т- и NK-клеточного типа, системная форма	Системное хроническое активное EBV-ассоциированное заболевание	Хроническое активное системное EBV-ассоциированное заболевание с иммунофенотипом Т- и NK-клеток
Системная EBV-положительная Т-клеточная лимфома детей	Системная EBV-положительная Т-клеточная лимфома детей	Системная EBV-положительная Т-клеточная лимфома детей
—		EBV-положительные Т- и NK-клеточные лимфомы
Первичная EBV-положительная нодальная Т-клеточная или NK-клеточная лимфома (вариант PTCL, NOS)	EBV-положительная нодальная Т- и NK-клеточная лимфома	Первичная нодальная Т-клеточная/NK-клеточная лимфома (предварительная нозология)
Экстранодальная NK/Т-клеточная лимфома, назальный тип	Экстранодальная NK/Т-клеточная лимфома	Экстранодальная NK/Т-клеточная лимфома, назальный тип

Таблица 3 (продолжение). Сопоставление классификационных схем Т- и НК-клеточных лимфоидных пролифераций / лимфом: редакция 4-го издания ВОЗ 2017 г., 5-е издание ВОЗ 2022 г., Международный консенсус по классификации лимфом (ICC, 2022)

ВОЗ, 2017 г.	ВОЗ, 2022 г.	ICC, 2022 г.
Интестинальные Т-клеточные лимфомы	Интестинальные Т-и НК-клеточные лимфопролиферации и лимфомы	Интестинальные Т-клеточные лимфомы
Т-клеточная лимфома, ассоциированная с энтеропатией (EATL)	Т-клеточная лимфома, ассоциированная с энтеропатией (EATL)	Т-клеточная лимфома, ассоциированная с энтеропатией (EATL)
—	Рефрактерная целиакия, тип II (предшественник Т-клеточной лимфомы, ассоциированной с энтеропатией)	—
Мономорфная эпителиотропная интестинальная Т-клеточная лимфома (MEITL)	Мономорфная эпителиотропная интестинальная Т-клеточная лимфома (MEITL)	Мономорфная эпителиотропная интестинальная Т-клеточная лимфома (MEITL)
Интестинальная Т-клеточная лимфома, БДУ	Интестинальная Т-клеточная лимфома, БДУ	Интестинальная Т-клеточная лимфома, БДУ
Индолентное Т-клеточное лимфопролиферативное заболевание (LPD) желудочно-кишечного тракта	Индолентное Т-клеточное лимфопролиферативное заболевание (LPD) желудочно-кишечного тракта	Индолентное клональное Т-клеточное лимфопролиферативное заболевание (LPD) желудочно-кишечного тракта
—	Индолентное НК-клеточное лимфопролиферативное заболевание (LPD) желудочно-кишечного тракта	Индолентное НК-клеточное лимфопролиферативное заболевание (LPD) желудочно-кишечного тракта
—	—	Гепатоспленическая Т-клеточная лимфома
Гепатоспленическая Т-клеточная лимфома	Гепатоспленическая Т-клеточная лимфома	Гепатоспленическая Т-клеточная лимфома
Первичная кожная Т-клеточная лимфома		
—	Первичная кожная Т-клеточная лимфома	—
Грибовидный микоз	Грибовидный микоз	Грибовидный микоз
Синдром Сезари	Синдром Сезари (перенесен в раздел «Лейкозы»)	Синдром Сезари
Подкожная панникулитоподобная Т-клеточная лимфома	Подкожная панникулитоподобная Т-клеточная лимфома	Подкожная панникулитоподобная Т-клеточная лимфома

Таблица 3 (продолжение). Сопоставление классификационных схем Т- и НК-клеточных лимфоидных пролифераций / лимфом: редакция 4-го издания ВОЗ 2017 г., 5-е издание ВОЗ 2022 г., Международный консенсус по классификации лимфом (ICC, 2022)

ВОЗ, 2017 г.	ВОЗ, 2022 г.	ICC, 2022 г.
Первичное кожное CD30-положительное лимфопролиферативное заболевание (LPD): лимфоматоидный папулез; первичная кожная анапластическая крупноклеточная лимфома	Первичное кожное CD30-положительное лимфопролиферативное заболевание (LPD): лимфоматоидный папулез; первичная кожная анапластическая крупноклеточная лимфома	Первичное кожное CD30-положительное лимфопролиферативное заболевание (LPD): лимфоматоидный папулез; первичная кожная анапластическая крупноклеточная лимфома
Первичная кожная периферическая Т-клеточная лимфома, редкие подтипы	—	—
Первичная кожная г/д-Т-клеточная лимфома	Первичная кожная г/д-Т-клеточная лимфома	Первичная кожная г/д-Т-клеточная лимфома
Первичная кожная CD8-положительная агрессивная эпидермотропная цитотоксическая Т-клеточная лимфома	Первичная кожная CD8-положительная агрессивная эпидермотропная цитотоксическая Т-клеточная лимфома	Первичная кожная CD8-положительная агрессивная эпидермотропная цитотоксическая Т-клеточная лимфома
Первичная кожная акральная CD8-положительная лимфома	Первичное кожное акральное CD8-положительное лимфопролиферативное заболевание (LPD)	Первичное кожное акральное CD8-положительное лимфопролиферативное заболевание (LPD)
Первичное кожное CD4-положительное Т-клеточное лимфопролиферативное заболевание (LPD) из мелких/средних клеток	Первичное кожное CD4-положительное Т-клеточное лимфопролиферативное заболевание (LPD) из мелких или средних клеток	Первичное кожное CD4-положительное Т-клеточное лимфопролиферативное заболевание (LPD) из мелких/средних клеток
—	Первичная кожная периферическая Т-клеточная лимфома, БДУ	—
Ангиоиммунобластная Т-клеточная лимфома и другие нодальные Т-клеточные лимфомы с иммунофенотипом фолликулярных Т-хелперов (Tfh)	Нодальные Т-клеточные лимфомы с иммунофенотипом фолликулярных Т-хелперов (Tfh)	Т-клеточные лимфомы с иммунофенотипом фолликулярных Т-хелперов (Tfh)
Ангиоиммунобластная Т-клеточная лимфома	Ангиоиммунобластный тип	Ангиоиммунобластный тип
Фолликулярная Т-клеточная лимфома	Фолликулярный тип	Фолликулярный тип
Нодальная периферическая Т-клеточная лимфома с иммунофенотипом фолликулярных Т-хелперов (Tfh)	Без дальнейших уточнений	Без дальнейших уточнений

Таблица 3 (окончание). Сопоставление классификационных схем Т- и НК-клеточных лимфоидных пролифераций / лимфом: редакция 4-го издания ВОЗ 2017 г., 5-е издание ВОЗ 2022 г., Международный консенсус по классификации лимфом (ICC, 2022)

ВОЗ, 2017 г.	ВОЗ, 2022 г.	ICC, 2022 г.
—	Анапластическая крупноклеточная лимфома	—
Анапластическая крупноклеточная лимфома, ALK-позитивная	Анапластическая крупноклеточная лимфома, ALK-позитивная	Анапластическая крупноклеточная лимфома, ALK-позитивная
Анапластическая крупноклеточная лимфома, ALK-негативная	Анапластическая крупноклеточная лимфома, ALK-негативная	Анапластическая крупноклеточная лимфома, ALK-негативная
Анапластическая крупноклеточная лимфома, ассоциированная с имплантатами молочных желез (предварительная нозология)	Анапластическая крупноклеточная лимфома, ассоциированная с имплантатами молочных желез	Анапластическая крупноклеточная лимфома, ассоциированная с имплантатами молочных желез
—	—	Другая периферическая Т-клеточная лимфома
Периферическая Т-клеточная лимфома, БДУ	Периферическая Т-клеточная лимфома, БДУ	Периферическая Т-клеточная лимфома, БДУ

С учетом развития молекулярно-генетических технологий разделы нозологий Т-клеточных лимфом дополнены новыми данными о молекулярном/мутационном профиле, новыми биомаркерами. Следует остановиться несколько подробнее на изменениях в разделе нодальных Т-клеточных лимфом. В частности, к новой нозологической форме, введенной в обе классификационные схемы в 2022 г., относится «EBV+ нодальная Т- и НК-клеточная лимфома».

Нодальные Т-клеточные лимфомы

Нодальные Т-клеточные лимфомы следует дифференцировать от вторичного опухолевого вовлечения лимфатических узлов при первичных кожных Т-клеточных лимфомах, интестинальной Т-клеточной лимфоме, гепатоспленической Т-клеточной лимфоме, экстранодальной НК/Т-клеточной лимфоме — это редкие события, и, в основном, относятся к регионарным лимфатическим узлам по отношению к зонам основного опухолевого поражения.

Нодальные Т-клеточные лимфомы имеют условное разделение по неопуховому аналогу, включая Th1, Th2, Th17 (Т-хелперы 1, 2, 17-го типов), Tfh (фолликулярные Т-хелперы), Treg (регулярные Т-клетки), характеризуются соответствующим специфическим для данной популяции Т-клеток хемокиновым и цитокиновым профилем.

Анапластическая крупноклеточная лимфома

Анапластическая крупноклеточная лимфома (АКЛ): выделяют ALK-позитивную и ALK-негативную АКЛ. Большинство ALK-негативных АКЛ имеют цитотоксический иммунофенотип, неопухолевым аналогом является цитотоксическая Т-клетка с реаранжировкой генов α/β -цепей TCR. Вместе с тем в группе ALK-негативных АКЛ выделяют так называемые *нецитотоксические АКЛ* со снижением экспрессии цитотоксических молекул (TIA-1, Granzyme B, Perforin) и ЕМА, среди которых преобладают случаи с реаранжировкой *DUSP22* (локус 6p25, около 30% случаев). По критерию общей выживаемости клиническое течение нецитотоксических ALK-негативных АКЛ с реаранжировкой *DUSP22* занимает промежуточное положение между ALK-позитивными и ALK-негативными АКЛ [42]. В качестве иммуногистохимического суррогатного маркера реаранжировки *DUSP22* может использоваться интенсивная ядерная экспрессия LEF1 более чем в 5% опухолевых клеток [43]. Ключевым морфологическим признаком ALK-негативных АКЛ с реаранжировкой *DUSP22* является небольшой размер опухолевых клеток с кольцевидными ядрами (наподобие «пончика»). Менее часто, примерно в 5—8% наблюдений ALK-негативных АКЛ отмечается реаранжировка *TP63*, имеющая неблагоприятное прогностическое значение [44]. Кроме того, в литературе появились данные о CD30+ Т-клеточных лимфомах с анаплазированной/ходжкиноподобной морфологией и реаранжировкой *JAK2*, что может быть в дальнейшем использовано для новых терапевтических подходов с использованием таргетных препаратов (ингибиторов *JAK2*) [45].

В 5-м издании классификации ВОЗ 2022 г. и ICC 2022 г. в группе анапластических крупноклеточных лимфом как самостоятельная нозологическая форма выделена АКЛ, ассоциированная с имплантом молочной железы (ALK-негативная), обладающая благоприятным клиническим течением (ранее предложена как новая нозология в редакции 4-го издания классификации ВОЗ 2017 г.).

В случаях АКЛ, ассоциированной с имплантом молочной железы, в 1/3 случаев выявлены мутации генов сигнального пути JAK/STAT3. Патогенетически при использовании текстурных имплантов с образованием липополисахаридной биопленки формируется хроническая антигенная стимуляция — иммунный ответ с активацией интерлейкинов (ИЛ) 10 и 13, Th17 с опосредованным участием Th1 и, возможно, Th2, что приводит к активации и мутациям в генах сигнального пути JAK/STAT3, формированию Т-клеточного опухолевого клона [46, 47]. Клинически и патоморфологически выделяют: 1) серому с CD30+ анаплазированными опухолевыми клетками в выпоте в пределах фиброз-

ной капсулы, 2) транскapsулярные и перикапсулярные участки инфильтративного роста и 3) вовлечение регионарных лимфатических узлов. Среди данной нозологии встречаются случаи с саркоматоидным вариантом, имитирующие саркому из фолликулярных дендритных клеток (собственное наблюдение).

Группа нодальных Т-клеточных лимфом с иммунофенотипом фолликулярных Т-хелперов

Фолликулярные Т-хелперы — эффекторные клетки, обеспечивающие взаимодействие между В-клетками, антигенпрезентирующими клетками герминативного центра фолликула для дифференцировки и созревания В-клеток с функцией переключения изотипов иммуноглобулинов и формирования популяций секретирующих антитела плазматических клеток.

Маркерами фолликулярных Т-хелперов являются ИЛ-21, ИЛ-4, CD40L, BCL6, SAP, CXCR5 и его лиганд CXCL13, ICOS (индуцибельный Т-клеточный ко-стимулятор). Значительная часть этих маркеров используется при иммуногистохимической верификации субстрата ангиоиммунобластной Т-клеточной лимфомы / нодальной Т-клеточной лимфомы с иммунофенотипом фолликулярных Т-хелперов (Tfh). В свою очередь, клинико-лабораторные признаки иммунного дисбаланса при ангиоиммунобластной Т-клеточной лимфоме послужили толчком для изучения роли фолликулярных Т-хелперов в иммунном ответе, поддержании иммунного гомеостаза [48—50].

Для всех нозологий из группы нодальных Т-клеточных лимфом с Tfh-иммунофенотипом фолликулярных Т-хелперов характерен иммунофенотип CD3+, CD4+, CD5+ с утратой или снижением экспрессии CD7; в ряде случаев допускается отсутствие экспрессии CD4; может присутствовать цитотоксический иммунофенотип — экспрессия TIA-1, Granzyme B / Perforin.

В диагностике ангиоиммунобластной Т-клеточной лимфомы иммуногистохимическое исследование имеет решающее значение, на парафиновых срезах для диагностических целей используются антитела к PD1 (CD279), ICOS, CXCL13, CD10, BCL-6. Эти пять Tfh-маркеров имеют разную чувствительность и специфичность. Так, высокой специфичностью с визуализацией собственно клональной популяции обладают CXCL13 (количество позитивных клеток всегда меньше по сравнению с ICOS и PD1) и CD10, но высокая чувствительность присуща PD1 (CD279) и ICOS при условии позитивной реакции в виде интенсивной мембранной реакции, сопоставимой по интенсивности с Tfh-клетками центра фолликулов, причем ключевым морфологическим признаком является периваскулярное расположение Tfh-пози-

тивных клеток. Важно напомнить, что лиганд CXCL13 служит также диагностическим маркером для фолликулярных дендритных клеток и используется при диагностике опухоли/саркомы из фолликулярных дендритных клеток.

Для верификации любой нозологии из группы нодальных Т-клеточных лимфом с Tfh-иммунофенотипом необходимо обнаружение экспрессии клетками опухолевого пролиферата по крайней мере двух позитивных Tfh-маркеров, в то время как при наличии одного позитивного Tfh-маркера субстрат лимфомы должен быть отнесен к ПТКЛ, БДУ.

Нозология «Периферические Т-клеточные лимфомы, БДУ (ПТКЛ, БДУ)» включает в себя спектр лимфом, не удовлетворяющих критериям вариантов нодальной Т-клеточной Tfh-лимфомы, анапластической крупноклеточной лимфомы.

Неопухолевым аналогом лимфом данной нозологии могут быть Т-хелперы 1-го и 2-го типа (Th1, Th2). В 2019 г. был предложен иммуногистохимический суррогатный алгоритм с помощью четырех маркеров T-bet, GATA3, CXCR3, CCR4 в целях выделения ПТКЛ с иммунофенотипом Th1 или Th2 [51]. ПТКЛ могут экспрессировать цитотоксические молекулы (до 30% случаев), чаще это ПТКЛ с иммунофенотипом неопухолевого аналога T-bet+ (Th1). Следует подчеркнуть, что CD8+ Т-клетки могут относиться как к Th1, так и к Th2.

Такие случаи свидетельствуют о том, что предполагаемый неопухолевый аналог для нодальных Т-клеточных лимфом — это некоторая формализация и схематизация, а дифференцировка Т-клеток в ответ на антигенное воздействие крайне сложна, с учетом недавних исследований о «пластичности» и возможности Т-клеточной трансдифференцировки. Так, базовый для дифференцировки Th2 транскрипционный фактор GATA3 экспрессируется на ранних этапах Т-клеточной дифференцировки в светлом центре фолликула и имеет важное значение в дифференцировке эффекторных Tfh [52]. Данной группой исследователей с помощью исследования профиля экспрессии mRNA была выделена группа Т-клеточных лимфом с «перекрестным» Tfh-Th2 иммунофенотипом, вероятно, за счет активации и трансдифференцировки Th2 с приобретением фенотипа Tfh. Кроме того, в последние годы выделены различные субпопуляции Tfh: Tfh1 (CXCR3+, CCR6–) и Tfh2 (CXCR3–, CCR6–) [42].

EBV-позитивная нодальная Т- и НК-клеточная лимфома

Первые случаи описания данного редкого варианта нодальных Т-клеточных лимфом появились в литературе более 10 лет назад из стран и регионов Восточной Азии — Японии, Южной Кореи, Тайваня [53, 54].

EBV-позитивная нодальная Т- и НК-клеточная лимфома — в настоящее время редкая нозология в Европе, характеризуется лимфаденопатией, гепатоспленомегалией, встречается в старшей возрастной группе, может быть ассоциирована с иммунодефицитным состоянием, аутоиммунными заболеваниями. Лимфома протекает с частым вовлечением костного мозга и печени, нередко — кожи, желудочно-кишечного тракта, но экстранодальное поражение носовой полости / носоглотки должны быть исключены.

Опухолевым субстратом являются среднего размера крупные центробластоподобные клетки с признаками полиморфизма, морфологическими признаками апоптоза, высокой митотической активностью; могут присутствовать некрозы, но ангиоцентрический рост, присущий экстранодальной НК/Т-клеточной лимфоме назального типа, не характерен для EBV-позитивной нодальной Т- и НК-клеточной лимфомы. Этот вариант нодальной Т-клеточной лимфомы чаще имеет реаранжировку генов α/β -цепей TCR, реже — генов γ/δ -цепей, встречаются «молчащие» варианты реаранжировки генов TCR или признаки НК-дифференцировки. Иммунофенотип опухолевого субстрата характеризуется экспрессией CD2+, CD3+, цитолитических молекул TIA-1, Granzyme B / Perforin, часто экспрессией CD8 (60—70% наблюдений) при отсутствии экспрессии CD4 и CD5, но в отличие от экстранодальной НК/Т-клеточной лимфомы отсутствует или редко встречается экспрессия CD56. Практически все случаи EBER-позитивны. Данная нозология введена как самостоятельная нозологическая единица в перечень Т- и НК-клеточных лимфопролиферативных заболеваний и лимфом в 5-м издании классификации ВОЗ 2022 г., однако распространенность заболевания и критерии дифференциальной диагностики будут в дальнейшем уточняться.

Литература

1. Harris NL, Jaffe ES, Stein H et al. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* 1994; 84:1361—1369.
2. Campo E, Jaffe ES, Cook JR et al. The International Consensus Classification of mature lymphoid neoplasms: a report from the Clinical Advisory Committee. *Blood* 2022; 140:1229—1253.
3. Alaggio R, Amador C, Anagnostopoulos I et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of haematolymphoid tumours: lymphoid neoplasms. *Leukemia* 2022; 36:1720—1748.
4. Rawstron AC, Bennett FL, O'Connor SJ et al. Monoclonal B-cell lymphocytosis and chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2008; 359(6):575—583. DOI: 10.1056/NEJMoa075290.

5. Gibson SE, Swerdlow SH, Ferry JA et al. Reassessment of small lymphocytic lymphoma in the era of monoclonal B-cell lymphocytosis. *Haematologica* 2011; 96(8):1144—1152. DOI:10.3324/haematol.2011.042333.
6. Habermeh GK, Durkin L., His ED et al. A tissue counterpart to monoclonal B-cell lymphocytosis. *Arch Pathol Lab Med* 2021; 145:1544—1551. DOI: 10.5858/arpa.2020-0654-OA.
7. Gine E, Martinez A, Villamor N et al. Expanded and highly active proliferation centers identify a histological subtype of chronic lymphocytic leukemia (“accelerated” chronic lymphocytic leukemia) with aggressive clinical behavior. *Haematologica* 2010; 95:1526—1533.
8. He R, Ding W, Viswanatha DS et al. PD-1 expression in chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma (CLL/SLL) and large B-cell Richter transformation (DLBCL-RT). A characteristic feature of DLBCL-RT and potential surrogate marker for clonal relatedness. *Am J Surg Pathol* 2018; 42(7): 843—854. DOI: 10.1097/PAS.0000000000001077.
9. Favini C, Talotta D, Almasri M et al. Clonally unrelated Richter syndrome are truly de novo diffuse large B-cell lymphomas with a mutational profile reminiscent of clonally related Richter syndrome. *Br J Haematol* 2022; 198:1016—1022. DOI: 10.1111/bjh.18352.
10. Aukema SM, Croci GA., Bens S et al. Mantle cell lymphomas with concomitant MYC and CCND1 breakpoints are recurrently TdT positive and frequently show high-grade pathological and genetic features. *Virchows Arch* 2021; 479:133—145. DOI: 10.1007/s00428-021-03022-8.
11. Parrott AM, Haggiagi AM, Murty VV et al. Primary large B-cell lymphoma of the central nervous system with cyclin D1 expression and t(11;14) (IGH-CCND1): Diffuse large B-cell lymphoma with CCND1 rearrangement or mantle cell lymphoma? *Hematol Oncol* 2020; 38(5):817—822. DOI: 10.1002/hon.2779.
12. Ok CY, Xu-Monette ZY, Tzankov A et al. Prevalence and clinical implications of cyclin D1 expression in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) treated with immunochemotherapy: a report from the international DLBCL rituximab-CHOP consortium program. *Cancer* 2014; 120(12):1818—1829.
13. Kroft S. Stratification of follicular lymphoma: time for a paradigm shift? *Am J Clin Pathol* 2019; 151(6):539—541. DOI: 10.1093/ajcp/aqz008.
14. Chaudhary S, Brown N, Song JY et al. Relative frequency and clinicopathologic characteristics of MYC-rearranged follicular lymphoma. *Hum Pathol* 2021; 114:19—27. DOI: 10.1016/j.humpath.2021.04.014.
15. Salmeron-Villalobos J, Egan C, Borgmann V et al. A unifying hypothesis for PNMZL and PTF: morphological variants with a common molecular profile. *Blood Adv* 2022; 6(16):4661—4674. DOI: 10.1182/bloodadvances.2022007322.
16. Ok CY, Medeiros LJ, Thakral B et al. High-grade B-cell lymphomas with TdT expression: a diagnostic and classification dilemma. *Mod Pathol* 2019; 32:48—58. DOI: 10.1038/s41379-018-0112-9.
17. Ramis-Zaldivar JE, Gonzalez-Farré B, Balagué O et al. Distinct molecular profile of IRF4-rearranged large B-cell lymphoma. *Blood* 2020; 135:274—286. DOI: 10.1182/blood.20190 02699.

18. Salaverria I, Philipp C, Oschlies I et al. Translocations activating IRF4 identify a subtype of germinal center-derived B-cell lymphoma affecting predominantly children and young adults. *Blood* 2011; 118:139—147. DOI: 10.1182/blood-2011-01-330795.
19. Frauenfeld L, Castrejon-de-Anta N, Ramis-Zaldivar JE et al. Diffuse large B-cell lymphomas in adults with aberrant coexpression of CD10, BCL6, and MUM1 are enriched in IRF4 rearrangements. *Blood Adv* 2022; 6:2361—2372. DOI: 10.1182/bloodadvances.20210 06034.
20. Schmitz R, Wright GW, Huang DW et al. Genetics and pathogenesis of diffuse large b-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2018; 378:1396—1407.
21. Chapuy B, Stewart C, Dunford AJ et al. Molecular subtypes of diffuse large B cell lymphoma are associated with distinct pathogenic mechanisms and outcomes. *Nat Med* 2018; 24:679—690.
22. Lacy SE, Barrans SL, Beer PA et al. Targeted sequencing in DLBCL, molecular subtypes, and outcomes: A Haematological Malignancy Research Network report. *Blood* 2020; 135:1759—1771.
23. Collinge B, Ben-Neriah S, Chong L et al. The impact of MYC and BCL2 structural variants in tumors of DLBCL morphology and mechanisms of false-negative MYC IHC. *Blood* 2021; 137:2196—2208.
24. McPhail ED, Maurer MJ, Macon WR et al. Inferior survival in high-grade B-cell lymphoma with MYC and BCL2 and/or BCL6 rearrangements is not associated with MYC/IG gene rearrangements. *Haematologica* 2018; 103:1899—1907. DOI: 10.3324/haema tol.2018.190157.
25. Rosenwald A, Bens S, Advani R et al. Prognostic significance of MYC rearrangement and translocation partner in diffuse large B-cell lymphoma: a study by the Lunenburg Lymphoma Biomarker Consortium. *J Clin Oncol* 2019; 37:3359—3368. DOI: 10.1200/jco.19.00743.
26. Ye Q, Xu-Monette ZY, Tzankov A et al. Prognostic impact of concurrent MYC and BCL6 rearrangements and expression in de novo diffuse large B-cell lymphoma. *Oncotarget* 2018; 7:2401—2416. DOI: 10.18632.oncotarget.6262.
27. Ennishi D, Jiang A, Boyle M et al. Double-hit gene expression signature defines a distinct subgroup of germinal center B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2018; 37:190—201.
28. Sha C., Barrans S., Cucco F et al. Molecular high-grade B-cell lymphoma: defining a poor-risk group that requires different approaches to therapy. *J Clin Oncol* 2019; 37:202—212.
29. Bhavsar S, Liu YC, Gibson SE et al. Mutational landscape of TdT+ large B-cell lymphomas supports their distinction from B-lymphoblastic neoplasms: a multi-parameter study of a rare and aggressive entity. *Am J Surg Pathol* 2022; 46:71—82. DOI: 10.1097/pas.0000000000001750.
30. Khanlari M, Medeiros LJ, Lin P et al. Blastoid high-grade B-cell lymphoma initially presenting in bone marrow: a diagnostic challenge. *Mod Pathol* 2022; 35(3):419—426. DOI: 10.1038/s41379-021-00909-4.
31. Nie K, Redmond D, Eng KW et al. Mutation landscape, clonal evolution pattern, and potential pathogenic pathways in B-lymphoblastic transformation of

- follicular lymphoma. *Leukemia* 2021; 35:1203—1208. DOI: 10.1038/s41375-020-01014-2.
32. Lopez C, Kleinheinz K, Aukema SM et al. Genomic and transcriptomic changes complement each other in the pathogenesis of sporadic Burkitt lymphoma. *Nat Commun* 2019; 10:1459. DOI: org/ 10.1038/s41467-019-08578-3.
33. Grande BM, Gerhard DS, Jiang A et al. Genome-wide discovery of somatic coding and noncoding mutations in pediatric endemic and sporadic Burkitt lymphoma. *Blood* 2019; 133:1313—1324. DOI: 10.1182/ blood-2018-09-871418.
34. Thomas N, Dreval K, Gerhard D et al. Genetic subgroups inform on pathobiology in adult and pediatric Burkitt lymphoma. *Blood* 2023; 141(8):904—916. DOI: 10.1182/blood.2022016534.
35. Newman AM, Zaka M, Zhou P et al. Genomic abnormalities of TP53 define distinct risk groups of paediatric B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Leukemia* 2022; 36(3):781—789. DOI: 10.1038/s41375-021-01444-6.
36. Gonzalez-Farre B, Ramis-Zaldivar JE, Salmeron-Villalobos J et al. Burkitt-like lymphoma with 11q aberration: A germinal center derived lymphoma genetically unrelated to Burkitt lymphoma. *Haematologica* 2019; 104:1822—1829.
37. Chen BJ, Chapuy B, Ouyang J et al. PD-L1 expression is characteristic of a subset of aggressive B-cell lymphomas and virus-associated malignancies. *Clin Cancer Res* 2013; 19(13):3462—3473.
38. Bourbon E, Maucort-Boulch D, Fontaine J et al. Clinicopathological features and survival in EBV-positive diffuse large B-cell lymphoma not otherwise specified. *Blood Adv* 2021; 5(16):3227—3239.
39. Traverse-Glehen A, Pittaluga S, Gaulard P et al. Mediastinal gray zone lymphoma. *Am J Surg Pathol* 2005; 29:1411—1421. DOI: 10.1097/ 01.pas.00000180856.74572.73.
40. Sarkozy C, Copie-Bergman C, Damotte D et al. Gray-zone lymphoma between cHL and large B-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol* 2019; 43:341—351. DOI: 10.1097/PAS.0000000000001198.
41. Pittaluga S, Nicolae A, Wright GW et al. Gene expression profiling of mediastinal gray zone lymphoma and its relationship to primary mediastinal B-cell lymphoma and classical Hodgkin lymphoma. *Blood Cancer Discov* 2020; 1:155—161. DOI: 10.1158/ 2643-3230.BCD-20-0009.
42. Drieux F, Ruminy Ph, Abdel-Sater A et al. Defining signatures of peripheral T-cell lymphoma with a targeted 20-marker gene expression profiling assay. *Haematologica* 2020; 105(6):1582—1592.
43. Ravindran A, Feldman AL, Ketterling RP et al. Striking association of lymphoid enhancing factor (LEF1) overexpression and DUSP22 rearrangements in anaplastic large cell lymphoma. *Am J Surg Pathol* 2021; 45(4):550—557. DOI: 10.1097/PAS.0000000000001614.
44. Savage KJ, Slack GW. DUSP22 rearranged ALK-negative ALCL is a pathogenetically distinct disease but can have variable clinical outcome. *Haematologica* 2023; 108(6):1463—1467. DOI: 10.3324/haematol.2022.282025.

45. Fitzpatrick MJ, Massoth LR, Marcus C et al. JAK2 rearrangements are a recurrent alteration in CD30+ systemic T-cell lymphomas with anaplastic morphology. *Am J Surg Pathol* 2021; 45(7):895—904.
46. DeCoster RC, Clemens MW, Di Napoli A et al. Cellular and molecular mechanisms of breast implant-associated anaplastic large cell lymphoma. *Plast Reconstr Surg* 2021; 147(1):30e—41e. DOI: 10.1097/PRS.00000000000007423.
47. Turner SD, Inghirami G, Miranda RN et al. Cell of origin and immunologic events in the pathogenesis of breast implant-associated anaplastic large-cell lymphoma. *Am J Pathol* 2020; 190:2—10. DOI: 10.1016/j.ajpath.2019.09.005.
48. Crotty S. Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annu Rev Immunol* 2011; 29: 621—663.
49. de Leval L, Rickman DS, Thielen C et al. The gene expression profile of nodal peripheral T-cell lymphoma demonstrates a molecular link between angioimmunoblastic T-cell lymphoma (AITL) and follicular helper T (TFH) cells. *Blood* 2007; 109(11):4952—4963.
50. Rodriguez-Pinilla SM, Atienza L, Murillo C et al. Peripheral T-cell lymphoma with follicular T-cell markers. *Am J Surg Pathol* 2008; 32(12):1787—1799.
51. Hevican TB, Bouska A, Yu J et al. Genetic drivers of oncogenic pathways in molecular subgroups of peripheral T-cell lymphoma. *Blood* 2019; 133(15):1664—1676.
52. Ioannidou K, Ndiaye DR, Noto A et al. In situ characterization of follicular helper CD4 T cells using multiplexed imaging. *Front Immunol* 2020; 11:607626. DOI: 10.3389/fimmu.2020.607626.
53. Takahashi E, Asano N, Li C et al. Nodal T/NK-cell lymphoma of nasal type: a clinicopathological study of six cases. *Histopathology* 2008; 52(5):585—596. DOI: 10.1111/j.1365-2559.2008.02997.x.
54. Kato S, Takahashi E, Asano N et al. Nodal cytotoxic molecule (CM)-positive Epstein-Barr virus (EBV)-associated peripheral T-cell lymphoma (PTCL): a clinicopathological study of 26 cases. *Histopathology* 2012; 61(2):186—199. DOI: 10.1111/j.1365-2559.2012.04199.x.

Глава 3.

Цитоморфологическая диагностика опухолевых заболеваний кроветворной ткани миелоидной линии дифференцировки

Общие принципы

Опухолевые заболевания кроветворной ткани миелоидной линии дифференцировки имеют клональный характер. В зависимости от патогенетических особенностей кроветворение характеризуется пролиферацией одной или более клеточной линии миелопоэза с признаками сохранной терминальной дифференцировки, либо неэффективным гемопоэзом, либо блоком дифференцировки с бесконтрольной пролиферацией незрелых миелоидных клеток. Эти процессы (и их сочетания) в костном мозге и крови проявляются в количественных нарушениях различных ростков кроветворения, появлении признаков дисплазии клеток, увеличении количества бластных клеток.

Общие подходы цитологической диагностики опухолевых заболеваний миелоидной линии дифференцировки направлены на выявление морфологических особенностей клеток, отражающих патогенетические процессы, свойственные той или иной группе заболеваний. При анализе аспиратов костного мозга они заключаются в оценке:

- клеточности костного мозга и соотношения ростков кроветворения;
- количества бластных клеток и их эквивалентов, анализе их морфологических характеристик;
- процессов созревания различных ростков кроветворения;

- признаков дисплазии клеток гранулоцитарного, эритроидного и мегакариоцитарного ростков кроветворения;
- ферментативных и метаболических характеристик клеток при проведении цитохимических реакций.

Анализ признаков дисплазии клеток необходим при подозрении на опухолевое заболевание миелоидной линии дифференцировки любой классификационной группы. Признаки дисплазии клеток являются отражением клонального кроветворения и сходных патогенетических механизмов при миелодиспластических синдромах (МДС) и миелодиспластических синдромах / миелопролиферативных новообразованиях (МДС/МПН). Для заболеваний этих классификационных групп наличие признаков дисплазии клеток является обязательным. Это отличает их от заболеваний группы миелопролиферативных новообразований (МПН), для которых характерно отсутствие признаков дисплазии клеток. При острых миелоидных лейкозах (ОМЛ) мультилинейная дисплазия ассоциирована с вариантом ОМЛ, связанным с миелодисплазией. При других вариантах ОМЛ диспластические характеристики клеток могут присутствовать или не определяться. Методические подходы в оценке признаков дисплазии клеток гранулоцитарного, эритроидного и мегакариоцитарного ростков одинаковы при подозрении на заболевания из групп МДС, МПН, МДС/МПН. Они изложены на примере описания признаков дисплазии клеток в разд. «Принципы цитологической диагностики миелодиспластических синдромов». Подход в анализе признаков дисплазии клеток при ОМЛ отличается от МДС, он описан в разд. «Принципы цитологической диагностики острых миелоидных лейкозов».

Обязательным в заключении миелограммы при подозрении на опухолевое заболевание миелоидной группы дифференцировки является отражение наличия или отсутствия признаков дисплазии клеток тех или иных ростков кроветворения.

Методические подходы в анализе бластных клеток и их эквивалентов одинаковы при всех заболеваниях с увеличением количества бластных клеток.

Важным этапом цитологической диагностики опухолевых заболеваний миелоидной природы является анализ ферментативной и метаболической активности клеток. При подозрении на заболевания из группы МДС или МДС/МПН без увеличения количества бластных клеток необходимо провести и оценить цитохимическую реакцию на кольцевые сидеробласты. При увеличении количества бластных клеток — на миелопероксидазу. При диагностике острых лейкозов стандартным подходом является проведение реакций на миелопероксидазу, неспецифическую эстеразу (с ингибированием NaF) и гликоген. В случаях повы-

шенного количества тучных клеток и/или базофилов рекомендуется провести реакцию с толуидиновым синим, особенно при гипогрануляции этих клеток.

Цитоморфологические характеристики бывают неинформативны в случае сухого пунктата. В такой ситуации рекомендуется сделать отпечатки трепанобиоптата костного мозга с дальнейшим цитоморфологическим анализом, который в очень короткое время может прояснить ситуацию или дополнить данные морфологического и иммуногистохимического анализа трепанобиоптатов костного мозга. Гистологические исследования занимают одно из ведущих мест в диагностике опухолевых заболеваниях миелоидной линии дифференцировки.

Преаналитический этап цитологической диагностики заболеваний гемопоэтической природы

Необходимым условием проведения анализа количественного и качественного состава клеток костного мозга и периферической крови, а также оценки наличия признаков дисплазии является хорошее качество препаратов аспирата костного мозга (далее костного мозга) и периферической крови (далее крови). Оно подразумевает приготовление мазков из свежих биологических образцов, хорошее качество техники нанесения материала на стекло с наличием мест с монослоем клеток, наличием «щеточки» мазка и хорошее качество окраски материала.

Если аспират костного мозга добавлен в пробирку с антикоагулянтом КЗ ЭДТА, то срок хранения материала до приготовления мазков не должен превышать 2 часов, поскольку клетки при хранении подвергаются дегенеративным изменениям, проявляющимся гетерогенностью окраски цитоплазмы, вакуолизацией ядра и цитоплазмы, пельгеризацией ядра, образованием апоптотических телец, и другим изменениям, которые могут быть ошибочно расценены как признаки дисплазии.

Препараты аспирата костного мозга следует маркировать простым карандашом после высыхания материала с указанием фамилии, инициалов имени и отчества, даты взятия материала. Маркировку препаратов должен проводить врач, выполнивший пункцию костного мозга, с целью минимизации ошибок. Окрашенные препараты хранятся в архиве в течение 20 лет.

Принципы цитологической диагностики миелодиспластических синдромов

Кроветворение при МДС характеризуется неэффективным гемопоэзом, отражением которого являются цитопении и различные виды дисмиелопоэза: дизэритропоэз, дисгранулопоэз и дисмегакариопоэз. Цитоморфологическая оценка препаратов костного мозга и крови опирается на принципы цитологической диагностики МДС, изложенные Международной рабочей группой морфологов по изучению МДС, и на актуальную классификацию ВОЗ. Определены минимальные диагностические критерии, позволяющие предположить диагноз МДС. Это специфические морфологические изменения костного мозга, из перечня которых необходимо наличие хотя бы одной из следующих характеристик:

1. Дисплазии в $\geq 10\%$ клеток в одной или нескольких линиях миелопоэза.
2. $\geq 15\%$ кольцевых сидеробластов при отсутствии мутации в гене *SF3B1* (или если мутация не определялась) или $\geq 5\%$ кольцевых сидеробластов при наличии мутации в гене *SF3B1*.
3. Наличие 5—19% миелобластов в мазке аспирата костного мозга.

Для правильного подсчета кроветворных клеток и выявления степени дисплазии при работе с мазком периферической крови необходимо дифференцировать 200 лейкоцитов (исключаются эритрокариоциты). При работе с мазком аспирата костного мозга необходимо дифференцировать не менее 500 ядросодержащих клеток (включая эритрокариоциты) и не менее 100 клеток неэритроидного происхождения. Например, при расширении эритроидного ростка до 80% доля неэритроидных клеток составляет 20% и дифференцированный подсчет клеток будет осуществляться на 500 клеток, поскольку суммарно неэритроидные клетки составят 100 клеток и подсчет на 500 клеток будет достаточным. В редких случаях, например когда эритроидный росток расширен до 90%, доля неэритроидных клеток составляет 10% и дифференцированный подсчет должен осуществляться на 1000 клеток для суммарного количества неэритроидных элементов до 100 клеток.

При анализе показателей гемограмм и миелограмм важно помнить о причинах, которые могут приводить к цитопениям и дисплазиям кроветворных клеток. Различные алиментарные, токсические факторы, инфекционные агенты, а также ятрогенные воздействия могут быть причиной неклональных цитопений и дисплазий.

Оценка признаков дисплазии клеток

Наличие дисплазии в какой-либо линии гемопоэза подтверждается обнаружением не менее 10% диспластичных форм. При этом оценивается 100 клеток гранулоцитарного ряда и 100 клеток эритроидного ряда. Для выявления степени дисплазии клеток мегакариоцитарного ряда необходимо оценить не менее 30 мегакариоцитов.

В различных ростках кроветворения выделяют несколько четких признаков, позволяющих классифицировать клетку как диспластичную форму. В одних случаях может наблюдаться преобладание какого-либо одного признака, в других — нескольких признаков одновременно.

С учетом того, что оценка признаков дисплазии проводится с помощью ручной методики, при которой коэффициент вариации достигает 30%, желательно привлечь к оценке по крайней мере двух морфологов для минимизации ее субъективности.

Также целесообразно значения выдавать в условных диапазонах: 10—29% диспластичных форм — слабо выраженные признаки дисплазии; 30—49% — умеренно выраженные признаки дисплазии; 50—100% диспластичных форм — сильно выраженные признаки дисплазии клеток тех или иных ростков миелопоэза.

В 10—20% случаев МДС наблюдается гипоплазия кроветворной ткани и в 10—20% случаев — фиброз стромы костного мозга. Аспират костного мозга при этих вариантах бывает чаще с пониженной клеточностью, что может привести к отсутствию количества диагностических клеток в различных ростках кроветворения (< 100 эритрокариоцитов, < 100 гранулоцитов, < 30 мегакариоцитов) и невозможности провести оценку признаков дисмиелопоэза в той или иной линии. В таких ситуациях анализ признаков дисплазии клеток может быть получен при гистологическом исследовании трепанобиоптатов костного мозга (преимущественно дизэритропоэз и дисмегакариопоэз) и при проведении проточной цитофлуориметрии костного мозга (дисгранулопоэз и дизэритропоэз).

Морфологические признаки дизэритропоэза: дольчатость или фрагментация ядра, межъядерные мостики, кариорексис, 2- и многоядерность, признаки мегалобластности, кольцевые сидеробласты, вакуолизация, положительная ШИК-реакция (Шифф-йодная кислота).

Морфологические признаки дисгранулопоэза: мелкие или необычно большие размеры клеток, гипосегментация ядра (псевдопельгеровская аномалия), гиперсегментация ядра, гипо- и агрануляция цитоплазмы, наличие псевдогранул Чедиака—Хигаси, телец Деле, палочек Ауэра.

Морфологические признаки дисмегакариопоза: микромегакариоциты, гиполобуляция ядра, многоядерные формы.

Большинство из перечисленных выше признаков дисплазии клеток 3 ростков кроветворения специфичны не только для МДС и не ассоциированы с каким-либо вариантом заболевания. Тем не менее псевдопельгеровская аномалия нейтрофилов, микромегакариоциты и гиполобулярные мегакариоциты являются наиболее патогномоничными для МДС.

Оценка сидеробластов

Сидеробластами называют эритрокариоциты с гранулами негемоглобинового железа в цитоплазме, а сидероцитами — эритроциты с аналогичными гранулами.

В соответствии с рекомендациями рабочей группы экспертов ВОЗ от 2008 г. сидеробласты принято классифицировать на сидеробласты I, II и III типа:

I тип — < 5 сидерозных гранул в цитоплазме.

II тип — ≥ 5 гранул перинуклеарного распределения.

III тип (кольцевые сидеробласты) — ≥ 5 гранул перинуклеарного распределения, занимающих $\geq 1/3$ окружности ядра.

В норме в костном мозге содержится 23—25% сидеробластов I и II типа, кольцевые сидеробласты не определяются.

Вне зависимости от этиологии выявление КС отражает неэффективный эритропоэз и наличие избытка железа в митохондриях. В норме митохондриальный ферритин не определяется. Всем пациентам при подозрении на МДС без избытка бластов следует выполнять цитохимическое исследование эритроидных клеток костного мозга для выявления кольцевых сидеробластов, которые необходимо определять не только при расширенном, но и при нормальном и редуцированном эритроидном ростке. Исключения могут составить случаи с низкой клеточностью костного мозга и при сужении эритроидного ростка $< 10\%$, что может привести к отсутствию возможности оценить суммарно 100 эритрокариоцитов.

Алгоритм анализа цитохимической реакции на сидеробласты

Алгоритм анализа цитохимической реакции на сидеробласты прост, он заключается в дифференцированном подсчете 100 эритрокариоцитов. В анализ включаются клетки эритроидного ростка всех стадий созревания, в том числе незрелые формы. В качестве положительного контроля реакции может служить нефиксированный неокрашенный препарат от предыдущего пациента (у которого выявлены сидеробла-

сты в значительном количестве), с которым проводится текущая диагностическая реакция. Ориентиром также могут служить и макрофаги, содержащие в цитоплазме окрашенные гранулы гемосидерина. Косвенно о перегрузке железом можно судить по количеству сидероцитов в мазке периферической крови, в норме они составляют всего 1,1% ($0,6\% \pm 0,4\%$), но диагностической ценности в плане установления варианта МДС с кольцевыми сидеробластами этот показатель не имеет.

Диагностическими критериями для варианта МДС с кольцевыми сидеробластами являются: количество кольцевых сидеробластов $\geq 15\%$ при отсутствии мутации в гене *SF3B1* или если мутацию не определяли и количество кольцевых сидеробластов $\geq 5\%$ при наличии мутации в гене *SF3B1*.

Заключение при оформлении результата анализа цитохимической реакции рекомендуется формулировать с указанием общего количества сидеробластов и количества сидеробластов всех типов: I типа, II типа и кольцевых сидеробластов.

Оценка цитохимической реакции на сидеробласты очень важна при первичной диагностике МДС, а также при проведении терапии. Несмотря на то что диагностически значимым является только количество кольцевых сидеробластов, тем не менее количество всех форм сидеробластов может в целом косвенно отражать «нагрузку костного мозга железом». Кроме того, оценка данных показателей в динамике позволяет предполагать тот или иной эффект при проводимом лечении с учетом трансфузионной нагрузки донорскими эритроцитами, а также хелаторной и таргетной терапии.

Оценка количества бластных клеток

Около 40% из всей группы МДС составляют варианты с избытком бластов. В этих случаях неэффективный гемопоэз с блоком дифференцировки клеток сочетается с пролиферацией незрелых миелоидных клеток.

Бластные клетки классифицируют на агранулярные и гранулярные. Их характеристики были изложены в классификации ВОЗ 2008 г. и остаются актуальными в настоящее время. К агранулярным бластным клеткам относят клетки с высоким ядерно-цитоплазматическим соотношением, нежносетчатым хроматином с четкой нуклеолой, без зернистости. К гранулярным принадлежат бластные клетки с несколько меньшим ядерно-цитоплазматическим соотношением, которые в цитоплазме содержат различное количество азурофильных гранул. Эти бластные клетки также могут содержать палочки Ауэра, чаще в от-

существование гранул. В редких случаях обнаруживаются крупные прямоугольные кристаллы или гигантские псевдогранулы Чедиака—Хигаши — аномалии структуры клеточных мембран с нарушением системы собирательных микротрубочек и дефектом взаимодействия последних с мембранами лизосом.

Варианты МДС с избытком бластов верифицируют при количестве бластных клеток в крови 2—19% и/или в костном мозге 5—19%. Помимо количества бластных клеток, присутствие палочек Ауэра в них играет ключевую роль в разграничении вариантов МДС с избытком бластов-1 и МДС с избытком бластов-2. Наличие палочек Ауэра всегда предполагает вариант МДС с избытком бластов-2 вне зависимости от количества бластных клеток в костном мозге и/или крови. Поэтому крайне важной задачей для морфологов является выявление этого признака. Не всегда палочки Ауэра хорошо визуализируются, особенно когда они немногочисленны. Рекомендуется в случаях с количеством бластных клеток в костном мозге 5—9% или 2—4% в крови проводить цитохимическую реакцию на миелопероксидазу с целью лучшей визуализации палочек Ауэра.

Трудности в дифференцировке бластных клеток могут быть сопряжены с присутствием в костном мозге увеличенного количества незрелых форм гранулоцитов в случае их гипогрануляции. Чаще всего приходится дифференцировать бластные клетки с гипо- или агранулярными формами промиелоцитов. Отличительной чертой промиелоцитов от бластных клеток является эксцентрично расположенное ядро, небольшая конденсация хроматина с сохранением нуклеолы, более обильная цитоплазма и перинуклеарная зона Гольджи. Важно помнить, что некоторые бластные клетки могут иметь зону Гольджи [например, при ОМЛ с $t(8;21)(q22;q22.1)$; *RUNX1-RUNX1T1*], а гранулоциты любой стадии созревания при некоторых вариантах ОМЛ могут содержать в цитоплазме палочки Ауэра [гранулоциты при СBF-ОМЛ (core binding factor — основной связывающий фактор — белок, принимающий участие в патогенезе этих вариантов ОМЛ)].

В общем количество бластных клеток помимо миелобластов, монобластов и мегакариобластов необходимо включать и промоноциты, являющиеся бластными эквивалентами монобластов. Суммарно количество бластных клеток и промоноцитов в случае МДС с избытком бластов-2 не должно превышать 19%. Если же их количество составляет $\geq 20\%$, то этот вариант расценивается как ОМЛ. Во всех предполагаемых случаях МДС с избытком бластов необходимо проводить дифференциальный диагноз с вариантами ОМЛ с определяющими генетическими аномалиями, поскольку большинство из них может быть диагностировано при количестве бластных клеток $< 20\%$.

Эритробласты не включаются в общий подсчет бластных клеток, они подсчитываются вместе с другими эритрокариоцитами и могут являться бластным эквивалентом только в случае одного варианта ОМЛ — острого эритроидного лейкоза.

Диагностическая значимость подсчета количества бластных клеток

Количество бластных клеток в костном мозге и периферической крови определяет вариант МДС. Если количество бластных клеток в костном мозге $< 5\%$ и в периферической крови $< 1\%$, то возможны варианты МДС без избытка бластов: МДС с линейной дисплазией, МДС с кольцевыми сидеробластами, МДС с мультилинейной дисплазией, МДС-5q-. МДС неклассифицируемый диагностируется при количестве бластных клеток в костном мозге $< 5\%$, а в крови — до 1% . МДС с избытком бластов — при количестве бластных клеток в костном мозге $5\text{—}19\%$, в крови $1\text{—}19\%$. В классификации ВОЗ 2022 г. вариант МДС неклассифицируемый отсутствует, а варианты МДС без избытка бластов допускают $< 2\%$ бластных клеток в периферической крови. МДС детского возраста может соответствовать любым вариантам МДС взрослых.

При выявлении единичных циркулирующих бластных клеток (в случаях с $< 5\%$ бластных клеток в костном мозге) дифференцированный подсчет должен проводиться двумя морфологами для более точного определения их количества, поскольку наличие 1% бластных клеток в двух последовательных подсчетах в одной лаборатории предполагает вариант заболевания — неклассифицированный МДС, который имеет худший прогноз в сравнении с соответствующими вариантами, когда бластные клетки в крови не определяются.

Обнаружение палочек Ауэра в бластных клетках вне зависимости от их количества является поводом для верификации МДС с избытком бластов-2.

Прогностическое значение оценки количества бластных клеток

В число факторов, входящих в различные прогностические шкалы МДС и определяющих прогноз заболевания, включаются не только показатели крови и цитогенетические нарушения, но и количество бластных клеток в костном мозге. Согласно пересмотренной международной прогностической скрининговой шкале IPSS-R, которая широко используется отечественными гематологами, диапазон от 0% до $< 5\%$ бластных клеток в костном мозге подразделяется на 2 группы: от 0% до $< 2\%$ бластных клеток и от 2% до $< 5\%$ бластных клеток. Группе с диа-

пазоном от 2% до < 5% бластных клеток в костном мозге присваивается 1 балл. Поэтому очень важно точно подсчитывать количество бластных клеток во всех диапазонах. Чем ближе количество бластных клеток к границе, определяющей варианты МДС различной прогностической значимости, тем большее количество клеток необходимо дифференцировать для исключения неправильной классификации вариантов заболевания.

При выявлении значений бластных клеток в повторных анализах крови и/или костном мозге, выходящих за пределы одного варианта МДС (например, доля бластных клеток в костном мозге — 8,0% и 3,5%), на момент верификации диагноза принято учитывать их максимальное значение (в данном случае — 8,0%).

Цитологические особенности миелодиспластических синдромов с широким эритроидным ростком

Отдельно стоит упомянуть о случаях МДС с эритроидным преобладанием, когда эритроидный росток составляет более 50% миелокариоцитов. Ранее, до классификации ВОЗ 2017 г., требовалось пересчитывать количество бластных клеток на неэритроидные клетки, что в большинстве случаев приводило к изменению варианта на более «продвинутый». В современной классификации пересчета количества бластных клеток на неэритроидные клетки не требуется. Вариант заболевания устанавливают в соответствии с их количеством при подсчете от всех ядросодержащих клеток. Если количество бластных клеток составляет 5—19%, а количество эритроидных клеток > 50%, то заболевание классифицируется как МДС с избытком бластов. В ситуациях с расширением эритроидного роста более 80% необходимо проводить дифференциальный диагноз с истинной эритроидной лейкозией, при которой количество эритробластов (или проэритробластов) составляет 30% и более. Во всех случаях МДС, когда наблюдается расширение эритроидного роста более 80%, подсчет клеток костного мозга следует проводить на более чем 500 клеток для того, чтобы сумма всех неэритроидных клеток составляла не менее 100. Вариант ОМЛ — острый эритромиелоз, предполагающий наличие бластных клеток как миелоидной, так и эритроидной дифференцировки, в классификации ВОЗ 2017 г. из категории ОМЛ исключен.

Цитохимические исследования

Две цитохимические реакции, необходимые для определения варианта МДС, являются обязательными в цитологической диагностике МДС. Реакция на сидеробласты позволяет диагностировать вариант МДС с

кольцевыми сидеробластами, а миелопероксидаза помогает лучше визуализировать палочки Ауэра при определении варианта МДС с избытком бластов. Другие цитохимические реакции применяются для выявления ферментативных нарушений клеток и, несмотря на то что являются факультативными, могут быть полезными для определения вовлеченности линий гемопоэза. Например, в нейтрофильных гранулоцитах активность миелопероксидазы может быть значительно снижена вплоть до ее полного отсутствия (так же как и снижение концентрации липидов при окраске суданом черным В). В клетках моноцитарной линии дифференцировки может быть снижена активность неспецифической эстеразы. В эритрокариоцитах наблюдается увеличение количества гликогена при проведении ШИК-реакции. Несмотря на то что увеличение количества гликогена в эритрокариоцитах является и при реактивных состояниях, тем не менее у больных МДС положительная ШИК-реакция является признаком дизэритропоэза и может свидетельствовать о принадлежности эритроидного ростка к аномальному клону.

С целью стандартизации подходов в диагностике МДС рекомендуется соблюдать алгоритм цитологической диагностики МДС.

Алгоритм цитологической диагностики миелодиспластических синдромов

I. При количестве бластных клеток в костном мозге < 5% рекомендуется:

1. Оценить наличие признаков дисплазии (подсчет диспластичных форм в 3 ростках кроветворения). С учетом количества диспластичных форм в том или ином ростке кроветворения рекомендуется условно оценивать выраженность признаков дисплазии как:
 - небольшую (10—29% диспластичных форм);
 - умеренную (30—49% диспластичных форм);
 - значительную ($\geq 50\%$ диспластичных форм).

2. Провести цитохимическую реакцию на сидеробласты с целью выявления кольцевых сидеробластов при суммарном количестве клеток эритроидного ростка $\geq 10\%$ от всех ядерных клеток (исключение — низкая клеточность КМ).

II. При количестве бластных клеток в костном мозге 5—9% рекомендуется:

Провести цитохимическую реакцию на миелопероксидазу с целью лучшей визуализации палочек Ауэра.

Примеры оформления заключений миелограмм при МДС приведены в прил. 1.

Принципы цитологической диагностики острых миелоидных лейкозов

Кроветворение при ОМЛ характеризуется бесконтрольной пролиферацией незрелых миелоидных клеток с блоком дифференцировки клеток. Цитоморфологическая диагностика ОМЛ по-прежнему является «золотым стандартом», поскольку подсчет бластных клеток наиболее точен при микроскопии мазка, и основывается на выявлении $\geq 20\%$ бластных клеток в костном мозге и/или крови, анализе морфологических, ферментативных и метаболических характеристик бластных клеток, оценке признаков дисплазии 3 ростков кроветворения. Для правильного подсчета кроветворных клеток и выявления степени дисплазии при работе с мазком периферической крови необходимо дифференцировать 200 лейкоцитов (исключая эритрокариоциты). При работе с мазком аспирата костного мозга необходимо дифференцировать не менее 500 ядросодержащих клеток (включая эритрокариоциты) и не менее 100 клеток незэритроидного происхождения.

Специфическая морфология лейкоэмических и созревающих клеток костного мозга позволяет предположить острый промиелоцитарный лейкоз, некоторые варианты ОМЛ с устойчивыми генетическими аномалиями. Обнаружение мультилинейной дисплазии предполагает вариант ОМЛ, связанный с миелодисплазией.

В обновленной классификации ВОЗ 2022 г. ОМЛ подразделяют на 2 группы: ОМЛ с определяющими генетическими аномалиями и ОМЛ, определяемые дифференцировкой (ранее неспецифицированные). В группе ОМЛ с определяющими генетическими аномалиями диагноз ОМЛ может быть установлен при количестве бластных клеток $< 20\%$. Это варианты ОМЛ со слиянием генов: ОМЛ с *PML::RARA*, ОМЛ с *RUNX1::RUNX1T1*, ОМЛ с *CBFB::MYH11*, ОМЛ с *DEK::NUP214*, ОМЛ с *RBM15::MRTFA*; ОМЛ с реаранжировками генов *KMT2A*, *MECOM*, *NUP98*; ОМЛ с мутацией гена *NPM1*. Исключения составляют 3 варианта: ОМЛ с *BCR::ABL1*, ОМЛ с мутацией *CEBPA* и ОМЛ, связанные с миелодисплазией, которые диагностируют при обязательном количестве бластных клеток $\geq 20\%$. В группе, определяемой дифференцировкой, диагноз ОМЛ также устанавливают при количестве бластных клеток $\geq 20\%$. Исключение составляет острый эритроидный лейкоз, который диагностируют при количестве незрелых эритроидных клеток (эритробласты + пронормобласты/проэритробласты) $\geq 30\%$.

Бластные клетки и их эквиваленты

Важно помнить, что миелобласты, монобласты и мегакариобласты включают в общий счет бластных клеток.

Промоноциты являются бластными эквивалентами в случаях ОМЛ с моноцитарной линией дифференцировки. В заключении миелограммы необходимо указывать суммарное количество бластных клеток и их эквивалентов.

Аномальные промиелоциты являются бластными эквивалентами при остром промиелоцитарном лейкозе.

Эритробласты не включают в общее количество бластных клеток, их вносят в счет клеток эритроидного ростка.

Цитохимические исследования

Цитохимический анализ бластных клеток не утратил своей актуальности. Изучение ферментативных и метаболических характеристик клеток помогает дифференцировать варианты ОМЛ, определяемых дифференцировкой, и полезно при диагностике острых лейкозов неясной линии дифференцировки. Проводить цитохимический анализ при подозрении на острый лейкоз необходимо во всех случаях и в полном объеме. Стандартными цитохимическими реакциями при определении линейной принадлежности бластных клеток считают миелопероксидазу, неспецифическую эстеразу и ее ингибирование NaF, гликоген (ШИК-реакция).

Миелопероксидаза является единственным специфичным маркером миелоидной линии дифференцировки. Миелоидная природа бластных клеток подтверждается позитивной реакцией на миелопероксидазу в $\geq 3\%$ бластных клеток и/или обнаружением палочек Ауэра.

Выявление липидов (с суданом черным В) не является полноценной заменой реакции на миелопероксидазу. Окраску на липиды проводят в тех случаях, когда по каким-либо техническим причинам реакция на миелопероксидазу плохо визуализируется. Во всех ситуациях, когда реакция на миелопероксидазу хорошо выявляется, осуществлять диагностику с суданом черным В не нужно.

Важно понимать, что не всегда при положительной реакции на миелопероксидазу в бластных клетках диагностируется ОМЛ. В редких случаях опухолевые клетки могут одновременно проявлять признаки миелоидной и лимфоидной (Т/В) линии дифференцировки (или определяются несколько опухолевых популяций различных линий дифференцировки), которые выявляются при иммунофенотипическом исследовании методом проточной цитофлуориметрии.

Постановка реакции на неспецифическую эстеразу с ингибированием NaF является необходимой, только она подтверждает моноцитарную линию дифференцировки клеток, помогает проводить дифференциальную диагностику промиелоцитов (бластных эквивалентов при остром моноцитарном лейкозе) с атипичными промиелоцитами в случае микрогранулярного варианта острого промиелоцитарного лейкоза.

ШИК-реакция в большинстве вариантов ОМЛ характеризуется диффузным или диффузно-гранулярным распределением гликогена. В случаях с отрицательными реакциями на миелопероксидазу и неспецифическую эстеразу при ШИК-позитивном материале в гранулярном виде не рекомендуется делать заключение об остром лимфобластном лейкозе. Верифицируют лимфобластный вариант острого лейкоза только при иммунофенотипическом исследовании методом проточной цитофлуориметрии, в редких случаях — при иммуногистохимическом исследовании.

При увеличении количества тучных клеток и/или базофилов полезной будет постановка реакции с толуидиновым синим. Выявление метакромазии (изменения окраски синего цвета красителя на малиновый) наблюдается как в мастоцитах, так и в базофилах. Эта реакция полезна для лучшей визуализации мастоцитов/базофилов в случаях предположительного диагноза системного мастоцитоза, ассоциированного с гематологическими новообразованиями, или острого базофильного лейкоза, особенно когда наблюдается гипогрануляция мастоцитов/базофилов.

Диагностика мультилинейной дисплазии

Оценка признаков дисплазии клеток гранулоцитарного, эритроидного и мегакариоцитарного ростков является обязательной при первичной диагностике ОМЛ и при рецидиве заболевания. Мультилинейная дисплазия служила одним из критериев принадлежности к варианту ОМЛ с изменениями, свойственными миелодисплазией (ВОЗ 2017 г.). В новой редакции ВОЗ 2022 г. мультилинейная дисплазия, как единственный признак, утратила силу при верификации варианта ОМЛ, связанного с миелодисплазией (ОМЛ, связанный с МДС). Тем не менее о наличии мультилинейной дисплазии важно знать в случаях обнаружения нормального кариотипа или отсутствия митозов при выполнении стандартного цитогенетического исследования для своевременного проведения FISH-исследования.

Наличие дисплазии в какой-либо линии гемопоэза при ОМЛ подтверждается обнаружением $\geq 50\%$ диспластичных форм. При этом оце-

нивается как минимум 25 клеток гранулоцитарного ряда и 25 клеток эритроидного ряда. Для выявления степени дисплазии клеток мегакариоцитарного ростка необходимо оценить не менее 6 мегакариоцитов. Мультилинейная дисплазия верифицируется при наличии дисплазии клеток в 2 и более ростках гемопоэза. В заключении миелограммы необходимо отметить признаки дисплазии клеток с указанием количества диспластичных форм ($\geq 50\%$ или $< 50\%$ от всех миелокариоцитов) каждого ростка и сделать вывод о наличии или отсутствии мультилинейной дисплазии.

Цитоморфологическая характеристика вариантов острых миелоидных лейкозов, определяемых дифференцировкой

Основой для классификации вариантов ОМЛ, определяемых дифференцировкой (неспецифицированных), служит морфологический и цитохимический анализ характеристик бластных клеток, позволяющий определить вовлеченную в лейкемический процесс линию, и оценка созревания ростков кроветворения.

С 2017 г. в классификации ВОЗ из категории ОМЛ неспецифицированных выведен вариант острого эритромиелоза, который предполагал наличие бластов 2 видов: миелоидных и эритроидных, он классифицируется как МДС с избытком бластов. В классификации ВОЗ 2022 г. к категории ОМЛ с эритроидной линией дифференцировки также относят только острый эритроидный лейкоз. Необходимо помнить, что процент бластных клеток всегда подсчитывается от всех миелокариоцитов вне зависимости от доли клеток эритроидного ростка.

Обязательным методом диагностики острых лейкозов является иммунофенотипическое исследование с помощью проточной цитофлуориметрии. Только с помощью иммунофенотипического анализа верифицируются варианты ОМЛ с минимальной дифференцировкой, острый эритроидный лейкоз, острый мегакариобластный лейкоз, острый базофильный лейкоз. Кроме того, исключаются варианты острых лейкозов неопределенной линейности, острые лейкозы из ранних Т-клеточных предшественников.

Критерии диагностики вариантов острых миелоидных лейкозов, определяемых дифференцировкой

Диагностические критерии

- $\geq 20\%$ бластных клеток в костном мозге и/или крови (кроме острого эритроидного лейкоза).

- Нет цитогенетических и молекулярных нарушений, характерных для группы ОМЛ с определяющими генетическими аномалиями.
- Исключены острые лейкозы неопределенной линейности.
- Отсутствует история предшествующей цитостатической терапии по поводу другого новообразования.
- Исключены ОМЛ, связанные с предрасположенностью к зародышевой линии.
- Отсутствует анамнез первичного МПН.

ОМЛ с минимальной дифференцировкой

- Бластные клетки негативны на миелопероксидазу ($< 3\%$).
- Миелоидная линия дифференцировки определяется методом точной цитофлюориметрии.
- Бластные клетки экспрессируют ≥ 2 миелоид-ассоциированных антигенов, таких как CD13, CD33, CD117.

ОМЛ без созревания

- $\geq 3\%$ бластных клеток позитивны на миелопероксидазу (цитохимия или иммунофенотип) и негативны на неспецифическую эстеразу.
- Созревающие клетки гранулоцитарного ростка составляют $< 10\%$ от всех ядерных клеток костного мозга.
- Бластные клетки экспрессируют ≥ 2 миелоид-ассоциированных антигенов, таких как миелопероксидаза, CD13, CD33, CD117.

ОМЛ с созреванием

- $\geq 3\%$ бластных клеток позитивны на миелопероксидазу (цитохимия или иммунофенотип) или судан черный В и негативны на неспецифическую эстеразу.
- Созревающие клетки гранулоцитарного ростка составляют $\geq 10\%$ от всех ядерных клеток костного мозга.
- Клетки моноцитарного ростка составляют $< 20\%$ от всех ядерных клеток костного мозга.
- Бластные клетки экспрессируют ≥ 2 миелоид-ассоциированных антигена, таких как миелопероксидаза, CD13, CD33, CD117.

Острый миеломоноцитарный лейкоз

- Моноциты и их предшественники (монобласты и промоноциты) составляют $\geq 20\%$ от всех ядерных клеток костного мозга.
- Созревающие гранулоцитарные клетки составляют $\geq 20\%$ от всех ядерных клеток костного мозга.
- $\geq 3\%$ бластных клеток позитивны на миелопероксидазу (цитохимия или иммунофенотип).

Острый моноцитарный лейкоз

- Моноциты и их предшественники (монобласты и промоноциты) составляют $\geq 80\%$ от опухолевой популяции.
- Созревающие гранулоцитарные клетки составляют $< 20\%$ клеток от всех ядерных клеток костного мозга.
- Бластные клетки и промоноциты экспрессируют ≥ 2 моноцитарных антигена, включая CD11c, CD14, CD36 и CD 64, или позитивны на неспецифическую эстеразу.

Острый эритроидный лейкоз

- Незрелые эритроидные клетки (эритробласты + пронормобласты/проэритробласты) составляют $\geq 30\%$ клеток от всех ядерных клеток костного мозга.
- Все клетки эритроидного ростка составляют $\geq 80\%$ от всех ядерных клеток костного мозга.

Острый мегакариобластный лейкоз

- Бластные клетки экспрессируют ≥ 1 маркера тромбоцитарных гликопротеинов: CD41 (гликопротеин IIb), CD61 (гликопротеин IIIa), CD42b (гликопротеин Ib).

Острый базофильный лейкоз

- Бластные клетки и базофилы (незрелые и зрелые формы) с гранулами, демонстрирующими метахромазию при окраске с толуидиновым синим.
- Бластные клетки негативны на миелопероксидазу, судан черный В и неспецифическую эстеразу.

Особенности диагностики острых миелоидных лейкозов с моноцитарной линией дифференцировки

Острые лейкозы с моноцитарной линией дифференцировки являются одними из самых распространенных вариантов среди всех ОМЛ и составляют около 1/3 случаев. Они нередко характеризуются гиперлейкоцитозом, экстрамедуллярным поражением и нейрорлейкемией. В группе ОМЛ, определяемой дифференцировкой, это миеломоноцитарный и моноцитарный варианты. В группе ОМЛ, определяемой генетическими нарушениями, моноцитарная линия дифференцировки преобладает при ОМЛ с *CBFB::MYH11*, ОМЛ с реаранжировкой гена *KMT2A* и ОМЛ с мутацией в гене *NPM1*.

Сложности морфологической диагностики острых лейкозов с моноцитарной линией дифференцировки связаны с определением количе-

ства промоноцитов, являющихся эквивалентом бластных клеток. Суммарное количество промоноцитов и бластных клеток играет ключевую роль в дифференциальной диагностике ОМЛ, МДС и заболеваний группы МДС/МПН. Зачастую промоноциты идентифицируют как зрелые моноциты, что приводит к занижению общего количества бластных клеток. Сложности диагностики могут быть связаны и с разведением образца костного мозга периферической кровью. Известно, что в крови пациентов доля зрелых моноцитов может быть значительно выше, чем в костном мозге. Следует отметить, что на фоне циторедуктивной терапии гидроксикарбамидом также отмечается увеличение доли клеток моноцитарного ростка со зрелой морфологией. В таких ситуациях чаще всего проводят дифференциальный диагноз с хроническим миеломоноцитарным лейкозом. Поэтому принципиально важным является исследование образцов аспирата костного мозга до какого-либо терапевтического воздействия и с минимальным разведением кровью.

Морфологические характеристики монобластов варьируют. В большинстве случаев это клетки крупных размеров с округлым ядром, нежнотетчатым хроматином, выраженными нуклеолами, слабо базофильной широкой цитоплазмой, нередко вакуолизированной, в которой могут содержаться мелкие азурофильные гранулы. В редких случаях монобласты характеризуются выраженной базофилией цитоплазмы и эксцентрично расположенным ядром, что придает им сходство с плазмобластами. При остром моноцитарном и монобластном лейкозах нередко выявляется клазматоз (отрыв кусочков цитоплазмы от внешней ее поверхности), что также мимикрирует под опухоли лимфоидной природы.

При ОМЛ с моноцитарной линией дифференцировки чаще, чем при других вариантах, выявляются дополнительные опухолевые клоны, например клон плазмацитоидных дендритных клеток (в 5% ОМЛ). Эти клетки могут быть как зрелой, так и незрелой морфологии. Бластные плазмацитоидно-дендритные клетки преимущественно с эксцентрично расположенным округлым ядром и бластным хроматином, могут иметь цитоплазматические выросты, агранулярные. В некоторых случаях они могут быть похожи на монобласты, активность миелопероксидазы в них отсутствует, но активность неспецифической эстеразы, в отличие от монобластов, тоже отсутствует. Верифицируют эти клетки только при иммунофенотипическом исследовании (проточная цитометрия и иммуногистохимическое исследование).

Цитоморфологическая характеристика вариантов острых миелоидных лейкозов с определяющими генетическими аномалиями

Некоторые генетические нарушения ассоциированы с характерными изменениями картины крови и костного мозга. К ним относят:

- острый промиелоцитарный лейкоз с *PML::RARA*;
- ОМЛ, в патогенезе которых ключевую роль играет основной связывающий фактор — core binding factor (CBF-ОМЛ): ОМЛ с *RUNX1::RUNX1T1* и ОМЛ с *CBFB::MYH11*;
- ОМЛ, связанный с МДС;
- ОМЛ с мутацией в гене *NPM1*.

Специфическая морфологическая характеристика помогает в короткое время предположить один из этих видов лейкоза. Важно помнить, что только при подтверждении наличия специфических цитогенетических нарушений может быть верифицирован вариант ОМЛ с определяющими генетическими аномалиями. Однако точное описание морфологических особенностей помогает гематологу направить материал на срочное скрининговое FISH-исследование, что бывает важным при необходимости раннего терапевтического воздействия.

Острый промиелоцитарный лейкоз с *PML::RARA*

Диагноз острого промиелоцитарного лейкоза (ОПЛ) с *PML::RARA* устанавливают при любом процентном содержании бластных клеток в костном мозге.

Выделяют 2 морфологических варианта ОПЛ — гипергранулярный (классический) и микрогранулярный (вариантный). Микрогранулярный вариант чаще определяется у больных ОПЛ высокой группы риска.

ОПЛ всегда является неотложной ситуацией, и специфическую терапию следует начинать незамедлительно при первом подозрении на этот вариант лейкемии. Поэтому важную роль в диагностике ОПЛ занимает морфоцитохимическое исследование.

Размеры и форма аномальных промиелоцитов при гипергранулярном варианте ОПЛ варьируемы, чаще они крупнее нормальных промиелоцитов, форма ядер характеризуется выраженным полиморфизмом (бобовидная, скрученная, складчатая), характерна их гиперхромия и отсутствие нуклеол. Аномальные промиелоциты, в отличие от неопухолевых промиелоцитов, лишены перинуклеарной зоны Гольджи. Цитоплазма содержит грубую, обильную азурофильную зернистость, плотно наслаивающуюся на ядро. Крупные гранулы могут сливаться, образуя палочки Ауэра, которые часто формируют так называ-

емые «снопы». Палочки Ауэра в аномальных промиелоцитах крупные, представлены тубулярными структурами, сложенными гексагонально с периодичностью в 250 мкм, в отличие от других ОМЛ, при которых палочки Ауэра меньших размеров и имеют пластинчатую структуру с периодичностью в 6—10 мкм. В костном мозге могут присутствовать макрофаги, содержащие крупные гранулы или палочки Ауэра из поглощенных лейкоэмических клеток.

Лейкемические клетки при микрогранулярном варианте ОПЛ характеризуются преимущественно складчатой, иногда двудольной формой ядра, наличием в цитоплазме мелких, пылевидных азурофильных гранул или вовсе их отсутствием, что делает схожими аномальные промиелоциты с промоноцитами и затрудняет диагностику ОПЛ.

Принципиальное значение имеет дифференциальная диагностика микрогранулярного варианта ОПЛ и острого моноцитарного лейкоза, протекающих с гиперлейкоцитозом. Важным является тщательный анализ препарата костного мозга и поиск так называемой «диагностической клетки» с множественными палочками Ауэра, которая, как правило, бывает обнаружена.

Крайне важной является постановка всех базовых цитохимических реакций (миелопероксидаза, неспецифическая эстераза с ингибированием NaF, гликоген). В лабораторной практике не исключены случаи, когда цитохимические реакции по техническим причинам недостаточно хорошо визуализируются, поэтому необходим контроль их прохождения и комплексная оценка морфоцитохимических характеристик.

CBF-острые миелоидные лейкозы

К CBF-ОМЛ относят ОМЛ с *RUNX1::RUNX1T1* и ОМЛ с *CBFB::MYH11*.

Диагноз острого лейкоза при наличии этих устойчивых цитогенетических нарушений устанавливают при любом процентном содержании бластных клеток в костном мозге. Общим морфологическим признаком CBF-ОМЛ является нередкое обнаружение палочек Ауэра в гранулоцитах любой стадии созревания. Иногда палочки Ауэра могут быть в виде снопов. Палочки Ауэра в гранулоцитах выявляются и при ОПЛ, но преимущественно на фоне дифференцирующей терапии вследствие созревания аномальных промиелоцитов.

Кроветворные клетки костного мозга при ОМЛ с *RUNX1::RUNX1T1* имеют ряд морфологических особенностей, позволяющих на момент первичной диагностики предположить наличие этой транслокации. Бластные клетки гетерогенны по размеру, чаще крупных размеров,

с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением, с округлой или неправильной формой ядра, наличием нескольких нуклеол, базофильной, иногда вакуолизированной цитоплазмой, многочисленными азурофильными гранулами. Для части бластных клеток характерно наличие перинуклеарной зоны просветления (зоны Гольджи). Некоторые бластные клетки и гранулоциты могут содержать в цитоплазме очень крупные гранулы (псевдогранулы Чедиака—Хигаси) и палочки Ауэра. Гранулоцитарный росток с признаками дисплазии (дольчатость ядра незрелых форм и пельгеризация ядра нейтрофилов). Для варианта ОМЛ с *RUNX1::RUNX1T1* не характерна выраженная нейтропения, а в отдельных случаях отмечается нейтрофилез, в связи с чем предполагается возможность вызревания лейкемических клеток до зрелых нейтрофилов. Нередко в костном мозге увеличено количество эозинофилов (зрелые формы без признаков дисплазии), тучных клеток, базофилов. В случаях с увеличением количества тучных клеток необходимо исключать системный мастоцитоз, ассоциированный с гематологическими новообразованиями. Дисплазия клеток эритроидного и мегакариоцитарного ростков не свойственна ОМЛ с *RUNX1::RUNX1T1*.

Морфocyтохимическая характеристика ОМЛ с *RUNX1::RUNX1T1* соответствует в большинстве случаев варианту ОМЛ с созревaniem; редко — миеломоноцитарному варианту или ОМЛ без созревания.

ОМЛ с *CBFB::MYH11* характеризуются моноцитарной линией дифференцировки в сочетании с эозинофилией. Увеличенное количество аномальных эозинофилов визуализируется в костном мозге, в то время как в крови эозинофилия чаще отсутствует. Эозинофилы при ОМЛ с *CBFB::MYH11*, в отличие от ОМЛ с *RUNX1::RUNX1T1*, выявляются на различных стадиях созревания, незрелые формы содержат в цитоплазме наряду с эозинофильными гранулами проэозинофильные гранулы (более крупные, чем у базофилов, темные гранулы). Эозинофилы при этом варианте лейкемии характеризуются чертами дисплазии (гипосегментация ядра, необычная складчатая форма ядра, гипогрануляция и вакуолизация цитоплазмы) и ферментативными нарушениями.

В случаях ОМЛ с эозинофилией, когда не подтверждается наличие цитогенетических нарушений, свойственных CBF-ОМЛ, необходимо исследовать реаранжировку генов *PDGFRa*, *PDGFRb* и *FGFR1*. При отрицательном результате — редкую транслокацию *ETV6::ABL1* и криптические реаранжировки.

Острые миелоидные лейкозы, связанные с миелодисплазией

ОМЛ, связанные с миелодисплазией, диагностируют при выявлении $\geq 20\%$ бластов, экспрессирующих миелоидный иммунофенотип, и спе-

цифических цитогенетических и молекулярных аномалий, связанных с МДС. Заболевание возникает *de novo* или после известного анамнеза МДС или МДС/МПН.

Основные изменения в классификации ВОЗ 2022 г. включают:

- удаление морфологического критерия мультилинейной дисплазии как единственного, подтверждающего вариант ОМЛ, связанных с миелодисплазией;
- обновление определения цитогенетических критериев;
- введение мутаций 8 генов — *SRSF2*, *SF3B1*, *U2AF1*, *ZRSR2*, *ASXL1*, *EZH2*, *BCOR*, *STAG2*, > 95% из которых присутствуют конкретно при ОМЛ, возникающем после МДС или МДС/МПН.

Несмотря на то что наличие мультилинейной дисплазии перестало быть самостоятельным критерием варианта ОМЛ, связанных с миелодисплазией, определение признаков дисплазии клеток гранулоцитарного, эритроидного и мегакариоцитарного ростков кроветворения является обязательным при цитоморфологической диагностике всех острых лейкозов. Как уже упоминалось ранее, о наличии мультилинейной дисплазии важно знать в случаях нормального кариотипа или при отсутствии митозов (при выполнении стандартного цитогенетического исследования) для возможности проведения FISH-исследования, что бывает важным при необходимости раннего терапевтического воздействия.

Острый миелоидный лейкоз с мутацией в гене *NPM1*

Этот вариант ОМЛ чаще моноцитарной или миеломоноцитарной дифференцировки. Бластные клетки имеют характерную морфологическую особенность — чашечкообразные инвагинации ядра (cup-like nuclear). Идентификация > 10% таких клеток среди бластной популяции высоко ассоциирована с наличием мутаций в генах *NPM1* и *FLT3-ITD*.

Заключение

При оформлении заключений миелограмм пациентов с ОМЛ необходимо указывать предполагаемый вариант из группы ОМЛ, определяемых дифференцировкой. Не рекомендуется использовать аббревиатуру устаревшей франко-американо-британской (ФАБ) классификации. Важно отмечать наличие/отсутствие признаков дисплазии клеток в гранулоцитарном, эритроидном и мегакариоцитарном ростках в диапазоне $\geq 50\%$ или $< 50\%$. При наличии критериев мультилинейной дисплазии обязательно это отражать. Если морфоцитохимические характеристики указывают на возможный вариант из группы ОМЛ с

определяющими генетическими аномалиями, это также необходимо отметить в заключении.

Примеры оформления заключений миелограмм при ОМЛ приведены в прил. 2.

Подводя итог вышесказанному, важно отметить, что цитоморфологический анализ является отправной точкой для дальнейших исследований, никакие другие виды лабораторного анализа не могут использоваться в качестве суррогата морфологии. Также важно понимать, что комплексная лабораторная диагностика острых миелоидных лейкозов, как и любых других опухолевых заболеваний миелоидной линии дифференцировки, включает в себя не только выявление и анализ цитоморфологических, цитохимических и иммунологических характеристик различных клеточных популяций, но и анализ молекулярно-генетических характеристик, которые в современной классификации ВОЗ определяют большинство вариантов опухолевых заболеваний гемопоэтической природы. Именно совокупность всех видов лабораторного анализа позволяет точно верифицировать диагноз и выбрать адекватную персонифицированную терапию, включая таргетное воздействие на опухоль.

Литература

1. Двирнык В. Н., Кохно А. В., Паровичникова Е. Н. Вторичный дисмиелопоэз у больных миелодиспластическими синдромами. *Терапевтический архив* 2014; 86(7): 97—103.
2. Троицкая В. В., Паровичникова Е. Н., Семенова А. А. и др. Риск-адаптированная терапия триоксидом мышьяка в сочетании с полностью транс-ретиновой кислотой больных впервые выявленным острым промиелоцитарным лейкозом. *Гематология и трансфузиология* 2021; 66(2):168—191.
3. Савченко В. Г., Паровичникова Е. Н., Кохно А. В. и др. Национальные клинические рекомендации по диагностике и лечению миелодиспластических синдромов взрослых. *Гематология и трансфузиология* 2016; 61(1-S4):1—32.
4. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 2016; 127(20):2391—2405.
5. Bain BJ, Béné MC. Morphological and immunophenotypic clues to the WHO categories of acute myeloid leukaemia. *Acta Haematol* 2019; 141(4):232—244.
6. Bain B, Heller M, Toma S et al. The cytological features of NPM1-mutated acute myeloid leukemia. *Am J Hematol* 2015; 90(6):560.
7. Boddu P, Benton CB, Wang W et al. Erythroleukemia — Historical perspectives and recent advances in diagnosis and management. *Blood Rev* 2018; 32(2): 96—105. DOI: 10.1016/j.blre.2017.09.002.

8. Dohner H, Wei A, Appelbaum F et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2022 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood* 2022; 140(12):1345—1377.
9. Foucar K, His E, Wang S et al. Concordance among hematopathologists in classifying blasts plus promonocytes: A bone marrow pathology group study. *Int J Lab Hematol* 2020; 42(4):418—422.
10. Mufti GJ, Bennett JM, Goasguen J et al. Diagnosis and classification of myelodysplastic syndrome: International Working Group on Morphology of myelodysplastic syndrome (IWGM-MDS) consensus proposals for the definition and enumeration of myeloblasts and ring sideroblasts. *Haematologica* 2008; 93(11):1712—1717.
11. Goasguen JE, Bennett JM, Bain BJ et al. Quality control initiative on the evaluation of the dysmegakaryopoiesis in myeloid neoplasms: Difficulties in the assessment of dysplasia. *Leuka Res* 2016; 45:75—81.
12. Goasguen JE, Bennett JM, Bain BJ et al. Morphological evaluation of monocytes and their precursors. *Haematologica* 2009; 94(7):994—997.
13. Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J et al. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood* 2012; 120(12):2454—2465.
14. Kern W, Haferlach C, Schnittger S, Haferlach T. Clinical utility of multiparameter flow cytometry in the diagnosis of 1013 patients with suspected myelodysplastic syndrome: correlation to cytomorphology, cytogenetics, and clinical data. *Cancer* 2010; 116(19):4549—4563.
15. Khoury J, Solary E, Abla O et al. The 5th edition of the World Health Organization classification of haematolymphoid tumours: myeloid and histiocytic/dendritic neoplasms. *Leukemia* 2022; 36:1703—1719.
16. Malcovati L, Karimi M, Papaemmanuil E et al. SF3B1 mutation identifies a distinct subset of myelodysplastic syndrome with ring sideroblasts. *Blood* 2015; 126:233—2241.
17. Patnaik MM, Tefferi A. Refractory anemia with ring sideroblasts (RARS) and RARS with thrombocytosis (RARS-T) – “2019 Update on Diagnosis, Risk-stratification, and Management”. *Am J Hematol* 2019; 94(4):475—488.
18. Naymagon L, Marcellino B, Mascarenhas J. Eosinophilia in acute myeloid leukemia: overlooked and underexamined. *Blood Rev* 2019; 36:23—31.
19. Park BG, Chi HS, Jang S et al. Association of cup-like nuclei in blasts with FLT3 and NPM1 mutations in acute myeloid leukemia. *Ann Hematol* 2013; 92(4):451—457.
20. Pellagatti A, Boulwood J. The molecular pathogenesis of the myelodysplastic syndromes. *Eur J Haematol* 2015; 95(1):3—15.
21. Valent P, Orazi A, Steensma DP et al. Proposed minimal diagnostic criteria for myelodysplastic syndromes (MDS) and potential pre-MDS conditions. *Oncotarget* 2017; 8(43):73483—73500.
22. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL et al. (editors). WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Revised 4th ed. Lyon: IARC Press; 2017. P. 97—120.
23. Valent P, Sotlar K, Blatt K et al. Proposed diagnostic criteria and classification of basophilic leukemias and related disorders. *Leukemia* 2017; 31(4):788—797.

Приложение 1. Примеры заключения цитологического исследования аспирата костного мозга при миелодиспластических синдромах

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
ГЕМАТОЛОГИИ» МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ (ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России)

ФИО: _____ Пол: _____ Дата рождения (возраст): _____
Дата забора материала: _____ Отделение: _____ Назначил: _____

Цитологическое исследование пунктата костного мозга

НОМЕР ПРЕПАРАТА				0			
Клеточные элементы		Содержание, %		Клеточные элементы		Содержание, %	
		Результат	Норма			Результат	Норма
Бластные клетки		8,8	0,2–1,7	Эритробласты		0,4	0,2–1,1
Промиелоциты		0,6	1,0–4,1	Пронормобласты		0	0,1–1,2
Миелоциты	б	0	0	Нормобласты	б	2,0	1,4–4,6
	э	0,4	0,5–0,9		п	11,8	8,9–16,9
	н	23,8	7,0–12,2		о	9,0	0,8–5,6
Метамиелоциты	б	0	0	Промегалобласты		0	0
	э	0	0,1–0,3	Мегалобласты	б	0	0
	н	18,0	8,0–15,0		п	0	0
Общее кол-во незрелых гранулоцитов		42,8	–		о	0	0
Палочко-ядерные	б	0	0	Общее кол-во эритро-кариоцитов		23,2	14,6–26,6
	э	0	0–0,2	Тучные клетки		0	0–0,5
	н	5,8	12,8–23,7	Плазмобласты		0	0
Сегментоядерные	б	0	0–0,5	Проплазмocyты		0	0
	э	0,8	0,4–1,6	Плазматические клетки		0,2	0,1–1,8
	н	4,8	13,1–24,1	Общее кол-во плазматических клеток		0,2	0,1–1,8
Общее кол-во зрелых гранулоцитов		11,4	–	Мегакариocyты		Нормальное кол-во	Нормальное кол-во
Суммарно гранулоцитов		54,2	52,8–68,8	Индекс созревания эритрокариоцитов		0,9	0,8–0,9
Лимфобласты		0	0	Индекс созревания нейтрофилов		3,8	0,5–0,9
Пролимфоциты		0	0	Лейко-эритробластическое отношение	3,3	2,1–4,5	
Лимфоциты		11,6	4,3–13,7				
Общее кол-во лимфоидных клеток		11,6	11,6				
Промоноциты		0	0				
Моноциты		2,0	0,7–3,1				

Примечание: Пунктат костного мозга клеточный. Лейко-эритробластическое отношение не нарушено. Увеличено количество бластных клеток — 8,8% (агранулярные, при окраске на миелопероксидазу определяются палочки Ауэра). Гранулоцитарный росток в достаточном количестве, отмечается задержка созревания гранулоцитов. Признаки дисгранулопоза определяются в 10—29% клеток (гипогрануляция цитоплазмы). Эритроидный росток в достаточном количестве, эритропоз по нормобластическому типу, созревание эритрокариоцитов не нарушено. Признаки дизэритропоза выявляются в < 10% клеток. Мегакариоциты в достаточном количестве, отмечается задержка созревания клеток, признаки дисмегакариопоза — в 30—49% клеток (микроформы, фрагментация ядер). В редких полях зрения определяются макрофаги. Заключение: с учетом клинической картины заболевания цитоморфологическая картина не противоречит МДС с избытком бластов 2.

Врач клинической лабораторной диагностики

Дата:

Подпись

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
ГЕМАТОЛОГИИ» МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ (ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России)**

ФИО: _____ **Пол:** _____ **Дата рождения (возраст):** _____
Дата забора материала: _____ **Отделение:** _____ **Назначил:** _____

Цитологическое исследование пунктата костного мозга

НОМЕР ПРЕПАРАТА				0			
Клеточные элементы		Содержание, %		Клеточные элементы		Содержание, %	
		Результат	Норма			Результат	Норма
Бластные клетки		1,4	0,2–1,7	Эритробласты		0,6	0,2–1,1
Промиелоциты		0,4	1,0–4,1	Пронормобласты		0	0,1–1,2
Миелоциты	б	0	0	Нормобласты	б	2,6	1,4–4,6
	э	1,2	0,5–0,9		п	23,6	8,9–16,9
	н	15,4	7,0–12,2		о	9,4	0,8–5,6
Метамиелоциты	б	0	0	Промегалобласты		0	0
	э	0	0,1–0,3	Мегалобласты	б	0	0
	н	13,0	8,0–15,0		п	0	0
Общее кол-во незрелых гранулоцитов		30,0	—	Общее кол-во эритрокариоцитов	о	0	0
Палочко-ядерные	б	0	0		36,2	14,6–26,6	
	э	0	0–0,2	Тучные клетки		0,2	0–0,5
	н	5,0	12,8–23,7	Плазмобласты		0	0
Сегментоядерные	б	0,4	0–0,5	Проплазмocyты		0	0
	э	1,8	0,4–1,6	Плазматические клетки		0,4	0,1–1,8
	н	8,8	13,1–24,1	Общее кол-во плазматических клеток		0,4	0,1–1,8
Общее кол-во зрелых гранулоцитов		16,0	—	Мегакариocyты		Нормальное кол-во	Нормальное кол-во
Суммарно гранулоцитов		46,0	52,8–68,8				
Лимфобласты		0	0	Индекс созревания эритрокариоцитов		0,9	0,8–0,9
Пролимфоциты		0	0				
Лимфоциты		13,2	4,3–13,7	Индекс созревания нейтрофилов		1,9	0,5–0,9
Общее кол-во лимфоидных клеток		13,2	4,3–13,7	Лейко-эритробластическое отношение		1,8	2,1–4,5
Промоноциты		0	0				
Моноциты		2,6	0,7–3,1				

Примечание: Пунктат костного мозга клеточный. Соотношение ростков кроветворения нарушено. Количество бластных клеток не увеличено — 1,4%. Гранулоцитарный росток умеренно сужен, отмечается задержка созревания гранулоцитов. Признаки дисгранулопоэза определяются в 30–49% клеток (гипогрануляция цитоплазмы, пельгеризация ядер нейтрофилов). Эритроидный росток расширен, эритропоэз по нормобластическому типу, созревание эритрокариоцитов не нарушено. Признаки дизэритропоэза выявляются в > 50% клеток (фрагментация ядра, кариорексис, базофильная пунктация цитоплазмы). Мегакариоциты в достаточном количестве, их созревание не нарушено, признаки дисмегакариопоэза — в < 10% клеток. В редких полях зрения определяются макрофаги.

Заключение: с учетом клинической картины заболевания дифференциальный диагноз следует проводить между МДС с мультилинейной дисплазией и вторичными нарушениями гемопоэза.

Врач клинической лабораторной диагностики

Дата:

Подпись

Приложение 2. Примеры заключения цитологического исследования аспирата костного мозга при ОМЛ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
ГЕМАТОЛОГИИ» МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ (ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России)

ФИО: _____ Пол: _____ Дата рождения (возраст): _____
Дата забора материала: _____ Отделение: _____ Назначил: _____

Цитологическое исследование пунктата костного мозга

НОМЕР ПРЕПАРАТА				0			
Клеточные элементы		Содержание, %		Клеточные элементы		Содержание, %	
		Результат	Норма			Результат	Норма
Бластные клетки		77,0	0,2–1,7	Эритробласты		0	0,2–1,1
Промиелоциты		0	1,0–4,1	Пронормобласты		0	0,1–1,2
Миелоциты	б	0	0	Нормобласты	б	0	1,4–4,6
	э	0	0,5–0,9		п	5,6	8,9–16,9
	н	0,8	7,0–12,2		о	2,4	0,8–2,4
Метамиелоциты	б	0	0	Промегалобласты		0	0
	э	0	0,1–0,3	Мегалобласты	б	0	0
	н	0	8,0–15,0		п	0	0
Общее кол-во незрелых гранулоцитов		0,8	—		о	0	0
Палочко-ядерные	б	0	0	Общее кол-во эритро-кариоцитов		8,0	14,6–26,6
	э	0	0–0,2	Тучные клетки		0	0–0,5
	н	0	12,8–23,7	Плазмобласты		0	0
Сегментоядерные	б	0	0–0,5	Проплазмоциты		0	0
	э	0	0,4–1,6	Плазматические клетки		0	0,1–1,8
	н	4,2	13,1–24,1	Общее кол-во плазматических клеток		0,4	0,1–1,8
Общее кол-во зрелых гранулоцитов		4,2	—	Мегакариоциты		не обнаружены	Нормальное кол-во
Суммарно гранулоцитов		5,0	52,8–68,8				
Лимфобласты		0	0	Индекс созревания эритрокариоцитов		1,0	0,8–0,9
Пролимфоциты		0	0				
Лимфоциты		9,2	4,3–13,7	Индекс созревания нейтрофилов		0,2	0,5–0,9
Общее кол-во лимфоидных клеток		9,2	11,6	Лейко-эритробластическое отношение		11,5	2,1–4,5
Промоноциты		0	0				
Моноциты		0,4	0,7–3,1				

Примечание: Пунктат костного мозга клеточный. Лейко-эритробластическое отношение нарушено. Увеличено количество бластных клеток — 77,0% (средних размеров с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением, неправильной формой ядра, нежносетчатым хроматином, четкими нуклеолами, агранулярные). Гранулоцитарный росток значительно сужен — 5,0% (< 10%). Признаки дисгранулопоэза определяются в < 50% клеток. Эритроидный росток сужен — 8,0%, признаки дизэритропоэза выявляются в < 50% клеток. Мегакариоциты не обнаружены.

Заключение: цитоморфологическая картина с учетом данных цитохимического исследования (заключение №...) соответствует ОМЛ без созревания.

Врач клинической лабораторной диагностики

Дата:

Подпись

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
ГЕМАТОЛОГИИ» МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ (ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России)**

ФИО: _____ **Пол:** _____ **Дата рождения (возраст):** _____
Дата забора материала: _____ **Отделение:** _____ **Назначил:** _____

Цитологическое исследование пункта костного мозга

НОМЕР ПРЕПАРАТА				0			
Клеточные элементы		Содержание, %		Клеточные элементы		Содержание, %	
		Результат	Норма			Результат	Норма
Бластные клетки		18,4	0,2—1,7	Эритробласты		0,8	0,2—1,1
Промиелоциты		0,4	1,0—4,1	Пронормобласты		0	0,1—1,2
Миелоциты	б	0	0	Нормобласты	б	4,0	1,4—4,6
	э	0	0,5—0,9		п	16	8,9—16,9
	н	4,2	7,0—12,2		о	8,8	0,8—5,6
Метамиелоциты	б	0	0	Промегалобласты		0	0
	э	0	0,1—0,3	Мегалобласты	б	0	0
	н	1,2	8,0—15,0		п	0	0
Общее кол-во незрелых гранулоцитов		5,8	—	Общее кол-во эритрокариоцитов	о	0	0
Палочко-ядерные	б	0	0		29,6	14,6—26,6	
	э	0	0—0,2	Тучные клетки		0	0—0,5
	н	6,0	12,8—23,7	Плазмобласты		0	0
Сегментоядерные	б	0	0—0,5	Проплазмocyты		0	0
	э	0,4	0,4—1,6	Плазматические клетки		0	0,1—1,8
	н	10,2	13,1—24,1	Общее кол-во плазматических клеток		0	0,1—1,8
Общее кол-во зрелых гранулоцитов		16,6	—	Мегакариocyты	единичные	Нормальное кол-во	
Суммарно гранулоцитов		22,4	52,8—68,8				
Лимфобласты		0	0	Индекс созревания эритрокариоцитов		0,8	0,8—0,9
Пролимфоциты		0	0	Индекс созревания нейтрофилов		0,6	0,5—0,9
Лимфоциты		4,8	4,3—13,7	Лейко-эритробластическое отношение	2,4	2,1—4,5	
Общее кол-во лимфоидных клеток		4,8	11,6				
Промоноциты		20,8	0				
Моноциты		4,0	0,7—3,1				

Примечание: Пунктат костного мозга клеточный. Лейко-эритробластическое отношение не нарушено. Увеличено количество бластных клеток — 18,4% (средних размеров с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением, округлым ядром, нежносетчатым хроматином, четкими нуклеолами; часть клеток с азурофильной зернистостью) и про-моноцитов (бластных эквивалентов) — 20,8%, суммарно — 39,6%. Гранулоцитарный росток сужен — 22,4% (> 20%). Признаки дисгранулопоэза — в > 50% клеток (гипогрануляция цитоплазмы). Моноцитарный росток значительно расширен, суммарно — 24,8% (> 20%). Эритроидный росток умеренно расширен, признаки дизэритропоэза — в > 50% клеток (фрагментация ядра, кариорексис, двухъядерные формы). Мегакариоциты единичные, нормальной морфологии.

Заключение: цитоморфологическая картина с учетом данных цитохимического исследования (заключение №...) соответствует миеломоноцитарному варианту ОМЛ. Мультилинейная дисплазия.

Врач клинической лабораторной диагностики

Дата:

Подпись

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
ГЕМАТОЛОГИИ» МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ (ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России)**

ФИО: _____ **Пол:** _____ **Дата рождения (возраст):** _____
Дата забора материала: _____ **Отделение:** _____ **Назначил:** _____

Цитологическое исследование пунктата костного мозга

НОМЕР ПРЕПАРАТА				0			
Клеточные элементы		Содержание, %		Клеточные элементы		Содержание, %	
		Результат	Норма			Результат	Норма
Бластные клетки		16,8	0,2—1,7	Эритробласты		0,2	0,2—1,1
Промиелоциты		3,2	1,0—4,1	Пронормобласты		0	0,1—1,2
Миелоциты	б	0	0	Нормобласты	б	0,8	1,4—4,6
	э	0,8	0,5—0,9		п	8,8	8,9—16,9
	н	15,8	7,0—12,2		о	3,0	0,8—5,6
Метамиелоциты	б	0	0	Промегалобласты		0	0
	э	0	0,1—0,3	Мегалобласты	б	0	0
	н	8,6	8,0—15,0		п	0	0
Общее кол-во незрелых гранулоцитов		28,4	—		о	0	0
Палочко-ядерные	б	0	0	Общее кол-во эритро-кариоцитов		12,8	14,6—26,6
	э	0	0—0,2	Тучные клетки		0,4	0—0,5
	н	10,8	12,8—23,7	Плазмобласты		0	0
Сегменто-ядерные	б	0,2	0—0,5	Проплазмocyты		0	0
	э	1,6	0,4—1,6	Плазматические клетки		1,2	0,1—1,8
	н	16,6	13,1—24,1	Общее кол-во плазма-тических клеток		1,2	0,1—1,8
Общее кол-во зре-лых гранулоцитов		29,2	—	Мегакариocyты		Нор-мальное кол-во	Нор-мальное кол-во
Суммарно грануло-цитов		57,6	52,8—68,8				
Лимфобласты		0	0	Индекс созревания эритрокариоцитов		0,9	0,8—0,9
Пролимфоциты		0	0				
Лимфоциты		8,8	4,3—13,7	Индекс созревания нейтрофилов		1,0	0,5—0,9
Общее кол-во лим-фоидных клеток		8,8	11,6	Лейко-эритробластиче-ское отношение		6,8	2,1—4,5
Промоноциты		0	0				
Моноциты		2,4	0,7—3,1				

Примечание: Пунктат костного мозга гиперклеточный. Лейко-эритробластическое отношение нарушено. Увеличено количество бластных клеток — 16,8% (средних и крупных размеров с умеренным ядерно-цитоплазматическим отношением, округлым ядром, нежносетчатым хроматином, четкими нуклеолами; часть клеток с перинуклеарным просветлением, азурофильной зернистостью, палочками Ауэра). Гранулоцитарный росток в достаточном количестве, созревание клеток не нарушено. Часть незрелых гранулоцитов с двудольчатым ядром. Признаки дисгранулопоэза — в > 50% клеток (пельгеризация ядра, гранулы Чедиака—Хигаси, единичные нейтрофилы с палочкой Ауэра). Эритроидный росток умеренно сужен, эритропоэз по нормобластическому типу, созревание не нарушено. Признаков дизэритропоэза нет. Мегакариоциты в достаточном количестве, нормальной морфологии. В частых полях зрения определяются макрофаги.

Заключение: цитоморфологическая картина не противоречит ОМЛ с *RUNX1::RUNX1T1*, необходимо цитогенетическое подтверждение. Дифференциальный диагноз следует проводить с другими вариантами ОМЛ с определяющими генетическими аномалиями и МДС с избытком бластов 2.

Врач клинической лабораторной диагностики

Дата:

Подпись

Глава 4.

Принципы диагностики острых лейкозов и лимфом методом проточной цитометрии

Диагностика острых лейкозов методом проточной цитометрии

Иммунофенотипическое (ИФТ) исследование с помощью проточной цитофлуориметрии — чувствительный метод для определения линейной принадлежности опухолевых клеток при острых лейкозах (ОЛ).

В результате ИФТ-исследования процент опухолевых клеток может оказаться более низким, чем при подсчете миелограммы. Этот феномен вполне логичен и возникает вследствие ряда причин. Первая причина — разбавление образца костного мозга периферической кровью. При выполнении аспирации костного мозга содержание миелокариотитов в первой порции образца превышает клеточность второй порции более чем в три раза. Примесь периферической крови в пробе костного мозга меняет соотношение клеточных популяций, поэтому процент бластных клеток может оказаться недостоверным. Другая причина — разрушение или механическое удаление клеток из исследуемого материала после химического и механического воздействия в процессе пробоподготовки для ИФТ-исследования.

Таким образом, цитологическое исследование остается «золотым стандартом» для определения количества бластных клеток в костном мозге, так как отражает более достоверные данные.

В то же время проточная цитометрия имеет несомненное преимущество для качественной оценки клеточных субпопуляций нормального костного мозга перед цитологическим исследованием. Иммунофенотипирование позволяет более подробно изучить лимфоциты, малочисленные популяции клеток, которые при микроскопии могут быть упущены. При подсчете мазка анализируется 500 клеток, а проточный цитометр оценивает десятки и сотни тысяч событий.

Один из основных способов разделения клеток на различные популяции при ИФТ-исследовании — оценка степени бокового светорассеяния (SSC, отображает сложность структуры клетки) и интенсивности экспрессии CD45 (общелейкоцитарный антиген, позитивен на всех лейкоцитах и негативен на клетках эритроидного ряда) (рис. 1).

При острых лейкозах в большинстве случаев отмечается увеличение событий в регионе предшественников (бластный регион) (рис. 2), однако опухолевые клетки могут располагаться и в других областях графика.

Главная задача проточной цитометрии в диагностике острых лейкозов — оценить ИФТ-характеристики опухолевых клеток и определить их принадлежность к какой-либо из трех основных линий дифференцировки (миелоидной, В- и Т-линейной) или более редким вариантам ОЛ.

Острый миелоидный лейкоз

Клетки миелоидной линии развиваются в костном мозге из общего кроветворного предшественника. В начале развития они экспрессируют маркеры, характерные для ранней стадии дифференцировки: CD34 — лиганд к одной из молекул адгезии лейкоцитов; CD117 — рецептор фактора стволовых клеток (stem-cell factor) или c-kit, оказывающий влияние на начальные процессы дифференцировки гемопоэтических клеток; HLA-DR — одна из молекул главного комплекса гистосовместимости (major histocompatibility complex II — МНС II).

Бластные клетки при остром миелоидном лейкозе (ОМЛ) чаще всего экспрессируют вышеуказанные маркеры предшественников (CD34, CD117, HLA-DR) и в редких случаях — TdT [терминальная дезокси-нуклеотидилтрансфераза (terminal deoxynucleotidyl transferase) — специализированная ДНК-полимераза, в норме добавляет N-нуклеотиды при реаранжировке генов Т- и В-клеточных рецепторов, усиливая их вариабельность].

Эти маркеры отражают раннюю степень дифференцировки клеток и позволяют подтвердить диагноз ОЛ. В некоторых случаях экспрессия ранних маркеров может быть снижена по сравнению с нормальными предшественниками или частично отсутствовать.

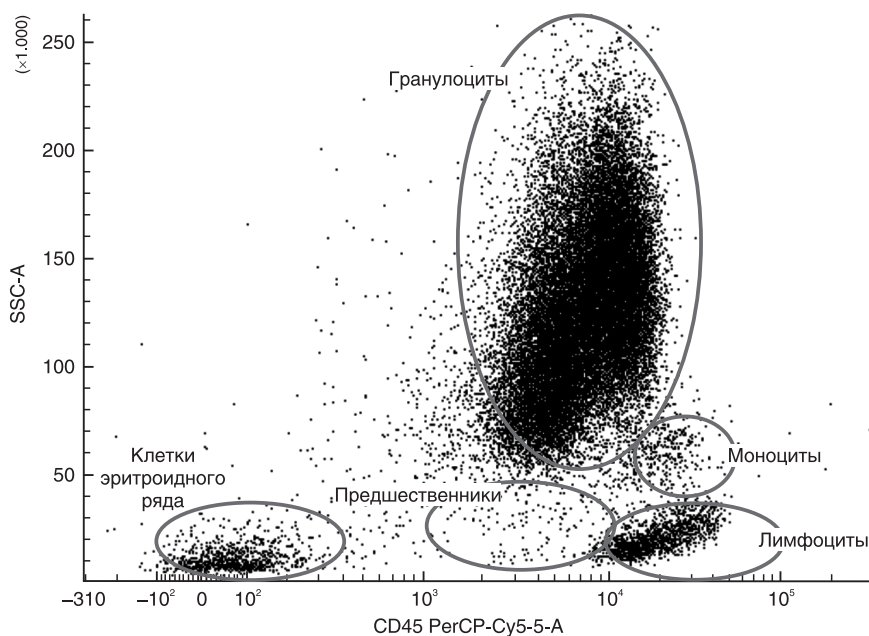


Рисунок 1. Донор. ИФТ-исследование клеток костного мозга. Соотношение экспрессии CD45 и бокового светорассеяния (SSC).

- Лимфоциты имеют наиболее яркую экспрессию CD45 и наименьшее количество гранул.
- Гранулоциты имеют менее интенсивную экспрессию CD45 и наиболее высокую гранулярность.
- Моноциты занимают промежуточное положение.
- Область слева от лимфоцитов и моноцитов называют **регионом предшественников**, где ближе к оси X располагаются В-линейные предшественники, а немного выше — миелоидные. Их фенотип обозначают CD45 low (слабая экспрессия).
- Негативными по CD45 являются ядросодержащие эритроидные клетки, устойчивые к лизирующим реактивам. Также в эту зону могут попасть тромбоциты и разрушенные в процессе пробоподготовки клетки, опухолевые клетки при множественной миеломе, клетки негемопэтической природы.

Для подтверждения миелоидной направленности опухолевых клеток необходимо оценить экспрессию **миелоидных** антигенов. Миелопероксидаза (МПО) — линейно-специфический маркер миелоидной линии, является лизосомальным ферментом гранулоцитов. К менее специфичным миелоид-ассоциированным антигенам относятся CD11b, CD11c, CD13, CD15, CD16, CD33, CD64, CD65, CD66b, лизоцим и другие (рис. 2). МПО экспрессируется опухолевыми клетками не во всех случаях ОМЛ, и диагноз устанавливают на основании выявления

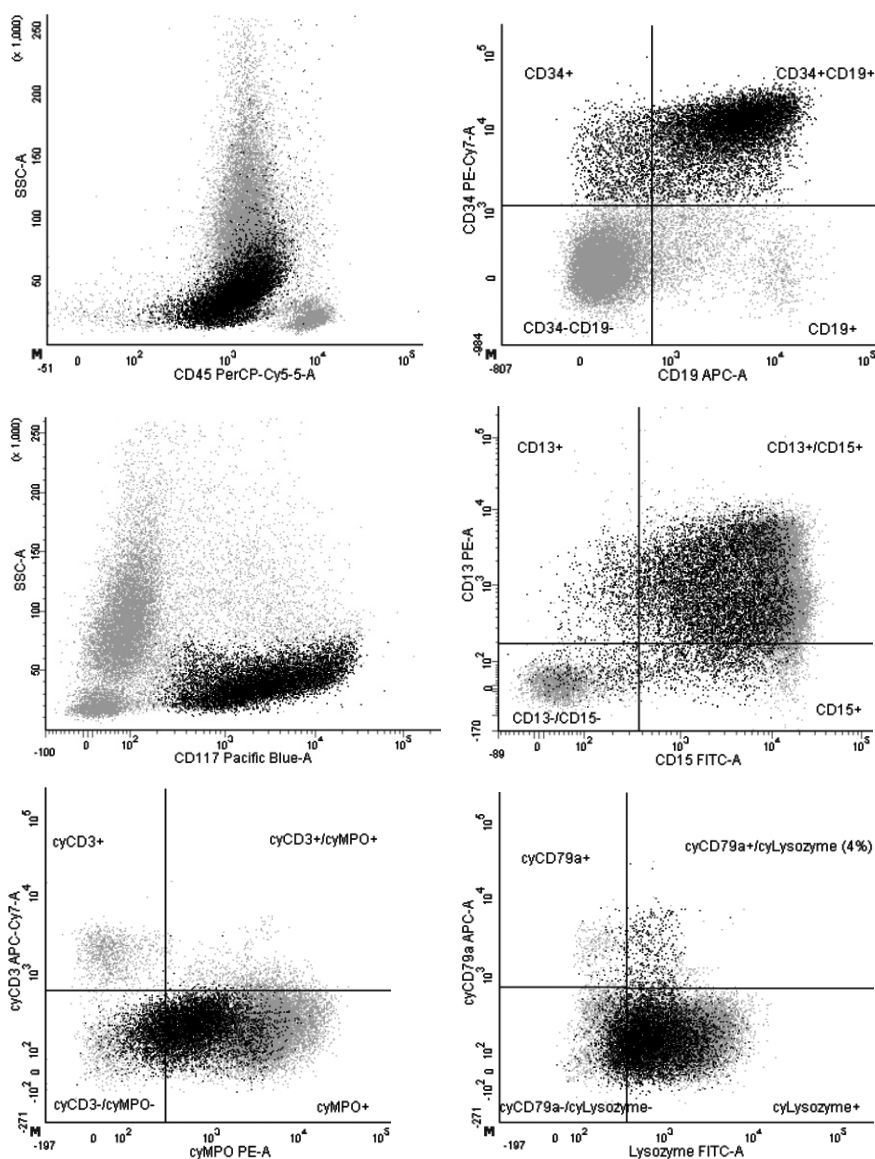


Рисунок 2. Пациент Л. ИФТ-исследование клеток костного мозга. ОМЛ CD19+.

Опухолевые клетки (выделены черным цветом) позитивны по CD45, CD34, CD19, CD117, CD13, CD15, МРО (МПО), Lysozyme (лизозим); негативны по cyCD79a, cyCD3, а также CD10, cyCD22, cyIgM, surfIgM (не представлены на рисунке), что соответствует ОМЛ с коэкспрессией CD19. При цитогенетическом исследовании выявлена t(8;21)(q22;q22.1). ОМЛ — острый миелоидный лейкоз; cy — цитоплазматический; surf — мембранный.

менее специфичных маркеров, указанных выше, при условии, что исключен острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ).

Опухолевые клетки также могут условно соответствовать более зрелым стадиям нормальной дифференцировки, в частности, при остром промиелоцитарном лейкозе (ОПЛ) субстрат опухоли представлен аномальными промиелоцитами, которые являются бластными эквивалентами (рис. 3).

Они имеют высокие значения SSC (бокового светорассеяния), сравнимые со зрелыми гранулоцитами, экспрессируют миелоидные маркеры дифференцировки (CD13, CD33, МПО и др.). Как правило, CD34 и HLA-DR отсутствуют, а CD117 положителен во многих случаях, но его экспрессия может быть снижена. Лейкемические клетки при ОПЛ чаще CD117+CD11b-, тогда как нормальные промиелоциты CD117-CD11b+. Также может наблюдаться коэкспрессия CD2, особенно характерная для микрогранулярной формы ОПЛ (рис. 4). Представленные выше ИФТ-характеристики не высоко специфичны и гарантированно свидетельствуют лишь о миелоидной направленности бластных клеток. Окончательный диагноз может быть установлен только при сопоставлении морфологических и, главным образом, цитогенетических и молекулярно-генетических данных.

Ранними клетками **моноцитарного** ряда являются монобласты и промоноциты. Монобласты экспрессируют маркеры предшественников CD34, CD117, HLA-DR, но экспрессия последнего (HLA-DR), в отличие от других миелоидных клеток, сохраняется в процессе созревания моноцитов. Затем последовательно появляются CD64, CD36, CD33, CD11c, CD11b, CD4, CD14, и к стадии промоноцита интенсивность экспрессии этих маркеров достигает максимума, а антигены ранней стадии дифференцировки (CD34, CD117) полностью утрачиваются (рис. 5, 6). Содержание монобластов и промоноцитов в костном мозге в норме крайне мало. Встречаются случаи, когда среди опухолевой популяции преобладают промоноциты, а CD34-позитивных бластов лишь небольшой процент. Тем не менее будет правомочен диагноз ОМЛ, так как монобласты и промоноциты тоже относятся к предшественникам миелоидного ряда и считаются бластными эквивалентами (рис. 7).

Зрелые моноциты в норме экспрессируют CD14, CD11c и CD33 с высокой интенсивностью, CD36, CD64 и лизоцим; в периферической крови их циркулирует до 10%, а в костном мозге — около 1,2%. При воспалительных процессах клетки активируются, превращаясь в провоспалительные моноциты, на которых снижается CD14 и увеличиваются CD16, HLA-DR. В данном случае HLA-DR не является ранним

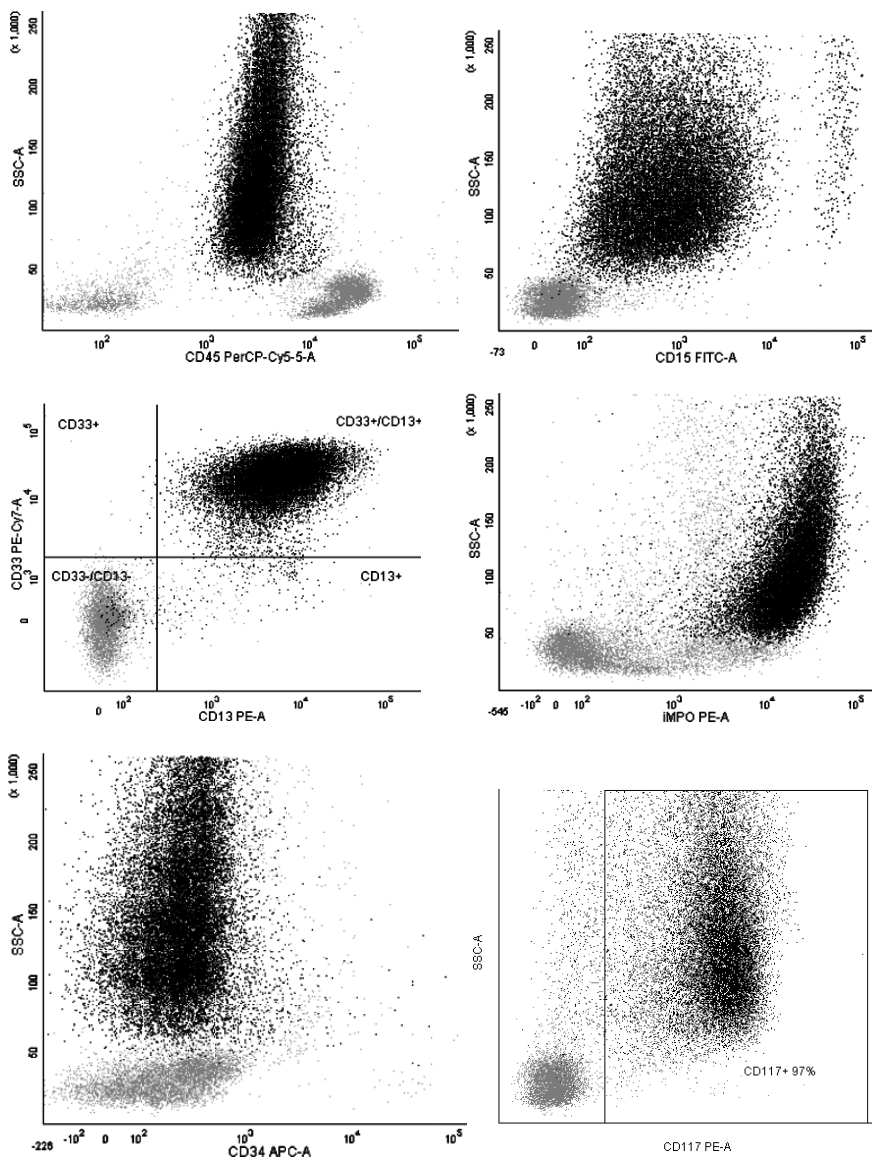


Рисунок 3. Пациент С. ИФТ-исследование клеток костного мозга. ОМЛ. Опухолевые клетки (выделены черным цветом) имеют высокое значение бокового светорассеяния (SSC), позитивны по CD45, CD117, CD13, CD33, CD15, МПО; негативны по CD34, что соответствует ОМЛ. При цитогенетическом исследовании выявлена $t(15;17)(q22-24;q21)$.

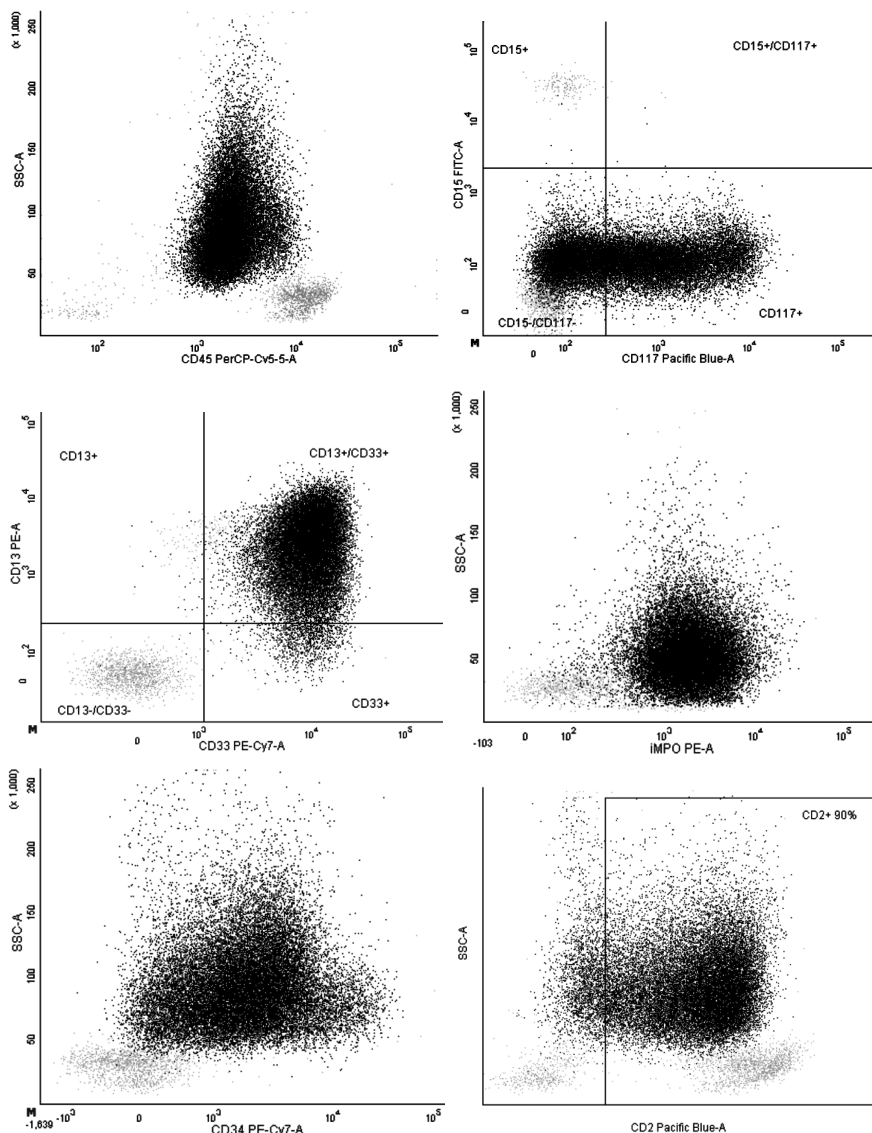


Рисунок 4. Пациент К. ИФТ-исследование клеток костного мозга. ОМЛ CD2+.

Опухолевые клетки (выделены черным цветом) позитивны по CD45, CD117, CD13, CD33, МПО, CD34, CD2; негативны по CD15, cyCD3, CD19, cyCD79a (не представлены на рисунке), что соответствует ОМЛ. При цитогенетическом исследовании выявлена $t(15;17)(q22;q11-12)$.

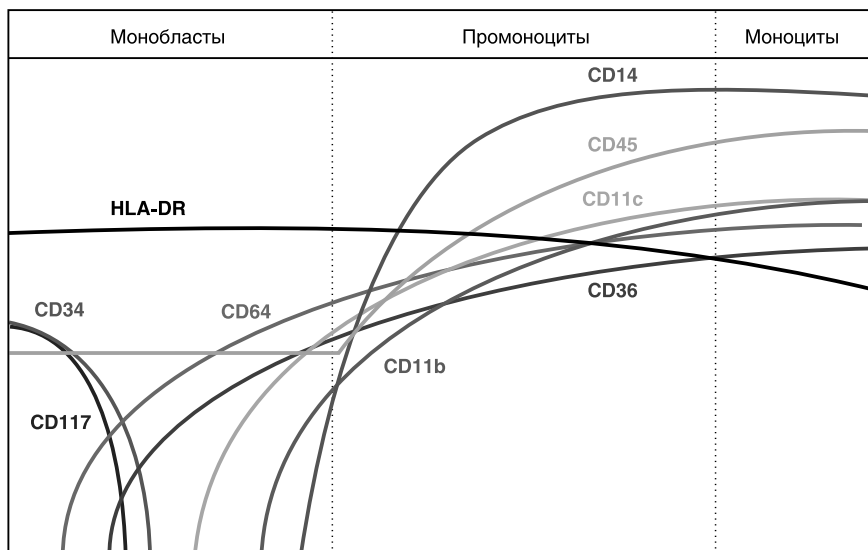


Рисунок 5. Экспрессия антигенов в процессе моноцитарной дифференцировки. Из: A. Orfao, ELNet Flow MDS 2008—2017, Amsterdam.

маркером, а нарастает в процессе созревания, так как это одна из молекул комплекса гистосовместимости, в составе которого моноциты презентруют антиген другим клеткам иммунной системы.

Эритроидные предшественники в начале дифференцировки экспрессируют CD105, CD71, CD36, однако специфичным для эритроидной линии является CD235a (гликофорин А), который характерен для более зрелых стадий развития. При остром эритролейкозе опухолевые клетки имеют иммунофенотип, схожий с ранними эритроидными предшественниками. В типичных случаях они не несут антигенов миелоидной линии, включая МПО, а также отрицательны по CD45. Для них не характерна экспрессия CD34, HLA-DR, но CD117 может быть позитивен. Экспрессия CD235a чаще гетерогенна или даже может быть негативна.

Мегакариобластный вариант ОЛ не имеет четких морфоцитохимических характеристик и устанавливается на основании ИФТ-исследования (рис. 8). Для бластных клеток характерна экспрессия мегакариоцитарных маркеров CD41a и CD61, а CD42b (тромбоцитарный гликопротеин, который в норме появляется на более зрелых стадиях) чаще отрицателен. CD36 (неспецифичный маркер, характерный для моноцитоидной, эритроцитарной и мегакариоцитарной линий) с высокой частотой позитивен на мегакариобластах. Опухолевые клетки

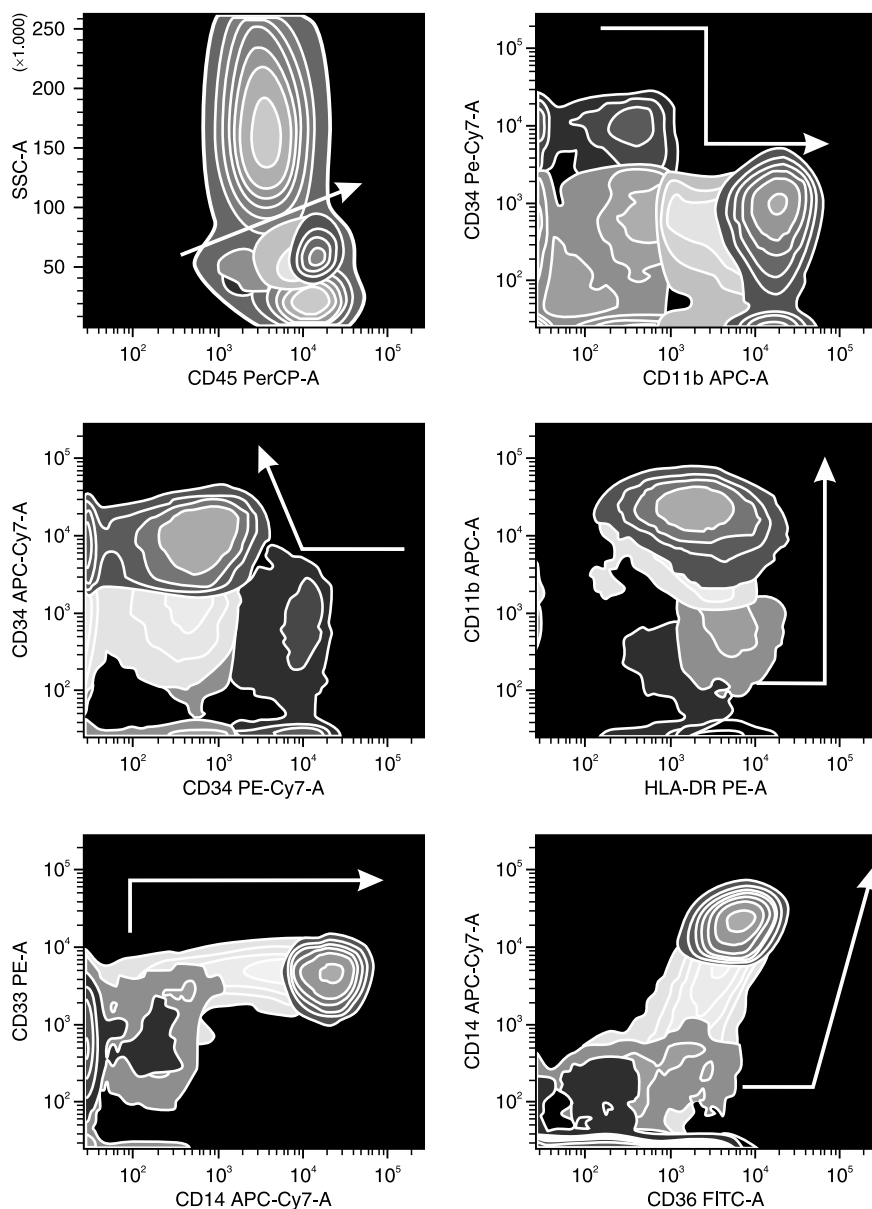


Рисунок 6. Моноцитарная дифференцировка (стрелкой указано направление вызревания от монобластов к моноцитам). Из: A. Orfao, ELNet Flow MDS 2008—2017, Amsterdam.

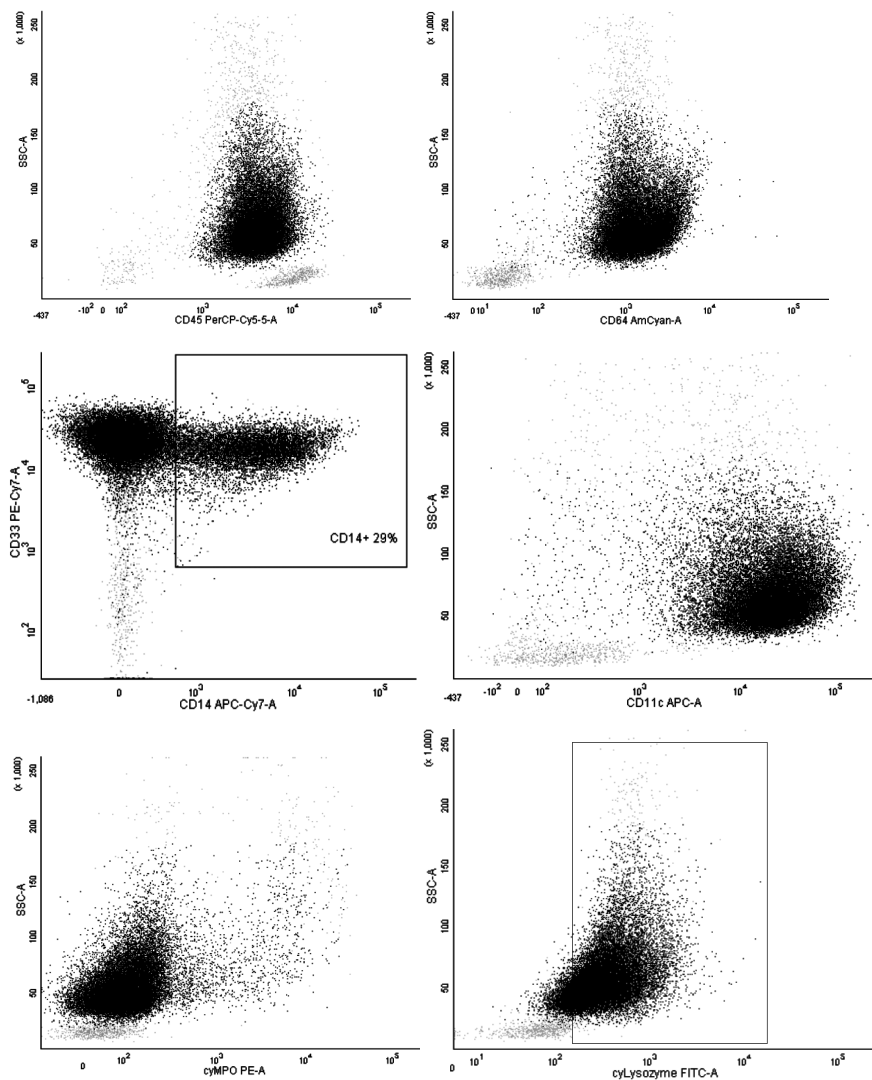


Рисунок 7. Пациент П. ИФТ-исследование клеток костного мозга. ОМЛ. Опухолевые клетки (выделены черным цветом) позитивны по CD45, CD64, CD33 (яркая экспрессия), CD14 (гетерогенная экспрессия), CD11c (яркая экспрессия), Lysozyme, CD11b, HLA-DR, CD36 (гетерогенная экспрессия); негативны по МПО, CD34. Опухолевые клетки условно соответствуют монобlastам и промиелоцитам с aberrантным иммунофенотипом.

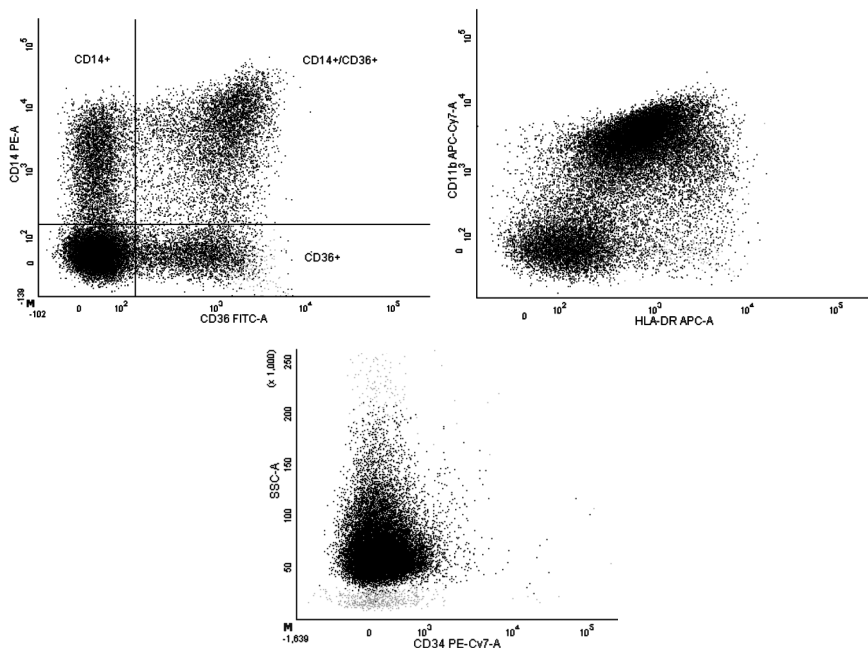


Рисунок 7 (окончание). Пациент П. ИФТ-исследование клеток костного мозга. ОМЛ.

обычно не несут ранних маркеров (CD34, HLA-DR) и общелейкоцитарного CD45. Из миелоид-ассоциированных антигенов возможна экспрессия CD13, CD33. МПО и остальные маркеры миелоидной линии негативны.

При остром **базофильном** лейкозе опухолевые клетки обычно позитивны по CD123, CD203c и CD11b. В отличие от зрелых базофилов, они могут нести ранние маркеры CD34 и HLA-DR; может наблюдаться коэкспрессия CD13 и/или CD33. Опухолевые клетки часто позитивны по CD9, иногда несут поверхностный CD22 и ядерный TdT. Слабая экспрессия CD117 или ее отсутствие позволяет разделить клетки базофильной направленности от тучных клеток, для последних всегда характерен ярко позитивный CD117.

В случаях ОМЛ довольно часто встречается aberrantная экспрессия лимфоидных маркеров:

- CD2 относится к лимфоидным антигенам, в норме экспрессируется тимоцитами, зрелыми Т- и NK-клетками. Острый миелобластный лейкоз с коэкспрессией CD2 встречается с частотой до 34%, возможно, ассоциирован с экстрамедуллярным поражением (рис. 4).

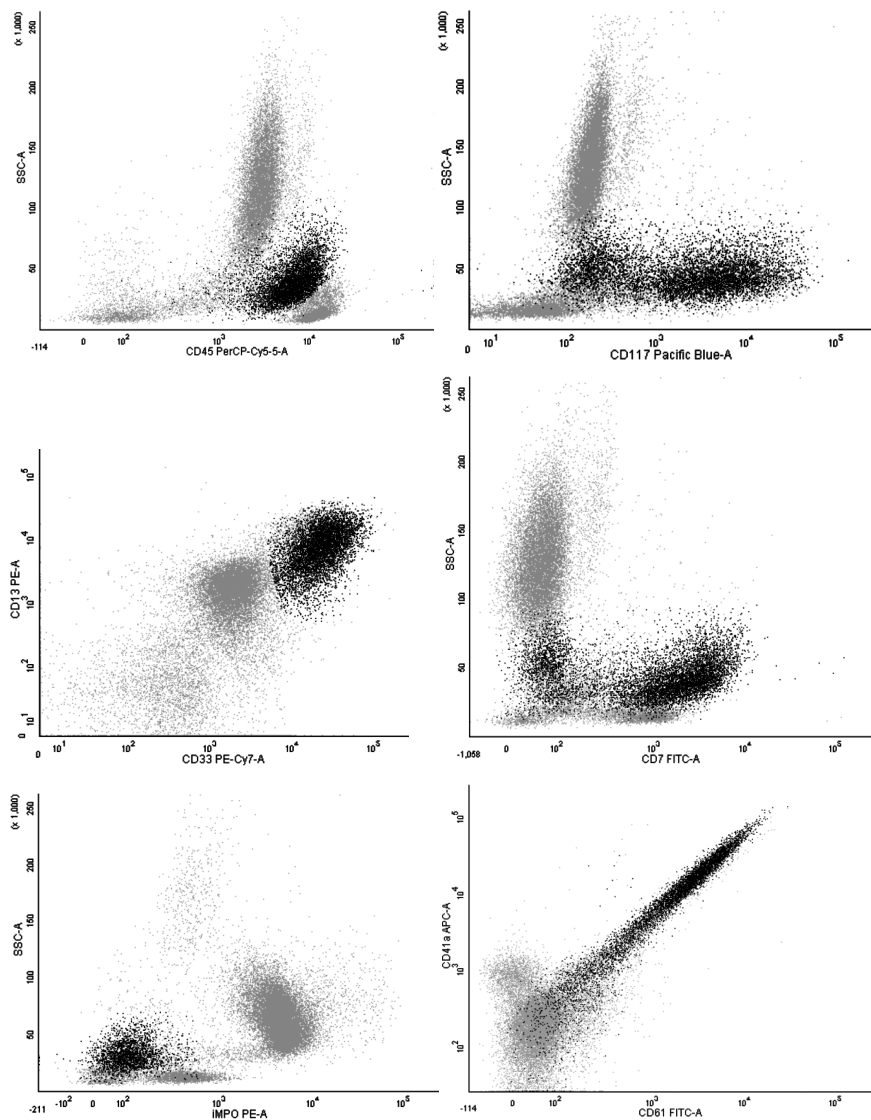


Рисунок 8. Пациент Б. ИФТ-исследование клеток костного мозга. ОМЛ (мегакариобластный вариант) CD7+. Опухолевые клетки (выделены черным цветом) позитивны по CD45, CD117, CD13, CD33, CD7, **CD41a**, **CD61**; негативны по МПО, CD34 (не представлен на рисунке), что соответствует мегакариобластному варианту ОМЛ с коэкспрессией CD7.

- CD7 в норме экспрессируется на лимфоидных и миелоидных предшественниках, тимocyтах, Т- и NK-клетках. CD7 позитивен при ОМЛ в 30% случаев (рис. 8).
- CD19 является линейно-ассоциированным В-клеточным маркером. Коэкспрессия CD19 встречается с частотой до 22% и характерна для ОМЛ с *RUNX1::RUNX1T1* (рис. 2).
- CD56 — молекула адгезии (neural cell adhesion molecule, NCAM); в норме экспрессируется NK-, NKT-лимфоцитами и небольшой популяцией моноцитов. Встречается с частотой до 29% среди острых монобластных лейкозов. В сочетании с CD19 и CD34 часто выявляется при ОМЛ с *RUNX1::RUNX1T1*.
- NG2 — хондроитин сульфат протеогликан (нейроглиальный антиген 2), линейно-неограниченный маркер, в норме экспрессируется на небольшом количестве гемопоэтических предшественников и ранних предшественниках плазмocитоидных дендритных клеток. Его экспрессия при ОЛ коррелирует с генетическими перестройками гена *KMT2A*, расположенного на длинном плече 11-й хромосомы в локусе 11q23, что является фактором крайне неблагоприятного прогноза. При остром миелобластном лейкозе NG2 позитивен примерно в 14% случаев.

Случаи коэкспрессии лимфоидных маркеров на бластных клетках ОМЛ должны быть четко отделены от ОЛ смешанного фенотипа (подробное описание признаков ОЛ смешанного фенотипа изложено ниже).

Таким образом, при диагностике ОМЛ наиболее специфичным является обнаружение МПО в цитоплазме опухолевых клеток. Если при иммунофенотипировании или цитохимическом исследовании данный маркер отрицательный, то для установления миелоидного варианта ОЛ необходимо исследовать другие миелоидные антигены, включая маркеры редких форм ОМЛ (эритроидный, мегакариобластный), а также исключить лимфоидный вариант дифференцировки опухолевых клеток (см. разд. «Острые лимфобластные лейкозы»).

Несмотря на возможности проточной цитофлуориметрии, иногда трудно полностью сопоставить морфоцитохимические данные и ИФТ-данные. Эти подходы дополняют друг друга, характеризуя опухолевые клетки с разных сторон.

Острые лимфобластные лейкозы

В-лимфобластный лейкоз/лимфома

Классификация Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) выделяет варианты В-ОЛЛ/лимфомы, как и других ОЛ, на основании ге-

нетических характеристик. Установить В-линейную направленность — задача проточной цитофлуориметрии.

Все этапы созревания В-лимфоцитов происходят в костномозговой нише при активном участии стромальных клеток костного мозга. Под воздействием различных цитокинов мультипотентный предшественник получает сигнал к В-линейной дифференцировке, суть которой — формирование (реаранжировка) гена В-клеточного рецептора (BCR) с последующей экспрессией самого рецептора на поверхности клетки. BCR представляет собой молекулу иммуноглобулина (Ig), а также дополнительных компонентов — CD79 α , CD79 β , способствующих проведению сигнала в клетку. Ig, в свою очередь, состоит из двух тяжелых и двух легких цепей, соединенных между собой. Из пяти разновидностей тяжелых цепей (α , γ , δ , ϵ , μ) в костном мозге формируется сначала μ -, а затем δ -цепь. Все остальные варианты рецептора появляются в периферических лимфоидных органах, когда после встречи наивного В-лимфоцита с антигеном запускается переключение классов Ig.

Самый ранний В-предшественник — **про-В** клетка. На этой стадии начинает формироваться ген тяжелой цепи Ig BCR и появляются первые признаки принадлежности В-линии — экспрессия CD19 (ко-рецептор В-клеток, после активации BCR способствует передаче сигнала на внутриклеточные сигнальные пути). Предшественники В-клеток, называемые гематогонами, также демонстрируют экспрессию CD34, CD38, TdT, а на самых начальных этапах — CD117. Затем появляется CD10, значение этого антигена в онтогенезе в настоящее время не совсем ясно, однако среди В-ОЛЛ фенотип CD19+CD10+ является наиболее распространенным, такой вариант лейкоза называют “**common**” (обычный). К этому времени в цитоплазме клетки выявляется экспрессия цитоплазматического CD79a (cyCD79a) и цитоплазматического CD22 (cyCD22) (ингибиторный ко-рецептор BCR).

Дальнейший этап, обозначаемый **пре-В** стадией, характеризуется завершением перестройки гена тяжелой цепи Ig, появлением молекулы тяжелой μ -цепи внутри клетки и началом процесса реаранжировки гена легкой цепи Ig. В этот момент слабо экспрессируется CD20, а интенсивность ранних CD10, CD34, CD38 и TdT снижается.

Так называемые **незрелые** В-клетки имеют полностью сформированный иммуноглобулин М (IgM) в составе BCR на поверхности, а **зрелые** наивные В-лимфоциты дополнительно экспрессируют IgD. Клетки приобретают полностью зрелый иммунофенотип: позитивны по CD19, утрачивают ранние маркеры (CD10, CD34, CD38, TdT), молекулы CD22 и CD79a выходят на поверхность, интенсивность экспрессии CD20 увеличивается. Дальнейшее созревание происходит

в периферических органах иммунной системы, куда зрелые наивные В-лимфоциты попадают с током крови.

Таким образом, к основным маркерам В-клеточных предшественников относят **CD19, cyCD79a, cyCD22**, CD10, CD20, однако ни один из них не специфичен.

В случае диагностики В-ОЛЛ/лимфомы должна выявляться комбинация из нескольких основных В-линейных антигенов: **CD19, cyCD79a, cyCD22**, также могут быть позитивны: surfCD22, CD10, CD20, CD24, CD34, HLA-DR, TdT. CD45 чаще позитивен, но может отсутствовать. Миелоид-ассоциированные антигены CD13 и CD33 могут быть позитивны, наличие их не исключает диагноз В-ОЛЛ/лимфомы. Также на лимфобластах может наблюдаться экспрессия линейно-неограниченных антигенов CD38, CD58, CD81.

Помимо классификации ВОЗ существует классификация Европейской группы иммунологической характеристики острых лейкозов (EGIL). В ней выделяют 4 варианта иммунофенотипа В-ОЛЛ, условно соответствующие стадиям развития гематогониев.

- VI — бластные клетки экспрессируют CD19, cyCD79a, cyCD22, ядерную TdT, отсутствуют CD10, тяжелые и легкие цепи иммуноглобулина (рис. 9);
- VII (“common” В-ОЛЛ) — CD10-позитивен, тяжелые и легкие цепи иммуноглобулина отрицательны;
- VIII — выявляется тяжелая цепь иммуноглобулина в цитоплазме клетки;
- IV — опухолевые клетки экспрессируют тяжелые цепи Ig на мембране и/или легкие цепи Ig в цитоплазме или на мембране.

Экспрессия CD20 может быть вариабельна, наблюдается при различных стадиях В-ОЛЛ по классификации EGIL (табл. 1).

Таблица 1. EGIL-классификация В-ОЛЛ

Вариант EGIL	Критерии иммунологического варианта В-ОЛЛ/лимфомы
Про-В-ОЛЛ (VI)	• CD10 – • Цитоплазматические и поверхностные Каппа или Лямбда – • Поверхностный IgM –
«Common» В-ОЛЛ (VII)	• CD10 + • Цитоплазматические и поверхностные Каппа или Лямбда – • Цитоплазматический и поверхностный IgM –
Пре-В-ОЛЛ (VIII)	• Цитоплазматический IgM + • CD10 + или CD10 – • Цитоплазматические и поверхностные Каппа или Лямбда – • Поверхностный IgM –

Таблица 1 (окончание). EGIL-классификация В-ОЛЛ

Вариант EGIL	Критерии иммунологического варианта В-ОЛЛ/лимфомы
Зрелый В-ОЛЛ (BIV)	• Цитоплазматические и поверхностные Каппа или Лямбда + и/или • Поверхностный IgM + • CD10 + или CD10 –

В случае выявления зрелого варианта В-ОЛЛ, особенно в случае отсутствия экспрессии CD34, необходимо проводить дифференциальный диагноз с агрессивными лимфомами (лимфома Беркитта, лимфомы высокой степени злокачественности и др.). Для этого необходимо выполнить гистологическое и иммуногистохимические исследования, генетические исследования для выявления перестроек генов *C-MYC*, *BCL2*, *BCL6* и др. Только при сопоставлении всего спектра клинических и лабораторных данных устанавливается окончательный диагноз.

Присутствие МПО в лейкоэмических клетках, выявленной любым способом, может свидетельствовать в пользу ОМЛ или В/миелоидного лейкоза смешанного фенотипа. Но в случае со слабой экспрессией МПО, выявленной методом проточной цитометрии или при иммуногистохимическом исследовании, может быть артефактом вследствие неспецифического связывания В-линейных бластных клеток с моноклональными антителами. В таких случаях необходимо использовать критерии дифференциальной диагностики, указанные для ОЛ смешанного фенотипа (см. табл. 3).

Среди В-ОЛЛ/лимфом с повторяющимися генетическими аномалиями только для двух вариантов описаны характерные особенности иммунофенотипа бластных клеток.

Так, при **В-лимфобластном лейкозе/лимфоме с *BCR::ABL1*** типично CD19+CD10+TdT+, присутствует коэкспрессия миелоидных антигенов CD13 и CD33, CD66c, а CD117 отрицателен.

При наличии реаранжировок гена *KMT2A* (**В-лимфобластный лейкоз/лимфома с *KMT2A***) часто наблюдается экспрессия хондроитинсульфатпротеогликана (NG2) в сочетании с CD15 и/или CD65 (рис. 9). Этот вариант ОЛЛ имеет неблагоприятный прогноз.

Т-лимфобластный лейкоз/лимфома

Первым на Т-клеточных предшественниках появляется CD7, и далее он сохраняется на всех стадиях созревания Т-клеток. Как указывалось ранее, этот антиген не специфичен и является также маркером НК-клеток, позитивен на ранних этапах миелопоэза. Коммитированный Т-клеточный предшественник сразу покидает костный мозг и мигрирует в тимус. В отсутствие этого центрального органа иммунной

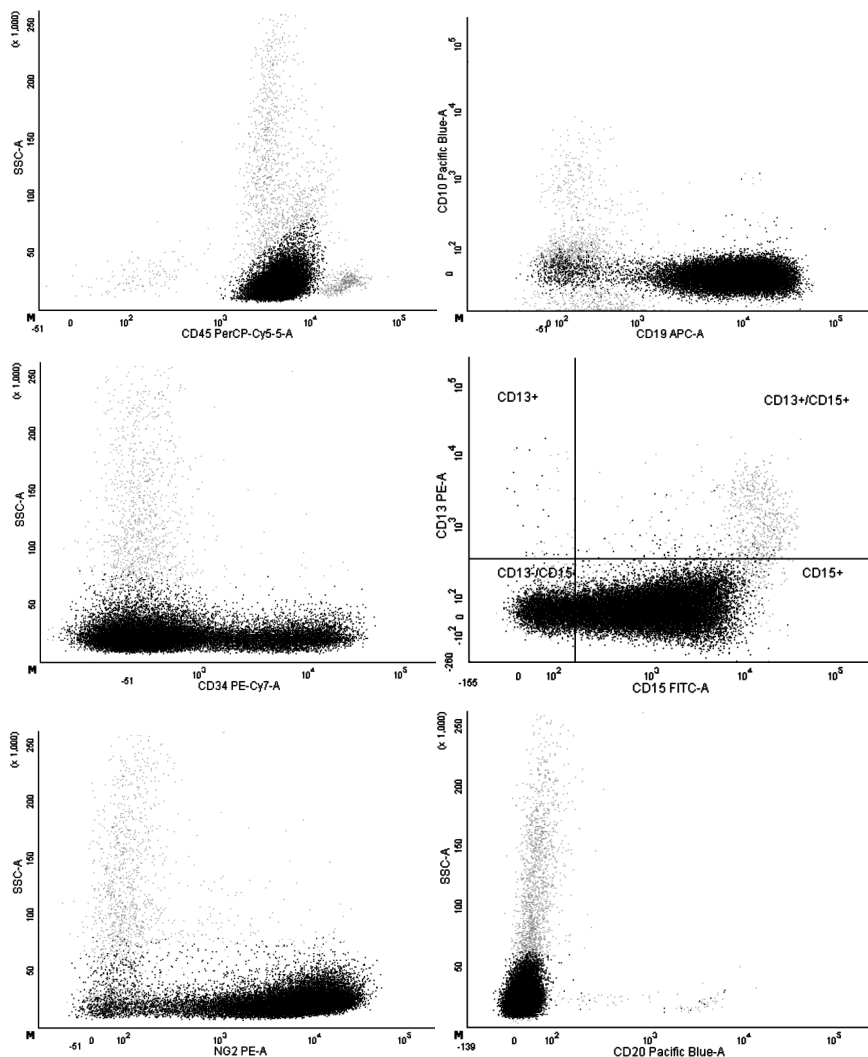


Рисунок 9. Пациент Т. ИФТ-исследование клеток костного мозга. В-І ОЛІ CD15+NG2+.

Опухолевые клетки (выделены черным цветом) позитивны по CD45, CD19, CD34 (гетерогенная экспрессия), CD15, NG2, cyCD79a (не представлен на рисунке); негативны по CD20, а также по CD10, cyIgM, surf-IgM (не представлены на рисунке). При цитогенетическом исследовании выявлена t(4;11)(q21;23).

системы формирование Т-клеток не происходит, развивается врожденное иммунодефицитное состояние, называемое синдромом Ди Джорджи.

Проникая через вены с высоким эндотелием, клетка поэтапно проходит через анатомические структуры тимуса, где тесно взаимодействует со стромой (эпителиальными клетками). Начало созревания происходит в **субкапсулярной области**, где запускается реаранжировка генов Т-клеточного рецептора (TCR), формирование которого является ключевым моментом созревания Т-лимфоцита. На этом этапе внутри клетки появляется цитоплазматический CD3 (суCD3) — наиболее специфичный маркер Т-линии, представляющий из себя комплекс молекул (γ -, δ -, ϵ -, ζ -цепи), ассоциированных с TCR. Клетка также может быть позитивна по CD117. Далее начинают экспрессироваться другие, менее специфичные Т-клеточные маркеры — CD2, CD5. Тимокит продолжает продвигаться вглубь стромы. По мере достижения **кортикального слоя**, в тимоките ген TCR уже частично сформирован, экспрессируется суррогатный пре-Т-клеточный рецептор и оба ко-рецептора CD4 и CD8, а также CD1a. Здесь происходит позитивная селекция тимокитов. Клетки, способные распознавать антиген в составе молекулы главного комплекса гистосовместимости I класса (MHC I), сохраняют экспрессию CD8, утрачивают антиген CD4. А те клетки, чей рецептор распознает антигены в комплексе с MHC II класса, наоборот, — сохраняют CD4, утрачивают CD8. Прошедшие отбор тимокиты получают сигнал к выживанию и дифференцировке. Клетки, не способные взаимодействовать с пептидами MHC или взаимодействующие с чрезмерной активностью, подвергаются апоптозу и фагоцитируются макрофагами. Практически зрелые клетки, имеющие сформированный Т-клеточный рецептор и поверхностный CD3, попадают на границу между кортикальным и **медуллярным** слоями тимуса, им предстоит этап негативной селекции. Тимокиты, несущие TCR, специфичный к антигенам собственного организма, не должны покидать пределы тимуса. Они получают сигнал к апоптозу и утилизируются. Зрелые наивные Т-лимфоциты, способные распознавать чужеродный антиген в составе MHC и ареактивные к клеткам собственного организма, попадают в медуллярную часть тимуса, откуда выходят через сосуды лимфатической системы или с током крови.

Существуют две основные разновидности Т-клеточного рецептора: TCR $\alpha\beta$ и TCR $\gamma\delta$. Вышеописанный онтогенез характерен для TCR $\alpha\beta$ Т-лимфоцитов. $\gamma\delta$ -Т-клетки относятся к клеткам врожденного иммунитета. Таких лимфоцитов менее 5%, из тимуса они мигрируют во вторичные лимфоидные органы, минуя процессы позитивной и негативной селекции. Они распознают антиген без участия молекул MHC и не

имеют ко-рецепторы CD4 и CD8, обладают цитотоксической активностью, имеют тропность к эпителию тонкой кишки, коже и красной пульпе селезенки.

При Т-ОЛЛ/лимфоме опухолевые клетки имеют фенотип, сходный с Т-линейными предшественниками.

Для диагностики этого варианта ОЛ в первую очередь необходимо оценить цитоплазматическую экспрессию CD3, который является единственным линейно-специфичным антигеном Т-линии. Как отмечалось ранее, CD3 экспортируется на поверхность тимоцитов в самом конце клеточной дифференцировки, поэтому большинство Т-ОЛЛ surfCD3-негативны. Бластные клетки часто позитивны по CD7 и вариabельно экспрессируют CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, CD10. К ранним маркерам при Т-ОЛЛ относят CD99, CD34, CD1a, TdT, может быть выявлен CD117. В 10% случаев наблюдается цитоплазматическая экспрессия CD79a. Один или оба миелоид-ассоциированных антигена CD13 и CD33 позитивны в 19–32%.

По аналогии со стадиями интратимической дифференцировки Т-лимфоцитов выделяют 4 варианта Т-ОЛЛ: про-Т, пре-Т, кортикальный Т, медуллярный (зрелый) Т-ОЛЛ. В классификации EGIL эти варианты называются TI, TII, TIII, TIV (табл. 2).

Таблица 2. EGIL-классификация Т-ОЛЛ

Вариант EGIL	Критерии иммунологического варианта Т-ОЛЛ/лимфомы
Про-Т-ОЛЛ (TI)	• CD7 + • CD2 – CD5 – CD8 – • CD1a – • TCR α/β – TCR γ/δ –
Пре-Т-ОЛЛ (TII)	• CD7 + • CD2 + и/или CD5 + и/или CD8 + • CD1a – • TCR α/β – TCR γ/δ –
Кортикальный Т-ОЛЛ (TIII)	• CD7 + и/или CD2 + и/или CD5 + и/или CD8 + • CD1a + • TCR α/β – TCR γ/δ –
Зрелый Т-ОЛЛ (TIV)	• CD7 + и/или CD2 + и/или CD5 + и/или CD8 + • Поверхностный CD3 + CD1a –
α/β + Т-ОЛЛ (группа а)	• TCR α/β +
γ/δ + Т-ОЛЛ (группа b)	• TCR γ/δ +

- TI — характерна экспрессия только ранних маркеров (суCD3, CD7; возможно, CD10, HLA-DR, CD34) и отсутствие CD4 и CD8, CD1a;
- TII — появляется CD2 и/или CD5 и/или CD8;

- ТIII (кортикальный Т-ОЛЛ) — обязательно наличие CD1a; мембранный CD3 – или +;
- ТIV (медуллярный Т-ОЛЛ) характеризуется экспрессией мембранного CD3, CD4 или CD8; CD1a отрицателен.

В классификации ВОЗ 2016 и 2022 гг. в отдельную нозологическую форму выделяется **ОЛЛ из ранних Т-клеточных предшественников — early T-precursor (ETP) ALL** (рис. 10). Бластные клетки при Т-ОЛЛ из ранних Т-клеточных предшественников имеют признаки миелоидных и стволовых клеток, иммунофенотип должен соответствовать определенным критериям:

- Т-линейная направленность (суCD3+CD7+).
- CD1a отрицательный, CD8 отрицательный.
- CD5 составляет менее 75%.
- Позитивен хотя бы один из следующих маркеров: CD34, CD117, HLA-DR, CD13, CD33, CD11b или CD65.

У пациентов с ETP Т-ОЛЛ больше вероятность развития рецидива и хуже прогноз общей выживаемости.

Острые лейкозы неопределенной линейности

К этой группе относятся такие варианты ОЛ, при которых трудно определить принадлежность опухолевых клеток к одной из линий дифференцировки.

В соответствии с классификацией ВОЗ 2022 г. эти виды ОЛ подразделяют на:

1. Острые лейкозы неопределенной линейности, определяемые генетическими аномалиями:
 - Острый лейкоз смешанного фенотипа с *BCR::ABL1*.
 - Острый лейкоз смешанного фенотипа с *KMT2A*-реаранжировкой.
 - Острый лейкоз неопределенной линейности с другими генетическими изменениями.
2. Острые лейкозы неопределенной линейности, определяемые иммунофенотипом:
 - Острый лейкоз смешанного фенотипа В/миелоидный.
 - Острый лейкоз смешанного фенотипа Т/миелоидный.
 - Острый лейкоз смешанного фенотипа, редкие варианты.
 - Острый лейкоз неопределенной линейности, без дополнительного уточнения (БДУ).
 - Острый недифференцированный лейкоз.

Острый лейкоз смешанного фенотипа

Это вариант ОЛ, при котором опухолевые клетки имеют признаки сразу нескольких линий дифференцировки.

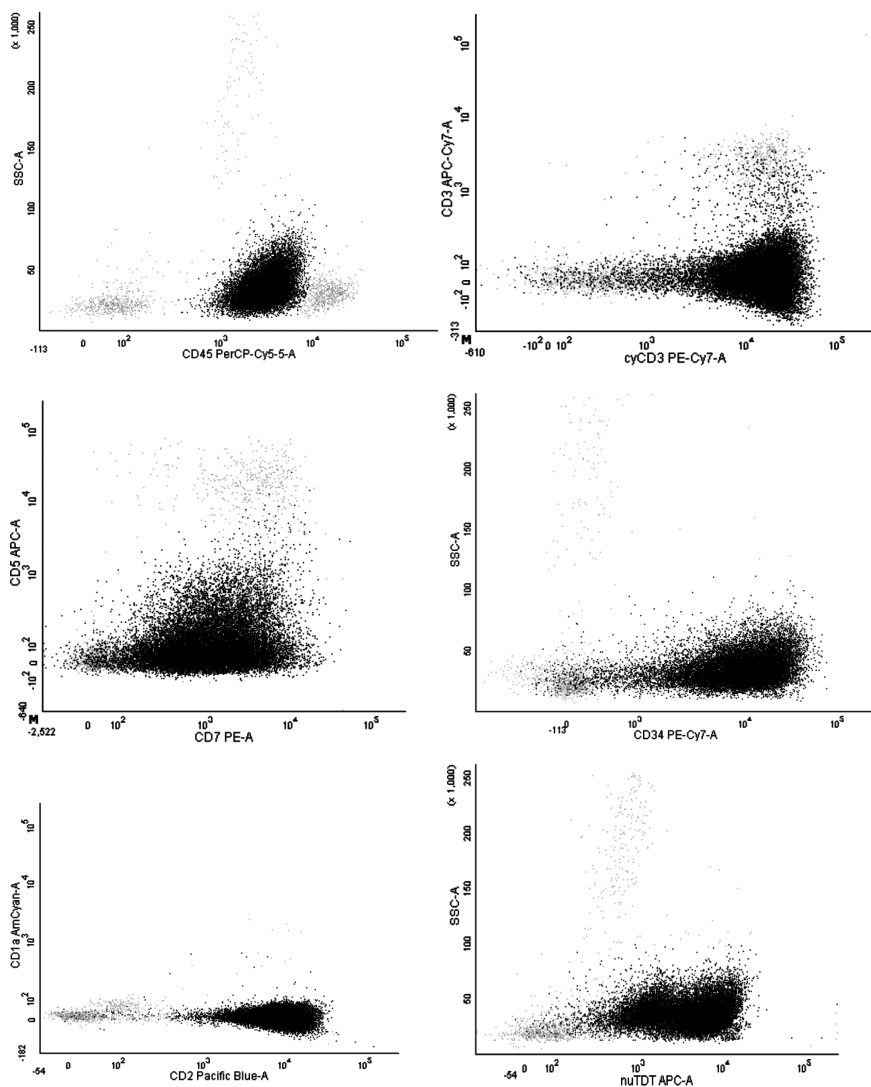


Рисунок 10. Пациент Г. ИФТ-исследование клеток костного мозга. Т-II ОЛЛ CD13+ (ЕТР).

Опухолевые клетки (выделены черным цветом) позитивны по CD45, CD7, CD34, cyCD3, CD2, CD13, TdT; негативны по surfCD3, CD5, CD8, CD4, что соответствует ОЛЛ из ранних Т-клеточных предшественников.

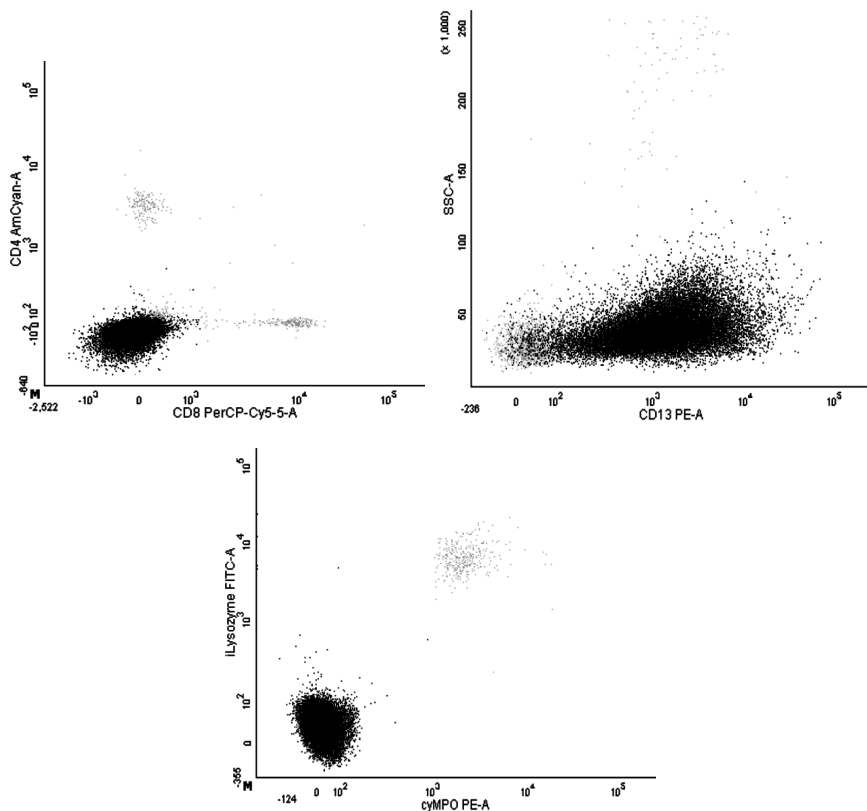


Рисунок 10 (окончание). Пациент Г. ИФТ-исследование клеток костного мозга. Т-II ОЛЛ CD13+ (ETP).

При таком варианте могут оказаться две отдельные или одна единая популяция с чертами разных линий дифференцировки. Первый вариант раньше называли билинейным, а второй — бифенотипическим, но на сегодняшний день они объединены под общим названием ОЛ смешанного фенотипа.

Диагноз ОЛ смешанного фенотипа (ОЛСФ) исключают:

1. Транслокации, характерные для ОМЛ:

- **t(8;21)(q22;q22.1)**; *RUNX1::RUNX1T1*;
- **t(16;16)(p13.1;q22)** или **inv(16)(p13.1;q22)**; *CBFB::MYH11*;
- *PML::RARA*.

2. Признаки, специфичные для других нозологий:

- Мутации генов *PDGFRA*, *PDGFRB*, *FGFR1*, *JAK2*, *FLT3*, *ETV6::ABL1* и мутации в других генах тирозинкиназ (миелоидные/лимфоидные опухоли с эозинофилией и определяющими диагноз мутациями).
- Бластный криз хронического миелолейкоза (ХМЛ).
- ОМЛ с изменениями, свойственными миелодисплазии.
- ОМЛ на фоне предшествующей цитотоксической терапии.

При выявлении указанных в п. 2 изменений иммунологический вариант опухоли не имеет определяющего значения, но может быть указан в диагнозе.

Диагностика ОЛСФ при выявлении одной популяции

Диагноз устанавливается только в том случае, если бластная популяция одновременно соответствует критериям миелоидной и одной из лимфоидных линий дифференцировки (табл. 3).

Таблица 3. Критерии диагностики ОЛСФ при одной бластной популяции

Бластная популяция	Критерии
В-линия	
CD19 сильный ¹ или	1 антиген и более с сильной экспрессией: CD10 ³ , суCD22, суCD79a ³
CD19 слабый ²	2 антигена и более с сильной экспрессией: CD10 ³ , суCD22, суCD79a ³
Т-линия	
CD3 (цитоплазматический или поверхностный) ⁴ суCD3 или surfCD3 ⁴	Интенсивность на части бластных клеток превышает 50% интенсивности флюоресценции зрелых Т-клеток при проточной цитометрии; или антиген позитивен при иммуногистохимии (с реагентами, специфичными к любой, кроме CD3-zeta, цепи)
Миелоидная линия	
МПО или Моноцитарная дифференцировка	Интенсивность флюоресценции хотя бы части бластных клеток превышает 50% интенсивности зрелых нейтрофилов при проточной цитометрии. Позитивная реакция при цитохимическом и/или иммуно- цитохимическом исследованиях. 2 антигена и более: неспецифическая эстераза (цитохимическое исследование), CD11c, CD14, CD64, лизоцим

¹ CD19 — интенсивность флюоресценции хотя бы на части бластных клеток превышает 50% интенсивности нормальных В-клеточных предшественников.

² CD19 — интенсивность флюоресценции не превышает 50% интенсивности нормальных В-клеточных предшественников.

³ Актуально только в случаях, когда Т-линейная направленность не предполагается.

⁴ Антитело к CD3-epsilon цепи.

Для диагностики **В-линейной направленности** в случае ОЛСФ опухолевые клетки должны быть позитивны по нескольким В-линейно-ассоциированным антигенам одновременно:

- наиболее специфичным является **сильный CD19 (интенсивность флюоресценции хотя бы на части бластных клеток превышает 50% интенсивности нормальных В-клеточных предшественников)**. Но одного этого маркера для диагностики ОЛ смешанного фенотипа недостаточно, необходимо дополнительно выявить **сильную экспрессию одного и более** из следующих антигенов: **CD10, суCD22, суCD79a;**

или

- если экспрессия **CD19** недостаточно сильная (интенсивность флюоресценции бластных клеток не превышает 50% интенсивности нормальных В-клеточных предшественников), то для установления В-линейной направленности при ОЛСФ дополнительно должна быть выявлена сильная экспрессия двух и более из следующих антигенов: **CD10, суCD22, суCD79a;**

или

- если экспрессия CD19 отрицательна, то для установления В-линейной направленности при ОЛСФ дополнительно должна быть выявлена **сильная экспрессия всех трех** антигенов: **CD10, суCD22, суCD79a.**

В случае если речь идет об очень редком варианте заболевания (Т/В-линейном ОЛСФ), то CD10 и CD79a исключаются из критериев диагностики, т. к. очень часто эти маркеры коэкспрессируются при чистом Т-ОЛЛ (подробнее в разд. «ОЛСФ, редкие варианты»).

Т-линейная направленность устанавливается на основании выявления **мембранной и/или цитоплазматической экспрессии CD3**, исследованного с помощью проточной цитофлуориметрии при использовании антител к ϵ -цепи антигена CD3 при иммуногистохимическом исследовании (однако необходимо избегать реагентов, специфичных к CD3-zeta цепи, т. к. этот белок присутствует и в цитоплазме НК-клеток).

Как было отмечено ранее, CD3 сначала появляется внутри тимоицита и только в самом конечном этапе развития выходит на поверхность. Поэтому, если мембранная экспрессия антигена отрицательна, это не может исключить Т-лимфобластный вариант ОЛ, в связи с чем необходимо **при каждом диагностическом случае ОЛ исследовать CD3 в цитоплазме опухолевых клеток**. В отсутствие экспрессии CD3 все остальные Т-ассоциированные маркеры (CD2, CD4, CD5, CD7, CD8) не играют ключевой роли при диагностике этой линии дифференцировки и будут трактоваться как коэкспрессия.

Важна также интенсивность экспрессии суCD3 в опухолевых клетках, хотя бы на части бластной популяции она должна достигать 50%

интенсивности зрелых Т-лимфоцитов. Менее интенсивная экспрессия CD3 не является критерием диагностики Т-линейной направленности в случае ОЛСФ, но является достаточным критерием для установления Т-лимфобластного варианта ОЛ (подробнее см. в разд. «Т-лимфобластный лейкоз/лимфома»).

Для установления **миелоидной линии** в случае ОЛСФ линейно-специфическими являются:

- **МПО**, позитивная при проточной цитофлуориметрии (интенсивность флуоресценции хотя бы на части бластных клеток должна достигать 50% зрелых нейтрофилов), проведении цитохимической реакции и/или иммуноцитохимического исследования;
- или
- два и более моноцитарных антигена: **неспецифическая эстераза**, выявленная при проведении цитохимической реакции, и **CD11c, CD64, CD14, лизоцим**, исследованные методом проточной цитофлуориметрии.

Таким образом, если единая опухолевая популяция имеет указанные выше специфические черты сразу миелоидной и лимфоидной линий, то диагностируется ОЛСФ.

Следует подчеркнуть, что все указанные признаки необходимы для диагностики ОЛ смешанного фенотипа и не используются для определения линейной направленности в других случаях. Например, если экспрессия CD3 слабая, но нет МПО, то ОЛ диагностируется как Т-линейный.

Диагностика ОЛСФ при выявлении двух отдельных популяций

Если в исследуемом материале выявлены две отдельные популяции с разной линейной направленностью, этого достаточно для верификации ОЛСФ и в использовании приведенных выше критериев нет необходимости (рис. 11). Суммарно доля бластных клеток должна составлять 20% и более. В соответствии с классификациями ВОЗ 2017 и 2022 гг., для каждой популяции в отдельности нет минимального порога, главное, чтобы каждая из них имела аберрантный иммунофенотип и была отличима от нормальных миелоидных или лимфоидных предшественников.

В классификации «Международного консенсуса» принят минимальный порог минорных популяций $> 5\%$ для диагностики ОЛСФ. Если на фоне массивного поражения костного мозга бластными клетками, например, миелоидной линии выявляются опухолевые клетки лимфоидной линии, но доля их составляет $\leq 5\%$, по мнению членов «Международного консенсуса», необходимо отдельно описать данную опухоль и составить заключение следующим образом: «Преимущественно

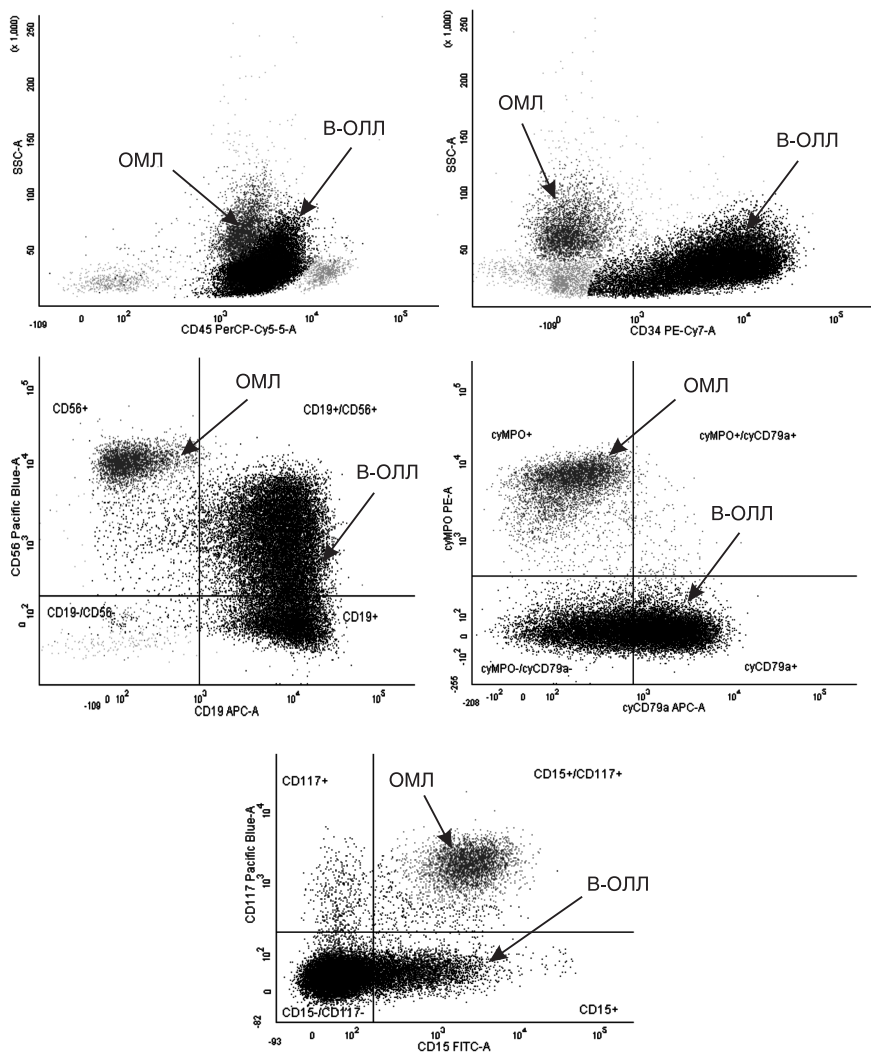


Рисунок 11. Пациент С. ИФТ-исследование клеток костного мозга. ОЛСФ VI-ОЛЛ CD56+/ОМЛ CD56+.

Опухолевые клетки представлены 2 популяциями с различной линейностью.

Первая популяция (выделена черным цветом) позитивна по CD45, CD34, CD19, cyCD79a, CD56; негативна по МПО, CD117, CD15 (9,9%), что соответствует В-лимфобластному лейкозу с коэкспрессией CD56.

Вторая популяция (выделена серым) позитивна по CD45, CD117, МПО, CD56; негативна по CD19, cyCD79a, CD34, что соответствует ОМЛ с коэкспрессией CD56.

ОМЛ, дополнительно выявлена популяция лимфобластов неясного значения».

Несмотря на то что у данных подходов есть небольшие отличия в терминологии окончательного диагноза, оба предлагают обращать внимание и описывать любую, даже крайне малочисленную популяцию опухолевых клеток. Известно, что выявление сотых долей процента опухолевых клеток на фоне терапии многократно увеличивает риск развития рецидива заболевания, поэтому крайне важно отмечать все особенности опухоли в дебюте лейкоза, в том числе и ее линейную гетерогенность.

ОЛСФ, редкие варианты

К данной категории относятся:

- Острый лейкоз смешанного фенотипа Т/В-линейный. В отличие от В/миелоидного варианта ОЛСФ, критериями для В-линии считают только сильную экспрессию CD19 и суCD22. CD10 и суCD79a часто встречаются при Т-ОЛЛ, поэтому не являются весомыми маркерами в случае диагностики Т/В-линейного варианта ОЛ.
- Острый лейкоз смешанного фенотипа с признаками 3 линий — Т/В/миелоидный. Крайне редкий вариант ОЛ, при котором одновременно выявляются МПО или два значимых моноцитарных маркера — неспецифическая эстераза (цитохимическое исследование), CD11c, CD14, CD64 или лизоцим; суCD3; CD19 и суCD22 сильной интенсивности. Или отдельные популяции с признаками Т-, В- и миелоидной линий дифференцировки.
- Острый лейкоз смешанного фенотипа Т/мегакариобластный.

В классификации ВОЗ 2016 г. отрицалось существование данного варианта ОЛ, но за последние несколько лет опубликовано достаточно клинических случаев, доказывающих обратное. В связи с этим в классификацию ВОЗ 2022 г. введен этот тип лейкоза. Для диагностики Т/мегакариобластного ОЛ необходимо выявить одновременную экспрессию суCD3, CD61 и CD41a или две отдельные опухолевые популяции — одна с Т-линейным, другая с мегакариобластным иммунофенотипом.

На сегодняшний день сохраняется скепсис в отношении существования сочетаний лимфоидной и эритроидных линий ввиду особенностей гемопоэза. Однако никто еще до конца не определил пределы пластичности стволовой кроветворной клетки-предшественницы, поэтому нельзя исключить появление новых концепций диагностики в будущем.

Острый лейкоз неопределенной линейности, без дополнительного уточнения

При ОЛ неопределенной линейности, БДУ (*acute leukaemia of ambiguous lineage, NOS*), опухолевые клетки экспрессируют 2 и более антигена, ни один из которых не может считаться более специфическим по отношению к другому. Возможно выявить одновременную экспрессию нескольких Т-линейно-ассоциированных антигенов (CD2, CD5, CD7), слабую экспрессию CD19 и одного из миелоидных антигенов. В случае если выявляется 2 миелоид-ассоциированных маркера, даже если экспрессия их не очень велика, то лейкоз скорее следует считать миелоидным.

На фоне терапевтического воздействия могут ярче проявиться черты той или иной линий дифференцировки, что позволит указать линейную принадлежность опухоли.

Острый недифференцированный лейкоз

При остром недифференцированном лейкозе (*acute undifferentiated leukaemia*) опухолевые клетки по определению не должны экспрессировать маркеры, специфичные для какой-либо линии (МПО, *cyCD3* или яркий CD19), и обычно имеют только ранние маркеры CD34, CD38, HLA-DR и TdT. Допускается экспрессия лишь одного линейно-ассоциированного маркера, в 2/3 случаев это миелоидный антиген, например CD13), в 1/3 случаев миелоидные антигены совсем не экспрессируются, очень редко могут быть позитивны CD7 или CD56.

Для окончательного диагноза необходимо исключить все редкие формы лейкозов, такие как острый базофильный лейкоз, острый мегакариобластный лейкоз, острый эритроидный лейкоз, опухоль из бластных плазмцитоподобных дендритных клеток, а также заболевания негемопозитической природы.

Дифференциальная диагностика острого миелоидного лейкоза без миелопероксидазы, острого лейкоза неопределенной линейности, без дополнительного уточнения, и острого недифференцированного лейкоза

Все эти типы лейкозов объединяет отсутствие линейно-специфических маркеров, в связи с чем их дифференциальная диагностика может быть затруднительна. Для ОМЛ с минимальной дифференцировкой необходимым считается наличие **двух и более** миелоид-ассоциированных маркера, для недифференцированного ОЛ допускается экспрессия всего **одного** линейно-ассоциированного антигена, чаще всего это

	Острый недифференцированный лейкоз	ОМЛ	Острый лейкоз неопределенной линейности, БДУ
Лимфоидные суCD3 , суCD22; суCD79a; яркий CD19	—	—	—
МПО; признаки Моно, Мега, Эритро, ПДК дифференцировки	—	—	—
Ассоциированные с миелоидной линией CD13, CD33, CD117, CD65 и т. д.	0—1 + 0—1 } ≤ 1	≥ 2	0—1 + ≥ 1 } ≥ 2
Ассоциированные с лимфоидной линией CD2, CD5, CD7, слабый CD19, CD56 и т. д.		—/+	

Рисунок 12. Дифференциальная диагностика острого недифференцированного лейкоза, ОМЛ без МПО, ОЛ неопределенной линейности, БДУ.

как раз миелоидный маркер. В случае ОЛНЛ, БДУ, выявляется экспрессия **двух и более** линейно-ассоциированных маркеров, среди которых **один** может быть миелоидным, остальные лимфоид-ассоциированные (рис. 12).

Переключение иммунофенотипа при остром лейкозе

Иммунофенотип опухолевых клеток, выявленный в дебюте ОЛ, чаще всего не претерпевает значительных изменений на фоне терапии или в момент рецидива. Но в редких случаях возможно полное изменение линейной направленности опухолевой популяции, этот феномен обозначают термином «переключение» (switch) фенотипа.

Перестройки гена *KMT2A* — фактор риска для такого явления. Ген *KMT2A* кодирует транскрипционные регуляторы гемопоэза и внутри-утробного развития, ассоциируется с различными формами линейной пластичности. Описано немало случаев В-ОЛЛ с перестройкой *KMT2A*, полностью меняющего линейную направленность на миелоидную, как в процессе терапии, так и в рецидиве.

В литературе есть описание так называемого «переключающегося» В-ОЛЛ (switching BCP-ALL, swALL), который характеризуется нарастанием моноцитоидной популяции в течение первых 33 дней терапии. Во всех случаях «переключающегося» В-ОЛЛ выявлялась коэкспрессия CD2, не было мутаций гена *KMT2A*. Несмотря на моноцитоидный иммунофенотип и морфологию, клетки имели ту же реаранжировку генов В-клеточного рецептора, что и В-линейные бластные клетки, исследованные до начала лечения. У детей частота встречаемости такого варианта оказалась неожиданно высокой и составила 4% из всех В-ОЛЛ.

Переключение фенотипа у взрослых пациентов часто встречается при Т-ОЛЛ из ранних Т-клеточных предшественников (ЕТР ОЛЛ) — лимфобластном лейкозе, профиль экспрессии генов которого больше схож с миелоидным (ИФТ-характеристики см. в разд. «Т-лимфобластный лейкоз/лимфома»).

Опухоль из бластных плазмцитоидных дендритных клеток

Опухоль из бластных плазмцитоидных дендритных клеток (BPDCN, ОБПДК) представляет собой крайне агрессивную опухоль из гемопоэтических предшественников плазмцитоидных дендритных клеток и составляет около 1% всех случаев ОЛ.

Дендритные клетки (DC) развиваются из миелоидных и лимфоидных предшественников в костном мозге, затем мигрируют через кровь к тканям и периферическим лимфоидным органам. В лимфоидных органах они располагаются в богатых Т-клетками областях корковой зоны.

Выделяют два типа дендритных клеток. Первые дифференцируются из миелоидных предшественников, поэтому их обозначают «миелоидные (типичные) дендритные клетки» (conventional dendritic cells, cDCs) или дендритные клетки I типа, их основная функция — презентация бактериальных и вирусных антигенов наивным Т-клеткам. Эти клетки характеризуются яркой экспрессией HLA-DR и CD11c и не несут антигенов других линий (CD14, CD3, CD19).

Дендритные клетки II типа образуются из лимфоидных предшественников, известны как плазмцитоидные дендритные клетки (pDC) или интерферонпродуцирующие клетки (IPSc). В основном они накапливаются в периферических лимфоидных тканях и с развитием вирусной инфекции, помимо активации наивных Т-лимфоцитов, продуцируют большое количество интерферонов I типа (в 1000 раз больше, чем другие клетки).

Плазмцитоидные дендритные клетки в периферической крови встречаются очень редко (0,001—0,005% от всех мононуклеаров). Их можно идентифицировать методом проточной цитофлуориметрии на основании яркой экспрессии HLA-DR, и, в отличие от миелоидных

дендритных клеток, они ярко позитивны по CD123 (рецептор к интерлейкину 3) и CD303 (антиген дендритных клеток крови, BDCA-2); отрицательны по CD11c.

Для опухоли из плазмцитоидных дендритных клеток характерна экспрессия CD4, CD56, CD303, CD304, HLA-DR (яркая экспрессия), CD123 (яркая экспрессия), также часто выявляются маркеры суTCL1 (T-cell leukemia/lymphoma protein 1) при отсутствии других линейно-ассоциированных маркеров миелоидной, NK-, T-, B-линий. В ряде случаев может наблюдаться коэкспрессия CD7 или CD33, в меньшей степени CD2, CD10, CD117. Также могут быть позитивны CD38 и TdT, что отражает раннюю стадию вызревания (рис. 13).

Алгоритм диагностики острых лейкозов методом проточной цитофлуориметрии

В настоящее время нет общепринятого стандарта для ИФТ-диагностики ОЛ методом проточной цитофлуориметрии. Различными исследовательскими группами разработаны варианты наборов (панелей) антител для установления линейной принадлежности бластных клеток. К их числу относятся рекомендации консорциума Еврофлоу (Euroflow), Европейской сети лейкемии (European leukemia net, ELN), международного консенсуса (Бетесда, США) (Bethesda International Consensus) и др.

На первом этапе диагностики необходимо определить линейную направленность опухолевых клеток (скрининг), а затем использовать более широкую панель для уточнения иммунологического варианта ОЛ.

В нашем центре для **скрининга** используется следующий набор антител:

- Общелейкоцитарный антиген: CD45.
- Линейно-неограниченные антигены и маркеры предшественников: CD34, CD117, CD38.
- Линейно-ассоциированные и линейно-специфические антигены:
 - ▲ Миелоидные: CD11c, CD13, CD14, CD15, CD33, CD64, МПО, ли-зоцим.
 - ▲ В-лимфоидные: CD19, CD10, cyCD22, cyCD79a.
 - ▲ Т-лимфоидные: cyCD3, CD3, CD7.
- Другие антигены: CD56, NG2.

При выявлении признаков **миелоидной** направленности дополнительно исследуются:

- CD65, CD16, CD11b, CD66b, CD4, CD36, CD105, CD235a, CD61, CD41a.

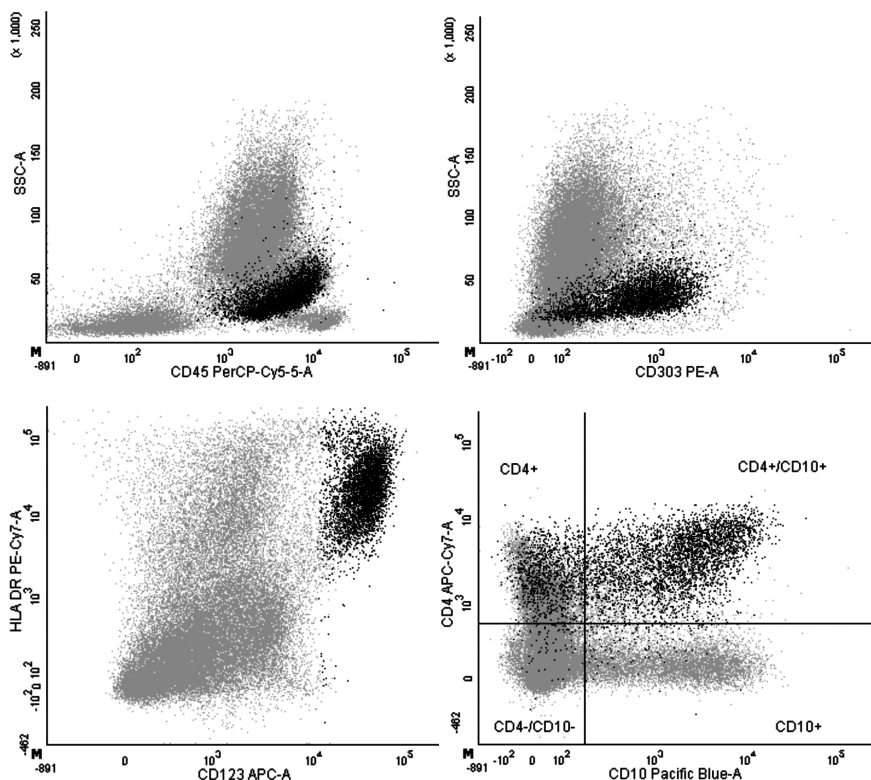


Рисунок 13. Пациент П. ИФТ-исследование клеток костного мозга. Опухоль из бластных плазмцитоидных дендритных клеток. Опухолевые клетки (выделены черным цветом) позитивны по CD45, CD303, CD4, CD10, CD123 (очень яркая экспрессия), HLA-DR (очень яркая экспрессия); негативны по маркерам предшественников и антигенам других линий [МПО, CD13, CD33, cyCD3, CD19, CD61, CD41a, CD14, CD64 и др. (не представлены на рисунке)], что соответствует опухоли из бластных плазмцитоидных дендритных клеток.

Для уточнения варианта **В-лимфобластного** лейкоза используются:

- CD20, IgM, cyIgM, Карра, cyКарра, Lambda, cyLambda, CD58.

В случае **Т-линейного** лейкоза применяются:

- CD2, CD5, CD4, CD8, CD1a, TCR $\alpha\beta$, TCR $\gamma\delta$, nuTdT, CD99.

Если на основании вышеуказанных маркеров вариант ОЛ установить не удалось, необходимо исключить более **редкие формы** заболевания:

- Опухоль из бластных плазмцитоидных дендритных клеток — CD123, HLA-DR, CD303, CD56, CD4, cyTCL1.

- Острый базофильный лейкоз, системный мастоцитоз — CD22, CD123, HLA-DR, CD203c, CD117.

При подозрении на метастазирование в костный мозг опухоли **негемопоэтического** происхождения возможно исследовать эпителиальный антиген EpCAM.

Пример бланка ИФТ-исследования приведен на рис. 14.

ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России
Централизованная клинко-диагностическая лаборатория. Группа проточной цитометрии.
г. Москва, Новый Зыковский проезд, д. 4. Тел.: (495) 612-64-13. E-mail: flowlabgnc@gmail.com

Иммунофенотипическое исследование.

Пациент: Год рождения: Дата взятия материала: №
Отделение: Направительный диагноз: Материал: к/м Миелокариомы *10⁹/л
(Норма 41,6-195*10⁹/л)

Бластный регион - % (выделен на основании экспрессии CD45 и бокового светорассеяния).

		Маркер	%	Нормальная экспрессия			Маркер	%	Нормальная экспрессия	
LCA	Sm	CD45		Общесайтоцитарный антиген	В-линейные	Sm	CD10		В, гранулоциты	
							CD19		В-лимфоциты	
	Cy	CD34		Гемопоэтические предшественники			CD20		В-лимфоциты	
		CD117		Гемопоэтические предшественники			IgM		В-лимфоциты	
Маркеры предшественников		TdT		Гемопоэтические предшественники			Kappa		В-лимфоциты	
							Lambda		В-лимфоциты	
Линейно Неогранич-е	Sm	CD38		T, B, NK, плазм. кл., гр-циты, моноциты, гемопоэт. предш-ки		Cy	CD22		В-лимфоциты	
		CD58		Anti-LFA-3			CD79a		В-лимфоциты	
		CD99		лимфоциты, гранулоциты			IgM		В-лимфоциты	
		NG2		Маркер реэпанжировки гена MLL			Kappa		В-лимфоциты	
		CD30		Активиров. B, T, NK			Lambda		В-лимфоциты	
Миелоидные	Sm	CD11a		Гранулоциты, моноциты, NK, T, B	Т-линейные	Sm	CD1a		Т-лимфоциты	
		CD11b		Гранулоциты, моноциты, NK, T, B			CD2		T, NK	
		CD11c		Гранулоциты, моноциты, NK, T, B			CD3		Т-лимфоциты	
		CD13		Гранулоциты, моноциты			CD4		T, моноциты	
		CD14		Моноциты, гранулоциты			CD5		Т-лимфоциты	
		CD15		Гранулоциты, моноциты			CD7		T, NK	
		CD16		Гранулоциты, NK, T			CD8		T, NK	
		CD33		Гранулоциты, моноциты			CD56		NK	
		CD41a		Тромбоциты, мегакариоциты			TCRab		Т-лимфоциты	
		CD61		Тромбоциты, мегакариоциты			TCRgd		Т-лимфоциты	
		CD64		Моноциты, гранулоциты		Cy	CD3		Линейно специфический T	
		CD65		Гранулоциты, моноциты						
		CD66b		Гранулоциты						
		GPA		Эритроциты и их предшественники						
		CD71		Пролиферирующие клетки, ретикулоциты, эритроидные предшественники						
	CD105		Предшественники эритроцитов, активированные моноциты, макрофаги							
Cy	MPO		Линейно специфический миелоидный							
	Lysozyme		Моноциты, макрофаги							

Пороговые значения экспрессии антигенов: поверхностные (Sm) ≥20%; цитоплазматические (Cy) ≥10%

Фенотип бластной популяции:

Рисунок 14. Пример бланка ИФТ-исследования.

Диагностика зрелых В-клеточных лимфом методом проточной цитометрии

В-лимфоциты созревают в костном мозге. Далее наивная В-клетка циркулирует в крови и лимфатической системе до тех пор, пока не встретит специфичный для своего рецептора антиген.

Если антиген представляет собой полисахарид или липид, то одного взаимодействия с антигеном достаточно для активации, пролиферации В-лимфоцита и его преобразования в плазматическую клетку, способную секретировать антитела IgM.

Если антиген имеет белковую природу, то В-лимфоцит развивается по Т-зависимому пути активации и дифференцировки. Ему нужно получить дополнительный сигнал от Т-лимфоцита-хелпера, специфичного к этому же антигену. Для этого В-клетка поглощает антиген посредством рецептор-опосредованного эндоцитоза и представляет его Т-лимфоциту в составе главного комплекса гистосовместимости (МНС) II класса. Также необходимы дополнительные сигналы при взаимодействии CD40 на В-клетке и CD40L на Т-лимфоците. При получении этих сигналов В-лимфоцит пролиферирует, часть из образованных клеток дифференцируется в короткоживущие плазматических клетки, секретирующие преимущественно IgM. Другая часть направляется в герминальный центр фолликула лимфатического узла, где происходят изменения в гене В-клеточного рецептора (BCR) — соматический гипермутагенез (способствует увеличению специфичности BCR к антигену) и переключение класса иммуноглобулина. После этих процессов В-лимфоцит, обладающий очень специфичным рецептором, может дифференцироваться в долгоживущую плазматическую клетку и переместиться в костный мозг или дифференцироваться в В-клетку памяти и остаться в В-зоне лимфатического узла.

Имунофенотип В-лимфоцита меняется по мере прохождения этапов дифференцировки. Особенно важными являются отличия, появляющиеся во время соматической гипермутации в герминальном центре фолликула лимфатического узла. При этом снижается экспрессия некоторых В-клеточных антигенов, например CD20, легких и тяжелых цепей иммуноглобулина, возобновляется экспрессия CD10. В случае удачного исхода соматической гипермутации В-лимфоцит с высокоспецифичным В-клеточным рецептором дифференцируется в плазматическую клетку, для которой характерен иммунофенотип CD19+CD20—CD38+CD138+. В-клеточный рецептор уходит с поверхности клетки, присутствуя только в цитоплазме в секретируемой форме.

В диагностике В-клеточных лимфом методом проточной цитометрии опухолевая популяция может быть выявлена при исследовании клональности: отношение экспрессии легких цепей κ/λ менее 0,3 или более 3,0; или более 25% зрелых В-лимфоцитов совсем не экспрессируют поверхностные иммуноглобулины.

Окончательный диагноз устанавливается клиницистом по совокупности клинических данных и результатов лабораторных, инструментальных исследований.

По данным проточной цитометрии формулируется ориентировочный диагноз согласно особенностям иммунофенотипа.

Хронический лимфоцитарный лейкоз/лимфома из малых лимфоцитов

Хронический лимфоцитарный лейкоз/лимфома из малых лимфоцитов (ХЛЛ/ЛМЛ) — это В-клеточная лимфома, состоящая из зрелых лимфоцитов малых размеров, которые часто экспрессируют CD5 и CD23. Для диагностики хронического лимфоцитарного лейкоза количество В-лимфоцитов должно составлять более $5 \times 10^9/\text{л}$. В случае лимфомы из малых лимфоцитов количество В-клеток менее $5 \times 10^9/\text{л}$, но отмечается поражение лимфатических узлов, селезенки и/или других экстрамедуллярных очагов.

Опухолевые клетки в «типичных» случаях CD19+CD5+CD23+, при этом экспрессия других В-линейных маркеров (CD20, CD22, CD79b, легкие цепи Ig) снижена, также характерна экспрессия CD43, CD200, ROR1; CD81 снижен, CD10 — отрицательный. Этот иммунофенотип наиболее характерен для ХЛЛ. Однако в ряде случаев встречаются отклонения, например, более яркая экспрессия В-линейных маркеров встречается при ХЛЛ с трисомией 12-й хромосомы. Также следует проводить дифференциальную диагностику с лимфомой из клеток мантийной зоны, которая тоже характеризуется экспрессией CD5, чаще CD23—CD200—, но бывают и CD23+CD200+ варианты. Лимфома из клеток маргинальной зоны чаще всего CD5—CD23—, но позитивная экспрессия данных маркеров не исключает этот вариант лимфомы.

Таким образом, только выявление «типичного» иммунофенотипа может позволить с большой долей уверенности диагностировать ХЛЛ, в случае отклонения от «типичной» экспрессии антигенов необходимо проводить дифференциальный диагноз с другими зрелыми В-клеточными лимфомами, при которых возможна экспрессия CD5 (лимфома из клеток мантийной зоны, лимфома из клеток маргинальной зоны, лимфоплазмочитарные лимфомы, диффузная В-крупноклеточная лимфома и др.).

Волосатоклеточный лейкоз

Индолентная зрелая В-клеточная опухоль, состоящая из неопластических клеток с характерной широкой отростчатой цитоплазмой, типично поражающих костный мозг, периферическую кровь, селезенку и более чем в 95% случаев несущих мутацию *BRAF* V600E.

Иммунофенотип опухолевых клеток характеризуется экспрессией **CD103**, **CD25**, **CD123**, **CD200**, **CD305**, **CD11c**, яркой экспрессией В-линейных маркеров **CD20**, **CD22**, **CD79b**, **Ig**, высокими показателями бокового светорассеяния, отражающими сложную структуру клетки (отростчатую цитоплазму).

Волосатоклеточный лейкоз (ВКЛ) необходимо дифференцировать с другими селезеночными лимфомами: вариантная форма волосатоклеточного лейкоза (селезеночная В-клеточная лимфома/лейкоз с заметными ядрышками согласно классификации ВОЗ 2022 г.), иммунофенотип сходен с типичным ВКЛ, отличие заключается в отсутствии экспрессии **CD25**; диффузная В-клеточная лимфома из малых лимфоцитов красной пульпы селезенки [может быть гетерогенная или отрицательная экспрессия **CD103**, отношение средней интенсивности флуоресценции (MFI) **CD200** к **CD180** < 0,5].

Лимфома Беркитта

Зрелая агрессивная В-клеточная лимфома, состоящая из мономорфных клеток среднего размера с базофильной цитоплазмой, несколькими нуклеолами, фенотипом герминального центра, высоким пролиферативным индексом и перестройкой *IG::MYC* — **t(8;14)**, **t(2;8)**, **t(8;22)**.

Поражение костного мозга и лейкемизация часто встречается при данном типе лимфомы, нередко необходимо проводить дифференциальный диагноз с ОЛ.

В типичных случаях опухолевые клетки при лимфоме Беркитта (ЛБ) имеют характерный иммунофенотип: яркая экспрессия поверхностных иммуноглобулинов с рестрикцией легких цепей, В-линейных маркеров (**CD19**, **CD20**, **CD22**, **CD79b**), маркеров герминального центра **CD10**, **BCL6**, линейно-неограниченных маркеров **CD45**, **CD38**, **CD43**, **ROR1**, при этом, в отличие от случаев ОЛ, отрицательная экспрессия **CD305**, **BCL2**, **CD34**, **TdT**.

Диагностика зрелых Т-клеточных лимфом методом проточной цитометрии

Зрелые Т-лимфоциты представлены гетерогенной популяцией клеток с разнообразным набором функций. Большая часть Т-клеток участвует в работе адаптивной иммунной системы, но некоторые субпопуляции

имеют признаки врожденного иммунного ответа, например НКТ-лимфоциты, $\gamma\delta$ -Т-лимфоциты.

Для формирования ответа на появление антигена в организме человека происходит каскад различных изменений Т-лимфоцита, в результате которых становится возможным выполнение его эффекторных функций (цитотоксических, хелперных или регуляторных). По мере этой трансформации меняется и иммунофенотип Т-клетки.

Наивный Т-лимфоцит с уникальным Т-клеточным рецептором выходит из тимуса и попадает в кровеносное русло и лимфатическую систему. Ему необходимы: селектиновые рецепторы (CD62L), интегрины (CD11a — LFA-1 интегрин) и хемокиновый рецептор (CD197), чтобы проникать в Т-зону лимфатических узлов; коактиваторы CD27, CD28 — для первичной активации (праймаинга) Т-лимфоцита, также он характеризуется экспрессией CD45RA и CD127.

Когда чужеродный антиген попадает в организм, его фагоцитируют дендритные клетки (преимущественно миелоидные дендритные клетки). Далее они с током лимфы попадают в регионарные лимфатические узлы, где презентруют чужеродные белки в составе главного комплекса гистосовместимости (МНС). Циркулирующий Т-лимфоцит, рецептор которого специфичен к данному антигену, проходя данную группу регионарных лимфатических узлов, встречается с дендритной клеткой, активируется и на время останавливает свое движение, получая стимул к дальнейшему развитию и пролиферации.

Если это цитотоксический Т-лимфоцит, то он начинает продуцировать цитотоксические гранулы, содержащие гранзимы и перфорин, способные разрушать клетку-мишень. Если это Т-хелпер, то в зависимости от антигена и стимулирующих сигналов могут образоваться субпопуляции, способные секретировать различные цитокины. Th1 стимулируют другие Т-клетки и макрофаги, Th2 способствуют активации В-лимфоцитов, Th17 оказывают влияние на гранулоциты, обладают провоспалительными функциями. Фолликулярные Т-хелперы — отдельная группа Т-клеток, которые играют роль в процессе соматической гипермутации и переключении класса В-лимфоцитов. Они практически не циркулируют в крови, имеют иммунофенотип: BCL6+CD10+CD279+CD185+. Регуляторные Т-клетки — еще одна особая группа, они обладают супрессорными функциями и имеют специфический иммунофенотип CD25+CD127-FOXP3+.

После активации и накоплении эффекторного потенциала клетки направляются к очагу поражения для реализации своих функций: киллинг инфицированных клеток, стимуляция других клеток-участниц иммунного ответа, супрессия иммунной реакции для предотвращения

повреждения органов и тканей организма хозяина собственными иммунными клетками.

Активированные клетки перестают экспрессировать маркеры, необходимые для первичной активации (CD27, CD28), на какое-то время появляются CD25, CD38, HLA-DR, CD56, лимфоцит может утратить хемокиновый рецептор Т-зоны лимфатических узлов (CD197) и, соответственно, тропность к лимфатическим узлам. Меняется также и экспрессия Т-клеточных маркеров: снижается CD7, CD5; повышается CD2.

После элиминации антигена большинство Т-клеток подвергаются апоптозу. Остается небольшая часть лимфоцитов в качестве клеток памяти, которые способны пролиферировать и повторно активироваться. Часть из них постоянно циркулирует, часть постоянно находится в тканях с высоким риском повторной инфекции (например, кожа, кишечник и т. д.) или регионарных лимфатических узлов. Характерным для клеток памяти является фенотип CD45RO+CD127+. Лимфоциты памяти, способные проникать в ткани лимфатических узлов, называют «центральными» клетками памяти, они экспрессируют соответствующий рецептор — CD197; а отрицательные по этому маркеру клетки, утратившие тропность к лимфатическим узлам и циркулирующие в крови, называют «периферическими» клетками памяти. Клетки, долго находящиеся в тканях различных органов, — «резидентные Т-клетки памяти».

Зрелые Т-клеточные опухоли представляют собой несколько десятков нозологических единиц, каждая из которых условно соответствует той или иной субпопуляции нормальных Т-лимфоцитов.

Процесс диагностики Т-клеточных лимфом методом проточной цитометрии можно условно разделить для 3 этапа:

1. Выявление опухолевой популяции (аберрантный иммунофенотип, признаки Т-клеточной клональности).
2. Сопоставление с неопухолевым аналогом.
3. Выявление патогномоничных опухолевых маркеров (суTCL1, CD30, CD10, CD279).

Для реализации пп. 1 и 2 необходимо помнить нормальные паттерны активации Т-лимфоцитов (рис. 15). В норме популяция Т-клеток гетерогенна и экспрессия антигенов представляет собой континуум (часть циркулирующий клеток — наивные, часть — активированные и памяти).

Популяция с гомогенной экспрессией или полным отсутствием одного или нескольких Т-клеточных маркеров, возможно, с какими-то другими абберациями (снижение CD45 и т. д.) должна быть расценена как потенциально опухолевая и подвергаться дальнейшему анализу.

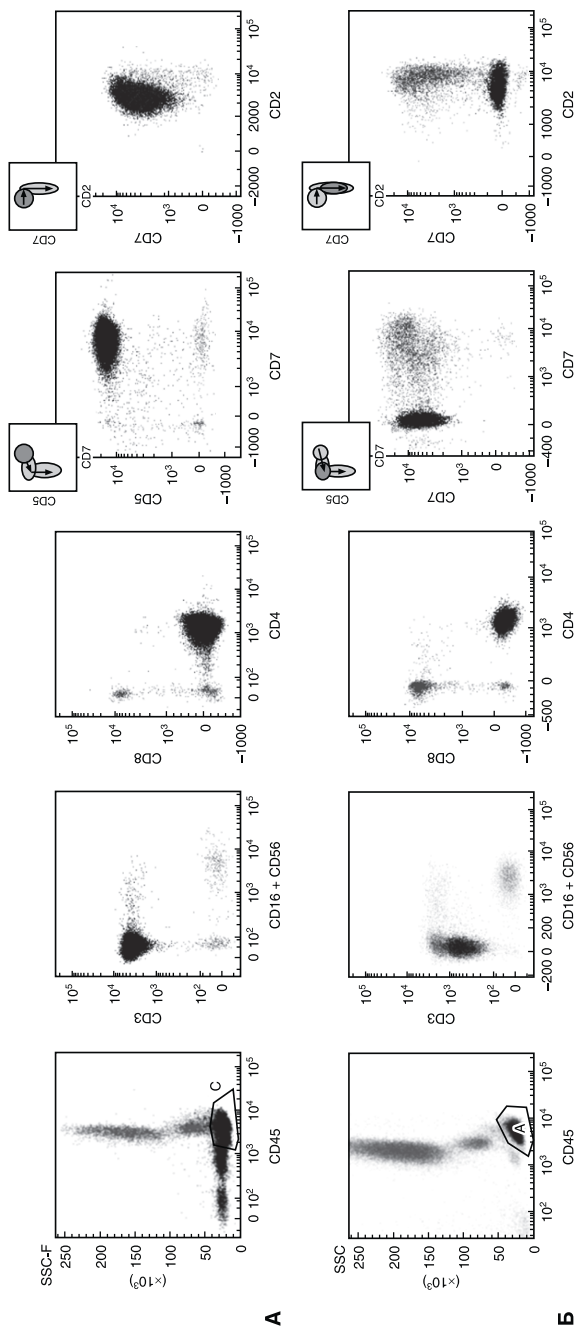
**Б**

Рисунок 15. Выделение опухолевой популяции в связи с aberrантным иммунофенотипом (выделена темно-серым). **А.** Опухолевая популяция отличается от нормальной популяции гетерогенной экспрессией CD45, гомогенно яркой экспрессией CD4, CD5, CD7 и сниженной экспрессией CD2. **Б.** Опухолевая популяция отличается сниженной экспрессией CD3, гомогенной экспрессией CD4, CD5, отрицательной экспрессией CD7. Уменьшенные схемы в левом верхнем углу графиков показывают нормальные паттерны активации лимфоцитов.

Т-клеточную клональность методом проточной цитометрии можно исследовать при помощи набора реагентов «TCRV β repertoire kit» или моноклонального антитела anti-TRBC1.

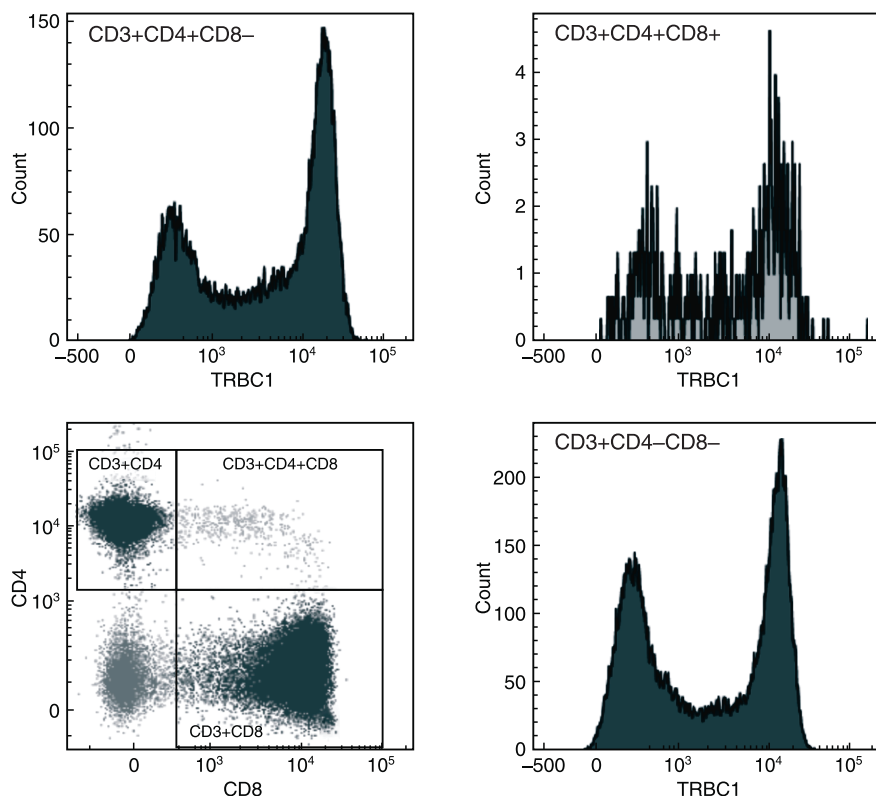
«TCRV β repertoire kit» состоит из 24 антител к вариабельному региону β -цепи TCR. Этот набор охватывает 70% репертуара Т-клеточного рецептора, остальные 30% циркулирующих Т-лимфоцитов не свяжутся ни с одним из 24 антител. При этом исследовании популяция клеток считается клональной, если $> 50\%$ клеток экспрессируют один и тот же тип TCRV β или $> 70\%$ клеток негативны по всем вариантам TCRV β , представленных в наборе. Метод довольно эффективен, чувствительность и специфичность составляют 89% и 88% соответственно, но достаточно трудоемкий и дорогостоящий.

С 2019 г. появился альтернативный метод — антитело к одному из двух вариантов константного региона β -цепи TCR (anti-TRBC1). В норме около половины Т-лимфоцитов позитивны по этому антигену, остальные — негативны. Популяция считается клональной, если $> 85\%$ или $< 15\%$ клеток экспрессируют этот маркер или наблюдается слабая экспрессия антигена. Метод прост в использовании, стоимость не отличается от остальных реагентов для диагностики, чувствительность 97—100%, специфичность 91% (рис. 16).

Следует отметить, что в 16% случаев у пациентов с заболеваниями, отличными от Т-лимфопролиферативных заболеваний (аутоиммунные процессы, В-клеточные лимфомы, эозинофилия, цитопения или лейкоцитоз неясной этиологии), выявляется популяция Т-лимфоцитов с монотипической экспрессией данного антигена. Чаще всего эти клетки составляют $< 15\%$ от всех лимфоцитов и имеют иммунофенотип TCRab+CD8+CD4 $-$, но встречаются и клетки TCRab+CD4+CD8+, и TCRab+CD4+CD8 $-$. Данную популяцию определили как T-CUS — T-cell clones of uncertain significance (клональная Т-клеточная популяция неясного значения). Таким образом, клональная популяция, составляющая $< 15\%$ от всех лимфоцитов, может быть реактивной, в этом случае необходимо проводить более тщательную дифференциальную диагностику и динамическое наблюдение.

Для второго этапа диагностики основными маркерами исследования являются: CD27, CD28, CD197, CD45RA, CD45R0, cyGranzyme B, cyPerforin.

Поскольку Т-клеточные лимфомы в пределах одной нозологии могут иметь различный иммунофенотип (например, описан и CD4+, и CD8+ лейкоз из больших гранулярных лимфоцитов и др.), главное, что необходимо уточнить, — обладают ли опухолевые клетки цитотоксическим потенциалом (есть ли гранулы гранзима В и перфорина), так как эта характеристика постоянная для всех типов лимфом, кроме



А

Рисунок 16. Выделение опухолевой популяции. Определение Т-клеточной клональности методом проточной цитометрии.

А. Вариант нормы: все субпопуляции Т-лимфоцитов имеют примерно равные позитивную и негативную популяции по TRBC1.

Т-клеточной периферической неспецифицированной лимфомы. Цитотоксический статус чаще всего ассоциирован с признаками активации или терминальной эффекторной дифференцировкой. Отсутствие признаков цитотоксичности — с иммунофенотипом наивных клеток или лимфоцитов памяти. Это может помочь сориентироваться в направлении диагноза, особенно когда иммунофенотип опухоли отличается от «классического» (рис. 17).

На третьем этапе проводится анализ экспрессии маркеров, ассоциированных с различными типами лимфом.

CD10 и CD279 — маркеры, характерные для лимфом из фолликулярных Т-хелперов. CD30 — обязательный маркер для анапластической крупноклеточной лимфомы (АККЛ), но может экспрессировать-

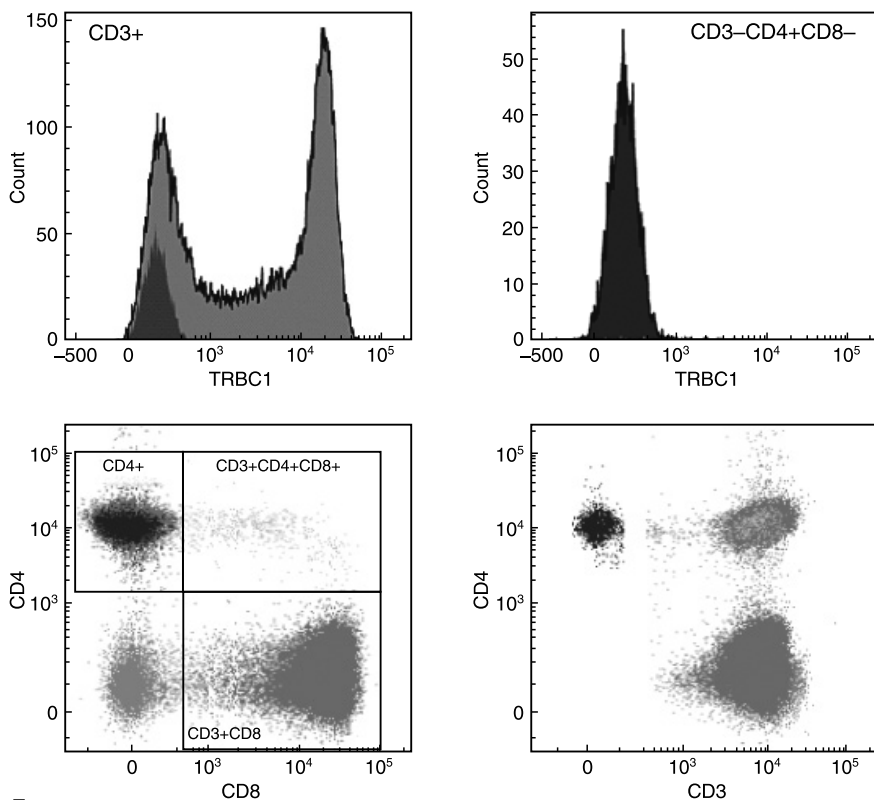
**Б**

Рисунок 16 (окончание). Выделение опухолевой популяции. Определение Т-клеточной клоналности методом проточной цитометрии.

Б. Выявлена клональная популяция Т-клеток (выделена темно-серым) с aberrantным иммунофенотипом CD4+CD3-.

ся и при других типах как Т-клеточных, так и В-клеточных лимфом, однако при анапластической крупноклеточной лимфоме отмечается наиболее яркая экспрессия антигена. TCL1 — белок, характерный для дубль-позитивных тимоцитов, и не экспрессируется на зрелых Т-клетках, является специфичным маркером для Т-клеточного пролимфоцитарного лейкоза.

При других типах лимфом можно предположить диагноз, опираясь только на 1-й и 2-й этапы диагностики. В любом случае диагноз Т-клеточных лимфом, как отмечалось ранее, требует максимально мультидисциплинарного подхода и производится на основании комплексной оценки данных клинического, лабораторного, гистологического, инструментального исследований.

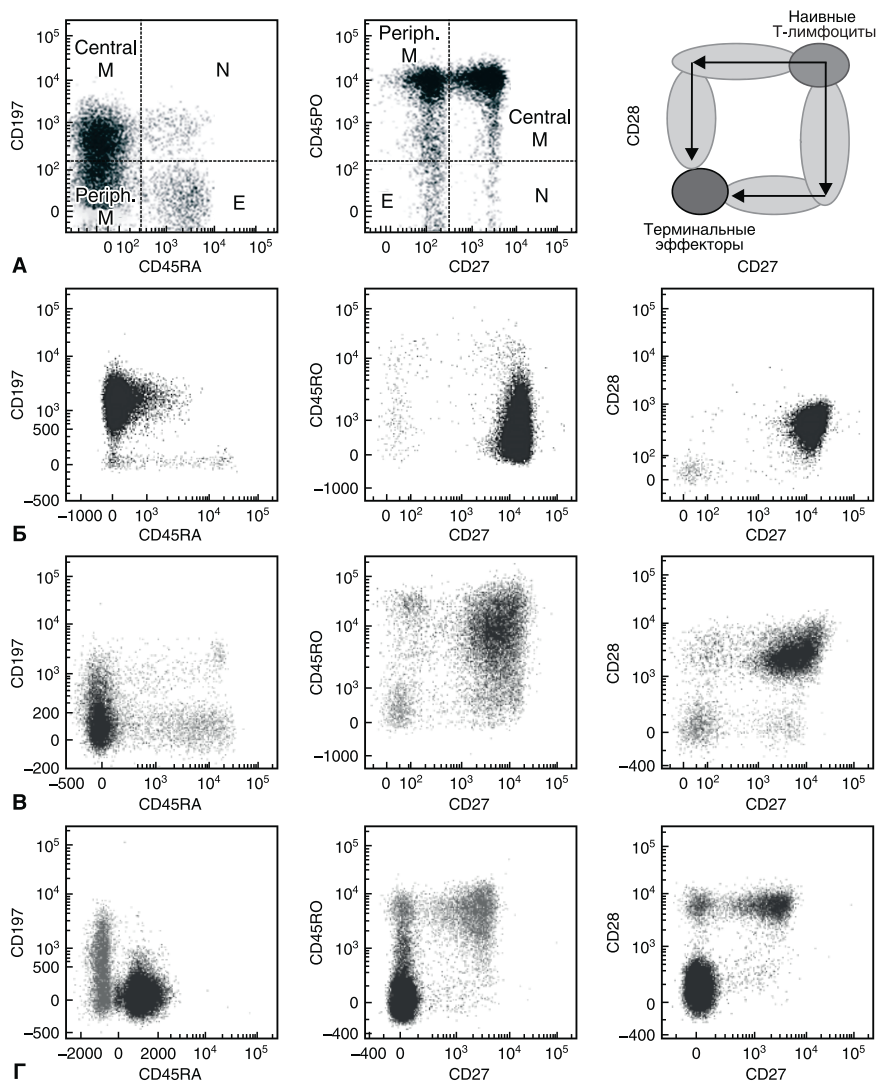


Рисунок 17. Сопоставление опухолевой популяции с неопухолевым аналогом. **А.** Вариант нормы. Распределение субпопуляций Т-хелперов (N — наивные, Central M — центральные памяти, Periph. M — периферические памяти, E — эффекторные). **Б.** Опухолевые клетки (выделены темно-серым) условно соответствуют наивным и центральным клеткам памяти. **В.** Опухолевые клетки (выделены темно-серым) условно соответствуют центральным и периферическим клеткам памяти. **Г.** Опухолевые клетки (выделены темно-серым) условно соответствуют терминальным эффекторам. Окончательный диагноз на основании данных полного обследования: Б, Д — Т-пролимфоцитарный лейкоз; В — синдром Сезари; Г — Т-клеточный лейкоз из больших гранулярных лимфоцитов.

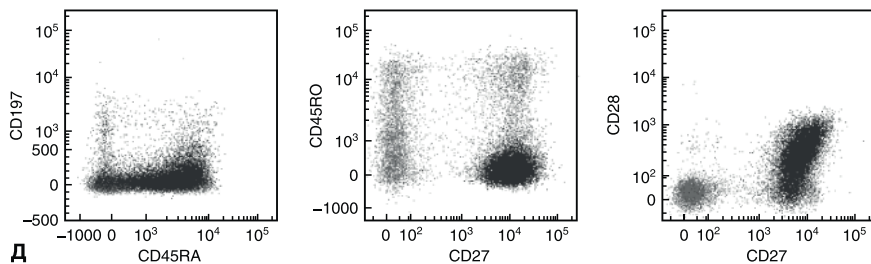


Рисунок 17 (окончание). Сопоставление опухолевой популяции с неопухолевым аналогом. **Д.** При сопоставлении экспрессии различных антигенов опухолевые клетки (выделены темно-серым) демонстрируют противоречивые паттерны дифференцировки (соответствуют терминальным эффекторам при исследовании CD197/CD45RA, наивным клеткам при исследовании CD45RA/CD27; CD28/CD27). Однако данный фенотип более соответствует наивным лимфоцитам с aberrантным отсутствием CD197.

Т-пролимфоцитарный лейкоз

Т-пролимфоцитарный лейкоз (Т-ПЛЛ) — клональная пролиферация пролимфоцитов малого и среднего размера со зрелым посттимическим фенотипом, характеризующаяся присоединением гена *TCL1A* или *MTCP1* рядом с локусом гена *TCR*, чаще всего к локусу, кодирующему α - и δ -цепи TCR (TRA/TRD).

В результате хромосомных перестроек *inv*(14)(q11q32) и *t*(14;14)(q11;q32) ген *TCL1A* встраивается рядом с локусом TRA/TRD (реже TRB) и его (*TCL1A*) экспрессия увеличивается. Примерно в 5% случаев возникает *t*(X;14)(q28;q11.2), в результате которой ген *MTCP1* переходит под влияние регуляторных элементов TCR. Все эти изменения приводят к нескольким лейкемогенным процессам:

1. Усиливается сигнальный каскад TCR, вследствие чего ингибируется ассоциированный с активацией апоптоз.
2. Усиливается сигнальный каскад АКТ, что повышает клеточную пролиферацию и выживание.

Также нередко возникают дополнительные генетические события, усиливающие процессы онкогенеза.

1. В результате мутации или делеции гена *ATM* (атаксии-телеангиэктазии) не происходит должной репарации, накапливаются повреждения и мутации ДНК.
2. Активирующие мутации генов *IL2RG*, *JAK1/3* и *STAT5B* приводят к постоянному STAT5-сигналингу (наблюдается в 75% случаев Т-ПЛЛ).
3. Мутации генов *EZH2*, *FBXW10* и *CHEK2* приводят к нарушению эпигенетической регуляции (процессы деградации протеосом, репарация ДНК, сигналинг).

4. Комплексные нарушения кариотипа наблюдаются в 70—80% случаев (изменения в 5, 6, 12, 17 и 22-й хромосомах).
5. Изменения в 8-й хромосоме: 8idic(8)(p11), t(8;8)(p11-12;q12), трисомия 8q.

Т-ПЛЛ демонстрирует зрелый иммунофенотип, чаще всего соответствующий центральным клеткам памяти, позитивный по CD2, CD3 (экспрессия может быть снижена), CD5 и CD7, негативный по CD34, TdT, CD1a. Чаще всего опухолевые клетки CD4+/CD8– (40—60%), CD4+/CD8+ встречается в 25—41% случаев, но обладает наибольшей специфичностью для Т-ПЛЛ, так как практически не встречается при других типах лимфом; CD4–/CD8+ Т-ПЛЛ выявляется в 15% случаев. Опухолевые клетки часто характеризуются высокой экспрессией CD52, что может являться мишенью терапевтического воздействия. Экспрессия TCL1 может быть выявлена при иммуногистохимическом исследовании или методом проточной цитометрии.

Критерии диагностики:

Большие:

1. $> 5 \times 10^9$ /л клеток с иммунофенотипом Т-ПЛЛ в крови или костном мозге.
2. Выявлена Т-клеточная клональность методом ПЦР (TRB/TRG) или проточной цитометрии.
3. Аномалии 14q32 и Xq28 с гиперэкспрессией генов *TCL1/2*, *MTCP1*.

Малые:

1. Аномалии, вовлекающие 11-ю хромосому (11q22.3; ATM)
2. Аномалии 8-й хромосомы: 8idic(8)(p11), t(8;8)(p11-12;q12), трисомия 8q.
3. Аномалии 5, 12, 13 и 22-й хромосом или комплексный кариотип.
4. Вовлечение специфических для Т-ПЛЛ очагов (спленомегалия, плевральный выпот).

Таким образом, основным маркером для проточной цитометрии является экспрессия белка TCL1. Однако отсутствие экспрессии антигена не исключает диагноз, в то же время отсутствие цитотоксических гранул и фенотип, соответствующий наивным Т-лимфоцитам или центральным Т-клетками памяти, поможет ориентировать дифференциальную диагностику в сторону Т-ПЛЛ.

Грибовидный микоз и синдром Сезари

Грибовидный микоз — эпидермотропная, первично кожная Т-клеточная лимфома, характеризующаяся инфильтрацией малыми или среднего размера Т-лимфоцитами с церебриформным ядром.

Синдром Сезари — Т-клеточная лимфома, определяемая триадой: эритродермия более 80% поверхности тела, генерализованная лимфа-

денопатия и наличие клонально родственных неопластических Т-клеток с церебриформными ядрами (клетки Сезари) в коже, лимфатических узлах и периферической крови (опухолевая природа клеток должна быть подтверждена выявлением клональных реаранжировок гена *TCR* или увеличением абсолютного числа клеток Сезари $\geq 1000/\text{мкл}$ либо отношением $\text{CD4}/\text{CD8} > 10$, наличием $\text{CD4}+\text{CD7}$ -клеток $\geq 40\%$ или клеток $\text{CD4}+\text{CD26}- \geq 30\%$.

Считается, что при грибовидном микозе опухолевые клетки сходны с тропными к коже Т-лимфоцитами памяти, а в случае синдрома Сезари — с центральными или периферическими Т-клетками памяти.

Иммунофенотип соответствует клеткам памяти ($\text{CD27}+\text{CD45RA}-\text{CD45RO}+$), с потерей нескольких Т-линейных маркеров (CD2 , CD5 , CD7 , CD26), снижением CD4 и TCR , часто $\text{CD30}+$. $\text{CD8}+\text{TCR}\gamma\delta+$ фенотип может также встречаться, чаще характерен для африканской и азиатской популяции.

Лимфомы из фолликулярных Т-хелперов

Это нодальные Т-клеточные лимфомы, при которых иммунофенотип опухолевых клеток соответствует фолликулярным Т-хелперам (ФТХ) — эффекторным клеткам, локализующимся в лимфатических узлах и регулирующим формирование вторичного фолликула, процессы синтеза иммуноглобулинов В-клетками.

К этой подгруппе относится ангиоиммунобластная Т-клеточная лимфома, которая в классификации ВОЗ 2022 г. обозначается как ангиоиммунобластный тип лимфомы из фолликулярных Т-хелперов.

Опухолевые клетки имеют иммунофенотип $\text{CD4}+$, часто $\text{CD2}+\text{CD5}+\text{CD7}+$, но поверхностная экспрессия CD3 может быть снижена или отсутствовать. Могут экспрессироваться антигены, ассоциированные с фолликулярными Т-хелперами: CD279 , CD278 , CD10 , BCL-6 , CXCL13 .

В здоровых тканях лимфатических узлов фолликулярные Т-хелперы стимулируют работу В-лимфоцитов. При развитии опухоли клеточный состав пораженного лимфатического узла может быть представлен преимущественно В-лимфоцитами, нередко выявляется моноклональная секреция иммуноглобулинов при иммунохимическом исследовании крови и мочи. В связи с этим проточная цитометрия может быть крайне полезна для идентификации минорного опухолевого клона с aberrантным фенотипом среди обширной реактивной популяции.

Т-клеточный лейкоз из больших гранулярных лимфоцитов (Т-БГЛ)

Это опухолевая пролиферация из цитотоксических больших гранулярных лимфоцитов с персистирующим абсолютным ($> 2 \times 10^9/\text{л}$) или относительным ($> 50\%$) лимфоцитозом.

Наиболее характерным иммунофенотипом является CD8+TCR $\alpha\beta$ + +CD57+CD16+CD45RA+CD62L—, соответствующий эффекторным клеткам памяти, часто негативным по CD5 и CD56. Реже встречаются Т-БГЛ из CD4+ или CD4+CD8+ клеток. TCR $\gamma\delta$ + фенотип наблюдается в 10% случаев. Опухолевые клетки экспрессируют цитотоксические гранулы (гранзим В, перфорин). Клональность может быть подтверждена методом проточной цитометрии или молекулярно-генетическим методом.

Необходимо проводить дифференциальный диагноз с другими Т-клеточными лимфомами, но в первую очередь с реактивными лимфоцитозами из БГЛ. В пользу опухолевого процесса свидетельствует поражение периферических лимфоидных органов (лимфатические узлы, селезенка и т. д.), выявление Т-клеточной клональности, мутация *STAT3/5B*.

Анапластическая крупноклеточная лимфома

Это зрелая нодальная Т-клеточная лимфома с яркой гомогенной экспрессией CD30. Различают подтипы опухоли с реаранжировкой гена *ALK* и экспрессией белка ALK, и без перестроек данного гена. Отдельно выделяют вариант, ассоциированный с имплантами молочной железы.

Опухолевые клетки имеют фенотип CD30+ в сочетании с CD4+ и одним или несколькими цитотоксическими маркерами (гранзим В, перфорин). Т-клеточные антигены (CD2, CD5, CD7, CD8, даже CD3 и TCR), CD45 могут быть отрицательными («нулевой фенотип»), но CD43, CD25, CD58, HLA-DR часто позитивны. В типичных случаях опухоль представлена крупными клетками с яркой экспрессией CD30, однако встречаются и мелкоклеточные варианты с более слабой или даже негативной экспрессией антигена. Такой вариант трудно дифференцировать с Т-ОЛЛ, экспрессия цитотоксических молекул может помочь направить диагноз в сторону зрелой Т-клеточной лимфомы (рис. 18).

Заключение

Таким образом, проточная цитофлуориметрия — чувствительный метод диагностики острых лейкозов и лимфом. Окончательный диагноз, согласно современным классификациям, должен быть установлен по совокупности данных клинических, лабораторных, патологоанатомических и инструментальных методов исследования.

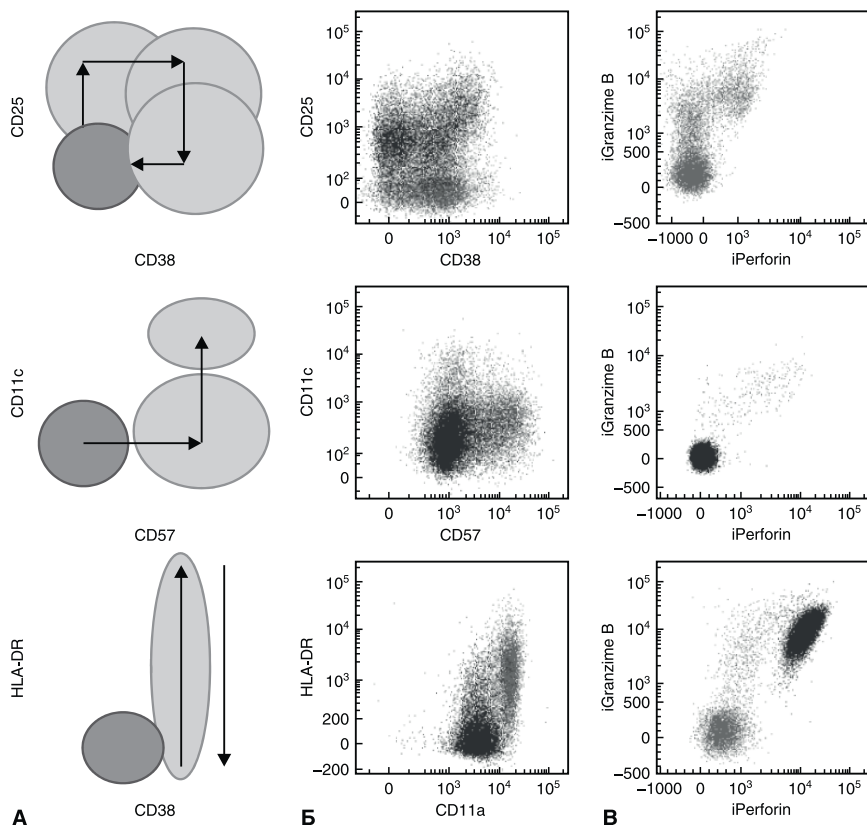


Рисунок 18. Маркеры активации и цитотоксичности. **А.** Паттерны активации лимфоцитов в норме. **Б.** Опухолевые клетки (выделены темно-серым) могут соответствовать той или иной стадии активации. **В.** 1. Нормальный паттерн экспрессии цитотоксических гранул (сначала в клетках появляется Granzyme B, затем Perforin). 2. Опухолевые клетки (выделены темно-серым) не экспрессируют цитотоксических молекул. 3. Опухолевые клетки (выделены темно-серым) гомогенно экспрессируют Granzyme B и Perforin.

Литература

1. Alexander TB, Gu Z, Iacobucci I et al. The genetic basis and cell of origin of mixed phenotype acute leukaemia. *Nature* 2018; 562:373–379. DOI: 10.1038/s41586-018-0436-0.
2. Allsup DJ, Craig Z, Cairns D et al. Long-term follow-up of 415 patients with chronic lymphocytic leukemia treated with fludarabine and cyclophosphamide-based chemoimmunotherapy in the frontline ADMIRE and ARCTIC trials: A comprehensive assessment of prognostic factors. *Am J Hematol* 2022; 97(5): E168–E171.

3. Pepper AGS, Zucchetto A, Norris K et al. Combined analysis of IGHV mutations, telomere length and CD49d identifies long-term progression-free survivors in TP53 wild-type CLL treated with FCR-based therapies. *Leukemia* 2022; 36(1):271—274.
4. Abo-Elwafa HA, Aziz SP, Ahmed HA et al. Surrogate role of CD85k on monocytic lineage involved leukemogenesis biology and clinical aspect. *OJBD* 2018; 8(4):61—73.
5. Alaggio R, Amador C, Anagnostopoulos I et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms. *Leukemia* 2022; 36(7):1720—1748.
6. Arber DA, Orazi A, Hasserjian RP et al. International Consensus Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemias: integrating morphologic, clinical, and genomic data. *Blood* 2022; 140(11):1200—1228.
7. Marballi Basavaraju D, Mishra S, Chhabra G, Chougule S. Comparison of flow-cytometry-based scoring system for the diagnosis of early T precursor-acute lymphoblastic leukemia. *Cytometry B Clin Cytom* 2023. DOI: 10.1002/cyto.b.22119.
8. Bulian P, Shanafelt TD, Fegan C et al. CD49d is the strongest flow cytometry-based predictor of overall survival in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*; 32(9):897—904.
9. Campo E, Jaffe ES, Cook JR et al. The International Consensus Classification of Mature Lymphoid Neoplasms: a report from the Clinical Advisory Committee. *Blood* 2022; 140(11):1229—1253.
10. Chapiro E, Delabesse E, Asnafi V et al. Expression of T-lineage-affiliated transcripts and TCR rearrangements in acute promyelocytic leukemia: Implications for the cellular target of t(15;17). *Blood* 2006; 108(10):3484—3493.
11. Christen F, Hoyer K, Yoshida K et al. Genomic landscape and clonal evolution of acute myeloid leukemia with t(8;21): An international study on 331 patients. *Blood* 2019; 133(10):1140—1151.
12. Churchill HRO, Fuda FS, Xu J et al. Leukocyte immunoglobulin-like receptor B1 and B4 (LILRB1 and LILRB4): Highly sensitive and specific markers of acute myeloid leukemia with monocytic differentiation. *Cytometry B Clin Cytom* 2021; 100(4):476—487.
13. D'Arena G, Volpe S, Amodeo R et al. Italian Cytometry Society (GIC) endorsement of consensus recommendations for measurable residual disease in chronic lymphocytic leukemia. *Int J Lab Hematol* 2022; 44(3):e120—e122.
14. Döhner H, Wei AH, Appelbaum Fret al. Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN. *Blood* 2022; 140(12):1345—1377.
15. van Dongen JJ, Lhermitte L, Böttcher S et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia* 2012; 26(9):1908—1975.
16. Duffield AS, Mullighan CG, Borowitz MJ. International Consensus Classification of acute lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Virchows Arch* 2023; 482(1): 11—26.

17. Ghia P, Rawstron A. Minimal residual disease analysis in chronic lymphocytic leukemia: A way for achieving more personalized treatments. *Leukemia* 2018; 32(6):1307–1316.
18. Grzywacz B, Yohe S, Shivers P et al. Patients without cutaneous T-cell lymphoma frequently harbor CD4 T-lymphocytes that lack CD26 and/or CD7. *Cytometry B Clin Cytom* 2022; 102(5):412–414.
19. Gu Z, Churchman ML, Roberts KG et al. PAX5-driven subtypes of B-progenitor acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet* 2019; 51(2):296–307.
20. Horna P, Wang SA, Wolniak KL et al. Flow cytometric evaluation of peripheral blood for suspected Sézary syndrome or mycosis fungoides: International guidelines for assay characteristics. *Cytometry B Clin Cytom* 2021; 100(2):142–155.
21. Huang SL, Fennell T, Chen X, Huang JZ. The patterns and diagnostic significance of the lack of surface immunoglobulin light chain on mature B cells in clinical samples for lymphoma workup. *Cytometry B Clin Cytom* 2023; 104(3): 263–270.
22. Khoury JD, Solary E, Abal O et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. *Leukemia* 2022; 36(7):1703–1719.
23. Maciocia PM, Wawrzyniecka PA, Philip B et al. Targeting the T cell receptor β -chain constant region for immunotherapy of T cell malignancies. *Nat Med* 2017; 23(12):1416–1423.
24. Mair F, Liechti T. Comprehensive phenotyping of human dendritic cells and monocytes. *Cytometry A* 2021; 99(3):231–242.
25. Matson DR, Yang DT. Autoimmune lymphoproliferative syndrome an overview. *Arch Pathol Lab Med* 2020; 144(2):245–251.
26. Munir T, Emmerson J, Hockaday A et al. Obinutuzumab as consolidation after chemo-immunotherapy: Results of the UK National Cancer Research Institute phase II/III GALACTIC trial. *Br J Haematol* 2022; 199(5):707–719.
27. Norris K, Hillmen P, Rawstron A et al. Telomere length predicts for outcome to FCR chemotherapy in CLL. *Leukemia* 2019; 33(8):1953–1963.
28. Novikov ND, Griffin GK, Dudley G et al. Utility of a simple and robust flow cytometry assay for rapid clonality testing in mature peripheral T-cell lymphomas. *Am J Clin Pathol* 2019; 151(5):494–503.
29. Rawstron AC, Fazi C, Agathangelidis A et al. A complementary role of multiparameter flow cytometry and high-throughput sequencing for minimal residual disease detection in chronic lymphocytic leukemia: An European Research Initiative on CLL study. *Leukemia* 2016; 30(4):929–936.
30. Rawstron AC, Kreuzer KA, Soosapilla A et al. Reproducible diagnosis of chronic lymphocytic leukemia by flow cytometry: An European Research Initiative on CLL (ERIC) & European Society for Clinical Cell Analysis (ESCCA) Harmonisation project. *Cytometry B Clin Cytom* 2018; 94(1):121–128.
31. Saksena A, Yin CC, Xu J et al. CD23 expression in mantle cell lymphoma is associated with CD200 expression, leukemic non-nodal form, and a better prognosis. *Hum Pathol* 2019; 89:71–80.

32. Scarfò L, Ghia P. Chronic lymphocytic leukemia: who, how, and where? In: Hallek M, Eichhorst B, Catovsky D (editors). *Chronic lymphocytic leukemia*. Cham (CH): Springer, 2019. P. 3—17.
33. Shi M, Jevremovic D, Otteson GE et al. Single antibody detection of T-cell receptor $\alpha\beta$ clonality by flow cytometry rapidly identifies mature T-cell neoplasms and monotypic small CD8-positive subsets of uncertain significance. *Cytometry B Clin Cytom* 2020; 98(1):99—107.
34. Slamova L, Starkova J, Fronkova E et al. CD2-positive B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia with an early switch to the monocytic lineage. *Leukemia* 2014; 28(3):609—620. DOI: 10.1038/leu.2013.354.
35. Staber PB, Herling M, Bellido M et al. Consensus criteria for diagnosis, staging, and treatment response assessment of T-cell prolymphocytic leukemia. *Blood* 2019; 134(14):1132—1143.
36. Tam CS, Otero-Palacios J, Abruzzo LV et al. Chronic lymphocytic leukaemia CD20 expression is dependent on the genetic subtype: A study of quantitative flow cytometry and fluorescent in-situ hybridization in 510 patients. *Br J Haematol* 2008; 141(1):36—40.
37. Tangri S, Vall H, Kaplan D et al. Validation of cell-based fluorescence assays: Practice guidelines from the ICSH and ICCS. Part III: Analytical issues. *Cytometry B Clin Cytom* 2013; 84(5):291—308.
38. Hamdan H, Luu L, Opsahl M et al. Genomic profile of TdT positive MYC/BCL2 rearranged high-grade B-cell lymphoma supporting its diagnosis as mature aggressive lymphoma. *Cytometry B Clin Cytom* 2022; 102(6):448—450.
39. Vaux DL, Cory S, Adams JM. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 1988; 335(6189):440—442.
40. Viney JL, Prosser HM, Hewitt CR et al. Generation of monoclonal antibodies against a human T cell receptor β chain expressed in transgenic mice. *Hybridoma* 1992; 11(6):701—713.
41. Wagener R, López C, Kleinheinz K et al. IG-MYC1 neoplasms with precursor B-cell phenotype are molecularly distinct from Burkitt lymphomas. *Blood* 2018; 132(21):2280—2285.
42. Weinberg OK, Hassarjian RP, Baraban E et al. Clinical, immunophenotypic, and genomic findings of acute undifferentiated leukemia and comparison to acute myeloid leukemia with minimal differentiation: a study from the bone marrow pathology group. *Mod Pathol* 2019; 32(9):1373—1385.
43. Weinberg OK, Arber DA, Döhner H et al. The International Consensus Classification of acute leukemias of ambiguous lineage. *Blood* 2023; 141(18):2275—2277. DOI:10.1182/blood.2022019493.
44. Wierda WG, Rawstron A, Cymbalista F et al. Measurable residual disease in chronic lymphocytic leukemia: expert review and consensus recommendations. *Leukemia* 2021; 35(11):3059—3072.
45. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL et al. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon (France): International Agency for Research on Cancer; 2017.

46. WHO Classification of Tumours Editorial Board. Haematolymphoid tumours. Lyon (France): International Agency for Research on Cancer; 2022. (WHO classification of tumours series, 5th ed.; vol. 11). URL: <https://tumourclassification.iarc.who.int/chapters/63>.

И. В. Гальцева, Ю. О. Давыдова, Н. М. Капранов,
К. А. Никифорова, З. В. Конова, Е. Н. Паровичникова

Глава 5.

Мониторинг минимальной остаточной болезни у пациентов с острыми лейкозами методом проточной цитометрии

Введение

Внедрение в практику новых подходов к терапии острых лейкозов привело к тому, что полная ремиссия (ПР) на ранних этапах терапии может быть достигнута у большинства больных. Несмотря на достижение ПР, нередко развивается рецидив заболевания [1, 2], что может быть связано с сохранением так называемой минимальной остаточной болезни (МОБ) — небольшой популяции опухолевых клеток, не выявляемой при цитологическом исследовании, но которую можно обнаружить более чувствительными методами, такими как полимеразная цепная реакция (ПЦР) и многоцветная проточная цитометрия (МПЦ). Термин «минимальная остаточная болезнь» в настоящее время заменяется термином «минимальная измеряемая остаточная болезнь» [3].

Определение МОБ проводят в контрольных точках как на начальных этапах терапии (индукции ремиссии), так и при достижении ремиссии (этапы консолидации и поддерживающей терапии). В пределах одного протокола больные с быстрым клиренсом МОБ имеют более благоприятный прогноз, нежели больные с медленным клиренсом опухолевого клона и высокими значениями МОБ. Исследование МОБ на ранних этапах терапии используется для стратификации больных на группы риска и корректировки химиотерапии, например рассмот-

рения возможности изменения схемы терапии, добавления таргетных препаратов или проведения трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК) [4].

У больных острыми лейкозами выявлена связь между предтрансплантационным МОБ-статусом и общей и безрецидивной выживаемостью (ОВ и БРВ) после алло-ТГСК, что подтверждает независимое прогностическое значение МОБ для результатов алло-ТГСК. В 2018 г. Shen и соавт. провели метаанализ 21 исследования, выполненного с 1998 по 2016 г., которые были посвящены изучению влияния МОБ-статуса непосредственно перед алло-ТГСК на выживаемость больных острыми лимфобластными лейкозами (ОЛЛ). Метаанализ показал, что у больных с МОБ-позитивным статусом перед алло-ТГСК частота развития рецидивов выше, чем у больных с МОБ-негативным статусом, — отношение рисков (ОР) = 3,26; $p < 0,05$. Также больные с МОБ-положительным статусом перед алло-ТГСК имели меньшую вероятность БРВ (ОР = 2,53; $p < 0,05$) и ОВ (ОР = 1,98; $p < 0,05$) [5]. У больных острыми миелоидными лейкозами (ОМЛ) наблюдается такая же закономерность: в случае наличия МОБ перед трансплантацией вероятность развития рецидива (ВРР) значимо выше, чем в случае отсутствия МОБ [6—9].

Таким образом, выполнение алло-ТГСК больным с МОБ-позитивным статусом ассоциировано с неблагоприятным прогнозом, а именно высоким риском развития рецидива в посттрансплантационном периоде, несмотря на наличие морфологической ПР перед алло-ТГСК. Поэтому проводится разработка терапевтических подходов, позволяющих либо добиться МОБ-негативности перед проведением алло-ТГСК, либо осуществлять выбор оптимального донора, варианта кондиционирования, иммуносупрессивной терапии, либо использовать различные виды посттрансплантационного воздействия на лейкоэмический клон (трансфузии лимфоцитов донора, таргетные препараты), направленного на предотвращение развития рецидива.

Принципы определения минимальной остаточной болезни методом многоцветной проточной цитометрии

В качестве материала для исследования МОБ методом МПЦ используется первая порция аспирата костного мозга (КМ) объемом не более 1 мл. Есть данные, что содержание миелокариоцитов в первой порции пунктата КМ превышает клеточность второй порции в три и более раз [10]. Таким образом, если объем аспирата КМ значительно превышает

1 мл или для исследования МОБ в лабораторию отправлена не первая порция КМ, можно ожидать значительную примесь крови в образце. Разведение кровью влияет на соотношение субпопуляций лейкоцитов, в результате чего доля бластных клеток не может быть точно подсчитана. Если в аспирате КМ присутствуют сгустки, то исследование не может быть проведено, поэтому сразу после забора материала рекомендуется тщательно перемешивать аспират КМ с антикоагулянтом в пробирке (рекомендуется использовать ЭДТА).

Поиск МОБ методом МПЦ основан на знании того, какие кластеры дифференцировки (CD — сокр. от англ. “clusters of differentiation”) обнаруживаются на клетках КМ разной линейной направленности (лимфоидной и миелоидной) и на разных стадиях созревания. Поиск МОБ методом МПЦ заключается в поиске одной или нескольких популяций клеток, имеющих такое сочетание антигенов дифференцировки, которое не встречается на нормальных клетках КМ. Такое сочетание называют лейкоз-ассоциированным иммунофенотипом (ЛАИФ).

Существует два подхода к поиску МОБ методом МПЦ: поиск клеток с ЛАИФ, аналогичным обнаруженному в дебюте заболевания, и поиск клеток, с иммунофенотипом, не встречающимся при нормальном созревании и дифференцировке лейкоцитов [11].

Первый подход подразумевает составление набора моноклональных антител на основании данных, полученных в результате поиска ЛАИФ на лейкоэмических клетках в дебюте заболевания. Такой набор затем используется для мониторинга МОБ в течение терапии. У каждого больного сочетание используемых моноклональных антител может быть разным. Очевидным недостатком этого метода является то, что при смене иммунофенотипа бластных клеток, выявленного в дебюте заболевания, результат исследования может быть ложноотрицательным [12, 13]. Кроме того, использование индивидуальных панелей для каждого пациента не всегда удобно в клинической практике.

Второй подход к поиску МОБ требует тщательного изучения нормального иммунофенотипа зрелых клеток и их предшественников и может осуществляться без знания иммунофенотипа бластных клеток в дебюте заболевания. На всех контрольных точках исследования применяется одна универсальная широкая панель моноклональных антител, которая позволяет обнаружить опухолевые клетки определенной линейности. То есть для детекции МОБ у больных В-ОЛЛ, Т-ОЛЛ и ОМЛ применяют абсолютно разные сочетания моноклональных антител. В ходе анализа используются двумерные графики — диаграммы, — которые позволяют визуально оценить экспрессию двух антигенов одновременно, а с помощью гейтирования (выделения клеток с интересующими характеристиками) можно изучить экспрессию всех антигенов

на клетках, выделенных на диаграмме. Если выделенная популяция клеток находится в тех областях диаграмм, в которых нормальные клетки отсутствуют, то дается заключение о наличии МОБ — клеток с иммунофенотипом, отличным от нормального. Такой подход называют «метод пустых мест» или метод «отличия от нормального» [12, 13].

Рекомендуется комбинировать оба методических подхода: в дебюте заболевания проводить поиск ЛАИФ с помощью той же панели антител, по которой в дальнейшем будет производиться детекция МОБ. Знание иммунофенотипа бластных клеток в дебюте заболевания помогает в определении остаточных опухолевых клеток в период ремиссии, однако следует помнить о возможной смене иммунофенотипа в течение терапии [12, 13].

Мониторинг МОБ при В-линейном остром лимфобластном лейкозе

Созревание В-клеток происходит в костном мозге и включает несколько этапов. Условно можно выделить три стадии созревания В-клеточных предшественников, так называемых гематогинов. Все эти стадии В-клеточных предшественников, а также зрелые В-клетки и большая часть плазматических клеток имеют на своей поверхности CD19. Самые незрелые гематогины (стадия 1) экспрессируют на своей поверхности CD34, CD10, CD38 и CD58. На их поверхности отсутствует CD20, а CD45 слабо экспрессирован. Содержание этих клеток в норме составляет 0,01—4,06% от всех ядросодержащих клеток [14]. При переходе к стадии 2 гематогины полностью теряют экспрессию CD34, а экспрессия CD10 и CD58 снижается, экспрессия CD45 и CD38, наоборот, повышается. На части гематогинов 2-й стадии экспрессирован CD20. В норме доля этих клеток составляет 0,05—29,59% от всех ядросодержащих клеток [14]. Как видно, количество этих клеток сильно варьирует, и описана зависимость их количества от возраста: у детей В-клеток и гематогинов больше, чем у взрослых [14]. Наиболее зрелая стадия гематогинов — стадия 3 — характеризуется низкой экспрессией CD10, наличием CD20, более низкой экспрессией CD38 и высокой — CD45 [15—17].

На зрелых В-клетках не экспрессируется CD10, CD38 может быть слабо экспрессирован, а CD20 и CD45 высоко экспрессированы. Наиболее дифференцированная стадия В-клеток — это плазматические клетки. Они имеют наибольшую плотность экспрессии CD38, высокую экспрессию CD58, экспрессия CD45 ниже по сравнению со зрелыми В-клетками, а CD20 на них не обнаруживается. Иногда можно

обнаружить популяцию плазмобластов — промежуточную стадию между зрелыми В-клетками и плазматическими клетками. Плазмобласты имеют невысокую экспрессию CD38, не экспрессируют или экспрессируют слабо CD20, а CD45 экспрессирован на них так же, как на лимфоцитах [15–18].

Зная типичное изображение расположения на диаграммах В-клеток различных стадий созревания, можно дифференцировать их с опухолевыми клетками В-ОЛЛ (рис. 1). Исследование коэкспрессии достаточного числа маркеров помогает более точно разделять клеточные популяции и необходимо для случаев, когда популяция опухолевых клеток может пересекаться с популяцией нормальных гематогонov.

В настоящее время анализ МОБ при В-ОЛЛ методом МПЦ является стандартизированной процедурой. Стандартизация стала возможной благодаря международным исследованиям в этой области. Например, в одной из работ зарубежных коллег показана высокая степень совпадения результатов, полученных разными лабораториями, несмотря на различия в используемых оборудовании и реактивах [19].

В литературе можно встретить несколько вариантов панелей моноклональных антител для диагностики МОБ при В-ОЛЛ. Обязательным является анализ семи антигенов: CD19, CD10, CD34, CD38, CD20, CD45, CD58. Ряд авторов дополнительно анализируют другие маркеры, например CD11a, CD13, CD33, CD9, CD22, CD81 [17, 20–22].

Особую проблему представляет исследование образцов КМ больных, получающих терапию таргетными препаратами против CD19 (блинату-момаб), против CD22 (инотузумаб озогамидин) и Т-клеточную терапию (chimeric antigen receptor — CAR). Иммунотерапия может приводить к изменению иммунофенотипа бластных клеток и требует пересмотра стандартно применяющейся в лаборатории панели моноклональных антител [23], поэтому при поступлении образца КМ для анализа МОБ информация о применении таргетных препаратов в обязательном порядке должна отображаться в сопроводительных документах.

Гейтирование при анализе МОБ у больных В-ОЛЛ начинают с выделения всех CD19⁺ клеток. Гейт ставится с учетом экспрессии CD19 и низких показателей бокового светорассеяния (SSC — side scatter). В выделенный регион попадают гематогонv всех стадий, зрелые В-клетки, плазматические клетки и опухолевые клетки, если они имеются (рис. 1). Затем анализируют диаграммы всех CD-антигенов, антитела против которых содержатся в панели. Иммунофенотип опухолевых клеток может отличаться у разных больных, а также и у одного больного на фоне проводимой терапии вследствие феномена изменения иммунофенотипа. На рис. 1 показано несколько случаев МОБ. Для наглядности также представлены диаграммы только с нормальными

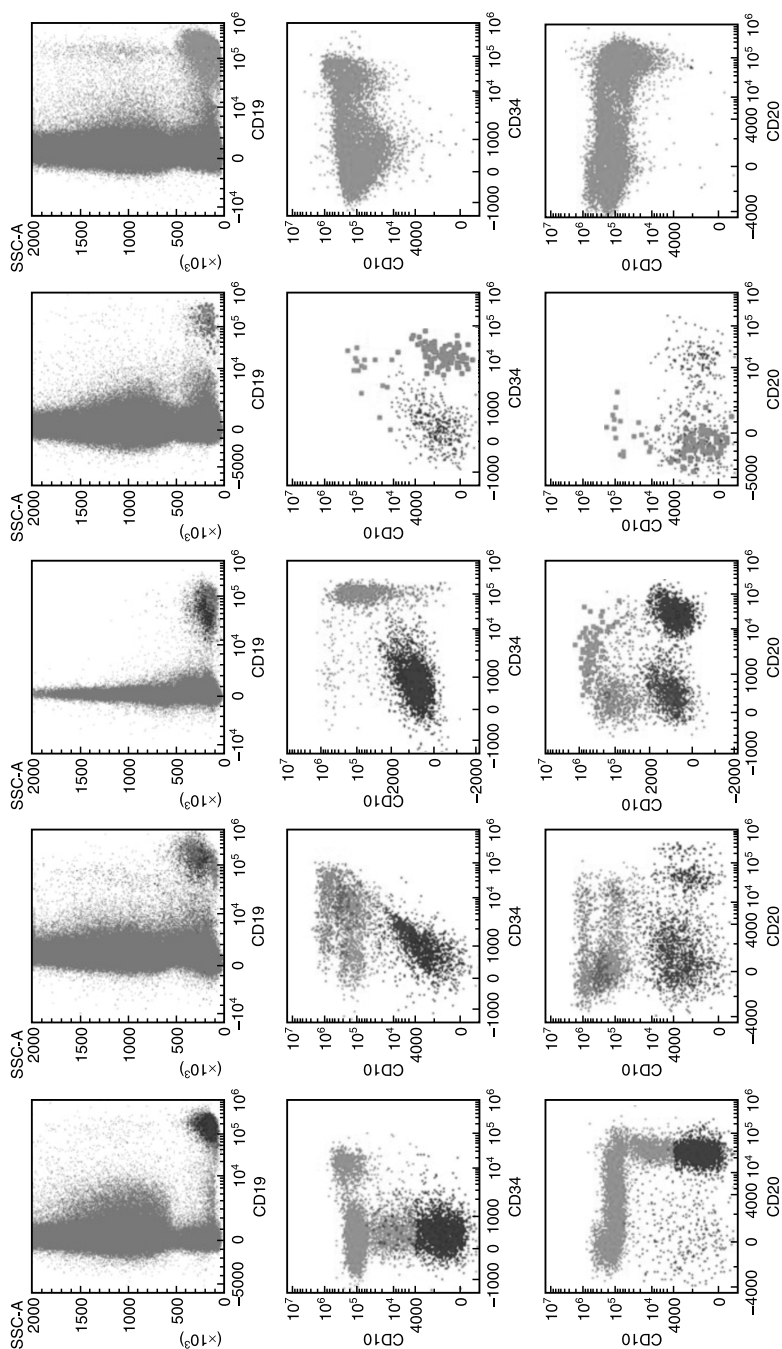


Рисунок 1. Примеры цитометрических диаграмм, полученных при анализе МОБ при В-ОЛЛ: А — образец КМ зло-
рового донора; Б—Г — примеры МОБ-положительного статуса; Д — пример интенсивной регенерации КМ после
химиотерапии.

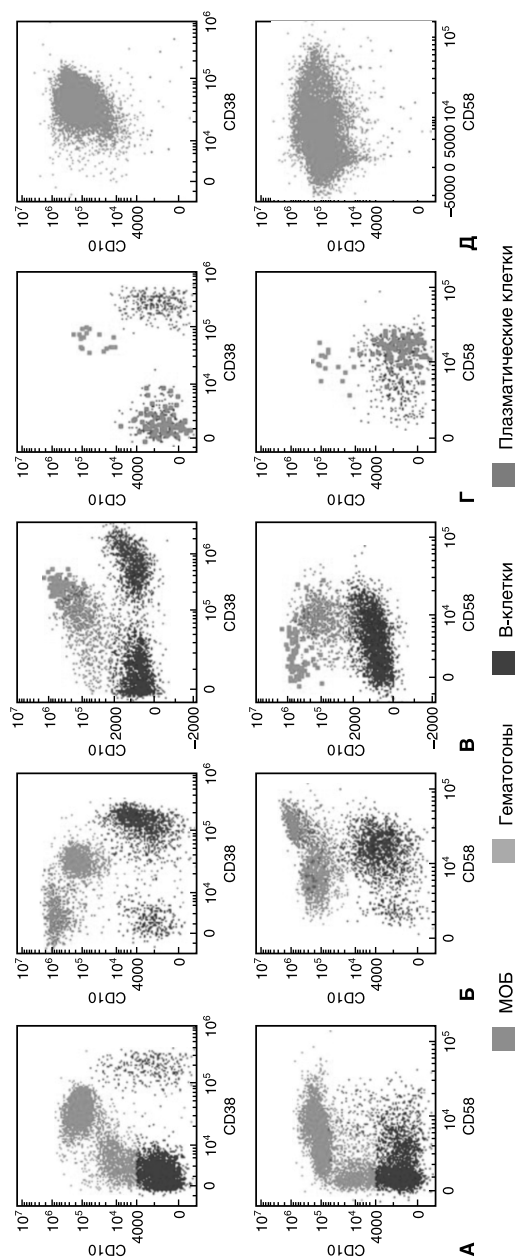


Рисунок 1 (окончание). Примеры цитометрических диаграмм, полученных при анализе ММБ при В-ОЛЛ: А — образец КМ здорового донора; Б–Г — примеры ММБ-положительного статуса; Д — пример интенсивной регенерации КМ после химиотерапии.

ми CD19⁺ клетками КМ (рис. 1, А). В первом случае обнаружена популяция аномальных клеток (выделены красным цветом) с гиперэкспрессией CD10 и CD58 и отсутствием CD38 (рис. 1, Б). Во втором случае популяция остаточных опухолевых клеток по сравнению с нормальными предшественниками имеет более высокую экспрессию CD34 и более низкую — CD10 и CD38 (рис. 1, В). В третьем случае популяция МОБ характеризуется наличием на бластных клетках CD34 при отсутствии CD10 и CD38 (рис. 1, Г). Таким образом, иммунофенотип опухолевых клеток в рассмотренных случаях сильно различается между собой и отличается от иммунофенотипа нормальных предшественников В-клеток.

Нередко после проведения высокодозной химиотерапии или после выполнения алло-ТГСК на фоне интенсивной регенерации клеток КМ может наблюдаться увеличение количества иммунофенотипически нормальных В-клеточных предшественников (рис. 1, Д). Эти предшественники имеют бластную морфологию, а обнаружение в миелограмме более 5% таких клеток может быть интерпретировано как рецидив острого лейкоза. Выполнение иммунофенотипического исследования методом МПЦ позволяет выяснить природу этих бластных клеток и исключить рецидив. После окончания интенсивной регенерации КМ количество предшественников приходит в норму, а в миелограмме количество бластных клеток уже не превышает 5%. Поэтому пункцию КМ для оценки МОБ рекомендуют выполнять при уже восстановленных показателях периферической крови.

Мониторинг МОБ при Т-линейном остром лимфобластном лейкозе

Т-линейный острый лимфобластный лейкоз/лимфома может возникнуть как в КМ, так и экстранодалных тканях, в частности в тимусе. Нередко опухоль поражает только средостение, а КМ остается интактным. Опухолевые клетки при этом заболевании часто обнаруживаются в одинаковом количестве как в периферической крови, так и в КМ, однако для мониторинга МОБ методом МПЦ мы рекомендуем исследование именно аспирата КМ [24].

Созревание Т-клеток происходит в тимусе, поэтому в норме в аспирате КМ можно обнаружить только зрелые Т-клетки, и при анализе МОБ не нужно дифференцировать нормальные Т-клеточные предшественники и бластные клетки. Обнаружение популяции клеток с иммунофенотипом Т-клеточных предшественников в КМ является патологией, а сама популяция признается опухолевой.

Исследование МОБ при Т-ОЛЛ менее стандартизовано, чем при В-ОЛЛ. К общим рекомендациям можно отнести исследование CD-антигенов Т-клеток и натуральных киллеров (НК), таких как CD7, CD5, CD2, CD3 (поверхностного и внутриклеточного), CD4, CD5, CD1a, CD16/CD56 [17, 25]. Целесообразным подходом в поиске МОБ при Т-ОЛЛ является одновременный анализ поверхностной и внутриклеточной экспрессии антигена CD3. Дело в том, что у зрелых Т-клеток обнаруживается и поверхностная, и внутриклеточная экспрессия антигена CD3, а Т-клеточные предшественники характеризуются экспрессией только цитоплазматического CD3. Если в КМ обнаруживается популяция клеток, которая имеет цитоплазматический CD3, но не поверхностный CD3 ($CD3^{cyt+}CD3^{-}$), то среди этих клеток с высокой вероятностью могут быть обнаружены опухолевые клетки. Однако и в этом регионе в норме присутствуют неопухолевые клетки, из которых большинство клеток являются НК с наличием ϵ -цепи CD3. Такие клетки экспрессируют антиген CD56, не экспрессируют CD5 и частично позитивны по маркеру CD8. Также можно обнаружить CD56-негативные НК, которые не отличаются от CD56-позитивных НК по экспрессии других маркеров [26].

Часто в панели антител для мониторинга МОБ у больных Т-ОЛЛ включают маркеры незрелых предшественников, например CD34 или TdT (терминальная дезоксирибонуклеотидилтрансфераза), которые могут экспрессироваться на бластных клетках. Полезным является анализ антигена CD45, экспрессия которого на опухолевых клетках может быть снижена, и антиген CD99, экспрессия которого часто повышена. Рекомендуют включать в панель антитела против CD48 — маркера, который экспрессируется на нормальных Т-клетках и НК, но отсутствует или снижается на бластных клетках [27].

При анализе МОБ гейтирование начинают с выделения всех $CD7^{+}$ клеток с низким показателем бокового светорассеяния. В этот регион попадают зрелые Т-клетки, НК, клетки со слабой экспрессией CD7 — субпопуляции ранних миелоидных и лимфоидных предшественников, субпопуляция плазмцитоидных дендритных клеток (ПДК), а также опухолевые клетки в МОБ-позитивных образцах [26]. Следует иметь в виду, что при поиске МОБ могут встречаться нормальные клетки с нетипичным иммунофенотипом. При этом их количество варьирует от единичных событий до нескольких процентов. Так, при анализе $CD7^{+}$ клеток большинство Т-клеток имеет иммунофенотип $CD3^{+}CD5^{+}$, однако может встречаться субпопуляция $CD3^{-}CD5^{+}$, которая соответствует НК-клеткам и $CD3^{+}CD5^{-}$, которые являются $\gamma\delta$ -Т-клетками, количество которых увеличивается с возрастом [25, 28].

На рис. 2 показано несколько примеров обнаружения МОБ методом проточной цитометрии при Т-ОЛЛ. Рис. 2, А иллюстрирует цитометрический анализ клеток костного мозга здорового донора. Синим цветом во всех случаях выделены зрелые Т-клетки, зеленым — CD7-позитивные клетки, которые не являются зрелыми Т-клетками (НК, предшественники гемопоэза и ПДК). На рис. 2, Б—Г показаны примеры выявляемой МОБ. Опухолевые клетки выделены красным цветом. В первом случае опухолевые клетки имеют высокую экспрессию антигена CD7 и цитоплазматического CD3, но не имеют поверхностной экспрессии CD3. Доказательствами того, что эти клетки не относятся к НК, является отсутствие антигена CD56, частичная позитивность по CD4, высокая экспрессия CD99 и сниженная — CD45 (рис. 2, Б). Во втором случае опухолевые клетки имеют не только внутриклеточную, но и слабую поверхностную экспрессию CD3. Также эти клетки экспрессируют с высокой плотностью CD4 и CD99 (рис. 2, В). В третьем случае бластные клетки лежат в регионе CD3-CD3cyt⁺, но они дубль-негативны по антигенам CD4 и CD8, а небольшая часть из них экспрессирует CD56 (рис. 2, Г).

Пробоподготовка и цитометрический анализ МОБ у больных Т-ОЛЛ являются более сложными, чем у больных В-ОЛЛ. По нашему мнению, для точной и уверенной оценки МОБ при Т-ОЛЛ 6-цветной панели недостаточно, а оптимальными являются 8- и более цветные панели моноклональных антител.

Мониторинг МОБ при остром миелоидном лейкозе

В сравнении с детекцией МОБ при ОЛЛ отслеживание МОБ при ОМЛ представляет собой еще более трудную задачу. Иммунофенотип миелоидных бластных клеток у разных больных значительно различается, поэтому отработка стандартной системы гейтирования становится проблемной. Кроме того, популяция бластных клеток даже у одного больного может быть гетерогенной и состоять как из незрелых клеток-предшественниц, так и из клеток с экспрессией зрелых миеломоноцитарных маркеров. Поэтому немаловажным для объективного исследования МОБ методом МПЦ после химиотерапии является изучение иммунофенотипа бластных клеток в дебюте заболевания с помощью той же панели антител, которая затем будет использоваться для мониторинга МОБ. Однако следует помнить, что для ОМЛ характерен «иммунофенотипический сдвиг», то есть исчезновение экспрессии антигенов, которые обнаруживались в дебюте заболевания, и/или появление новых антигенов на бластных клетках в течение терапии.

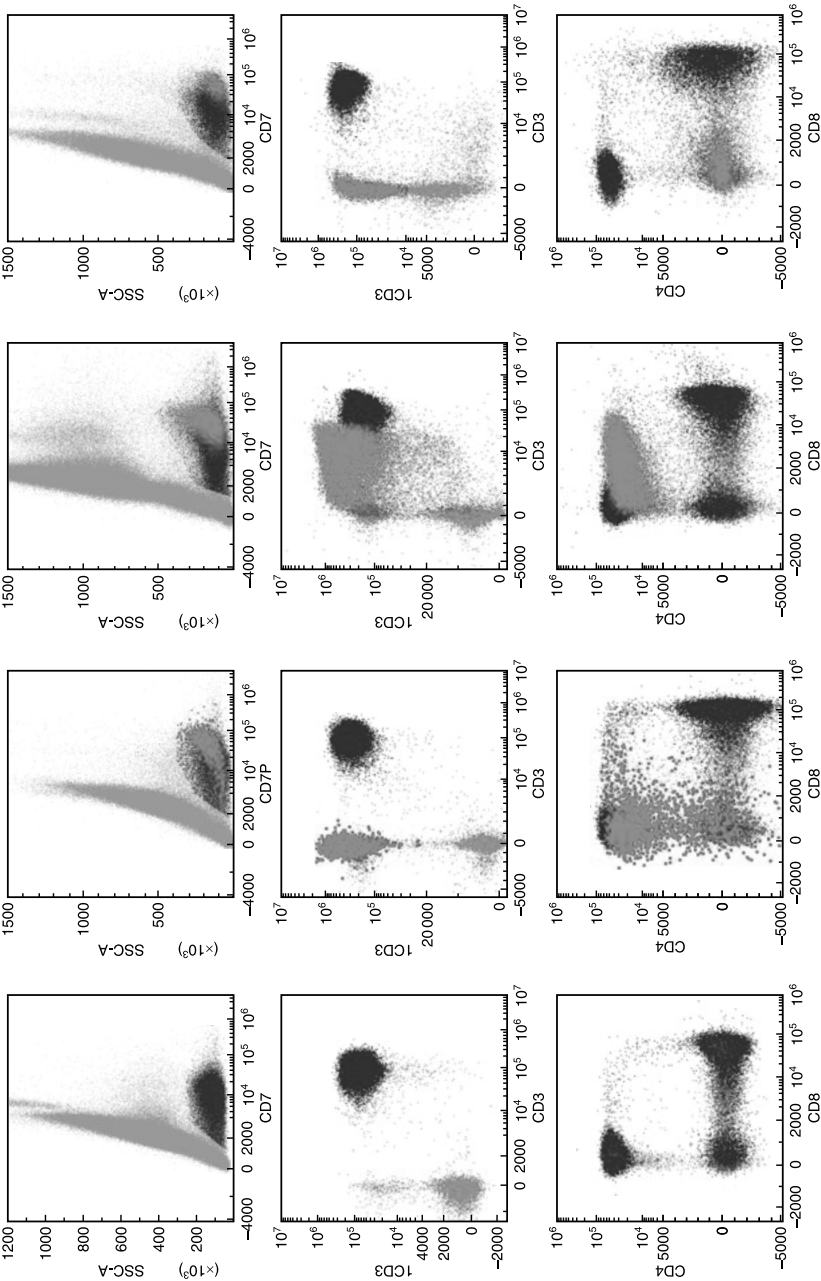


Рисунок 2. Примеры цитометрических диаграмм, полученных при анализе МОБ при Т-ОЛЛ. Описание в тексте.

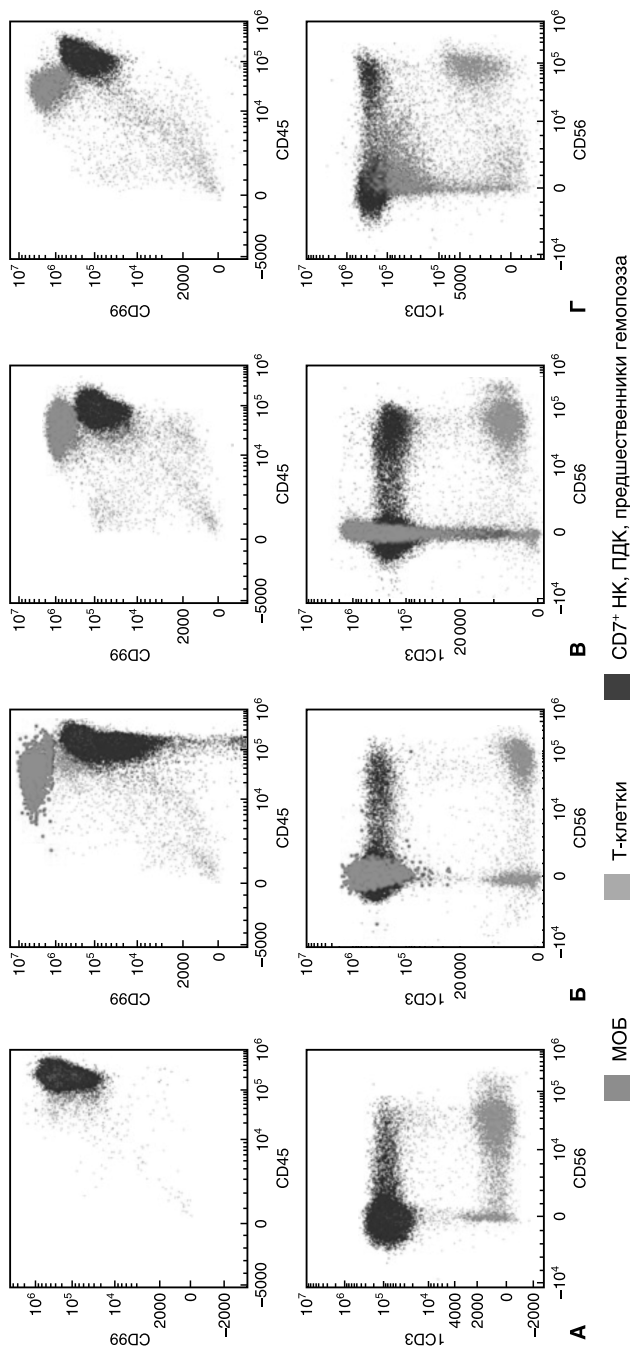


Рисунок 2 (окончание). Примеры цитометрических диаграмм, полученных при анализе МОБ при Т-ОЛЛ. Описание в тексте.

По данным разных авторов, в период рецидива «дебютный» ЛАИФ может измениться у 16—91% пациентов [29].

Исследование МОБ у больных ОМЛ методом МПЦ не является стандартизованным. Однако в 2018 г. опубликованы рекомендации Европейской рабочей группы по острым лейкозам касательно анализа МОБ у больных ОМЛ. Согласно этим рекомендациям, панель моноклональных антител должна быть ≥ 8 -цветной и включать антитела против антигенов CD7, CD11b, CD13, CD15, CD19, CD33, CD34, CD45, CD56, CD117, HLA-DR. Выделение бластных клеток рекомендуется выполнять по маркерам CD45, CD34, CD117, CD13, CD33, а также по параметрам прямого и бокового светорассеяния. В случае необходимости можно дополнительно исследовать антигены CD64, CD14, CD4, позволяющие оценить моноцитарную дифференцировку клеток [3].

Для анализа МОБ у больных ОМЛ должно использоваться такое сочетание моноклональных антител, которое позволит выделить клетки основных миелоидных ростков гемопоэза и изучить стадии их созревания. Обычно остаточные опухолевые клетки при анализе обнаруживаются в так называемом бластном регионе — области, ограничивающей часть клеток с низкой экспрессией CD45 и низким показателем бокового светорассеяния. В бластный регион попадают нормальные CD34⁺ ранние предшественники, гематогоны, промиелоциты, часть миелоцитов и зрелых нейтрофилов, эритроидные предшественники, базофилы, ПДК, промоноциты, тучные клетки и часть лимфоцитов [30].

Для того чтобы дифференцировать все эти клетки и обнаружить среди них популяцию МОБ, мы рекомендуем гейтирование, при котором последовательно изучаются и исключаются уже проанализированные клетки.

На первом этапе мы предлагаем выделить все CD34⁺ клетки. Эта популяция в норме небольшая и у взрослых составляет не более 2—2,5% от всех клеток костного мозга, но является довольно гетерогенной. Так, с помощью антигена CD19 и/или CD10 можно определить популяцию нормальных CD34⁺ В-предшественников (гематогоны стадии 1). Эта популяция характеризуется наличием экспрессии CD38, HLA-DR и отсутствием миелоидных маркеров CD13, CD33, CD117 (рис. 3). Не-В-клеточные предшественники можно разделить на несколько субпопуляций разной степени зрелости. Так, по маркерам CD45RA, CD371 (CLL-1) и CD123 можно выделить четыре основные субпопуляции CD34⁺ клеток: общие миелоидные предшественники (common myeloid progenitors, CMP), гранулоцитарно-макрофагальные предшественники (granulocyte-macrophage progenitors, GMP), лимфоидные мультипотентные предшественники (lymphoid-primed multi-

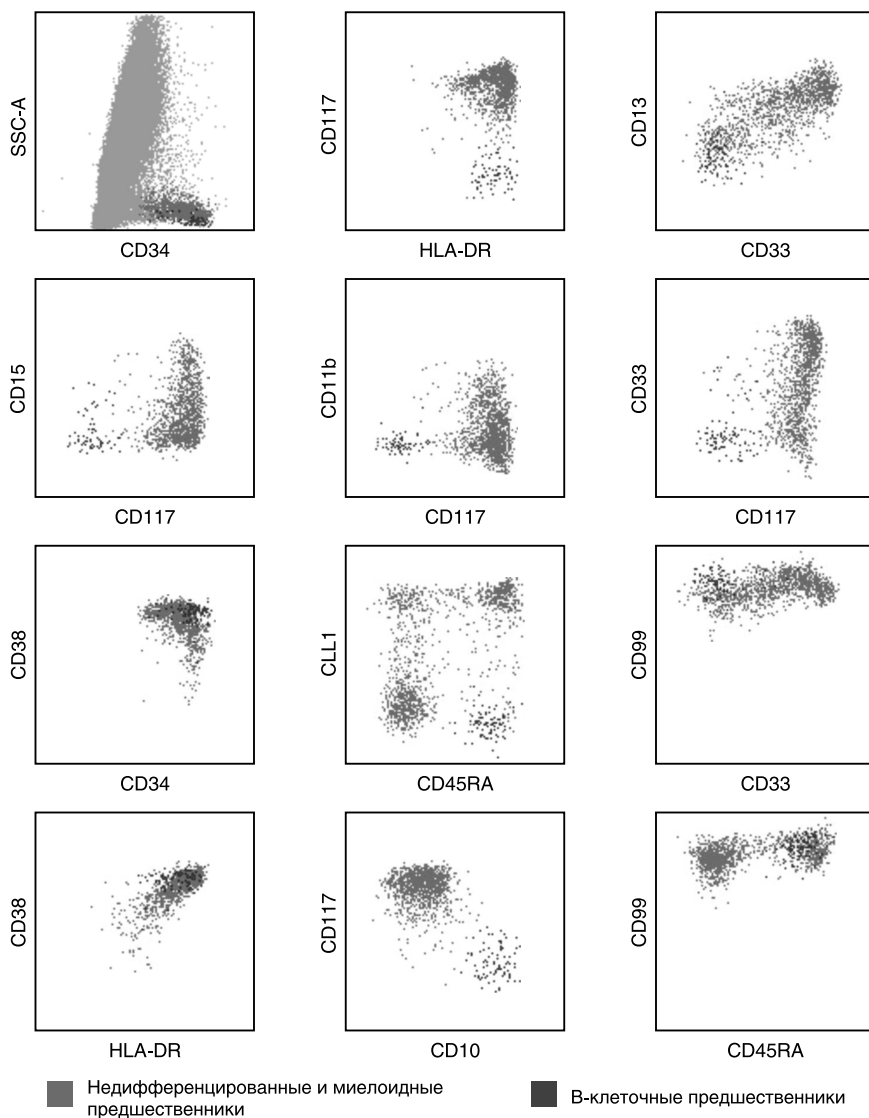


Рисунок 3. Цитометрический анализ CD34⁺ клеток здорового донора. Описание в тексте.

potential progenitors, LMPP) и мультипотентные предшественники (multipotential progenitors, MPP). Среди MPP клетки с наиболее низкой экспрессией CD38 образуют популяцию истинных гемопоэтических предшественников (hematopoietic stem cells, HSC) [31—34]. Более

зрелые CD34⁺ клетки могут начинать экспрессировать CD15 и даже CD11b, при этом они продолжают оставаться CD117-позитивными, плотность экспрессии CD34 в процессе дифференцировки на них снижается, а CD33 — увеличивается (рис. 3).

После анализа CD34⁺ клеток с помощью специальных возможностей программного обеспечения для анализа цитометрических данных можно исключить все CD34⁺ клетки. После этого из оставшихся клеток мы рекомендуем выделить все CD117⁺ клетки. Большую часть из них составляют миелоидные предшественники, среди которых можно различить промиелоциты, не экспрессирующие HLA-DR, и экспрессирующие HLA-DR предшественники моноцитов. Миелоидные предшественники имеют на поверхности маркеры CD13, CD33, CLL-1, CD38, CD99 и частично могут приобретать CD11b. Другой крупной популяцией CD117⁺ клеток являются эритроидные предшественники, которые не экспрессируют CD13, CD33, CLL-1, и лишь очень небольшая часть из них может быть HLA-DR-слабопозитивной (рис. 4). Среди CD117⁺ клеток также можно обнаружить предшественники базофилов, которые CD123-частично позитивны и экспрессируют миелоидные маркеры и HLA-DR. Также в изучаемом CD117⁺ регионе можно обнаружить клетки со слабой экспрессией CD117 и CD33, отсутствием CD13, CLL-1 и высокой плотностью экспрессии CD45, которые, вероятно, соответствуют предшественникам НК, что подтверждается наличием на их поверхности CD7 [35]. По нашему опыту, особенно много таких клеток у больных после алло-ТГСК, что связано с интенсивной регенерацией НК — популяцией, восстанавливающейся быстрее остальных лимфоцитов. У больных после химиотерапии может обнаруживаться большое количество тучных клеток, которые имеют наиболее высокую плотность экспрессии CD117, высокий показатель бокового светорассеяния, экспрессируют миелоидные маркеры и HLA-DR-негативны. Предшественники тучных клеток имеют низкий показатель бокового светорассеяния, а по экспрессии CD117 — самые яркие.

После анализа CD117-позитивных клеток мы рекомендуем их исключить и рассмотреть оставшиеся клетки. Основную часть из этих клеток будут составлять нейтрофилы разной степени зрелости. Они имеют высокий показатель бокового светорассеяния и средний уровень экспрессии CD33, а экспрессия антигенов CD11b, CD16, CD10 и CD45 будет увеличиваться по мере созревания нейтрофилов. Клетки с наибольшей плотностью CD33 образуют популяцию промоноцитов и моноцитов. По мере созревания на поверхности моноцитов увеличивается плотность экспрессии CD11b, CD14 и уменьшается HLA-DR. На части этих клеток обнаруживается высокая экспрессия CD16. Ми-

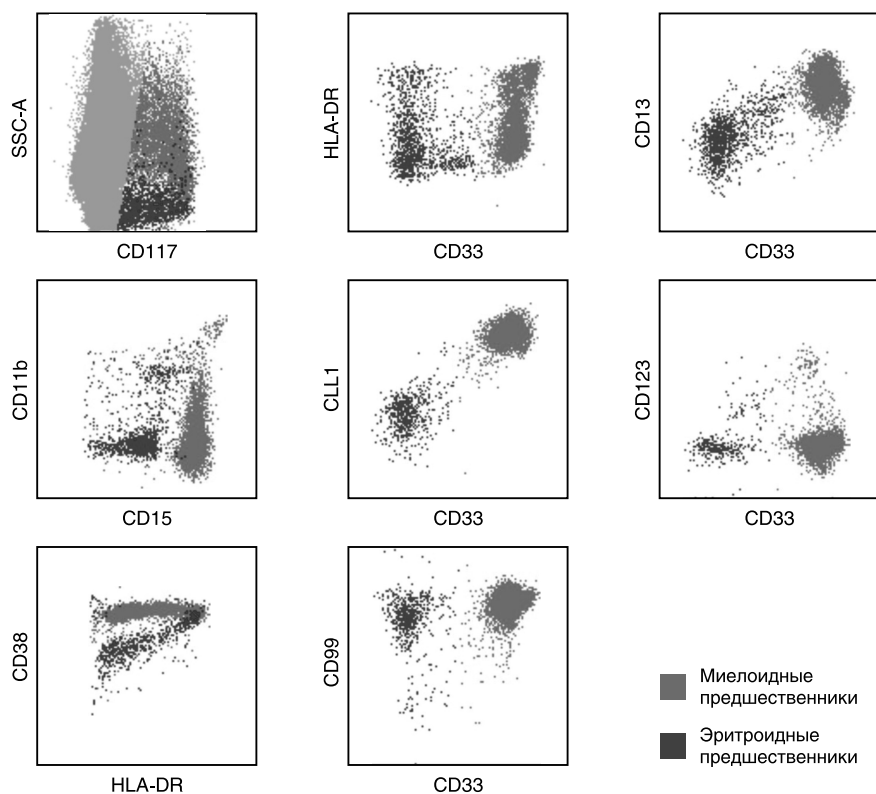


Рисунок 4. Цитометрический анализ $CD117^+$ клеток здорового донора. Описание в тексте.

нормными популяциями, обнаруживаемыми среди $CD117$ -негативных клеток в бластном регионе, являются базофилы, ПДК и гематогоны. Базофилы и ПДК характеризуются наличием $CD123$. Отличием ПДК от базофилов является более высокая экспрессия $CD123$, более низкая экспрессия $CD33$ и наличие $HLA-DR$.

Рассмотрим несколько случаев МОБ. На рис. 5 показан случай $CD34^+$ остаточных опухолевых клеток, причем последовательность диаграмм такая же, как на рис. 3, где показаны нормальные клетки КМ здорового донора. У больного после проведения первого курса химиотерапии среди анализируемых $CD34^+$ клеток обнаружены нормальные миелоидные предшественники, которые на рис. 5 отображены зеленым цветом, В-клеточные предшественники отсутствуют, при этом определена довольно большая популяция аномальных клеток, выделенных красным цветом. Клетки этой популяции имеют асин-

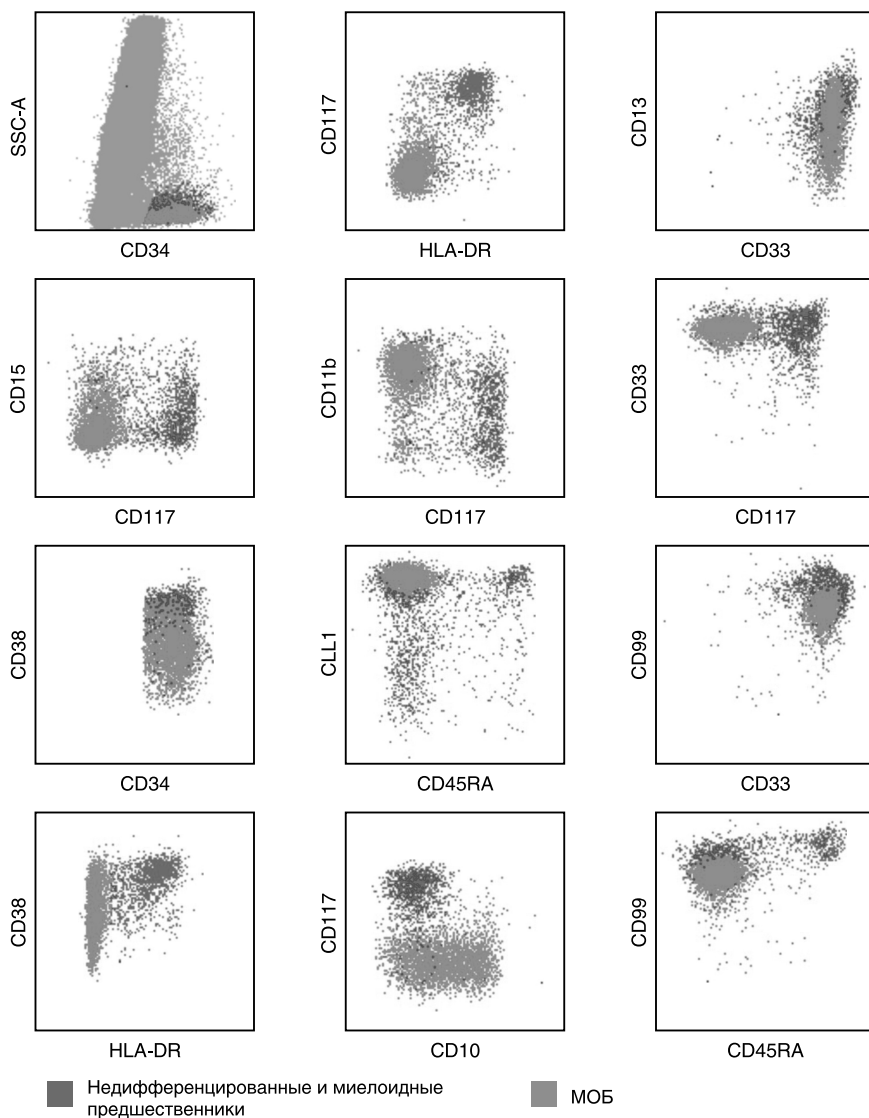


Рисунок 5. Пример детекции остаточной опухолевой популяции с асинхронной коэкспрессией CD11b и CD34, сниженной экспрессией CD38, HLA-DR, CD117 и коэкспрессией лимфоидного маркера CD10.

хронную коэкспрессию CD11b на CD34⁺ клетках, при отсутствии CD117, HLA-DR и низкой экспрессии CD38. Интересно, что на этой популяции частично экспрессирован CD10 (рис. 5).

Второй случай демонстрирует МОБ среди $CD117^+CD34^-$ клеток у больной ОМЛ, достигшей ПР, готовившейся к выполнению алло-ТГСК. Остаточные опухолевые клетки показаны на рис. 6 и выделены красным цветом. Их отличием от нормальных миелоидных предшественников является отсутствие HLA-DR, сниженная экспрессия CD13, при этом клетки обладают яркой экспрессией CD33 и CD99, а также частично позитивны по маркеру CD123 (рис. 6).

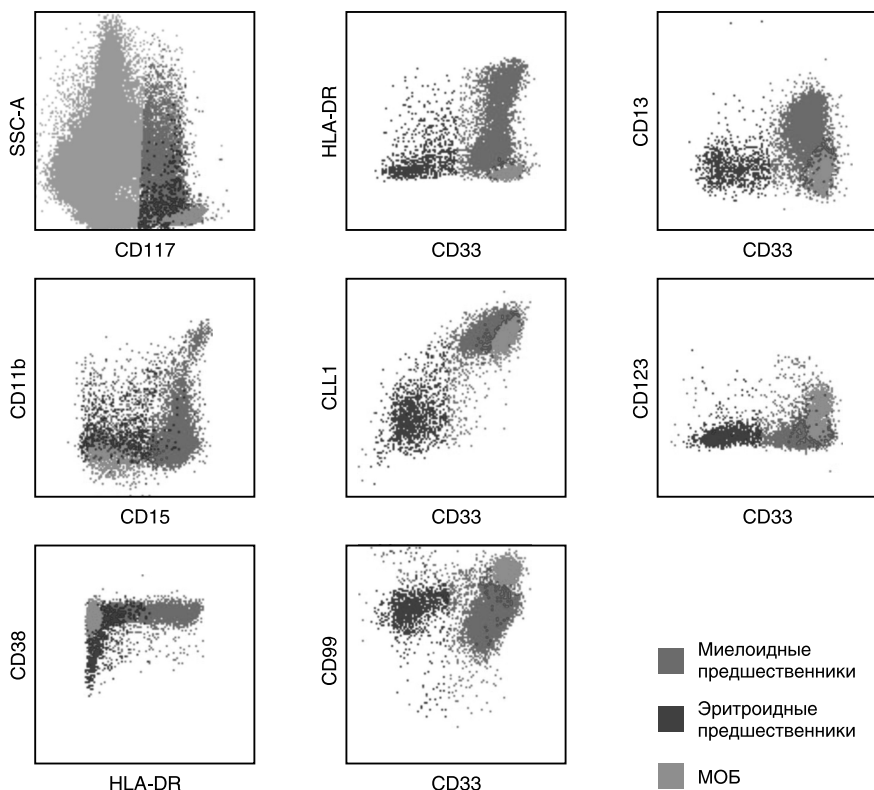


Рисунок 6. Пример детекции остаточной опухолевой популяции среди $CD117^+$ клеток с отсутствием HLA-DR, высокой плотностью CD33 и CD99, а также частично-позитивных по маркеру CD123.

В разных протоколах лечения приняты разные пороговые значения МОБ в зависимости от контрольной точки исследования (определенных конкретным протоколом терапии), а также применяемого метода исследования (МПЦ или ПЦР). Эти значения позволяют разделить больных на группы риска. Чтобы оценить влияние показателя МОБ на

частоту возникновения рецидивов, используют анализ выживаемости и рассчитывают те значения МОБ, по которым можно выделить больных с разными рисками развития рецидива [29]. Согласно рекомендациям LeukemiaNet MRD Working Party, в случае ОМЛ следует применять порог 0,1%, а для МОБ менее 0,1% прогностическую значимость необходимо уточнять в дальнейших исследованиях для каждого конкретного протокола терапии [3].

В лаборатории иммунофенотипирования клеток крови и костного мозга ФГБУ «НМИЦ гематологии» мы проводим мониторинг МОБ у больных ОМЛ, используя с 2016 г. 6- и 11-цветные панели моноклональных антител (табл. 1). Общим принципом при составлении этих панелей явилось то, что ряд антигенов (CD7, CD19, CD56, CD2, CD4, CD11a) исследуется лишь в случае их информативности, определяемой при анализе первичного иммунофенотипа бластных клеток, изученного до начала терапии ОМЛ (например, если бластные клетки экспрессировали CD56 в дебюте заболевания, то и после терапии нужно анализировать CD56, а не CD2, экспрессии которого изначально на бластных клетках не было).

С 2016 по 2018 г. мы применяли 6-цветную панель, состоящую из 4 пробирок, которая имела несколько недостатков: недостаточно четкое отделение CD34-позитивной популяции, антитело против CD117 присутствовало только в одной пробирке, поэтому не было возможности выполнить детальный анализ CD117⁺ клеток, анализ промоноцитов и моноцитов также не был достаточно глубоким, кроме того, отсутствовали маркеры для отделения ПДК и базофилов. С 2019 по 2020 г. мы обновили 6-цветную панель, которая стала включать 6 пробирок, поменяли моноклональное антитело против CD34, начали добавлять в 4 из 6 пробирок антитела к CD34 и CD117, и в результате анализ незрелых предшественников стал более детальным. Также мы подобрали комбинации для анализа моноцитов, базофилов и ПДК. Но в такой панели невозможно было анализировать ранние клетки и более зрелые клетки одновременно, поскольку технические характеристики цитометра позволяли нам исследовать только 6 цветов одновременно. С 2020 г. мы начали применять 11-цветную панель, которая на данном этапе исследования удовлетворяет всем международным и нашим требованиям к проведению анализа МОБ у больных ОМЛ и может быть оптимальной.

Таким образом, детекция МОБ у больных ОМЛ является одной из самых непростых задач, стоящих перед специалистом по проточной цитометрии. Анализ цитометрических данных требует экспертного знания иммунофенотипа всех клеточных компартментов КМ, должен быть большой «архив» диаграмм, полученных при анализе КМ здоро-

Таблица 1. Панели моноклональных антител для мониторинга МОБ у больных ОМЛ

FITC	PE	ECD	PerCP-Cy5.5/ PC5.5	PE-Cy7	APC	APC-A700	APC-Cy7	BV421	BV510	BV605
6-цветная панель, 1-й вариант										
CD7 (8H8.1) или CD56 (NCAM16.2)	CD19(SI25C1) или CD4 (RPA-T4)		HLA-DR (L243)	CD34 (8G12)	CD33 (P67.6)		CD45 (2D1)			
CD65 (VIM8)	CD15 (HI98)		CD14 (M1P9)	CD34 (8G12)	CD33 (P67.6)		CD45 (2D1)			
CD66b (G10F5)	CD11b (D12)		CD16 (3G8)	CD34 (8G12)	CD33 (P67.6)		CD45 (2D1)			
CD99 (3B2/TA8)	CD13 (L138)		CD117 (104D2)	CD34 (8G12)	CD33 (P67.6)		CD45 (2D1)			
6-цветная панель, 2-й вариант										
CD38 (HIT2)	CD7 (8H8.1) или CD56 (NCAM16.2) или CD4 (RPA-T4)		HLA-DR (L243)	CD117 (104D2)	CD34 (8G12)		CD45 (2D1)			
CD38 (HIT2)	CD133 (clone 7)		CD19 (SI25C1)	CD117 (104D2)	CD34 (8G12)		CD45 (2D1)			
CD99 (3B2/TA8)	CD33 (WM53)		CD13 (WM15)	CD117 (104D2)	CD34 (8G12)		CD45 (2D1)			
CD65 (88H7)	CD33 (WM53)		CD13 (WM15)	CD56 (NC AM16.2)	CD123 (7G3)		CD45 (2D1)			
CD66b (G10F5)	CD33 (WM53)		CD14 (M1P9)	HLA-DR (L243)	CD36 (CB38)		CD11b (ICRF44)			
CD15 (MMA)	CD33 (WM53)		HLA-DR (L243)	CD117 (104D2)	CD34 (8G12)		CD11b (ICRF44)			
11-цветная панель										
CD15 (80H5)	CD2 (39C1.5)/CD7 (8H8.1)/ CD11a (25.3)/CD19 (J3-119)/CD56 (NCAM16.2)	CD34 (581)	CD117 (104D2D1)	CD33 (D3 HL60.251)	CD13 (WM15)	CD14 (RMO52)	CD11b (ICRF44)	HLA-DR (L243)	CD45 (2D1)	CD16 (3G8)
CD38 (HIT2 или T16)	CD371 (50C1)	CD34 (581)	CD117 (104D2D1)	CD33 (D3 HL60.251)	CD99 (3B2/TA8)	CD123 (SSDCLY 107D2)	CD45RA (2H4LDH11L DB9)	HLA-DR (L243)	CD45 (2D1)	CD10 (Hi10a)

вых доноров. Вследствие того что опухолевые клетки при ОМЛ могут быть гетерогенны и значительно различаться у больных, а иммунофенотип лейкемических клеток иногда незначительно отличается от нормальных клеточных аналогов, необходим достаточный многоцветный анализ, а именно 8—10-цветный.

Количественное определение и чувствительность детекции МОБ

Вне зависимости от варианта острого лейкоза количественное определение МОБ производится одинаковым образом. Если опухолевая популяция клеток с аномальным иммунофенотипом обнаружена, то подсчитывают число клеток, составляющих эту популяцию. Далее определяют или число проанализированных ядросодержащих клеток (используя нуклеотропные красители Syto или выделение клеток по показателям прямого и бокового светорассеяния), или число лейкоцитов (используя маркер CD45). Затем определяют долю опухолевых клеток от всех ядросодержащих клеток или лейкоцитов. Ответ выдается в виде процента.

Результат исследования МОБ считается положительным, если при цитометрическом исследовании выявлена **популяция** лейкемических клеток, состоящая по меньшей мере из 10—50 клеток с aberrантной гомогенной экспрессией определенных антигенов. Число клеток, формирующих минимальную популяцию, в разных лабораториях может различаться. Если среди собранных клеток не обнаружено 10—50 лейкемических клеток, то делается заключение, что МОБ не выявлена при достигнутой чувствительности анализа. В лаборатории иммунофенотипирования клеток крови и костного мозга ФГБУ «НМИЦ гематологии» в качестве минимального количества клеток, которое формирует популяцию, принято 20 aberrантных клеток.

Не исключено, что МОБ у больного не будет выявляться, но при этом опухолевая популяция будет сохраняться в количестве ниже достигнутого порога чувствительности. Согласно определению, аналитическая чувствительность любого лабораторного метода — это наименьшее количество вещества (наименьшая концентрация), которое можно обнаружить этим методом. Перекладывая это понятие на МОБ, чувствительность метода можно описать как минимальное количество опухолевых клеток, которое возможно обнаружить с помощью данного метода. Таким образом, МОБ-негативность не означает, что достигнуто полное отсутствие опухолевых клеток у больного [4].

Чувствительность в МПЦ зависит от общего количества проанализированных клеток. Например, если за минимальную принимается популяция, состоящая из 20 клеток, то чувствительность определяется по формуле:

$$\text{Чувствительность} = \frac{20}{\text{Количество ядросодержащих клеток}} \times 100\%.$$

Требуемая чувствительность метода составляет 0,01%. Для того чтобы достичь такой чувствительности, необходимо проанализировать 200 000 клеток и более (если за минимальную была принята популяция, состоящая из 20 клеток). Если такая чувствительность не достигается, например, вследствие низкой клеточности КМ или значительного разведения образца КМ периферической кровью, то необходимо провести повторную пункцию КМ и повторное исследование МОБ [4].

Заключение

В этой главе мы дали определение понятию «минимальная остаточная болезнь» и показали значимость ее мониторинга у больных острыми лейкозами на определенных этапах терапии. Выявление МОБ непосредственно перед алло-ТГСК является крайне неблагоприятным прогностическим признаком и сопряжено с высоким риском развития рецидива и низкой вероятностью общей выживаемости. Мы постарались подробно изложить принципы определения МОБ методом проточной цитометрии, познакомили с понятиями «лейкоз-ассоциированный иммунофенотип» и «метод пустых мест». В этой главе представлены несколько примеров цитометрического анализа у больных В- и Т-вариантами острых лимфобластных лейкозов и острым миелоидным лейкозом, а также продемонстрировано, как производится количественное определение опухолевой популяции и чувствительности анализа. Надеемся, что эта глава будет полезна не только врачам-клиницистам, в частности гематологам, но и специалистам лабораторий, которые осуществляют цитометрический анализ и планируют внедрить методики по определению МОБ при острых лейкозах. И безусловно, мониторинг МОБ до алло-ТГСК поможет оптимизировать тактику терапии у больных ОМЛ с МОБ-положительным статусом (отбор подходящего донора, варианты кондиционирования, иммунотерапия).

Приложение 1

Пример отрицательного заключения при мониторинге МОБ ОМЛ

ФИО: ----

ЛПУ:-- -

Год рождения: ---

Дата анализа: ---

Диагноз: ОМЛ

Этап лечения:

- ☐ после курса 1
- ☐ после курса 2
- ☐ перед поддерживающей терапией
- ☐ поддерживающая терапия
- ☐ окончание терапии
- ☐ перед алло-ТГСК
- ☐ после алло-ТГСК
- ☒ другой

РЕЗУЛЬТАТ:

Кол-во проанализированных клеток	МОБ, %	Чувствительность, %
896324	0	0,002

Были исследованы:

Миелоидные маркеры	CD13, CD33, CD14, CD15, CD371
Маркеры ранних клеток	CD34, CD117
Линейно-неограниченные маркеры	CD99, CD38, CD11b, CD16, CD45, CD45RA, HLA-DR, CD123, CD11a
Маркеры лимфоцитов	CD10

Заключение :

МОБ (ОМЛ) не выявляется.

Литература

1. Cheson BD, Bennett JM, Kopecky KJ et al. Revised recommendations of the International Working Group for Diagnosis, Standardization of Response Criteria, Treatment Outcomes, and Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia. J Clin Oncol 2003; 21:4642—4649.

2. Pui CH, Campana D. New definition of remission in childhood acute lymphoblastic leukemia. Leukemia 2000; 14:783—785.

3. Schuurhuis GJ, Heuser M, Freeman S et al. Minimal/measurable residual disease in AML: a consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party. Blood 2018; 131(12):1275—1291.

4. Гальцева И. В., Давыдова Ю. О., Паровичникова Е. Н. Определение минимальной измеримой остаточной болезни у взрослых больных острыми лейкозами. Гематология и трансфузиология 2020; 65(4):460—472.

5. Shen Z, Gu X, Mao W et al. Influence of pre-transplant minimal residual disease on prognosis after allo-SCT for patients with acute lymphoblastic leukemia: Systematic review and meta-analysis. BMC Cancer 2018; 18(1):755.

6. Leung W, Pui CH, Coustan-Smith E et al. Detectable minimal residual disease before hematopoietic cell transplantation is prognostic but does not preclude cure for children with very-high-risk leukemia. Blood 2012; 120(2):468—472.

7. Norkin M, Katragadda L, Zou F et al. Minimal residual disease by either flow cytometry or cytogenetics prior to an allogeneic hematopoietic stem cell trans-

- plant is associated with poor outcome in acute myeloid leukemia. *Blood Cancer J* 2017; 7(12):634.
8. Anthias C, Dignan FL, Morilla R et al. Pre-transplant MRD predicts outcome following reduced-intensity and myeloablative allogeneic hemopoietic SCT in AML. *Bone Marrow Transplant* 2014; 49(5):679—683.
 9. Buckley SA, Wood BL, Othus M et al. Minimal residual disease prior to allogeneic hematopoietic cell transplantation in acute myeloid leukemia: a meta-analysis. *Haematologica* 2017; 102(5):865—873.
 10. Drovok M, Popova N, Davydova Y et al. Preanalytical phase in flow cytometric evaluation of bone marrow. *Cytometry at the crossroads of culture. ESCCA*, 2017.
 11. Wood BL. Principles of minimal residual disease detection for hematopoietic neoplasms by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom* 2016; 90:47—53.
 12. Wood B. Multicolor immunophenotyping: human immune system hematopoiesis. *Methods Cell Biol* 2004; 75:559—576.
 13. Wood BL. Flow cytometric monitoring of residual disease in acute leukemia. *Methods Mol Biol* 2013; 999:123—136.
 14. Lúcio P, Parreira A, van den Beemd MW et al. Flow cytometric analysis of normal B cell differentiation: A frame of reference for the detection of minimal residual disease in precursor-B-ALL. *Leukemia* 1999; 13(3):419—427.
 15. Rimsza LM, Larson RS, Winter SS et al. Benign hematogone-rich lymphoid proliferations can be distinguished from B-lineage acute lymphoblastic leukemia by integration of morphology, immunophenotype, adhesion molecule expression, and architectural features. *Am J Clin Pathol* 2000; 114:66—75.
 16. Wohlfahrt AB, Hannel L, Olivera LZ et al. The importance of immunophenotyping by flow cytometry in distinction between hematogones and B lymphoblasts. *J Bras Patol Med Lab* 2015; 51(1):7—12.
 17. Попов А. М., Вержбицкая Т. Ю., Фечина Л. Г. и др. Острые лейкозы: различия иммунофенотипа бластных клеток и их неопухолевых аналогов в костном мозге. *Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика* 2016; 9:302—313.
 18. Wei C, Jung J, Sanz I. OMIP-003: phenotypic analysis of human memory B cells. *Cytometry A* 2011; 79(11):894—896.
 19. Dworzak MN, Gaipa G, Ratei R et al. Standardization of flow cytometric minimal residual disease evaluation in acute lymphoblastic leukemia: Multicentric assessment is feasible. *Cytometry B Clin Cytom* 2008; 74(6):331—340.
 20. Ciudad J, Orfao A, Vidrales B et al. Immunophenotypic analysis of CD19+ precursors in normal human adult bone marrow: implications for minimal residual disease detection. *Haematologica* 1998; 83:1069—1075.
 21. Borowitz MJ, Pullen DJ, Shuster JJ et al. Minimal residual disease detection in childhood precursor-B-cell acute lymphoblastic leukemia: relation to other risk factors. A Children's Oncology Group study. *Leukemia* 2003; 17:1566—1572.
 22. Muzzafar T, Medeiros LJ, Wang SA et al. Aberrant underexpression of CD81 in precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia: utility in detection of minimal residual disease by flow cytometry. *Am J Clin Pathol* 2009; 132:692—698.

23. Mejstříková E, Hrusak O, Borowitz MJ et al. CD19-negative relapse of pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia following blinatumomab treatment. *Blood Cancer J* 2017; 7(12):659.
24. DiGiuseppe JA, Wood BL. Applications of flow cytometric immunophenotyping in the diagnosis and posttreatment monitoring of B and T lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Cytometry B Clin Cytom* 2019; 96(4):256–265.
25. Campana D, Coustan-Smith E. Advances in the immunological monitoring of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2002; 15:1–19.
26. Tembhare PR, Chatterjee G, Khanka T et al. Eleven-marker 10-color flow cytometric assessment of measurable residual disease for T-cell acute lymphoblastic leukemia using an approach of exclusion. *Cytometry B Clin Cytom* 2021; 100(4):421–433.
27. Wood BL, Levin G, Wilson M et al. High-throughput screening by flow cytometry identifies reduced expression of CD48 as a universal characteristic of T-ALL and a suitable target for minimal residual disease (MRD) detection. *Blood* 2011; 118(21):2547–2547.
28. Porwit-MacDonald A, Björklund E, Lucio P et al. BIOMED-1 concerted action report: flow cytometric characterization of CD7+ cell subsets in normal bone marrow as a basis for the diagnosis and follow-up of T cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL). *Leukemia* 2000; 14:816–825.
29. Лобанова Т. И., Гальцева И. В., Паровичникова Е. Н. Исследование минимальной остаточной болезни у пациентов с острыми миелоидными лейкозами методом многоцветной проточной цитофлуориметрии (обзор литературы). *Онкогематология* 2018; 13(1):83–102.
30. Wood BL. Acute myeloid leukemia minimal residual disease detection: the difference from normal approach. *Curr Protoc Cytom* 2020; 93(1):e73.
31. Ostendorf BN, Flenner E, Flörcken A, Westermann J. Phenotypic characterization of aberrant stem and progenitor cell populations in myelodysplastic syndromes. *PLoS One* 2018; 13(5):e0197823.
32. Goardon N, Marchi E, Atzberger A et al. Coexistence of LMPP-like and GMP-like leukemia stem cells in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell* 2011; 19(1):138–152.
33. Shameli A, Dharmani-Khan P, Luijer J et al. Exploring blast composition in myelodysplastic syndromes and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms: CD45RA and CD371 improve diagnostic value of flow cytometry through assessment of myeloblast heterogeneity and stem cell aberrancy. *Cytometry B Clin Cytom* 2021; 100(5):574–589.
34. Bill M, van Kooten Niekerk PB, Woll PS et al. Mapping the CLEC12A expression on myeloid progenitors in normal bone marrow; implications for understanding CLEC12A-related cancer stem cell biology. *J Cell Mol Med* 2018; 22(4):2311–2318.
35. Eissens DN, Spanholtz J, van der Meer A et al. Defining early human NK cell developmental stages in primary and secondary lymphoid tissues. *PLoS One* 2012; 7(2):e30930.

Глава 6.

Цитогенетическая диагностика опухолевых заболеваний системы крови

Открытие в 1960 г. филадельфийской хромосомы, ассоциированной с хроническим миелолейкозом [1], и описание за последующие несколько десятилетий более 800 рекуррентных (неслучайных, повторяющихся) при опухолевых заболеваниях системы крови хромосомных аномалий [2] переместило цитогенетику из области научных исследований в клиническую практику. Признавая связь между специфическими цитогенетическими аномалиями и определенными морфологическими и клиническими особенностями, Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) с 2001 г. классифицирует уникальные варианты острых миелоидных лейкозов [3], а в следующих изданиях и других вариантов лейкозов и лимфом в соответствии с цитогенетическими аномалиями [4—7]. Помимо диагностики и классификации на основании выявленных специфических хромосомных маркеров опухолей, результаты цитогенетического исследования позволяют прогнозировать течение заболевания и влияют на выбор терапии, в том числе таргетной.

Диагностика хромосомных аномалий проводится с использованием методов стандартной и молекулярной цитогенетики. Стратегия цитогенетического тестирования в каждом конкретном случае зависит от цели исследования (установление диагноза или уточнение варианта заболевания, определение группы прогноза, проведение клинического

исследования), общей характеристики генома предполагаемого заболевания, локализации опухоли, пролиферативной активности опухолевых клеток и стадии заболевания (первичная диагностика, прогрессия/рецидив). Выбор цитогенетического метода исследования или комбинации методов определяется преимуществами и ограничениями каждого из них и оснащением лаборатории. В каждой цитогенетической лаборатории для диагностики опухолевых заболеваний системы крови должны выполняться как минимум два основных метода исследования — стандартное цитогенетическое исследование и флюоресцентная гибридизация *in situ* [8, 9].

Методы исследования

Стандартное цитогенетическое исследование

Стандартное цитогенетическое исследование (стандартное кариотипирование, хромосомный анализ) включает этапы культивирования клеток в питательной среде с целью получения метафазных пластин с последующим дифференциальным окрашиванием хромосом и исследованием кариотипа с помощью светового микроскопа. С целью остановки митоза и накопления метафазных пластин в препарате к культуре добавляют колхицин (или синтетический аналог — колцемид), который разрушает веретено деления. В ряде случаев в дополнение к культивированию проводится исследование «прямым методом» — добавление колхицина без этапа культивирования клеток. Затем для растворения цитоплазмы и разброса хромосом проводят обработку гипотоническим раствором хлорида калия с последующей фиксацией в смеси ледяной уксусной кислоты и метанола и готовят препараты хромосом для окраски.

Существует несколько методов дифференциального окрашивания хромосом по длине, но наиболее распространенным является G-окрашивание, основанное на инкубации препаратов хромосом в солевых растворах и в растворах протеолитических ферментов с последующей окраской красителями Гимзы или Райта [10]. Идентификацию хромосом обеспечивает чередование темно- и светлоокрашенных полос. По числу, величине и расположению полос (сегментов) можно определить изменения в хромосомном наборе (кариотипе).

Стандартное цитогенетическое исследование является обязательным при хроническом миелолейкозе (ХМЛ), острых лейкозах и миелодиспластических синдромах (МДС), желательным при хроническом лимфолейкозе (ХЛЛ). Главным достоинством метода является возможность полногеномного анализа на уровне одной клетки. Метод по-

зволяет исследовать весь кариотип на наличие численных и структурных аномалий и идентифицировать как независимые клоны, так и родственные субклоны. Однако в ряде случаев не удается получить метафазы для кариотипирования, как правило, вследствие низкой клеточности исследуемого биоматериала или низкой митотической активности клеток при зрелоклеточных лимфатических опухолях, либо их качество неудовлетворительное для идентификации хромосомных аномалий. Нормальный кариотип не всегда свидетельствует об отсутствии хромосомных аномалий в опухолевом клоне, так как может быть результатом деления остаточной популяции неопухолевых клеток, что особенно актуально для зрелоклеточных лимфом и множественной миеломы (ММ), в меньшей степени для острых лимфобластных лейкозах (ОЛЛ) и МДС. Кроме того, разрешающая способность стандартного цитогенетического исследования составляет 7—10 миллионов пар нуклеотидов (п. н.), что не позволяет выявлять субмикроскопические аномалии и требует применения более высокочувствительных методов молекулярной цитогенетики [11]. Стандартное цитогенетическое исследование — трудоемкий метод, требующий высокой квалификации специалистов и длительного времени на анализ кариотипа.

Выбор условий культивирования клеток зависит от предполагаемого диагноза. Для острых лейкозов, МДС и миелопролиферативных заболеваний (МПЗ) обязательной является краткосрочная 17—24-часовая культура клеток аспирата костного мозга [12, 13]. При достаточном количестве материала также проводят исследование «прямым методом». При подозрении на острый промиелоцитарный лейкоз рекомендуется дополнительное культивирование клеток в течение 48 часов [8, 14]. При культивировании клеток большинства зрелоклеточных опухолей лимфатической системы требуются стимуляторы деления (митогены). При В-клеточных лимфомах выполняются краткосрочная культура без стимуляторов и 3-дневная культура с добавлением форбол-12-миристат-13-ацетата (ТРА) в сочетании с липополисахаридом в качестве митогенов. При Т-клеточных опухолях краткосрочная культура и 3-дневная культура с добавлением фитогемагглютинина (ФГА) [15]. При ХЛЛ выполняется постановка 3-дневной культуры с добавлением специфического стимулятора деления опухолевых клеток — СрG-олигонуклеотида DSP30 в сочетании с интерлейкином-2 [16, 17].

По определению Международной системы цитогеномной номенклатуры (An International System for Human Cytogenomic Nomenclature — ISCN, 2020), цитогенетическим клоном считается наличие идентичной структурной аномалии или дополнительной хромосомы не менее чем в двух метафазах и потеря хромосомы не менее чем в трех метафазах [18].

При установлении диагноза по возможности анализируют 20 метафаз для выявления хромосомных aberrаций как в основном клоне, так и в возможных субклонах. Отсутствие выявленных аномалий при анализе менее 20 метафаз не может надежно исключать их наличие в опухолевом клоне [8]. При подозрении на конституциональную аномалию может быть выполнен хромосомный анализ ФГА-стимулированных лимфоцитов периферической крови для исключения клонального происхождения.

Проведение стандартного цитогенетического исследования в ремиссии заболевания нецелесообразно, но оно должно быть выполнено при подозрении на рецидив/прогрессирование заболевания или вторичную гематологическую опухоль.

Молекулярно-цитогенетические методы исследования

С внедрением достижений молекулярной биологии в исследование хромосом были разработаны новые технологии, основанные на принципах гибридизации нуклеиновых кислот *in situ* [19—21], преодолевающие основные ограничения стандартного кариотипирования. Молекулярно-цитогенетические методы исследования не требуют наличия делящихся клеток и обладают более высокой разрешающей способностью, определяющейся минимальным числом нуклеотидов, которое можно проанализировать с помощью данного метода исследования. Самым широкодоступным высокоэффективным молекулярно-цитогенетическим методом для выявления диагностических и прогностически значимых хромосомных aberrаций при опухолевых заболеваниях системы крови является флюоресцентная гибридизация *in situ* (fluorescence *in situ* hybridization, FISH).

Флюоресцентная гибридизация *in situ*

Флюоресцентная гибридизация *in situ* (FISH) основана на гибридизации одноцепочечных последовательностей меченной флюорохромом ДНК пробы (ДНК-зонда) с комплементарной нуклеотидной последовательностью исследуемой ядерной ДНК (ДНК образца). Основными этапами метода FISH являются: денатурация двухцепочечной ДНК зонда и ДНК образца до одноцепочечных под воздействием температуры (72—75 °C); гибридизация одноцепочечных последовательностей ДНК зонда и исследуемой ДНК с образованием двухцепочечных молекул ДНК (4—24 часа при $t = 37$ °C); постгибридизационная отмывка остатка не связавшейся ДНК пробы с помощью детергентов и солевых растворов; контрокрашивание ядер клеток специальным красителем; анализ меченных флюорохромами участков ДНК под флюоресцентным микроскопом. Для диагностических образцов рекомендуется ана-

лиз не менее 100 интерфазных ядер. В каждой лаборатории должно проводится определение верхних границ нормальных значений для каждого ДНК-зонда путем расчета 95% доверительного интервала для закономерности распределения флюоресцентных сигналов, обнаруженных в нормальных контрольных образцах, соответствующих исследуемому [22].

Основными преимуществами метода FISH перед кариотипированием является возможность анализировать интерфазные ядра на наличие цитогенетических аномалий при отсутствии митозов или низком их качестве и более высокая разрешающая способность, позволяющая выявлять диагностические аномалии, скрытые в сложных хромосомных структурах (маркерные, дериватные хромосомы и др.), и субмикроскопические аберрации более 50 тысяч п. н. В определенных клинических ситуациях, требующих быстрого результата цитогенетического исследования, например при остром промиелоцитарном лейкозе, FISH-исследование может быть выполнено в течение нескольких часов. Кроме того, с помощью этого метода можно исследовать архивный цитологический (мазки костного мозга, отпечатки опухоли) и гистологический (парафиновые блоки) материал.

Однако в отличие от полногеномного метода стандартного цитогенетического исследования при FISH-исследовании информация об изменениях кариотипа ограничивается применяемыми ДНК-зондами. Использование большого набора коммерческих ДНК-зондов делает FISH дорогостоящим методом исследования. FISH-исследование не может быть выполнено на парафиновых блоках трепанобиоптатов и биоптатов опухолей костей после проведения декальцинации по стандартным протоколам. Возможность исследования парафиновых блоков всех биоптатов на наличие делеций ограничена верхними границами нормальных значений, достигающими 50% [23, 24].

Существует ряд дополнительных методов, основанных на FISH, таких как многоцветное окрашивание хромосом (multicolor FISH, mFISH) и многоцветное окрашивание сегментов хромосом (multicolor banding FISH, MCB FISH). В основе многоцветной FISH лежит комбинаторное мечение ДНК-зонда различными флюорохромами. Последующая цифровая регистрация интенсивности свечения каждого отдельного флюорохрома для всех точек изображения с обработкой при помощи специального программного обеспечения позволяет перевести различные комбинации флюорохромов в псевдоцвета, индивидуальные для каждой хромосомы [25]. При mFISH используется набор 24 дифференциально меченных ДНК-зондов, соответствующих каждой гомологичной аутосоме и половым хромосомам человека. Метод позволяет анализировать весь геном и выявлять скрытые транслока-

ции и инсерции, а также хромосомные компоненты маркерных хромосом, но не позволяет идентифицировать внутривхромосомные перестройки и перестройки между гомологичными хромосомами. Разработка многоцветных микродиссекционных ДНК-зондов, специфичных к сегментам хромосом, — mBAND — позволяет получить разноцветное сегментное окрашивание отдельных хромосом и проводить их детальное исследование с высоким разрешением [20]. Методы многоцветной FISH не применяются в рутинной диагностике, но являются дополнительными уточняющими методами идентификации сложных и субмикроскопических структурных хромосомных перестроек.

Сравнительная геномная гибридизация

Еще одной технологией, основанной на гибридизации нуклеиновых кислот, является сравнительная геномная гибридизация (comparative genomic hybridization, CGH). Принцип метода основан на гибридизации меченных разными красителями ДНК исследуемого образца и референсной ДНК с последующим сравнительным анализом при помощи специального программного обеспечения, результат которого графически отображается в виде профиля гибридизации для каждой пары хромосом [26]. CGH позволяет провести скрининг всего генома на наличие его дисбаланса — нарушения числа копий участков ДНК (copy number alterations, CNA) в виде делеций или дупликаций. Изначально в качестве референсной ДНК использовали препараты метафазных хромосом лимфоцитов индивидуумов с нормальным кариотипом — метафазная CGH, которая не нашла широкого применения в клинической практике в связи с низкой разрешающей способностью, сопоставимой с методом стандартного кариотипирования (10—12 миллионов п. н.). При этом в отличие от кариотипирования метод CGH не позволяет выявлять сбалансированные хромосомные аномалии (транслокации, инверсии, инсерции) [26—28].

Замена метафазных хромосом на стекле в качестве платформы для гибридизации на стекло-микроматрицу, на которое нанесено большое количество клонов меченых последовательностей ДНК (микроматричная CGH), значительно повысила разрешающую способность метода для скрининга геномного дисбаланса. Результаты гибридизации на микроматрице сканируются и анализируются с помощью лазерного сканера и специального программного обеспечения. Разрешение метода зависит от дизайна чипа, а именно от размера клонов и плотности фрагментов ДНК на микроматрице. Существуют как полногеномные матрицы (whole genome array), в которых клоны последовательностей ДНК равномерно распределены по всему геному, так и таргетные матрицы (tar-

geted array) с высокой плотностью нанесения клонов в специфичных районах, наиболее часто вовлеченных в хромосомные перестройки при определенных группах заболеваний, в том числе при опухолевых заболеваниях системы крови [29, 30]. Микроматричная CGH (array-CGH) позволяет проводить полногеномное высокоразрешающее (не менее 100 тысяч п. н.) сканирование всего генома на наличие нарушений числа копий участков ДНК (CNA), в том числе микроделеции, микродупликации, без необходимости культивирования биоматериала и приготовления из него цитогенетических препаратов. Микрочипы, содержащие однонуклеотидные полиморфизмы (SNP-array), позволяют установить уровень ploidy и выявить потерю гетерозиготности участков ДНК без нарушения копияности (copy-neutral loss of heterozygosity, CN-LOH; однородительские дисомии, ОРД). Клиническое значение CN-LOH в определенных хромосомных регионах может соответствовать значению делеций в этих регионах [31, 32]. Метод array-CGH позволяет выявлять хромотрипсис и другие комплексные геномные нарушения, при которых хромосома или ее участок одномоментно разрывается на десятки или сотни фрагментов с последующей хаотичной сборкой, сопровождающейся многочисленными делециями и/или дупликациями участков ДНК, как правило затрагивающими локусы генов-супрессоров опухолевого роста и онкогенов [33].

Ограничением метода array-CGH является невозможность выявления сбалансированных хромосомных аномалий (транслокаций, инверсий, инсерций) и малых клонов ($< 15\text{--}25\%$) [34—36]. Критерии интерпретации результатов исследования устанавливаются таким образом, чтобы исключить аномалии, не связанные с опухолью, — конституциональные вариации числа копий участков ДНК (copy number variations, CNV), присутствующие в популяции, часто выявляемые с помощью метода array-CGH и не влияющие на стратификацию риска. Только крупные CNA ($\geq 5\text{ Mb}$) и CN-LOH ($\geq 10\text{ Mb}$ и распространяющиеся на теломеры) считаются ассоциированными с опухолью аномалиями. Обнаружение более мелких CNA ($< 5\text{ Mb}$) отражается в результатах диагностического теста только тогда, когда они связаны с локусами известных генов-супрессоров и онкогенов [37].

Результаты стандартного и молекулярно-цитогенетических методов исследования описывают в соответствии с действующей Международной системой цитогеномной номенклатуры (ISCN, 2020) [18].

Материал для цитогенетического исследования

Материалом для цитогенетического исследования может быть любая ткань, вовлеченная в опухолевый процесс. При острых лейкозах, МДС, ХМЛ и ММ рекомендуется исследовать костный мозг, при ХЛЛ — пе-

риферическую кровь, при лимфомах — биоптат опухоли. Другая ткань при подтверждении опухолевой инфильтрации может исследоваться при отсутствии возможности биопсии костного мозга или опухоли.

Забор аспирата костного мозга в объеме 2—4 мл (минимальный объем — 1 мл) следует проводить в стерильные вакуумные пробирки с напылением лития гепарина (не гранулами). При хроническом лимфолейкозе объем периферической крови, направляемой на цитогенетическое исследование, зависит от концентрации лейкоцитов и лимфоцитов. Примерный расчет: концентрация лейкоцитов $< 20 \times 10^9$ — 3 пробирки с лития гепарином объемом 8—10 мл, $20\text{—}50 \times 10^9$ — 2 пробирки, $> 50 \times 10^9$ — 1 пробирка. Важно! Не следует направлять на исследование кровь больных на лечении при отсутствии абсолютного лимфоцитоза. Биоптат лимфоузла и другой опухолевой ткани в объеме более 1 см³ (минимальный объем — 0,5 см³) следует доставлять в стерильном флаконе с транспортной средой, предоставленной лабораторией, при отсутствии возможности — с физиологическим раствором. Материал должен быть доставлен в лабораторию в самые короткие сроки, желательно не более 24 часов; 48 часов — критическое время. При транспортировке биоматериала более 4 часов следует использовать термоконтейнеры с хладагентами (+4 °C), не замораживать для предотвращения гемолиза [8, 12, 13]. Соблюдение правил забора и транспортировки биоматериала существенно влияет на результаты цитогенетического исследования.

Заболевания системы крови

Хронический миелолейкоз

Цитогенетическим маркером ХМЛ является t(9;22)(q34;q11) (филадельфийская хромосома, Ph-хромосома), в результате которой образуется химерный ген *BCR::ABL1*. В 90—95% случаев встречается простая реципрокная транслокация, в остальных случаях — варианты транслокации с вовлечением трех или более хромосом или криптические (скрытые при кариотипировании) перестройки, как правило инсерции, приводящие к слиянию *BCR::ABL1* [38—40].

Хромосомный анализ является обязательным при диагностике ХМЛ [41—43]. Настоятельно рекомендуется анализировать 20 метафаз для исключения дополнительных хромосомных аномалий высокого риска прогрессирования заболевания. К аномалиям высокого риска относят удвоение Ph-хромосомы, трисомии 8 и 19, изохромосому 17q, к аномалиям очень высокого риска — моносомию 7/делецию 7q, перестройки хромосомного района 3q26/*EVII* (*MECOM*) и комплексные нарушения

кариотипа, включающие $t(9;22)(q34;q11)$ и две или более любые дополнительные цитогенетические аномалии [44–46].

FISH-исследование проводится при отсутствии метафаз и в случаях выявления нормального кариотипа при убедительной клинической картине ХМЛ для исключения криптических перестроек. При выявлении в кариотипе вариантных транслокаций слияние *BCR::ABL1* обязательно подтверждается методом FISH [8, 41].

При неудовлетворительных результатах лечения стандартное цитогенетическое исследование выполняется на любом этапе терапии. Появление любых новых клональных хромосомных нарушений в Ph-положительных клетках свидетельствует о клональной эволюции и прогрессировании ХМЛ [46, 47].

Клональные цитогенетические аномалии в Ph-негативных клетках встречаются у 5–10% больных ХМЛ в ходе болезни и, как правило, не оказывают влияния на течение заболевания. Исключение составляют аномалии хромосомы 7 (моносомия 7 / делеция 7q), а по нашему опыту, и перестройки $3q26/EVII$, при которых возможно развитие МДС с последующей трансформацией в острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) [41, 47–50].

Миелодиспластические синдромы

Цитогенетическое исследование аспирата костного мозга следует проводить всем пациентам с подозрением на МДС для верификации диагноза, определения группы риска в соответствии с критериями прогностических шкал и выбора терапевтической тактики [51–54].

Хромосомные нарушения при стандартном цитогенетическом исследовании выявляются у 45–50% больных МДС. Наиболее часто встречающиеся хромосомные аномалии представлены в табл. 1.

Таблица 1. Наиболее часто встречающиеся хромосомные аномалии при МДС

Хромосомное нарушение	Частота встречаемости	Хромосомное нарушение	Частота встречаемости
+8	10%	del(11q)	3%
del(5q)/–5	10%	–13 или del(13q)	3%
–7/del(7q)	10%	inv(3)(q21q26)/t(3;3)(q21;q26)	1%
del(20q)	5–8%	t(3;21)(q26;q22)	1%
–Y	5%	t(6;9)(p23;q34)	1%
i(17q) или t(17p)	3–5%	Комплексные нарушения кариотипа (≥ 3)	5–10%
del(12p) или t(12p)	3%		

Отдельные хромосомные аномалии признаются свидетельством МДС даже при отсутствии убедительных морфологических признаков: -5 или $\text{del}(5q)/-5$, $-7/\text{del}(7q)$, $i(17q)$ или $t(17p)$, $\text{del}(12p)$ или $t(12p)$, $\text{del}(11q)$, -13 или $\text{del}(13q)$, $\text{del}(9q)$, $\text{idic}(X)(q13)$, $\text{inv}(3)(q21q26)$, $t(3;21)(q26;q22)$, $t(6;9)(p23;q34)$, $t(1;3)(p36;q21)$, $t(11;16)(q23;p13)$, $t(2;11)(p21;q23)$ [5].

Больным с нормальным кариотипом и повторным отсутствием митозов при выполнении стандартного цитогенетического исследования на момент установления диагноза выполняется исследование методом FISH для исключения $\text{del}5q/-5$, $-7/\text{del}7q$ и $\text{inv}(3)(q21q26)/t(3;3)(q21;q26)$, которые, по нашим данным, выявляются в 4%, 1% и 4,5% случаев с нормальным кариотипом при анализе не менее 20 метафаз. FISH-тест может быть расширен исследованием на наличие $+8$, $\text{del}20q$ и $\text{del}17p$.

Вместе с тем FISH-исследование не заменяет стандартное кариотипирование, поскольку все прогностические системы включают результаты анализа именно кариотипа, в том числе выявление комплексных нарушений, что влияет на выбор тактики лечения [53, 55, 56].

Следует отметить, что вариант МДС с изолированной делецией $5q$ подразумевает наличие в кариотипе только $\text{del}5q$ либо с одной дополнительной аномалией, кроме моносомии 7 или $\text{del}7q$ [5].

В лабораториях, располагающих платформой для исследования агау-СГН, FISH-анализ может быть заменен микроматричным анализом, при котором в одном тесте сканируется весь геном на наличие несбалансированных аберраций, которые характерны для МДС. Кроме того, метод агау-СГН позволяет обнаружить субмикроскопические делеции, а также не выявляемую ни при кариотипировании, ни при FISH потерю гетерозиготности без нарушения копийности (однородительские дисомии, ОРД) [31, 59]. Клиническое значение ОРД в критических хромосомных регионах ($5q$, $7q$, $17p$) соответствует клиническому значению делеций в этих регионах [32, 58, 59].

Острые миелоидные лейкозы

Отмечая связь отдельных хромосомных нарушений с клиничко-морфологическими особенностями и прогнозом, ВОЗ выделяет категорию ОМЛ с рекуррентными (устойчиво выявляемыми, неслучайными, определяющими) генетическими аномалиями, а также категорию ОМЛ с аномалиями, ассоциированными с миелодисплазией.

В классификацию ВОЗ 2017 г. [5] включены 7 вариантов ОМЛ со сбалансированными транслокациями и инверсиями:

- ОМЛ с $t(8;21)(q22;q22)/\text{RUNX1}::\text{RUNX1T1}$;

- ОМЛ с $\text{inv}(16)(\text{p13q22})$ или $\text{t}(16;16)(\text{p13;q22})/\text{CBFB}::\text{MYH11}$;
- ОМЛ с $\text{t}(15;17)(\text{q24;q21})/\text{PML}::\text{RARA}$;
- ОМЛ с $\text{t}(9;11)(\text{p21;q23})/\text{KMT2A}::\text{MLLT3}$;
- ОМЛ с $\text{t}(6;9)(\text{p23;q34})/\text{DEK}::\text{NUP214}$;
- ОМЛ с $\text{inv}(3)(\text{q21q26})$ или $\text{t}(3;3)(\text{q21;q26})/\text{MECOM} (\text{EVII})::\text{GATA2}$;
- ОМЛ с $\text{t}(1;22)(\text{p13;q13})/\text{RBM15}::\text{MRTFA}$.

В результате этих структурных хромосомных перестроек образуются химерные гены, кодирующий химерные белки, которые играют ключевую роль в патогенезе ОМЛ [60]. Исключение составляют $\text{inv}(3)(\text{q21q26})$ и $\text{t}(3;3)(\text{q21;q26})$, при которых гиперэкспрессия комплекса *MECOM*, в состав которого входит ген *EVII*, происходит в результате перемещения в область энхансера *GATA2* [61, 62].

Гиперэкспрессия *MECOM* отмечается и при других перестройках $3\text{q}26$, в том числе $\text{t}(3;21)(\text{q26;q22})$ с образованием химерного гена *MECOM::RUNX1*, которые в классификации ВОЗ 2017 г. не включены в вариант ОМЛ с $\text{inv}(3)(\text{q21q26})/\text{t}(3;3)(\text{q21;q26})$. В предложенной в 2022 г. 5-й версии классификации ВОЗ предполагается объединить все перестройки $3\text{q}26/\text{MECOM}$ в одну общую группу [6].

В новой версии классификации выделены варианты ОМЛ с $\text{t}(9;22)(\text{q34;q11})/\text{BCR}::\text{ABL1}$ (ранее — предварительная нозологическая форма) и с перестройками $11\text{p15}/\text{NUP98}$ с многочисленными хромосомными партнерами (> 20), самой частой является $\text{t}(7;11)(\text{p15;p15})/\text{NUP98}::\text{HOXA9}$ [6]. ОМЛ с перестройками *NUP98* встречаются у 2,5% взрослых больных, характеризуется наличием высокого лейкоцитоза ($> 100 \times 10^9/\text{л}$), высокой ассоциацией с мутациями в гене *FLT3* (~ 90% случаев) и неблагоприятным прогнозом. Хромосомные аномалии часто бывают криптоическими и требуют проведения FISH-исследования [63, 64]. Кроме того, предлагается объединить в одну группу $\text{t}(9;11)(\text{p21;q23})/\text{KMT2A}::\text{MLLT3}$ и все другие перестройки $11\text{q}23/\text{KMT2A} (\text{MLL})$, несмотря на то что Европейская организация по лечению лейкозов (European Leukemia Net, ELN) по-прежнему относит $\text{t}(9;11)(\text{p21;q23})$ к факторам промежуточного риска при ОМЛ, а все другие перестройки — к факторам высокого риска [65] (табл. 2). ОМЛ с $\text{t}(1;22)(\text{p13;q13})/\text{RBM15}::\text{MRTFA}$ у взрослых не встречается.

К цитогенетическим аномалиям, ассоциированным с миелодисплазией, относят [5]:

- комплексные нарушения кариотипа (≥ 3 aberrаций);
- несбалансированные аномалии: $\text{del}(7\text{q})/-7$, $\text{del}(5\text{q})/\text{t}(5\text{q})$, $\text{i}(17\text{p})/\text{t}(17\text{p})$, $\text{del}(13\text{q})/-13$, $\text{del}(11\text{q})$, $\text{del}(12\text{p})/\text{t}(12\text{p})$, $\text{idic}(X)(\text{q13})$;
- сбалансированные аномалии: $\text{t}(11;16)(\text{q23;p13})$, $\text{t}(3;21)(\text{q26;q22})$, $\text{t}(1;3)(\text{p36;q21})$, $\text{t}(2;11)(\text{p21;q23})$, $\text{t}(5;12)(\text{q32;p13})$, $\text{t}(5;7)(\text{q32;q11})$, $\text{t}(5;17)(\text{q32;p13})$, $\text{t}(5;10)(\text{q32;q21})$, $\text{t}(3;5)(\text{q25;q35})$.

В соответствии с рекомендациями ELN больных ОМЛ разделяют на 3 группы риска в зависимости от выявленных цитогенетических аномалий, мутаций в ряде генов, а также наличия комплексного и моносомного кариотипа [65].

Таблица 2. Классификация генетического риска ОМЛ (ELN, 2022) [65]

Категория риска	Выявляемое нарушение
Благоприятная	<i>t(8;21)(q22;q22.1)/RUNX1::RUNX1T1</i> ; <i>inv(16)(p13.1;q22)</i> или <i>(16;16)(p13.1;q22)/CBFB::MYH11</i> ; мутации <i>NPM1</i> без <i>FLT3-ITD</i> ; биаллельная мутация <i>CEBPA</i>
Промежуточная	мутации <i>NPM1</i> с <i>FLT3-ITD</i> ; дикий тип <i>NPM1</i> с <i>FLT3-ITD</i> (без генетических нарушений высокого риска); <i>t(9;11)(p21.3;q23.3)/MLLT3::KMT2A</i> ; цитогенетические и/или молекулярные нарушения, не классифицированные как благоприятные или неблагоприятные
Неблагоприятная	<i>t(6;9)(p23.3;q34.1)/DEK::NUP214</i> ; <i>t(v;11q23.3)/KMT2A</i> ; <i>t(9;22)(q34.1;q11.2)/BCR::ABL1</i> ; <i>t(8;16)(p11.2;p13.3)/KAT6A::CREBBP</i> ; <i>inv(3)(q21.3q26.2)</i> или <i>t(3;3)(q21.3;q26.2)/GATA2, MECOM(EV11)</i> ; <i>t(3q26.2;v)/MECOM(EV11)</i> ; —5 или <i>del(5q)</i> ; —7; —17/аномалии 17p; комплексный кариотип, моносомный кариотип; мутации <i>ASXL1</i> , <i>BCOR</i> , <i>EZH2</i> , <i>RUNX1</i> , <i>SF3B1</i> , <i>SRSF2</i> , <i>STAG2</i> , <i>U2AF1</i> , и/или <i>ZRSR2</i> ; мутации <i>TP53</i>

Понятие моносомного кариотипа при ОМЛ подразумевает наличие двух аутосомных моносомий или одной моносомии в сочетании с ≥ 1 любой структурной или численной хромосомной аномалией [66]. Самыми частыми являются моносомии хромосом 5 (20—30%), 7-й (25—45%) и 17 (10—20%). Однако наличие только двух аутосомных моносомий в кариотипе больных ОМЛ является очень редким событием, в большинстве случаев моносомии выявляются в составе комплексного кариотипа (≥ 3 aberrаций) [66, 67]. В нашем исследовании комплексных кариотипов с моносомиями больных ОМЛ и МДС с использованием многоцветного кариотипирования (многоцветная FISH, MFISH) фрагменты хромосомы 5 обнаружены во всех случаях, хромосом 7 и 17 — в большинстве случаев. Предполагаемые моносомии были представлены транслокациями с делециями или другими сложными аномалиями, которые не идентифицированы при стандартном кариотипировании и описаны как маркерные хромосомы [68].

В 2019 г. Mrózek K. et al. предложили разделять комплексный кариотип при ОМЛ на типичный (70—80%) — ≥ 3 аномалий хромосом,

включая несбалансированные аномалии с потерей 5q и 7q и/или 17p (делеции, моносомии, несбалансированные транслокации с делециями), — и атипичный — ≥ 3 других несбалансированных аномалий или ≥ 3 нарушений, включая ≥ 1 сбалансированную аномалию (реципрокные транслокации, инверсии) [69]. Таким образом, моносомный кариотип является частью типичного комплексного кариотипа.

Классификационные транслокации и инверсии — $t(8;21)$, $inv(16)/t(16;16)$, $t(15;17)$, $t(9;11)(p22;q23)$, $inv(3)(q21q26)/t(3;3)$, сбалансированные перестройки $11q23$, $t(6;9)$ и $t(9;22)$ — с дополнительными хромосомными аномалиями не относятся к категории комплексного кариотипа [69].

Стандартное цитогенетическое исследование является обязательным при установлении диагноза и при рецидиве ОМЛ для стратификации пациентов по группам риска и определения тактики лечения, а также для выявления маркера для мониторинга динамики опухолевого клона на фоне терапии [65, 70]. Аберрантный кариотип выявляется у 50—60% больных ОМЛ. При отсутствии митозов или нормальном кариотипе, но наличии клинических, морфологических, иммунофенотипических признаков, характерных для определенных вариантов ОМЛ, выполняют исследование методом FISH на наличие $t(8;21)(q22;q22)/RUNX1::RUNX1T1$, $inv(16)(p13q22)/CBFB::MYH11$, $t(15;17)(q24;q21)/PML::RARA$, $t(11q23)/KMT2A (MLL)$ и $inv(3)(q21q26)/MECOM (EVII)::GATA2$, а также $-7/del(7q)$ и $del(5q)$ [5, 6]. FISH-исследование должно быть выполнено, если клиническая ситуация требует быстрого результата цитогенетического исследования, например, при остром промиелоцитарном лейкозе.

Острые лейкозы со смешанным фенотипом

Больным острыми лейкозами со смешанным фенотипом необходимо проводить исследование методом FISH на наличие $t(9;22)(q34;q11)/BCR::ABL1$ и $t(11q23)/KMT2A (MLL)$, так как они наиболее часто встречаются и, в соответствии с классификацией ВОЗ, определяют отдельные варианты заболевания [5, 7, 71—73].

Острые лимфобластные лейкозы

В-клеточный острый лимфобластный лейкоз

ВОЗ выделяет несколько вариантов В-клеточного острого лимфобластного лейкоза (В-ОЛЛ) с рекуррентными (определяющими) генетическими аномалиями [5, 7]:

- В-ОЛЛ с $t(9;22)(q34;q11)/BCR::ABL1$;
- В-ОЛЛ с $t(11q23)/KMT2A (MLL)$;

- В-ОЛЛ с $t(12;21)(p12;q22)/ETV6::RUNX1$;
- В-ОЛЛ с гипердиплоидией;
- В-ОЛЛ с гиподиплоидией;
- В-ОЛЛ с $t(5;14)(q31;q32)/IGH::IL3$;
- В-ОЛЛ с $t(1;19)(q23;p13)/TCF3::PBX1$;
- В-ОЛЛ $BCR::ABL1$ -подобный;
- В-ОЛЛ с $iAMP21$;
- В-ОЛЛ с $t(17;19)(q22;p13)/TCF3::HLF$;
- В-ОЛЛ, $ETV6::RUNX1$ -подобный.

Варианты В-ОЛЛ с $t(12;21)(p12;q22)/ETV6::RUNX1$ и $ETV6::RUNX1$ -подобный характерны для детей, варианты В-ОЛЛ с $iAMP21$ и $t(17;19)(q22;p13)/TCF3::HLF$ в редких случаях встречаются также и у молодых взрослых [74—76].

Наиболее значимыми генетическими диагностическими и прогностическими факторами В-ОЛЛ у взрослых являются $t(9;22)(q34;q11)/BCR::ABL1$; $t(11q23)/KMT2A$ (*MLL*) и $t(1;19)(q23;p13)/TCF3-PBX1$ [77—79].

Стандартное цитогенетическое исследование следует проводить всем больным В-ОЛЛ. Хромосомные аномалии выявляются в 60% случаев. При отсутствии митозов, нормальном кариотипе, аберрантном кариотипе без выявленных определяющих (в соответствии с классификацией ВОЗ) нарушений кариотипа, а также при невозможности выполнить стандартный хромосомный анализ проводится исследование методом FISH с последовательным использованием ДНК-зондов для выявления $t(9;22)(q34;q11)/BCR::ABL1$, затем $t(11q23)/KMT2A$ (*MLL*) и $t(1;19)(q23;p13)/TCF3-PBX1$ [8, 80].

Больным В-ОЛЛ со зрелым иммунофенотипом следует выполнять FISH-исследование на наличие транслокаций с вовлечением локуса гена *MYC*, а в случае их обнаружения проводить дополнительное исследование на наличие транслокаций *BCL2* и *BCL6* — double-/triple-hit В-ОЛЛ. Больных В-ОЛЛ с транслокациями *MYC* и/или *BCL2* и *BCL6* относят к группе высокого риска [81—84].

Классификация ВОЗ включает $BCR::ABL1$ -подобный вариант В-ОЛЛ, характеризующийся сходным с $BCR::ABL1$ -позитивным ОЛЛ профилем экспрессии генов и прогнозом при отсутствии $t(9;22)/BCR::ABL1$ и наличии различных генетических нарушений (цитогенетических аномалий и мутаций в генах), которые активируют сигнальные пути рецепторов цитокинов и киназ [85, 86]. С помощью метода FISH можно выявлять большинство перестроек *ABL1*-класса, которые включают транслокации с вовлечением локусов генов *ABL1*, *ABL2*, *CSF1R* (или *PDGFRB*) и нарушениями, активирующими JAK-STAT-путь (перестройки *CRLF2* — $IGH::CRLF2$, $P2RY8::CRLF2$, транслокации

EPOR и *JAK2*), что позволяет выявлять больных группы высокого риска для применения таргетной терапии [87, 88].

Т-клеточный острый лимфобластный лейкоз

При Т-клеточном остром лимфобластном лейкозе (Т-ОЛЛ) aberrантный кариотип определяется в 50—70% случаев [5]. В 35% Т-ОЛЛ выявляются перестройки (транслокации и инверсии) с участием локусов генов Т-клеточных рецепторов — 14q11 (*TRA/TRD*) и 7q34 (*TRB*) с многочисленными хромосомными партнерами, наиболее часто встречающимися из которых являются 10q24/*TLX1* и 5q35/*TLX3*. В 8% случаев Т-ОЛЛ встречаются транслокации 11q23/*KMT2A*, чаще представленные *t(11;19)(q23;p13)/KMT2A::MLLT1* [89, 90]. FISH-исследование для выявления этих хромосомных нарушений не является необходимым при диагностике Т-ОЛЛ.

В 30% случаев Т-ОЛЛ из ранних предшественников (ЕТР ОЛЛ) встречаются перестройки в локусе гена транскрипционного фактора Т-клеточной линии *BCL11B/14q32*, которые могут быть выявлены с помощью метода FISH, что позволяет выделять больных группы более благоприятного прогноза по сравнению с больными ЕТР ОЛЛ без нарушений *BCL11B/14q32* [91—93].

При исследовании методом агау-СГН в большинстве случаев ОЛЛ выявляются субмикроскопические вариации количества копий участков ДНК, некоторые из которых затрагивают локусы генов, участвующих в патогенезе заболевания, и имеют клиническое значение. В настоящее время анализ агау-СГН выполняется больным ОЛЛ, включенным в клинические исследования, и в будущем может быть внедрен в рутинную диагностику [8, 94, 95].

Зрелоклеточные лимфатические опухоли

Стандартное цитогенетическое исследование при зрелоклеточных лимфатических опухолях затруднено: большинство лимфом имеют низкую митотическую активность опухолевых клеток, вследствие чего отсутствуют митозы для кариотипирования или определяется нормальный кариотип неопухолевых клеток, что не свидетельствует об отсутствии хромосомных аномалий в опухолевом клоне; aberrантный кариотип во многих случаях характеризуется наличием множества хромосомных нарушений, что значительно затрудняет интерпретацию результатов исследования. Наличие ряда диагностических и прогностически значимых хромосомных аномалий при зрелоклеточных лимфатических опухолях (табл. 3) позволяет с помощью метода FISH проводить прицельный поиск цитогенетических маркеров на основании клинических данных и результатов гистологического исследования,

ИГХ и ИФТ. Кроме того, FISH-исследование может быть выполнено на архивном материале без повторной биопсии (парафиновые блоки, отпечатки). Тем не менее желательно, при возможности, проведение и стандартного кариотипирования, которое позволяет получить важную дополнительную информацию, а при хроническом лимфолейкозе определять больных группы высокого риска для определения тактики терапии.

Таблица 3. Цитогенетические аномалии, характерные для зрелоклеточных лимфатических опухолей

Нозология	Хромосомные нарушения / гены-участники
В-клеточные опухоли	
Лимфома Беркитта	t(8;14)(q24;q32)/ <i>MYC::IGH</i> ; t(2;8)(p12;q24)/ <i>MYC::IGK</i> ; t(8;22)(q24;q11)/ <i>MYC::IGL</i>
В-клеточная лимфома высокой степени злокачественности с перестройками <i>MYC</i> и <i>BCL2</i> и/или <i>BCL6</i>	t(8q24)/ <i>MYC</i> + t(18q21)/ <i>BCL2</i> и/или t(3q27)/ <i>BCL6</i>
В-клеточная лимфома высокой степени злокачественности с абберациями 11q	dup(11q23.2-23.3); del(11q24.1-qter)
Фолликулярная лимфома	t(18q21)/ <i>BCL2</i>
Диффузная В-крупноклеточная лимфома	t(3q27)/ <i>BCL6</i> ; t(18q21)/ <i>BCL2</i> ; t(8q24)/ <i>MYC</i>
Лимфома из клеток мантии	t(11q13)/ <i>CCND1</i>
Крупноклеточная В-клеточная лимфома с перестройкой <i>IRF4</i>	t(6p25)/ <i>IRF4</i>
Экстранодальная лимфома из клеток маргинальной зоны MALT-типа	t(18q21)/ <i>MLT</i>
Т-клеточные опухоли	
Т-пролимфоцитарный лейкоз	inv/t(14q11)/ <i>TRA/TRD (TCR A/D)</i>
Гепатолиенальная Т-клеточная лимфома	i(7)(q10),+8
Анапластическая крупноклеточная лимфома	
ALK-позитивная	t(2p23)/ <i>ALK</i>
ALK-негативная	t(6p25)/ <i>DUSP22</i> ; inv(3)(q26q28)/ <i>TP63::TBL1XR1</i>

Транслокации с вовлечением локуса гена *MYC/8q24* являются цитогенетическим маркером **лимфомы Беркитта**. В 80% случаев встречается t(8;14)(q24;q32)/*MYC::IGH*, в 20% — варианты транслокации t(2;8)(p12;q24)/*MYC::IGK* и t(8;22)(q24;q11)/*MYC::IGL*. У половины больных транслокация с вовлечением локуса гена *MYC/8q24* является единственным нарушением кариотипа, в остальных случаях дополни-

тельно выявляется трисомия 1/дупликация 1q и/или трисомия 7/дупликация 7q и очень редко другие аномалии [96—98].

Однако в 5—10% случаев транслокации 8q24/*MYC* встречаются и при других В-клеточных лимфатических опухолях в дебюте заболевания или в прогрессии/рецидиве в качестве вторичного хромосомного нарушения, связанного с клональной эволюцией и опухолевой прогрессией. Случаи выявления транслокаций *MYC*/8q24 в сочетании с другими неслучайными транслокациями в повторяющихся точках разрывов — *BCL2*/18q21 и/или *BCL6*/3q27 — было принято называть **double-hit** и **triple-hit лимфомами** [99]. В отличие от лимфомы Беркитта при double-hit и triple-hit лимфомах в транслокациях *MYC* могут участвовать не-*Ig* хромосомные партнеры, а кариотип характеризуется наличием комплексных нарушений [100—102]. В классификации ВОЗ 2017 г. double-hit и triple-hit лимфомы отнесены к категории «**В-клеточная лимфома высокой степени злокачественности с транслокациями *MYC* и *BCL2* и/или *BCL6***» [5]. В 5-й версии классификации ВОЗ 2022 г. на основании результатов исследования профиля экспрессии генов выделена **диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома (ДВККЛ) / В-клеточная лимфома высокой степени злокачественности с транслокациями *MYC* и *BCL2***. К этой же нозологии относятся случаи с транслокациями *MYC*, *BCL2* и *BCL6*. Случаи с транслокациями *MYC* и *BCL6* исключены из этой нозологии и в соответствии с их цитоморфологическими особенностями классифицируются либо как подтип **диффузной В-крупной лимфомы, без дополнительных уточнений**, либо как подтип **В-клеточной лимфомы высокой степени злокачественности, без дополнительных уточнений** [7].

Транслокации с вовлечением локуса гена *BCL2*/18q21 встречаются в 80—90% случаев **фолликулярной лимфомы**; 80% составляет t(14;18)(q24;q32)/*BCL2*::*IGH*, 20% — варианты транслокации t(2;18)(p12;q21)/*BCL2*::*IGK* и t(18;22)(q21;q11)/*BCL2*::*IGL* [103—105]. В классификации ВОЗ 2022 г. случаи с транслокациями *BCL2* отнесены к классической фолликулярной лимфоме [7]. Транслокации *BCL2*/18q21 также встречаются при GC-типе ДВККЛ [106].

В транслокациях с вовлечением локуса гена *BCL6*/3q27 могут участвовать как локусы генов *Ig* (14q32/*IGH*, 2p11/*IGK*, 22q11/*IGL*), так и множество других хромосомных партнеров [107].

FISH-исследование на наличие транслокаций *MYC*, *BCL2* и *BCL6* в большинстве случаев проводится на срезах с парафиновых блоков по результатам гистологического и ИГХ исследований. Уточнять хромосомный партнер, как правило, не требуется, так как он не влияет на выбор терапевтической тактики.

Иммуногистохимический профиль, включающий экспрессию опухолевыми клетками MUM1 и BCL6, в ряде случаев — в сочетании с

CD10, особенно у больных молодого возраста с локализацией опухоли в области лимфатических узлов головы и шеи и/или лимфоидного кольца Пирогова—Вальдейера, — требует проведения FISH-исследования на наличие транслокаций *IRF4/6p25* для исключения **крупноклеточной В-клеточной лимфомы с перестройкой *IRF4*** [5, 108, 109].

В-клеточная лимфома высокой степени злокачественности с абберациями 11q (ранее — беркиттоподобная лимфома с абберациями 11q) представляет собой агрессивную зрелую В-клеточную лимфому с морфологией, сходной с лимфомой Беркитта, без транслокаций с вовлечением локуса гена *MYC*, но с характерными абберациями в длинном плече хромосомы 11 — дупликация/амплификация проксимального участка и/или делеция теломерного участка. Минимальный участок дупликации — 11q23.2-23.3, делеции — 11q24.1-qter. Выявление этих аббераций возможно методом FISH с использованием ДНК-зондов к регионам 11q23.3 и 11q24.3. Однако в редких случаях может происходить потеря гетерозиготности без нарушения копийности, которая определяется методом агау-CGH [110, 111].

Цитогенетическим маркером **лимфомы из клеток мантии** является $t(11;14)(q13;q32)/CCND1::IGH$ [114, 115]. В редких случаях выявляются вариантные транслокации $[t(2;11)(p12;q13)/CCND1::IGK$ и $t(11;22)(q13;q11)/CCND1::IGL]$ и криптические аномалии [114—116]. В небольшой подгруппе лимфомы из клеток мантии, SOX11-позитивной, но негативной по наличию экспрессии циклина D1 и транслокации *CCND1*, более чем в 90% случаев выявляются перестройки *CCND2* или *CCND3*, преимущественно транслокации *CCND2* с локусами генов тяжелой или легких цепей *Ig* (55—70%), реже криптические аномалии (инсерции) *CCND2* и *CCND3* [117, 118]. Транслокации *MYC* в качестве вторичного хромосомного нарушения встречаются при лимфоме из клеток мантии с $t(11;14)(q13;q32)$, такие случаи не относят к категории double-hit [119, 120]. В редких случаях $t(11;14)(q13;q32)$ также может быть вторичным хромосомным нарушением при прогрессировании других В-клеточных лимфатических опухолей (ХЛЛ, фолликулярной лимфомы, ДВКЛ). Такие случаи не диагностируются как лимфома из клеток мантии [121—123].

Транслокация $t(11;18)(q21;q21)/MALT1::BIRC3$ (*API2*) выявляется в 15—35% случаев **экстранодальной лимфомы из клеток маргинальной зоны MALT-типа**, является высокоспецифичной для этого заболевания и не встречается при других опухолях. Эта транслокация наиболее характерна для MALT-лимфомы желудка, легкого и орбиты, при других локализациях опухоли практически не встречается. В редких случаях выявляется вариантная транслокация — $t(14;18)(q32;q21)/MALT1::IGH$ [124—126].

Более чем в 90% случаев **Т-пролимфоцитарного лейкоза** встречаются перестройки локуса генов Т-клеточного рецептора (*TRA/TRD*; *TCR A/D*): *inv(14)(q11;q32)/TCR A/D::TCL1*, значительно реже *t(14;14)(q11;q32)/TCR A/D::TCL1* или *t(X;14)(q28;q11)/TCR A/D::MTCPI* [127—129]. В 80% случаев нарушения в локусе *TCR A/D* сочетаются с аномалиями хромосомы 8, которые представлены *i(8)(q10)*, транслокацией *t(8;8)(p11;q12)* или трисомией 8 [130].

Для **гепатолиенальной Т-клеточной лимфомы** характерно наличие *i(7)(q10)* — изохромосомы с потерей короткого и удвоением длинного плеча хромосомы 7, которая может быть единственной аномалией в кариотипе, но в большинстве случаев сопровождается трисомией 8. При использовании метода FISH *i(7)(q10)* выявляется в 50—80% случаев гепатолиенальной Т-клеточной лимфомы [131—133].

Цитогенетическим маркером **ALK-позитивной анапластической крупноклеточной лимфомы** являются перестройки с вовлечением локуса гена *ALK/2p23*. В 75% встречается *t(2;5)(p23;q35)/ALK::NPM*, в остальных случаях — варианты перестройки *t(1;2)(q25;p23)/ALK::TPM3*, *t(2;3)(p23;q21)/ALK::TFG-l, TFG-s*, *inv(2)(p23q35)/ALK::ATIC*, *t(2;17)(p23;q23)/ALK::CLTC* и др. [134, 135].

Хромосомные перестройки с вовлечением локусов генов *DUSP22/6p25* и *TP63/3q28* встречаются в 30% и 8% случаев **ALK-негативной анапластической крупноклеточной лимфомы**. Перестройки *DUSP22/6p25* в большинстве случаев представлены *t(6;7)(p25;q32)/DUSP22::FRA7H* или *t(6;14)(p25;q11)/DUSP22::TCRA/D*, перестройки *TP63/3q28* представлены *inv(3)(q26q28)/TP63::TBL1XR1*. Аномалии *DUSP22* и *TP63* являются взаимоисключающими, не встречаются при ALK+ АКЛ, перестройки *TP63/3q28* связаны с неблагоприятным прогнозом заболевания [136, 137].

Хронический лимфолейкоз

При ХЛЛ нет специфического диагностического хромосомного маркера, все выявляемые нарушения встречаются и при других опухолях, но у 80% больных с помощью метода FISH выявляется одна или несколько из 4 аномалий, для которых определено прогностическое значение (делеции 11q, 13q, 17p и трисомия 12). Фактором благоприятного прогноза является наличие изолированной делеции 13q14, среднего прогноза — трисомии 12 или отсутствие нарушений, неблагоприятного — делеции 11q23/*ATM*, и крайне неблагоприятным прогностическим фактором является делеция 17p13 с потерей гена-супрессора опухолевого роста *TP53* [138—140].

В соответствии с рекомендациями Международной рабочей группы по изучению хронического лимфолейкоза (*iwCLL*), FISH-исследова-

ние лимфоцитов периферической крови следует выполнять всем больным ХЛЛ при появлении показаний к началу лечения перед первой и каждой следующей линией терапии для выбора ее тактики [141]. В первую очередь это относится к исследованию на наличие делеции 17p, которая является главным цитогенетическим фактором, определяющим выбор тактики лечения. Делеция 17p является одним из 5 параметров, включенных в Международный прогностический индекс для ХЛЛ. Выявление делеции 17p относит больного как минимум к группе высокого риска [142].

Изменения кариотипа при ХЛЛ не ограничиваются 4 прогностически значимыми хромосомными аномалиями. Однако выявление других клональных aberrаций при хромосомном анализе длительное время было затруднено. В стандартных условиях культивирования большинство опухолевых клеток ХЛЛ, находящихся в G0/G1-фазе клеточного цикла, не могут делиться. Использование различных комбинаций митогенов и цитокинов лишь незначительно увеличивает количество делящихся опухолевых клеток [139, 143, 144]. Новая комбинация СрG-олигонуклеотида DSP30 и интерлейкина-2 стимулирует клетки ХЛЛ к делению в культуре и позволяет выявлять хромосомные аномалии в 80% случаев и, что особенно важно, выявлять комплексные нарушения кариотипа у 15% больных до начала лечения и более чем у 25% больных при прогрессировании ХЛЛ [17, 145—147].

Комплексный кариотип определяется Международной цитогеномной номенклатурой как наличие ≥ 3 любых клональных численных и/или структурных хромосомных аномалий [18]. Для ХЛЛ наличие ≥ 5 аномалий в кариотипе является независимым фактором неблагоприятного прогноза, в то время как 3—4 аномалии определяют неблагоприятный прогноз только при наличии нарушений *TP53* (делеция 17p или мутации в гене *TP53*) [148].

Комплексный кариотип почти в 2 раза чаще встречается у больных ХЛЛ с делецией 17p, но определяется и у 5% больных с изолированной делецией 13q или отсутствием аномалий при FISH-исследовании. Таким образом, стандартное кариотипирование со специфической стимуляцией позволяет выявлять больных группы высокого риска, которые в случае выполнения только FISH-исследования были бы отнесены к группе благоприятного прогноза [146, 148, 149].

Отмечая неблагоприятное прогностическое значение комплексного кариотипа, iwCLL в последних рекомендациях определяет стандартное кариотипирование перед началом лечения как «желательное» исследование в рамках проспективных клинических исследований и «полезное» в общей практике при условии наличия установленной методологии (специфической стимуляции опухолевых клеток ХЛЛ) [141]. Дру-

гие консорциумы, в том числе российский, недавно включили хромосомный анализ в рутинную диагностику [150, 151].

Исследование методом агау-СГН при ХЛЛ позволяет выявлять хромосомные аномалии с установленным прогностическим значением, новые неслучайные хромосомные аномалии и комплексные нарушения кариотипа [152, 153]. Кроме того, с помощью агау-СГН можно выявлять комплексные генетические нарушения, такие как хромотрипсис, который был открыт именно при ХЛЛ [33, 154]. Хромотрипсис выявляется у 1,5—8,8% больных ХЛЛ и является фактором неблагоприятного прогноза [35, 152, 153, 155]. Из-за присущих методу ограничений для обнаружения структурных aberrаций (транслокаций, инверсий) и малых клонов агау-СГН пока не включен в рутинную клиническую практику. Тем не менее метод признается информативным инструментом для оценки степени aberrантности генома в клинических исследованиях [156, 157].

Множественная миелома

Среди цитогенетических аномалий при ММ выделяют первичные, связанные с возникновением опухоли, и вторичные, накопление которых приводит к трансформации опухоли на разных этапах от моноклональной гаммапатии неопределенного значения до плазмоклеточного лейкоза. К первичным аномалиям относят 5 транслокаций 14q32/*IGH* с локусами различных генов, участвующих в регуляции циклинов группы Д, и гипердиплоидию (≥ 50 хромосом, трисомии 3, 5, 7, 9, 11, 15, 17 и 19) с увеличением количества копий потенциальных онкогенов [158—160]. Первичные цитогенетические аномалии определяют варианты множественной миеломы с особым клиническим течением и прогнозом [161—164]. На их основании в классификации Международного консенсуса зрелых лимфатических опухолей в 2022 г. выделено 4 генетических варианта ММ [165]:

- ММ с транслокациями *CCND*:
 - ▲ t(11;14)/*CCND1::IGH*;
 - ▲ t(6;14)/*CCND3::IGH*.
- ММ с транслокациями *MAF*:
 - ▲ t(14;16)/*IGH::MAF*;
 - ▲ t(14;20)/*IGH::MAFB*.
- ММ с транслокацией *NSD2*:
 - ▲ t(4;14)/*IGH::NSD2*.
- ММ с гипердиплоидией.

К вторичным цитогенетическим аномалиям относятся специфические для ММ нарушения — моносомия 13/делеция 13q, амплификация 1q21/*CKS1B* и делеция 1p32/*CDKN2C*, а также неспецифические,

характерные для прогрессии других опухолей — делеция 17p13/*TP53* и транслокации 8q24/*MYC* [162—164, 166, 167]. Частота встречаемости цитогенетических аномалий при ММ представлена в табл. 4.

Таблица 4. Частота встречаемости цитогенетических аномалий при ММ

Первичные цитогенетические аномалии		Вторичные цитогенетические аномалии	
Аномалия	Частота, %	Аномалия	Частота, %
Гипердиплоидия	55	Делеция/моносомия 13	45—50
Транслокации 14q32/ <i>IGH</i> :	45	Амплификация 1q21	40
t(11;14)(q13;q32)	20	Делеция 1p32	5—10
t(4;14)(p16;q32)	15	Транслокации 8q24	10—15
t(14;16)(q32;q23)	5	Делеция 17p13	10
t(14;20)(q32;q12)	1		
t(6;14)(p21;q32)	1		

Стандартное цитогенетическое исследование при ММ имеет ограничения и в настоящее время не применяется в рутинной диагностике. Из-за низкой пролиферативной активности зрелых опухолевых клеток aberrантный кариотип на момент установления диагноза ММ определяется не более чем у 10—30% больных [168—170]. В остальных случаях либо отсутствуют метафазы для кариотипирования, либо определяется нормальный кариотип популяции неопухолевых клеток костного мозга. Кроме того, t(4;14)(p16;q32) и t(14;20)(q32;q12) не выявляются при кариотипировании в связи с крайне теломерной локализацией точек разрыва хромосом. Такие цитогенетические аномалии, как t(14;16)(q32;q23), del17p/*TP53*, amp1q21, t8q24/*MYC*, также могут быть криптическими, при подозрении на их наличие в кариотипе требуется подтверждение методом FISH [171]. При этом FISH-исследование позволяет выявлять хромосомные нарушения почти у всех больных ММ и является методом выбора для цитогенетической диагностики этого заболевания. Из-за частого низкого содержания плазматических клеток в костном мозге FISH-исследование следует проводить только на CD138+ клетках, выделенных из общего костномозгового пула методом иммуномагнитной селекции [172].

При ММ были разработаны различные системы стратификации риска с использованием первичных и вторичных цитогенетических аномалий для прогнозирования результатов и потенциального определения подходов к лечению (табл. 4) [167, 173—175]. Стратификацию риска следует рассматривать как динамический процесс, который определяется не только биологией опухоли и клональной эволюцией в ходе

прогрессирования, но и доступными методами лечения. Во второй пересмотренной международной системе стадирования (R2-ISS) к факторам высокого риска отнесены t(4;14), делеция 17p и амплификация 1q21 [176]. В последней версии системы стратификации риска клиники Мейо (mSMART 3.0) к высокому цитогенетическому риску относят t(4;14), t(14;16), t(14;20), делецию 17p и амплификацию 1q21, а также выделяют категории double-hit и triple-hit ММ — сочетание двух или трех аномалий высокого риска [177]. В ряде исследований, в том числе нашем собственном, показано негативное влияние амплификации 1q21 на показатели выживаемости больных ММ только при наличии двух или более дополнительных копий локуса 1q21 [178—181].

С помощью метода array-CGH при ММ выявляются другие вариации числа копий участков ДНК, не определяемые при FISH-исследовании, а также хромотрипсис. Хромотрипсис встречается у 10—20% больных ММ на момент установления диагноза и у менее 45% больных при прогрессировании заболевания, связан с низкими показателями выживаемости и предлагается в качестве нового генетического фактора высокого риска [182—184].

Литература

1. Nowell PC, Hungerford DA. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science* 1960; 142:1497.
2. Mitelman F, Mertens F, Johansson B. A breakpoint map of recurrent chromosomal rearrangements in human neoplasia. *Nat Genet* 1997; 15:417—474. DOI:10.1038/ng0497supp-417.
3. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW (editors). World Health Organization classification of tumours. Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. 3rd edition. Lyon: IARC; 2001.
4. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL et al. (editors). WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. 4th edition. Lyon: IARC; 2008.
5. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL et al. (editors). WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Revised 4th edition. Lyon: IARC; 2017.
6. Khoury JD, Solary E, Abla O et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. *Leukemia* 2022; 36(7):1703—1719. DOI:10.1038/s41375-022-01613-1.
7. Alaggio R, Amador C, Anagnostopoulos I et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms. *Leukemia* 2022; 36(7):1720—1748. DOI:10.1038/s41375-022-01620-2.
8. Rack KA, van den Berg E, Haferlach C et al. European recommendations and quality assurance for cytogenomic analysis of haematological neoplasms. *Leukemia* 2019; 33(8):1851—1867. DOI:10.1038/s41375-019-0378-z.

9. Цаур Г. А., Ольшанская Ю. В., Обухова Т. Н. и др. Цитогенетическая и молекулярно-генетическая диагностика онкогематологических заболеваний: позиция Организации молекулярных генетиков в онкологии и онкогематологии. *Гематология и трансфузиология* 2023; 68(1):129—143. DOI: 10.35754/0234-5730-2023-68-1-129-143.
10. Seabright M. A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet* 1971; 298:971—972. DOI:10.1016/S0140-6736(71)90287-X.
11. Menten B, Maas N, Thienpont B et al. Emerging patterns of cryptic chromosomal imbalance in patients with idiopathic mental retardation and multiple congenital anomalies: a new series of 140 patients and review of published reports. *J Med Genet* 2006; 43(8):625—633. DOI:10.1136/jmg.2005.039453.
12. Mikhail FM, Heerema NA, Rao KW et al. Section E6.1-6.4 of the ACMG technical standards and guidelines: chromosome studies of neoplastic blood and bone marrow-acquired chromosomal abnormalities. *Genet Med* 2016; 18(6):635—642. DOI:10.1038/gim.2016.50.
13. Heerema N. Cytogenetic analysis of hematologic malignant diseases. In: Arsham MS, Barch MJ, Lawce HJ (editors). *AGT cytogenetics laboratory manual*. Hoboken (NJ): Wiley Blackwell; 2017. P. 499—575. DOI:10.1002/9781119061199.ch11.
14. Haferlach C, Rieder H, Lillington DM et al. Proposals for standardized protocols for cytogenetic analyses of acute leukemias, chronic lymphocytic leukemia, chronic myeloid leukemia, chronic myeloproliferative disorders, and myelodysplastic syndromes. *Genes Chromosomes Cancer* 2007; 46(5):494—499. DOI:10.1002/gcc.20433.
15. Баркаган З. С., Варламова Е. Б., Владимирская П. А. и др. *Гериатрическая гематология: Заболевания системы крови в старших возрастных группах*. М: Медиум, 2011. Том 1. 312 с.
16. Decker T, Schneller F, Sparwasser T et al. Immunostimulatory CpG-oligonucleotides cause proliferation, cytokine production, and an immunogenic phenotype in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood* 2000; 95(3):999—1006. DOI: 10.1182/blood.v95.3.999.003k10_999_1006.
17. Кислицына М. А., Обухова Т. Н., Алимова Г. А. и др. Эффективность использования олигонуклеотида DSP30 в сочетании с интерлейкином-2 для выявления хромосомных aberrаций у больных хроническим лимфолейкозом. *Гематология и трансфузиология* 2019; 64(1):22—35. DOI:10.35754/0234-5730-2019-64-1-21-34.
18. McGowan-Jordan J, Hastings RJ, Moore S (editors). *ISCN (2020). An international system for human cytogenomic nomenclature*. Basel (CH): S. Karger AG; 2020. DOI: <https://doi.org/10.1159/isbn.978-3-318-06867-2>.
19. Kjeldsen E, Kølvrå S. FISH technique, FISH probes and their applications in medicine and biology—an overview. In: Rautenstrauss BW, Liehr T (editors). *FISH technology*. Berlin: Springer-Verlag; 2002. P. 3—50.
20. Levsky JM, Singer RH. Fluorescence in situ hybridization: past, present and future. *J Cell Sci* 2003; 116(Pt 14):2833—2838. DOI:10.1242/jcs.00633.
21. Юров И. Ю., Ворсанова С. Г., Воинова В. Ю. и др. *Цитогенетические, молекулярные и клинические основы генетически обусловленных болезней*. М.: Академия Естествознания, 2019. 164 с.

22. Gozzetti A, Le Beau MM. Fluorescence in situ hybridization: uses and limitations. *Semin Hematol* 2000; 37(4):320—333. DOI:10.1016/s0037-1963(00)90013-1.
23. Tibiletti MG, Vanni R. FISH on histological sections of solid tumours: ECA recommendations. *ECA Newsletter* 2011; 27. URL: www.e-c-a.eu/en/NEWSLETTER.html.
24. Обухова Т. Н., Барях Е. А., Капланская И. Б. и др. Выявление диагностических для лимфомы Беркитта транслокаций методом флуоресцентной in situ гибридизации на гистологических срезах парафиновых блоков. *Терапевтический архив* 2007; 79(7):80—83.
25. Chudoba I, Plesch A, Lörch T et al. High resolution multicolor-banding: a new technique for refined FISH analysis of human chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 1999; 84(3—4):156—160. DOI:10.1159/000015245.
26. du Manoir S, Kallioniemi OP, Lichter P et al. Hardware and software requirements for quantitative analysis of comparative genomic hybridization. *Cytometry* 1995; 19(1):4—9. DOI:10.1002/cyto.990190103.
27. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D et al. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 1992; 258(5083):818—821. DOI:10.1126/science.1359641.
28. Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Piper J et al. Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 1994; 10(4):231—243. DOI:10.1002/gcc.2870100403.
29. Shaw CJ, Shaw CA, Yu W et al. Comparative genomic hybridisation using a proximal 17p BAC/PAC array detects rearrangements responsible for four genomic disorders. *J Med Genet* 2004; 41(2):113—119. DOI:10.1136/jmg.2003.012831.
30. Shaffer LG, Kashork CD, Saleki R et al. Targeted genomic microarray analysis for identification of chromosome abnormalities in 1500 consecutive clinical cases. *J Pediatr* 2006; 149(1):98—102. DOI:10.1016/j.jpeds.2006.02.006.
31. Heinrichs S, Kulkarni RV, Bueso-Ramos CE et al. Accurate detection of uniparental disomy and microdeletions by SNP array analysis in myelodysplastic syndromes with normal cytogenetics. *Leukemia* 2009; 23(9):1605—1613. DOI:10.1038/leu.2009.82.
32. Gondek LP, Tiu R, O’Keefe CL et al. Chromosomal lesions and uniparental disomy detected by SNP arrays in MDS, MDS/MPD, and MDS-derived AML. *Blood* 2008; 111(3):1534—1542. DOI:10.1182/blood-2007-05-092304.
33. Stephens PJ, Greenman CD, Fu B et al. Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development. *Cell* 2011; 144(1):27—40. DOI:10.1016/j.cell.2010.11.055.
34. Puiggros A, Ramos-Campoy S, Kamaso J et al. Optical genome mapping: a promising new tool to assess genomic complexity in chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Cancers (Basel)* 2022; 14(14):3376. DOI:10.3390/cancers14143376.
35. Salaverria I, Martín-García D, López C et al. Detection of chromothripsis-like patterns with a custom array platform for chronic lymphocytic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 2015; 54(11):668—680. DOI:10.1002/gcc.22277.

36. Rigolin GM, Traversa A, Caputo V et al. Additional lesions identified by genomic microarrays are associated with an inferior outcome in low-risk chronic lymphocytic leukaemia patients. *Br J Haematol* 2023; 202(5):953—959. DOI: 10.1111/bjh.18946.
37. Schoumans J, Suela J, Hastings R et al. Guidelines for genomic array analysis in acquired haematological neoplastic disorders. *Genes Chromosomes Cancer* 2016; 55(5):480—491. DOI:10.1002/gcc.22350.
38. Rowley JD. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 1973; 243(5405):290—293. DOI:10.1038/243290a0.
39. Bartram CR, de Klein A, Hagemeijer A et al. Translocation of c-abl oncogene correlates with the presence of a Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. *Nature* 1983; 306(5940):277—280. DOI:10.1038/306277a0.
40. Melo JV. The diversity of BCR-ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype. *Blood* 1996; 88:2375—2384.
41. Baccarani M, Deininger MW, Rosti G et al. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. *Blood* 2013; 122(6):872—884. DOI:10.1182/blood-2013-05-501569.
42. Hochhaus A, Baccarani M, Silver RT et al. European LeukemiaNet 2020 recommendations for treating chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 2020; 34(4):966—984. DOI:10.1038/s41375-020-0776-2.
43. Хронический миелоидный лейкоз. Клинические рекомендации, 2022. URL: npngo.ru/biblioteka/klinicheskie_rekomendatsii_2022_god_?page=2.
44. Fabarius A, Leitner A, Hochhaus A et al. Impact of additional cytogenetic aberrations at diagnosis on prognosis of CML: long-term observation of 1151 patients from the randomized CML Study IV. *Blood* 2011; 118(26):6760—6768. DOI: 10.1182/blood-2011-08-373902.
45. Farag SS, Ruppert AS, Mrózek K et al. Prognostic significance of additional cytogenetic abnormalities in newly diagnosed patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia treated with interferon-alpha: a Cancer and Leukemia Group B study. *Int J Oncol* 2004; 25(1):143—151.
46. Wang W, Cortes JE, Tang G et al. Risk stratification of chromosomal abnormalities in chronic myelogenous leukemia in the era of tyrosine kinase inhibitor therapy. *Blood* 2016; 127(22):2742—2750. DOI:10.1182/blood-2016-01-690230.
47. Cortes JE, Talpaz M, Giles F et al. Prognostic significance of cytogenetic clonal evolution in patients with chronic myelogenous leukemia on imatinib mesylate therapy. *Blood* 2003; 101(10):3794—3800. DOI:10.1182/blood-2002-09-2790.
48. Удовиченко А. И., Клеина И. В., Гребенюк Л. А. и др. Случай выявления inv(3)(q21q26) в Ph-негативных клетках костного мозга у больного хроническим миелолейкозом с развитием миелодиспластического синдрома и трансформацией в острый миелоидный лейкоз. *Гематология и трансфузиология* 2016; 60(1):32—36.
49. Karimata K, Masuko M, Ushiki T et al. Myelodysplastic syndrome with Ph negative monosomy 7 chromosome following transient bone marrow dysplasia du-

- ring imatinib treatment for chronic myeloid leukemia. *Intern Med* 2011; 50(5):481—485. DOI:10.2169/internalmedicine.50.4481.
50. Larsson N, Billström R, Lilljebjörn H et al. Genetic analysis of dasatinib-treated chronic myeloid leukemia rapidly developing into acute myeloid leukemia with monosomy 7 in Philadelphia-negative cells. *Cancer Genet Cytogenet* 2010; 199(2):89—95. DOI:10.1016/j.cancergencyto.2010.02.005.
51. Malcovati L, Hellström-Lindberg E, Bowen D et al. Diagnosis and treatment of primary myelodysplastic syndromes in adults: recommendations from the European LeukemiaNet. *Blood* 2013; 122(17):2943—2964. DOI:10.1182/blood-2013-03-492884.
52. Valent P, Orazi A, Steensma DP et al. Proposed minimal diagnostic criteria for myelodysplastic syndromes (MDS) and potential pre-MDS conditions. *Oncotarget* 2017; 8(43):73483—73500. DOI:10.18632/oncotarget.19008.
53. Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J et al. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood* 2012; 120(12):2454—2465. DOI:10.1182/blood-2012-03-420489.
54. Schanz J, Tüchler H, Solé F et al. New comprehensive cytogenetic scoring system for primary myelodysplastic syndromes (MDS) and oligoblastic acute myeloid leukemia after MDS derived from an international database merge. *J Clin Oncol* 2012; 30(8):820—829. DOI:10.1200/JCO.2011.35.6394.
55. Greenberg P, Cox C, LeBeau MM et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood* 1997; 89(6):2079—2088.
56. Malcovati L, Della Porta MG, Strupp C et al. Impact of the degree of anemia on the outcome of patients with myelodysplastic syndrome and its integration into the WHO classification-based Prognostic Scoring System (WPSS). *Haematologica* 2011; 96(10):1433—1440. DOI:10.3324/haematol.2011.044602.
57. Новикова Т. Ю., Обухова Т. Н., Кохно А. В. и др. Выявление скрытых геномных дисбалансов (вариаций числа копий и однородительских дисомий) методом сравнительной геномной гибридизации на микрочипах у больных миелодиспластическим синдромом с избытком бластов и нормальным кариотипом. *Гематология и трансфузиология* 2022; 67(S2):266.
58. Svobodova K, Zemanova Z, Lhotska H et al. Copy number neutral loss of heterozygosity at 17p and homozygous mutations of TP53 are associated with complex chromosomal aberrations in patients newly diagnosed with myelodysplastic syndromes. *Leuk Res* 2016; 42:7—12. DOI:10.1016/j.leukres.2016.01.009.
59. O'Keefe C, McDevitt MA, Maciejewski JP. Copy neutral loss of heterozygosity: a novel chromosomal lesion in myeloid malignancies. *Blood* 2010; 115(14):2731—2739. DOI:10.1182/blood-2009-10-201848.
60. Speck NA, Gilliland DG. Core-binding factors in haematopoiesis and leukaemia. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(7):502—513. DOI:10.1038/nrc840.
61. Gröschel S, Sanders MA, Hoogenboezem R et al. A Single oncogenic enhancer rearrangement causes concomitant EVI1 and GATA2 deregulation in leukemia. *Cell* 2014; 157(2):369—381. DOI:https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.019.

62. Yamazaki H, Suzuki M, Otsuki A et al. A remote GATA2 hematopoietic enhancer drives leukemogenesis in inv(3)(q21; q26) by activating EVI1 expression. *Cancer Cell* 2014; 25(4):415—427. DOI:10.1016/j.ccr.2014.02.008.
63. Xie W, Raess PW, Dunlap J et al. Adult acute myeloid leukemia patients with NUP98 rearrangement have frequent cryptic translocations and unfavorable outcome. *Leuk Lymphoma* 2022; 63(8):1907—1916. DOI:10.1080/10428194.2022.2047672.
64. Hollink IHIM, van den Heuvel-Eibrink MM, Arentsen-Peters STCJM et al. NUP98/NSD1 characterizes a novel poor prognostic group in acute myeloid leukemia with a distinct HOX gene expression pattern. *Blood* 2011; 118(13): 3645—3656. DOI:10.1182/blood-2011-04-346643.
65. Döhner H, Wei AH, Appelbaum FR et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN. *Blood* 2022; 140(12):1345—1377. DOI:10.1182/blood.2022016867.
66. Breems DA, Van Putten WLJ, De Greef GE et al. Monosomal karyotype in acute myeloid leukemia: a better indicator of poor prognosis than a complex karyotype. *J Clin Oncol* 2008; 26(29):4791—4797. DOI:10.1200/JCO.2008.16.0259.
67. Strickland SA, Sun Z, Ketterling RP et al. Independent prognostic significance of monosomy 17 and impact of karyotype complexity in monosomal karyotype/complex karyotype acute myeloid leukemia: Results from four ECOG-ACRIN prospective therapeutic trials. *Leuk Res* 2017; 59:55—64. DOI:10.1016/j.leukres.2017.05.010.
68. Гребенюк Л. А., Обухова Т. Н., Паровичникова Е. Н. и др. Аномалии хромосом 5, 7, 11 и 17 в комплексном кариотипе при миелодиспластических синдромах и острых миелоидных лейкозах. *Медицинская генетика* 2018; 17(6):39—47.
69. Mrózek K, Eisfeld AK, Kohlschmidt J et al. Complex karyotype in de novo acute myeloid leukemia: typical and atypical subtypes differ molecularly and clinically. *Leukemia* 2019; 33(7):1620—1634. DOI:10.1038/s41375-019-0390-3.
70. Острые миелоидные лейкозы. Клинические рекомендации, 2022. URL: cr.minzdrav.gov.ru/schema/131_1.
71. Антипова А. С., Баранова О. Ю., Френкель М. А. и др. Острые лейкозы со смешанным фенотипом: клиничко-лабораторные особенности и прогноз. *Клиническая онкогематология* 2015; 8(2):136—150.
72. Wang Y, Gu M, Mi Y et al. Clinical characteristics and outcomes of mixed phenotype acute leukemia with Philadelphia chromosome positive and/or bcr-abl positive in adult. *Int J Hematol* 2011; 94(6):552—555. DOI:10.1007/s12185-011-0953-1.
73. Owaidah TM, Al Beihany A, Iqbal MA et al. Cytogenetics, molecular and ultrastructural characteristics of biphenotypic acute leukemia identified by the EGIL scoring system. *Leukemia* 2006; 20(4):620—626. DOI:10.1038/sj.leu.2404128.
74. Пискунова И. С., Обухова Т. Н., Паровичникова Е. Н. и др. Структура и значение цитогенетических перестроек у взрослых больных Ph-негативным острым лимфобластным лейкозом. *Терапевтический архив* 2018; 90(7):30—37.
75. Thol F. ALL is not the same in the era of genetics. *Blood* 2021; 138:915—916. DOI:10.1182/blood.2021011934.

76. Panagopoulos I, Micci F, Thorsen J et al. A novel TCF3-HLF fusion transcript in acute lymphoblastic leukemia with a t(17; 19)(q22; p13). *Cancer Genet* 2012; 205(12):669—672. DOI:10.1016/j.cancergen.2012.10.004.
77. Hoelzer D, Bassan R, Dombret H et al. Acute lymphoblastic leukaemia in adult patients: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2016; 27(suppl 5):v69—v82. DOI:10.1093/annonc/mdw025.
78. Паровичникова Е. Н., Алешина О. А., Троицкая В. В. и др. Сравнение результатов лечения взрослых больных острыми Ph-негативными лимфобластными лейкозами по протоколам российских многоцентровых исследований «ОЛЛ-2009» и «ОЛЛ-2016». *Гематология и трансфузиология* 2022; 67(4):460—477.
79. Pullarkat V, Slovak ML, Kopecky KJ et al. Impact of cytogenetics on the outcome of adult acute lymphoblastic leukemia: results of Southwest Oncology Group 9400 study. *Blood* 2008; 111(5):2563—2572. DOI:10.1182/blood-2007-10-116186.
80. Moorman AV, Chilton L, Wilkinson J et al. A population-based cytogenetic study of adults with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2010; 115(2):206—214. DOI:10.1182/blood-2009-07-232124.
81. Обухова Т. Н., Паровичникова Е. Н., Гаврилина О. А. и др. Double-и triple-hit в-клеточный острый лимфобластный лейкоз. *Гематология и трансфузиология* 2020; 65(S1):92—93.
82. Stratmann JA, von Rose AB, Koschade S et al. Clinical and genetic characterization of de novo double-hit B cell precursor leukemia/lymphoma. *Ann Hematol* 2019; 98(3):647—656. DOI:10.1007/s00277-018-03590-x.
83. Wagener R, López C, Kleinheinz K et al. IG-MYC (+) neoplasms with precursor B-cell phenotype are molecularly distinct from Burkitt lymphomas. *Blood* 2018; 132(21):2280—2285. DOI:10.1182/blood-2018-03-842088.
84. Moench L, Sachs Z, Aasen G et al. Double- and triple-hit lymphomas can present with features suggestive of immaturity, including TdT expression, and create diagnostic challenges. *Leuk Lymphoma* 2016; 57(11):2626—2635. DOI:10.3109/10428194.2016.1143939.
85. Roberts KG. The biology of Philadelphia chromosome-like ALL. *Best Pract Res Clin Haematol* 2017; 30(3):212—321. DOI:10.1016/j.beha.2017.07.003.
86. Harvey RC, Tasian SK. Clinical diagnostics and treatment strategies for Philadelphia chromosome-like acute lymphoblastic leukemia. *Blood Adv* 2020; 4(1):218—228. DOI:10.1182/bloodadvances.2019000163.
87. Roberts KG, Mullighan CG. Genomics in acute lymphoblastic leukaemia: insights and treatment implications. *Nat Rev Clin Oncol* 2015; 12(6):344—357. DOI:10.1038/nrclinonc.2015.38.
88. Tanasi I, Ba I, Sirvent N et al. Efficacy of tyrosine kinase inhibitors in Ph-like acute lymphoblastic leukemia harboring ABL-class rearrangements. *Blood* 2019; 134:1351—1355. DOI:10.1182/blood.2019001244.
89. Graux C, Cools J, Michaux L et al. Cytogenetics and molecular genetics of T-cell acute lymphoblastic leukemia: from thymocyte to lymphoblast. *Leukemia* 2006; 20(9):1496—1510. DOI:10.1038/sj.leu.2404302.

90. Han X, Bueso-Ramos CE. Precursor T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoblastic lymphoma and acute biphenotypic leukemias. *Am J Clin Pathol* 2007; 127(4):528—544. DOI:10.1309/2QE3A6EKQ8UYDYRC.
91. Montefiori LE, Bendig S, Gu Z et al. Enhancer hijacking drives oncogenic BCL11B expression in lineage-ambiguous stem cell leukemia. *Cancer Discov* 2021; 11(11):2846—2867. DOI:10.1158/2159-8290.CD-21-0145.
92. Di Giacomo D, La Starza R, Gorello P et al. 14q32 rearrangements deregulating BCL11B mark a distinct subgroup of T-lymphoid and myeloid immature acute leukemia. *Blood* 2021; 138(9):773—784. DOI:10.1182/blood.2020010510.
93. Fang H, Wang W, El Hussein S et al. B-cell lymphoma/leukaemia 11B (BCL11B) expression status helps distinguish early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia/lymphoma (ETP-ALL/LBL) from other subtypes of T-cell ALL/LBL. *Br J Haematol* 2021; 194(6):1034—1038. DOI:10.1111/bjh.17681.
94. Moorman AV, Schwab C, Ensor HM et al. IGH@ translocations, CRLF2 deregulation, and microdeletions in adolescents and adults with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 2012; 30(25):3100—3108. DOI:10.1200/JCO.2011.40.3907.
95. Mullighan CG. Genomic profiling of B-progenitor acute lymphoblastic leukemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2011; 24(4):489—503. DOI:10.1016/j.beha.2011.09.004.
96. Барях Е. А., Кравченко С. К., Обухова Т. Н. и др. Лимфома Беркитта: клиника, диагностика, лечение. *Клиническая онкогематология* 2009; 2(2): 37—146.
97. Обухова Т. Н., Барях Е. А., Капланская И. Б. и др. Выявление диагностических для лимфомы Беркитта транслокаций методом флюоресцентной in situ гибридизации на гистологических срезах парафиновых блоков. *Терапевтический архив* 2007; 79(7):80—83.
98. Aukema SM, Theil L, Rohde M et al. Sequential karyotyping in Burkitt lymphoma reveals a linear clonal evolution with increase in karyotype complexity and a high frequency of recurrent secondary aberrations. *Br J Haematol* 2015; 170(6):814—825. DOI:10.1111/bjh.13501.
99. Aukema SM, Siebert R, Schuurin E et al. Double-hit B-cell lymphomas. *Blood* 2011; 117(8):2319—2331. DOI:10.1182/blood-2010-09-297879.
100. Obukhova TN, Baryakh EA, Lorie Y et al. Double hit b-cell lymphomas. *Haematologica* 2012; 97(S1):283.
101. Обухова Т. Н., Барях Е. А., Лорие Ю. Ю. и др. “Double-hit” лимфомы. *Гематология и трансфузиология* 2012; 57(S3):17.
102. Obukhova T, Grebenuk L, Alimova G et al. A case of TdT+ “triple-hit” lymphoma. *Chromosom Res* 2015; 23(S1):106—107.
103. Horsman DE, Gascoyne RD, Coupland RW et al. Comparison of cytogenetic analysis, southern analysis, and polymerase chain reaction for the detection of t(14; 18) in follicular lymphoma. *Am J Clin Pathol* 1995; 103(4):472—478. DOI:10.1093/ajcp/103.4.472.
104. Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J et al. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14; 18) chromosome translocation. *Science* 1984; 226(4678):1097—1099. DOI:10.1126/science.6093263.

105. Hockenbery D, Nuñez G, Milliman C et al. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 1990; 348(6299):334—336. DOI:10.1038/348334a0.
106. Pasqualucci L, Dalla-Favera R. The genetic landscape of diffuse large B-cell lymphoma. *Semin Hematol* 2015; 52(2):67—76. DOI:10.1053/j.seminhematol.2015.01.005.
107. Pasqualucci L, Dalla-Favera R. Genetics of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2018; 131(21):2307—2319. DOI:10.1182/blood-2017-11-764332.
108. Verma A, Epari S, Gujral S et al. An unusual presentation of large B-cell lymphoma with interferon regulatory factor 4 gene rearrangement. *Indian J Pathol Microbiol* 2018; 61(2):271—274. DOI:10.4103/IJPM.IJPM_194_17.
109. Пластинина Л. В., Моисеева Т. Н., Аль-Ради Л. С. Крупноклеточная В-клеточная лимфома с перестройкой IRF4. *Гематология и трансфузиология* 2021; 66(3):445—557. DOI:10.35754/0234-5730-2021-66-3-445-457.
110. Horn H, Kalmbach S, Wagener R et al. A Diagnostic approach to the identification of Burkitt-like lymphoma with 11q aberration in aggressive B-cell lymphomas. *Am J Surg Pathol* 2021; 45(3):356—364. DOI:10.1097/PAS.0000000000001613.
111. Gonzalez-Farre B, Ramis-Zaldivar JE, Salmeron-Villalobos J et al. Burkitt-like lymphoma with 11q aberration: a germinal center-derived lymphoma genetically unrelated to Burkitt lymphoma. *Haematologica* 2019; 104(9):1822—1829. DOI:10.3324/haematol.2018.207928.
112. Обухова Т. Н., Лорие Ю. Ю., Водинская Л. А. и др. Цитогенетика лимфомы из клеток мантийной зоны. *Терапевтический архив* 2004; 76(7): 70—77.
113. Li JY, Gaillard F, Moreau A et al. Detection of translocation t(11; 14)(q13; q32) in mantle cell lymphoma by fluorescence in situ hybridization. *Am J Pathol* 1999; 154(5):1449—1452. DOI:10.1016/S0002-9440(10)65399-0.
114. Remstein ED, Kurtin PJ, Buño I et al. Diagnostic utility of fluorescence in situ hybridization in mantle-cell lymphoma. *Br J Haematol* 2000; 110(4):856—862. DOI:10.1046/j.1365-2141.2000.02303.x.
115. Гребенюк Л. А., Обухова Т. Н., Ковригина А. М. и др. Случай выявления редкого хромосомного нарушения с вовлечением локуса гена CCND1/11q13 у больного лимфомой из клеток мантии. *Гематология и трансфузиология* 2020; 65(S1):135.
116. Peterson JF, Baughn LB, Ketterling RP et al. Characterization of a cryptic IGH/CCND1 rearrangement in a case of mantle cell lymphoma with negative CCND1 FISH studies. *Blood Adv* 2019; 3(8):1298—1302. DOI:10.1182/bloodadvances.2019031450.
117. Salaverria I, Royo C, Carvajal-Cuenca A et al. CCND2 rearrangements are the most frequent genetic events in cyclin D1(-) mantle cell lymphoma. *Blood* 2013; 121(8):1394—1402. DOI:10.1182/blood-2012-08-452284.
118. Martín-García D, Navarro A, Valdés-Mas R et al. CCND2 and CCND3 hijack immunoglobulin light-chain enhancers in cyclin D1(-) mantle cell lymphoma. *Blood* 2019; 133(9):940—951. DOI:10.1182/blood-2018-07-862151.

119. Hu Z, Medeiros LJ, Chen Z et al. Mantle cell lymphoma with MYC rearrangement: a report of 17 patients. *Am J Surg Pathol* 2017; 41(2):216—224. DOI:10.1097/PAS.0000000000000758.
120. Aukema SM, Croci GA, Bens S et al. Mantle cell lymphomas with concomitant MYC and CCND1 breakpoints are recurrently TdT positive and frequently show high-grade pathological and genetic features. *Virchows Arch* 2021; 479(1):133—145. DOI:10.1007/s00428-021-03022-8.
121. Обухова Т. Н., Звонков Е. Е., Королева Д. А. и др. В-клеточная лимфома с транслокациями CCND1, BCL2 и BCL6. *Гематология и трансфузиология* 2020; 65(S1):93.
122. Nishida Y, Takeuchi K, Tsuda K et al. Acquisition of t(11; 14) in a patient with chronic lymphocytic leukemia carrying both t(14; 19)(q32; q13.1) and +12. *Eur J Haematol* 2013; 91(2):179—182. DOI:10.1111/ejh.12119.
123. Al-Kawaaz M, Mathew S, Liu Y et al. Cyclin D1-positive diffuse large B-cell lymphoma with IGH-CCND1 translocation and BCL6 rearrangement: a report of two cases. *Am J Clin Pathol* 2015; 143(2):288—299. DOI:10.1309/AJCPUIDW2CPTA1JA.
124. Ye H, Liu H, Attygalle A et al. Variable frequencies of t(11; 18)(q21; q21) in MALT lymphomas of different sites: significant association with CagA strains of *H pylori* in gastric MALT lymphoma. *Blood* 2003; 102(3):1012—1018. DOI:10.1182/blood-2002-11-3502.
125. Streubel B, Simonitsch-Klupp I, Müllauer L et al. Variable frequencies of MALT lymphoma-associated genetic aberrations in MALT lymphomas of different sites. *Leukemia* 2004; 18(10):1722—1726. DOI:10.1038/sj.leu.2403501.
126. Ye H, Gong L, Liu H et al. MALT lymphoma with t(14; 18)(q32; q21)/IGH-MALT1 is characterized by strong cytoplasmic MALT1 and BCL10 expression. *J Pathol* 2005; 205(3):293—301. DOI:10.1002/path.1715.
127. Maljaei SH, Brito-Babapulle V, Hiorns LR et al. Abnormalities of chromosomes 8, 11, 14, and X in T-prolymphocytic leukemia studied by fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 1998; 103(2):110—116. DOI: 10.1016/s0165-4608(97)00410-x.
128. Pekarsky Y, Hallas C, Isobe M et al. Abnormalities at 14q32.1 in T cell malignancies involve two oncogenes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96(6):2949—2951. DOI:10.1073/pnas.96.6.2949.
129. Stern MH, Soulier J, Rosenzweig M et al. MTCP-1: a novel gene on the human chromosome Xq28 translocated to the T cell receptor alpha/delta locus in mature T cell proliferations. *Oncogene* 1993; 8(9):2475—2483.
130. Mossafa H, Brizard A, Huret JL et al. Trisomy 8q due to i(8q) or der(8) t(8; 8) is a frequent lesion in T-prolymphocytic leukaemia: four new cases and a review of the literature. *Br J Haematol* 1994; 86(4):780—785. DOI:10.1111/j.1365-2141.1994.tb04829.x.
131. McKinney M, Moffitt AB, Gaulard P et al. The genetic basis of hepatosplenic T-cell lymphoma. *Cancer Discov* 2017; 7(4):369—379. DOI:10.1158/2159-8290.CD-16-0330.

132. Bojanini L, Jiang L, Tun AJ et al. Outcomes of hepatosplenic T-cell lymphoma: the Mayo Clinic experience. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2021; 21(2):106—112.e1. DOI:10.1016/j.clml.2020.09.013.
133. Wlodarska I, Martin-Garcia N, Achten R et al. Fluorescence in situ hybridization study of chromosome 7 aberrations in hepatosplenic T-cell lymphoma: isochromosome 7q as a common abnormality accumulating in forms with features of cytologic progression. *Genes Chromosomes Cancer* 2002; 33(3):243—251. DOI:10.1002/gcc.10021.
134. Duyster J, Bai RY, Morris SW. Translocations involving anaplastic lymphoma kinase (ALK). *Oncogene* 2001; 20(40):5623—5637. DOI:10.1038/sj.onc.1204594.
135. Hernández L, Campo E. Identification of anaplastic lymphoma kinase variant translocations using 5'RACE. *Methods Mol Med* 2005; 115:295—314. DOI:10.1385/1-59259-936-2:295.
136. Leventaki V, Bhattacharyya S, Lim MS. Pathology and genetics of anaplastic large cell lymphoma. *Semin Diagn Pathol* 2020; 37(1):57—71. DOI:10.1053/j.semdp.2019.12.002.
137. Parrilla Castellar ER, Jaffe ES, Said JW et al. ALK-negative anaplastic large cell lymphoma is a genetically heterogeneous disease with widely disparate clinical outcomes. *Blood* 2014; 124(9):1473—1480. DOI:10.1182/blood-2014-04-571091.
138. Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2000; 343(26):1910—1916. DOI:10.1056/NEJM200012283432602.
139. Захарова А. И., Обухова Т. Н., Лорие Ю. Ю. и др. Цитогенетические нарушения при хроническом В-клеточном лимфолейкозе и их связь с клинико-биологическими особенностями и прогнозом заболевания. *Терапевтический архив* 2006; 78:57—62.
140. Обухова Т. Н., Кислова М. И., Никитин Е. А. и др. Структура и прогностическое значение делеции 13q14 при хроническом лимфолейкозе. *Гематология и трансфузиология* 2022; 67(1):75—89. DOI:10.35754/0234-5730-2022-67-1-75-89.
141. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D et al. iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL. *Blood* 2018; 131(25):2745—2760. DOI:10.1182/blood-2017-09-806398.
142. An international prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL-IPI): a meta-analysis of individual patient data. *Lancet Oncol* 2016; 17(6):779—790. DOI:10.1016/S1470-2045(16)30029-8.
143. Gahrton G, Robèrt KH, Friberg K et al. Nonrandom chromosomal aberrations in chronic lymphocytic leukemia revealed by polyclonal B-cell-mitogen stimulation. *Blood* 1980; 56(4):640—647.
144. Juliusson G, Oscier DG, Fitchett M et al. Prognostic subgroups in B-cell chronic lymphocytic leukemia defined by specific chromosomal abnormalities. *N Engl J Med* 1990; 323(11):720—724. DOI:10.1056/NEJM199009133231105.
145. Haferlach C, Dicker F, Schnittger S et al. Comprehensive genetic characterization of CLL: a study on 506 cases analysed with chromosome banding analysis,

- interphase FISH, IgV(H) status and immunophenotyping. *Leukemia* 2007; 21(12):2442—2451. DOI:10.1038/sj.leu.2404935.
146. Obukhova T, Nikitin E, Kislitsyna M et al. Complex karyotype is a strong predictor of short-term progression in chronic lymphocytic leukemia patients treated with ibrutinib. *HemaSphere* 2020; 4(S1):293.
147. Обухова Т. Н., Никитин Е. А., Кислицына М. А. и др. Комплексный кариотип — ключевой предиктор раннего рецидива у пациентов с хроническим лимфолейкозом, получающих терапию ибрутинибом. *Гематология и трансфузиология* 2020; 65(S1):41—42.
148. Baliakas P, Jeromin S, Iskas M et al. Cytogenetic complexity in chronic lymphocytic leukemia: definitions, associations, and clinical impact. *Blood* 2019; 133(11):1205—1216. DOI:10.1182/blood-2018-09-873083.
149. Thompson PA, O'Brien SM, Wierda WG et al. Complex karyotype is a stronger predictor than del(17p) for an inferior outcome in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia patients treated with ibrutinib-based regimens. *Cancer* 2015; 121(20):3612—3621. DOI:10.1002/cncr.29566.
150. Quinquenel A, Aurran-Schleinitz T, Clavert A et al. Diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: recommendations of the French CLL Study Group (FILO). *HemaSphere* 2020; 4(5):e473. DOI:10.1097/HS9.0000000000000473.
151. Хронический лимфоцитарный лейкоз/лимфома из малых лимфоцитов. Клинические рекомендации, 2022. URL: oncology-association.ru/wp-content/uploads/2022/06/hronicheskij-limfocitarnyj-lejkoz.pdf.
152. Leeksa AC, Baliakas P, Moysiadis T et al. Genomic arrays identify high-risk chronic lymphocytic leukemia with genomic complexity: a multi-center study. *Haematologica* 2021; 106(1):87—97. DOI:10.3324/haematol.2019.239947.
153. Ramos-Campoy S, Puiggros A, Beà S et al. Chromosome banding analysis and genomic microarrays are both useful but not equivalent methods for genomic complexity risk stratification in chronic lymphocytic leukemia patients. *Haematologica* 2022; 107(3):593—603. DOI:10.3324/haematol.2020.274456.
154. Обухова Т. Н., Кислицына М. А., Новикова Т. Ю. и др. Детекция делеции 17p13/TP53 при хроническом лимфолейкозе методом ArrayCGH. *Гематология и трансфузиология* 2022; 67(S2):130—131.
155. Edelmann J, Holzmann K, Miller F et al. High-resolution genomic profiling of chronic lymphocytic leukemia reveals new recurrent genomic alterations. *Blood* 2012; 120(24):4783—4794. DOI:10.1182/blood-2012-04-423517.
156. Baliakas P, Espinet B, Mellink C et al. Cytogenetics in chronic lymphocytic leukemia: ERIC perspectives and recommendations. *HemaSphere* 2022; 6(4):e707. DOI:10.1097/HS9.0000000000000707.
157. Kater AP, Wu J.Q, Kipps T et al. Venetoclax plus rituximab in relapsed chronic lymphocytic leukemia: 4-year results and evaluation of impact of genomic complexity and gene mutations from the MURANO phase III study. *J Clin Oncol* 2020; 38(34):4042—4054. DOI:10.1200/JCO.20.00948.
158. Fonseca R, Debes-Marun CS, Picken EB et al. The recurrent IgH translocations are highly associated with nonhyperdiploid variant multiple myeloma. *Blood* 2003; 102(7):2562—2567. DOI:10.1182/blood-2003-02-0493.

159. Smadja NV, Fruchart C, Isnard F et al. Chromosomal analysis in multiple myeloma: cytogenetic evidence of two different diseases. *Leukemia* 1998; 12(6):960—969. DOI:10.1038/sj.leu.2401041.
160. Morgan GJ, Walker BA, Davies FE. The genetic architecture of multiple myeloma. *Nat Rev Cancer*. 2012; 12(5):335—48. DOI:10.1038/nrc3257.
161. Wuilleme S, Robillard N, Lodé L et al. Ploidy, as detected by fluorescence in situ hybridization, defines different subgroups in multiple myeloma. *Leukemia* 2005; 19(2):275—278. DOI:10.1038/sj.leu.2403586.
162. Avet-Loiseau H, Facon T, Daviet A et al. 14q32 translocations and monosomy 13 observed in monoclonal gammopathy of undetermined significance delineate a multistep process for the oncogenesis of multiple myeloma. *Intergroupe Francophone du Myélome. Cancer Res* 1999; 59(18):4546—4550.
163. Avet-Loiseau H, Attal M, Campion L et al. Long-term analysis of the IFM 99 trials for myeloma: cytogenetic abnormalities [t(4; 14), del(17p), 1q gains] play a major role in defining long-term survival. *J Clin Oncol* 2012; 30(16):1949—1952. DOI:10.1200/JCO.2011.36.5726.
164. Nahi H, Sutlu T, Jansson M et al. Clinical impact of chromosomal aberrations in multiple myeloma. *J Intern Med* 2011; 269(2):137—147. DOI:10.1111/j.1365-2796.2010.02324.x.
165. Campo E, Jaffe ES, Cook JR et al. The International Consensus Classification of Mature Lymphoid Neoplasms: a report from the Clinical Advisory Committee. *Blood* 2022; 140(11):1229—1253. DOI:10.1182/blood.2022015851.
166. Ross FM, Chiecchio L, Dagrada G et al. The t(14; 20) is a poor prognostic factor in myeloma but is associated with long-term stable disease in monoclonal gammopathies of undetermined significance. *Haematologica* 2010; 95(7):1221—1225. DOI:10.3324/haematol.2009.016329.
167. Dispenzieri A, Rajkumar SV, Gertz MA et al. Treatment of newly diagnosed multiple myeloma based on Mayo Stratification of Myeloma and Risk-adapted Therapy (mSMART): consensus statement. *Mayo Clin Proc* 2007; 82(3):323—341. DOI:10.4065/82.3.323.
168. Lai JL, Zandecki M, Mary JY et al. Improved cytogenetics in multiple myeloma: a study of 151 patients including 117 patients at diagnosis. *Blood* 1995; 85(9):2490—2497.
169. Fonseca R, Barlogie B, Bataille R et al. Genetics and cytogenetics of multiple myeloma: a workshop report. *Cancer Res* 2004; 64(4):1546—1558. DOI: 10.1158/0008-5472.can-03-2876.
170. Зубашева Е. И., Обухова Т. Н., Андреева Н. Е. и др. Прогностическое значение хромосомных aberrаций при множественной миеломе. *Гематология и трансфузиология* 2008; 53(6):31—35.
171. Mellors PW, Binder M, Ketterling RP et al. Metaphase cytogenetics and plasma cell proliferation index for risk stratification in newly diagnosed multiple myeloma. *Blood Adv* 2020; 4(10):2236—2244. DOI:10.1182/bloodadvances.2019001275.
172. Ross FM, Avet-Loiseau H, Amey G et al. Report from the European Myeloma Network on interphase FISH in multiple myeloma and related disorders. *Haematologica* 2012; 97(8):1272—1277. DOI:10.3324/haematol.2011.056176.

173. Mikhael JR, Dingli D, Roy V et al. Management of newly diagnosed symptomatic multiple myeloma: updated Mayo Stratification of Myeloma and Risk-Adapted Therapy (mSMART) consensus guidelines 2013. *Mayo Clin Proc* 2013; 88(4):360—376. DOI:10.1016/j.mayocp.2013.01.019.
174. Palumbo A, Avet-Loiseau H, Oliva S et al. Revised International Staging System for Multiple Myeloma: A Report From International Myeloma Working Group. *J Clin Oncol* 2015; 33(26):2863—2869. DOI:10.1200/JCO.2015.61.2267.
175. Chng WJ, Dispenzieri A, Chim CS et al. IMWG consensus on risk stratification in multiple myeloma. *Leukemia* 2014; 28(2):269—277. DOI:10.1038/leu.2013.247.
176. D'Agostino M, Cairns DA, Lahuerta JJ et al. Second revision of the International Staging System (R2-ISS) for overall survival in multiple myeloma: A European Myeloma Network (EMN) report within the HARMONY Project. *J Clin Oncol* 2022; 40(29):3406—3418. DOI:10.1200/JCO.21.02614.
177. mSMART risk stratification of newly diagnosed myeloma. URL: https://static1.squarespace.com/static/5b44f08ac258b493a25098a3/t/5b802d8270a6adbc6a79a678/1535126914646/Risk+Strat+3.0rev_svr.pdf.
178. Neben K, Lokhorst HM, Jauch A et al. Administration of bortezomib before and after autologous stem cell transplantation improves outcome in multiple myeloma patients with deletion 17p. *Blood* 2012; 119(4):940—948. DOI:10.1182/blood-2011-09-379164.
179. Walker BA, Mavrommatis K, Wardell CP et al. A high-risk, Double-Hit, group of newly diagnosed myeloma identified by genomic analysis. *Leukemia* 2019; 33(1):159—170. DOI:10.1038/s41375-018-0196-8.
180. Абрамова Т. В., Обухова Т. Н., Грибанова Е. О. и др. Структура и значение цитогенетических перестроек у больных множественной миеломой. *Гематология и трансфузиология* 2021; 66(1):54—67. DOI:10.35754/0234-5730-2021-66-1-54-67.
181. Абрамова Т. В., Обухова Т. Н., Менделеева Л. П. и др. Прогностическое значение амплификации 1q21 при множественной миеломе. *Терапевтический архив* 2017; 89(7):32—38. DOI:10.17116/terarkh201789732-38.
182. Magrangeas F, Avet-Loiseau H, Munshi NC et al. Chromothripsis identifies a rare and aggressive entity among newly diagnosed multiple myeloma patients. *Blood* 2011; 118(3):675—678. DOI:10.1182/blood-2011-03-344069.
183. Kaur G, Gupta R, Mathur N et al. Clinical impact of chromothriptic complex chromosomal rearrangements in newly diagnosed multiple myeloma. *Leuk Res* 2019; 76:58—64. DOI:10.1016/j.leukres.2018.12.005.
184. Maura F, Boyle EM, Rustad EH et al. Chromothripsis as a pathogenic driver of multiple myeloma. *Semin Cell Dev Biol* 2022; 123:115—123. DOI:10.1016/j.semcdb.2021.04.014.

С. Ю. Смирнова, Ю. В. Сидорова, Б. В. Бидерман, Н. А. Северина,
Е. Б. Ликольд, Т. В. Макарик, Н. В. Рисинская, И. С. Февралева,
Г. А. Цаур, А. Б. Судариков

Глава 7.

Молекулярная диагностика опухолевых заболеваний системы крови

Отдельные методические вопросы молекулярно-генетических исследований при онкогематологических заболеваниях

Для молекулярно-генетического исследования оптимальным является материал, предположительно содержащий наибольшее количество опухолевых клеток (биоптат опухоли, лимфатического узла, других органов и тканей, аспират костного мозга, другое). Забор материала должен быть выполнен в стерильную вакуумную пробирку с антикоагулянтом ЭДТА (в случае костного мозга и крови), сухую пробирку (в случае биоптатов органов и тканей). При заболеваниях с наличием опухолевых клеток в периферической крови, таких как хронический лимфолейкоз (ХЛЛ), хронический миелоидный лейкоз (ХМЛ), Ph-негативные миелопролиферативные новообразования, в качестве материала выбора для молекулярно-генетического исследования должна служить кровь. Также возможно выделение нуклеиновых кислот из срезов парафиновых блоков.

Минимальный объем материала для молекулярно-генетических исследований — 2 мл костного мозга или 3 мл крови, 3 мм³ материала биопсии. Сроки транспортировки не должны превышать 48 ч. В отдельных

случаях при невозможности оперативно доставить кровь в лабораторию могут использоваться специальные транспортные среды, препятствующие разрушению РНК, такие как РНК-среда (Интерлабсервис), Blood RNA stabilizer (Иноген) и другие. Условия транспортировки пробирок с транспортной средой, костным мозгом, кровью, материалами биопсии — в термоконтейнерах при температуре +4 — +10 °С.

Выделение РНК может проводиться с использованием трехкомпонентного реактива по технологии Хомчинского [1] или колоночными методами [2]. Первый вариант обеспечивает больший выход РНК, второй — меньшее количество при более высокой чистоте. Для выделения ДНК также могут использоваться жидкостные или колоночные методы. Перед проведением полимеразной цепной реакции (ПЦР) или, в случае выделения РНК, перед обратной транскрипцией (ОТ) целесообразно провести измерение концентрации ДНК или РНК методами спектрофотометрии или флуориметрии.

Обязательным в ходе проведения качественной ПЦР является анализ на наличие одного или нескольких контрольных генов. Чаще для этих целей в онкогематологии применяют ген *ABL1*, однако возможно выявление и других генов [3, 4]. При проведении количественной ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) обязательным является использование стандартизованных контрольных материалов с известной концентрацией химерного и контрольного генов [5], наиболее оптимальными из них являются плазмиды Ipsogen (Qiagen, Франция), а в случае ХМЛ — *BCR-ABL* pDNA calibrant (Merck). Для исключения ложноотрицательных результатов выявления экспрессии химерного гена минимально допустимым количеством нормального гена является 10 000 копий гена *ABL1* или эквивалентное количество для других контрольных генов [6].

Для мониторинга минимальной остаточной болезни (МОБ) при острых лейкозах, а также после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) рекомендуется использовать костный мозг. Мониторинг МОБ из периферической крови проводится только при ХМЛ, а также в отдельных случаях острого миелоидного лейкоза (ОМЛ). Наиболее целесообразно проводить определение МОБ в одной и той же лаборатории, специализирующейся именно на мониторинге МОБ, одним или несколькими стандартизованными методами. При использовании нескольких методов — ПЦР, высокопроизводительное секвенирование (ВПС), проточная цитометрия — запрещено экстраполировать результаты одного метода на другой. В большинстве случаев эффективный мониторинг МОБ возможен только при наличии данных об инициальной молекулярно-генетической характеристике опухолевых клеток.

Трансплантация аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК) является наиболее эффективным, а часто и единственным методом излечения пациентов со злокачественными гематологическими заболеваниями. Успешная трансплантация в дальнейшем ведет к полноценной реконституции иммунной системы, позволяющей контролировать опухоль. Основным методом, дающим информацию о функционировании трансплантата, является мониторинг химеризма кроветворения. При всем многообразии современных подходов к определению доли мононуклеаров донора и реципиента в образцах крови и костного мозга после трансплантации «золотым стандартом» мониторинга химеризма остается STR-ПЦР — анализ аллелей коротких тендемных повторов (STR) реципиента и донора в исследуемой ДНК методом ПЦР с последующим капиллярным электрофорезом.

В настоящее время нет однозначного мнения об оптимальном перечне исследований для генетической диагностики онкогематологических заболеваний, что обусловлено ограниченными технологическими возможностями лабораторий и быстрым развитием науки, расширением спектра новых маркеров, которые являются привлекательными для ограниченного контингента больных. На основании консенсусного мнения панели экспертов выработаны подходы к цитогенетической и молекулярно-генетической диагностике онкогематологических заболеваний у детей и взрослых. Более подробно ознакомиться с позицией организации молекулярных генетиков России вы можете в недавно опубликованной статье [7]. Оптимальные и научно-исследовательские показатели молекулярно-генетических исследований для диагностики гематологических заболеваний у взрослых приведены в табл. 1.

Общие принципы выявления однонуклеотидных замен в ДНК с помощью аллель-специфичной полимеразной цепной реакции

Существует несколько подходов для исследования однонуклеотидных замен, делеций, инсерций, транслокаций в ДНК. К ним относятся прямое секвенирование по Сэнгеру, высокопроизводительное секвенирование (ВПС), рестрикционный анализ ПЦР-продуктов, цифровая капельная ПЦР (цкПЦР), аллель-специфичная ПЦР в реальном времени (асПЦР-РВ). Для исследования уже известных однонуклеотидных замен, небольших делеций и инсерций в гене, приводящих к нарушению функций и структуры белков, очень удобно использовать асПЦР — недорогой, быстрый и очень чувствительный количественный метод. Его чувствительность превосходит все названные методы,

Таблица 1. Молекулярно-генетические исследования для диагностики гематологических заболеваний у взрослых [7]

Нозология	Оптимальный объем исследований (обязательные для установления диагноза исследования выделены полужирным шрифтом)	Научно-исследовательские показатели (выполняются в дополнение к оптимальному объему)
В-линейный острый лимфобластный лейкоз (В-ОЛЛ)	1. ОТ-ПЦР для выявления химерного транскрипта <i>BCR::ABL1</i> *. 2. ПЦР для выявления химерных транскриптов с участием гена <i>KMT2A::AFF1</i> *, <i>KMT2A::MLLT1</i> , <i>KMT2A::MLLT3</i> , <i>KMT2A::MLLT10</i>	1. ПЦР-РВ для выявления <i>BCR::ABL1</i> -подобного профиля экспрессии генов. 2. Таргетное ВПС для идентификации генов-партнеров <i>ABL1</i> , <i>ABL2</i> , <i>PDGFRb</i> , <i>CRLF2</i> , <i>JAK2</i> и поиска мутаций в генах <i>JAK1</i> , <i>JAK2</i> , <i>JAK3</i> , <i>SH2B3</i> , <i>IL7R</i> , <i>IL2RB</i> , <i>TYK2</i>) и в более редких генах, связанных с <i>BCR::ABL1</i> -подобным ОЛЛ (<i>FLT3</i> , <i>NRAS</i> , <i>NFI</i> , <i>PTPN11</i>). 3. Таргетное ВПС для выявления перестроек <i>IGH</i> (при ОЛЛ с химерными генами <i>IGH::CEBPE</i> , <i>IGH::IL3</i>). 4. ПЦР или таргетное ВПС для поиска химерного гена <i>UBTF::ATXN7L3</i> 5. Аллель-специфичная ПЦР, секвенирование по Сэнгеру или таргетное ВПС для поиска мутаций N159Y в гене <i>IKZF1</i> ; H1038R в гене <i>ZEB2</i> , P80R в гене <i>PAX5</i> . 6. ПЦР или множественная лигазозависимая амплификация зондов (<i>MLPA</i>) для выявления делеций <i>IKZF1</i> . 7. Оценка клональной эволюции по перестройкам генов <i>Ig/TR</i> . 8. ВПС для анализа экзона и транскриптома
Т-клеточный острый лимфобластный лейкоз (Т-ОЛЛ)	—	1. ОТ-ПЦР для выявления <i>KMT2A::MLLT1</i> , <i>KMT2A::AFDN</i> . 2. ПЦР для выявления химерного гена <i>SCL::TAL1</i> . 3. ПЦР с фрагментным анализом для выявления мутаций в гене <i>FLT3</i> (при Т-ОЛЛ из ранних предшественников). 4. ОТ-ПЦР для выявления химерных транскриптов <i>PICALM::MLLT10</i> , <i>NUP214::ABL1</i> . 5. Секвенирование по Сэнгеру или таргетное ВПС для выявления мутаций <i>NOTCH1</i> , <i>FBXW7</i> , <i>NRAS</i> , <i>KRAS</i> , <i>PTEN</i> . 6. ВПС для анализа экзона и транскриптома

Острый миелоидный лейкоз (ОМЛ)	1. ОТ-ПЦР для выявления химерных транскриптов <i>RUNX1::RUNX1T1*</i>, <i>CBFB::MYH11*</i>. 2. ОТ-ПЦР для выявления химерных транскриптов с участием гена <i>KMT2A::MLLT3</i>, <i>KMT2A::MLLT10</i>, <i>KMT2A::ELL</i>, <i>KMT2A::MLLT1</i>, <i>KMT2A::AFDN</i>. 3. ПЦР с фрагментным анализом для выявления мутаций в генах <i>FLT3*</i>, <i>NPM1*</i>, мутаций в регионе bZIP в гене <i>CEBPA*</i>.	1. Секвенирование по Сэнгеру или таргетное ВПС для верификации типа мутации в <i>NPM1</i>, мутации <i>FLT3-TKD</i>, локализации мутации <i>FLT3-ITD</i>, выявления мутаций <i>CEBPA*</i>, <i>RUNX1*</i>, <i>TP53*</i>, <i>KIT</i>, <i>IDH1*</i>, <i>IDH2</i>, <i>TET2*</i>, <i>WT1*</i>, <i>DNMT3A</i>. 2. ПЦР-РВ для определения экспрессии генов <i>WT1*</i>, <i>EVI1*</i>, <i>NPM1c*</i>. 3. Аллель-специфичная ПЦР или цифровая ПЦР для мутации <i>FLT3-TKD</i>. 4. У пациентов с ОМЛ с миелодисплазией секвенирование по Сэнгеру или таргетное ВПС для выявления мутаций <i>SRSF2</i>, <i>SF3B1</i>, <i>U2AF1</i>, <i>ZRSR2</i>, <i>ASXL1</i>, <i>EZH2</i>, <i>BCOR</i>, <i>STAG2</i>. 5. ВПС для анализа экзона и транскриптома
Острый промиелоцитарный лейкоз (ОПЛ)	1. ОТ-ПЦР для выявления и определения типа химерного транскрипта <i>PML::RAR4</i>. 2. ОТ-ПЦР и FISH для верификации других перестроек гена <i>RAR4</i>	1. ПЦР с фрагментным анализом, а также секвенирование по Сэнгеру для выявления локализации мутаций в гене <i>FLT3</i>
Миелодиспластический синдром (МДС)	1. Секвенирование по Сэнгеру или таргетное ВПС для выявления мутаций в генах <i>SF3B1*</i>, <i>TP53</i>	1. Таргетное ВПС для выявления мутаций в генах <i>BCOR</i>, <i>SRSF2</i>, <i>STAG2</i>, <i>U2AF1</i>, <i>ZRSR2</i>, <i>ASXL1</i>, <i>EZH2</i>, <i>RUNX1</i>, <i>DNMT3A</i>, <i>TET2</i>. 2. ВПС для анализа экзона и транскриптома
Системный мастоцитоз	1. ПЦР-РВ или цифровая ПЦР для выявления и количественного определения мутации D816V в гене <i>KIT</i>. 2. ПЦР-РВ для выявления V617F <i>JAK2</i>, W515L/<i>K</i> <i>MLL</i>, ПЦР с фрагментным анализом или ПЦР-РВ для выявления мутаций в <i>CALR</i> — в случаях системного мастоцитоза, ассоциированного с гематологическими заболеваниями, и для дифференциальной диагностики	1. ПЦР-РВ или цифровая ПЦР для выявления других мутаций D816 в гене <i>KIT</i>. 2. Секвенирование по Сэнгеру или таргетное ВПС для детекции иных активирующих мутаций в гене <i>KIT</i>. 3. Таргетное ВПС для выявления мутаций <i>ASXL1</i>, <i>CBL</i>, <i>RUNX1</i>, <i>DNMT3A</i>, <i>SRSF2</i>, <i>NRAS</i>. 4. ВПС для анализа экзона и транскриптома

Таблица 1 (продолжение). Молекулярно-генетические исследования для диагностики гематологических заболеваний у взрослых [7]

Нозология	Оптимальный объем исследований (обязательные для установления диагноза исследования выделены полужирным шрифтом)	Научно-исследовательские показатели (выполняются в дополнение к оптимальному объему)
Хронический миелоидный лейкоз (ХМЛ)	1. ОТ-ПЦР для выявления транслокации <i>BCR::ABL1</i>²¹⁰ (e13a2 или e14a2)* и подсчета отношения <i>BCR::ABL1/ABL1</i> в % по международной шкале. 2. ОТ-ПЦР для выявления атипичных транскриптов <i>BCR::ABL1</i>: p²¹⁰ (e13a3 или e14a3), p¹⁹⁰, p²³⁰, p¹⁸⁵.* 3. Секвенирование по Сэнгеру для выявления точечных мутаций в <i>BCR::ABL1</i>*	1. Таргетное ВПС для выявления точечных мутаций в <i>BCR::ABL1</i>. 2. Секвенирование по Сэнгеру или таргетное ВПС генов <i>ASXL1</i>, <i>RUNX1</i>, <i>IKZF1</i>, <i>DNMT3A</i>, <i>SETD1B</i>, <i>TP53</i>, <i>TET2</i>. 3. ВПС для анализа экзона и транскриптома
Ph-негативные хронические миело-пролиферативные заболевания	1. Качественная* или количественная ПЦР-РВ для выявления V617F <i>JAK2</i>*, W515L/K <i>MPL</i>*. 2. ПЦР с фрагментным анализом или ПЦР-РВ для выявления мутаций в <i>CALR</i>*. 3. Качественная ПЦР с фрагментным анализом или секвенирование по Сэнгеру для мутаций в 12-м экзоне гена <i>JAK2</i>*. 4. Секвенирование по Сэнгеру или таргетное ВПС для определения мутаций <i>ASXL1</i>*, <i>EZH2</i>*, <i>TET2</i>*, <i>IDH1</i>*, <i>IDH2</i>*, <i>SRSF2</i>*, <i>ST3B1</i>* (при первичном миелофиброзе)	1. Секвенирование по Сэнгеру или таргетное ВПС для верификации типа мутаций <i>CALR</i>, определения мутаций <i>SRSF2</i>* (при истинной полицитемии); мутаций в <i>SRSF2</i>*, <i>ST3B1</i>*, <i>U2AF1</i>, <i>TP53</i> (при эссенциальной тромбоцитемии). 2. ВПС для анализа экзона и транскриптома
Миелоидные/лимфоидные новообразования с эозинофилией и химерными тенами с участием тирозинкиназ	1. ПЦР для определения химерных генов <i>ETV6::ABL1</i>, <i>PDGFRA::FIP1L1</i> и других перестроек генов <i>PDGFRA</i>	1. ПЦР или таргетное ВПС для верификации генов-партнеров <i>PDGFRB</i>, <i>FGFR1</i>, <i>PDGFRA</i>, <i>FLT3</i>, <i>JAK2</i>, выявления химерных генов <i>ETV6::FGFR2</i>, <i>ETV6::LYN</i>, <i>ETV6::NTRK3</i>, <i>RANBP2::ALK</i>, <i>BCR::RET</i>, <i>FGFR1OP::RET</i>. 2. ВПС для анализа экзона и транскриптома

Хронический миело monocитарный лейкоз (ХММЛ)	–	1. Таргетное ВПС для выявления мутаций <i>ASXL1</i> , <i>TET2</i> , <i>SRSF2</i> , <i>SETBP1</i> , <i>NRAS</i> , <i>KRAS</i> , <i>RUNX1</i> , <i>CBL</i> , <i>EZH2</i> , <i>NPM1</i> . 2. ВПС для анализа экзона и транскриптома
Хронический нейтрофильный лейкоз	1. ПЦР или секвенирование по Сэнгеру для выявления мутации T6181 в гене <i>CSF3R</i>	1. Секвенирование по Сэнгеру или таргетное ВПС для выявления иных мутаций <i>CSF3R</i> , мутаций в <i>SETBP1</i> , <i>ASXL1</i> , <i>SRSF2</i> . 2. ВПС для анализа экзона и транскриптома
Ювенильный миело monocитарный лейкоз (ЮММЛ)	1. Секвенирование по Сэнгеру для выявления мутаций в генах <i>KRAS</i> , <i>NRAS</i> , <i>PTPN11</i> , <i>CBL</i>	1. Таргетное ВПС для выявления мутаций в генах <i>NF1</i> , <i>RRAS</i> , <i>ETBP1</i> , <i>JAK3</i> , <i>SH2B3</i> , <i>EZH2</i> , <i>DNMT3A</i> , <i>ASXL1</i> , <i>GATA2</i> , <i>RUNX1</i> , <i>ZRSR2</i> , химерных генов с участием <i>ALK</i> , <i>ROS1</i> , <i>FIP1L1::RARA</i> , <i>CCDC88C::FLT3</i> . 2. ВПС для анализа экзона и транскриптома
KSHV/HHV8-ассоциированные В-клеточные лимфоиды	1. ПЦР из фиксированной ткани, залитой в парафиновый блок, для выявления KSHV/HHV8 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus / human herpes virus type 8) — герпесвируса человека типа 8, ассоциированный с саркомой Капоши	–
Лимфома Беркитта, фолликулярная лимфома, диффузная В-крупноклеточная лимфома, В-клеточная лимфома высокой степени злокачественности с перестройками <i>MYC</i> и <i>BCL2</i>	–	1. ПЦР с фрагментным анализом для оценки клональности. 2. ПЦР с фрагментным анализом для оценки клональности в свободно циркулирующей ДНК. 3. Секвенирование по Сэнгеру или таргетное ВПС для выявления мутаций в <i>MYD88</i> , <i>CD79B</i> , <i>TBL1XR1</i> , <i>KMT2D</i> , <i>TP53</i> (при В-клеточной лимфоме высокой степени злокачественности, БДУ). 4. ВПС для анализа экзона и транскриптома
Лимфома из клеток мантии (ЛКМ)	1. Секвенирование по Сэнгеру или ВПС для выявления мутаций в гене <i>TP53</i>	1. ПЦР с фрагментным анализом для оценки клональности в свободно циркулирующей ДНК. 2. ВПС для анализа экзона и транскриптома

Таблица 1 (окончание). Молекулярно-генетические исследования для диагностики гематологических заболеваний у взрослых [7]

Нозология	Оптимальный объем исследований (обязательные для установления диагноза исследования выделены полужирным шрифтом)	Научно-исследовательские показатели (выполняются в дополнение к оптимальному объему)
Хронический лимфолейкоз (ХЛЛ)	1. Секвенирование по Сэнгеру или ВПС для определения мутаций в гене <i>TP53</i> * и мутационного статуса генов <i>IGH</i> /*	1. Секвенирование по Сэнгеру или таргетное ВПС для определения BCR-стереотипов, мутаций в <i>NOTCH1</i> , <i>SF3B1</i> , <i>BIRC3</i> , мутаций R110 в <i>IGLV3-21</i> . 2. Аллель-специфичная ПЦР или таргетное ВПС для определения мутаций, определяющих устойчивость к ибрутинибу в генах <i>ВТК</i> , <i>PLCG2</i> . 3. ВПС для анализа экзона и транскриптома
Множественная миелома	—	1. ВПС для анализа экзона и транскриптома
Лимфомы маргинальной зоны	—	1. Секвенирование по Сэнгеру или таргетное ВПС для выявления мутаций/делений <i>TNFAIP3</i> (при локализации в придатках глаза); мутаций <i>GPR34</i> (при лимфоме слюнных желез); инактивирующих мутаций, приводящих к потере функции гена <i>CD274</i> , мутаций <i>TNFRSF14</i> и/или <i>TET2</i> (при локализации в щитовидной железе). 2. При первичной кожной лимфоме маргинальной зоны — секвенирование по Сэнгеру или ВПС для выявления мутаций <i>FAS</i> . 3. Секвенирование по Сэнгеру или таргетное ВПС для выявления мутаций <i>KMT2D</i> , <i>RTPRD</i> , <i>NOTCH2</i> , <i>KLF2</i> . 4. ВПС для анализа экзона и транскриптома
Крупноклеточная В-клеточная лимфома с перестройкой <i>IRF4</i>	—	1. ВПС для анализа экзона и транскриптома

Волосатоклеточный лейкоз (ВКЛ)	1. ПЦР для выявления мутации V600E в гене <i>BRAF</i>	1. ВПС для анализа экзема и транскриптома
Лимфоплазмочитарная лимфома	1. ПЦР для выявления мутации L265P в гене <i>MYD88</i> при макроглобулинемии Вальденстрема. 2. Секвенирование по Сэнгеру или таргетное ВПС для выявления мутаций в <i>SXCR4</i>	1. Аллель-специфичная ПЦР или ВПС для определения мутаций в гене <i>BTK</i> . 2. ВПС для анализа экзема и транскриптома
Т-клеточный лейкоз из больших гра-нуляриных лимфоцитов	1. ПЦР с фрагментным анализом для определения Т-клеточной клональности. 2. Секвенирование по Сэнгеру или аллель-специфичная ПЦР для выявления мутаций в генах <i>STAT3</i> и <i>STAT5B</i>	1. ВПС для анализа экзема и транскриптома
Т-пролимфоцитарный лейкоз	1. ПЦР с фрагментным анализом для оценки Т-клеточной клональности	1. ВПС для анализа экзема и транскриптома
Т-уδ гепатоспленическая лимфома	—	1. ВПС для анализа экзема и транскриптома
Анапластическая Т-крупноклеточная лимфома	1. Количественная ПЦР-RV для выявления химерного транскрипта <i>NPM1::ALK</i> , <i>AT1C::ALK</i> , <i>CLTC::ALK</i>	1. ВПС для анализа экзема и транскриптома
Антиоиммунобластная Т-клеточная лимфома	1. ПЦР с фрагментным анализом для оценки Т-клеточной клональности. 2. Аллель-специфичная ПЦР для выявления мутации <i>RHOA Gly17Val</i>	1. Секвенирование по Сэнгеру или таргетное ВПС для определения мутаций в генах <i>TET2</i> , <i>DNMT3A</i> , <i>IDH2 R172</i> . 2. ВПС для анализа экзема и транскриптома

* Включены в действующее «Клинические рекомендации Министерства здравоохранения Российской Федерации» [8—17, 53, 54, 62, 72, 73, 125].

кроме цкПЦР, а стоимость и время выполнения существенно меньше остальных [18—20]. Недостатком является то, что, в отличие от прямого секвенирования по Сэнгеру и ВПС, при помощи аСПЦР можно выявить только те мутации, на которые сконструированы применяемые праймеры. В данной главе мы описываем основные принципы конструирования праймеров и флуоресцентных зондов для аСПЦР и использования гидролизующихся зондов (т. н. TaqMan) и рассматриваем их применение на конкретном примере.

Основные принципы конструирования праймеров и флуоресцентных зондов для аллель-специфичной ПЦР

1. В электронной базе данных Национального центра биотехнологической информации США (National Center for Biotechnology Information, NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) в разделе SNP следует найти и проанализировать соответствующий фрагмент последовательности ДНК в окрестности мутации и выбрать два праймера длиной 16—20 нуклеотидов. **Первый** из них должен повторять последовательность нормального аллеля, а его последний 3'-нуклеотид — соответствовать аллель-специфичному нуклеотиду в нормальном аллеле. **Второй** праймер должен иметь ту же последовательность, что и первый, за тем исключением, что последний 3'-нуклеотид этого праймера должен соответствовать измененному нуклеотиду в мутантном аллеле.
2. Далее для обоих праймеров следует подобрать общие обратный праймер и флуоресцентный зонд для проведения ПЦР-РВ по технологии TaqMan с анализируемым образцом ДНК, содержащим возможную мутацию [21, 22]. Общий обратный праймер выбираем таким образом, чтобы длина амплифицируемой последовательности была не более 400 нуклеотидов.
3. При подборе праймеров и условий для ПЦР пороговый цикл реакции амплификации (Ct) при отсутствии мутантного аллеля должен быть более 40 (допустимо более 35).
4. Далее следует провести параллельно две ПЦР с аллель-специфичными праймерами, общим обратным праймером и зондом, причем в одной реакции используют праймер для нормального аллеля, а во второй — для мутантного. Соотношение пороговых циклов обеих реакций позволяет оценивать количественный уровень мутантного аллеля относительно нормального.

ПЦР по технологии TaqMan основана на использовании 5'-экзонуклеазной активности полимеразы. Флуоресцентный зонд мечен на 5'-конце флуоресцентным красителем, а на 3'-конце — фосфатной

группой и тушителем флуоресценции. Зонд комплементарен участку амплифицируемой области. Тушитель поглощает испускаемое флуоресцентной меткой излучение, а фосфатная группа в 3'-положении блокирует полимеразу [23]. При отжиге праймеров проба количественно связывается с комплементарным участком ДНК. Во время стадии элонгации полимеразы синтезирует комплементарную цепь ДНК и, дойдя до участка, гибридизованного с пробой, начинает расщеплять пробу за счет 5'-экзонуклеазной активности. В результате флуоресцентная метка отделяется от тушителя, и ее свечение может быть детектировано. Таким образом, увеличение флуоресценции будет прямо пропорционально количеству наработанного продукта ПЦР. На рис. 1 показано расположение праймеров и флуоресцентного зонда на исследуемом фрагменте ДНК.

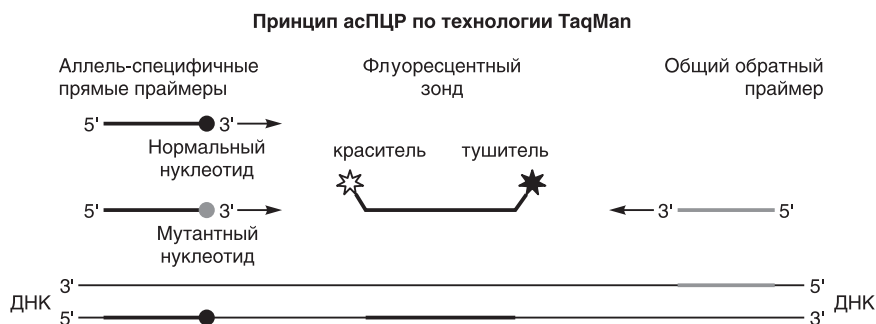


Рисунок 1. Расположение праймеров и флуоресцентного зонда на исследуемом фрагменте ДНК.

Пример подбора праймеров для выявления точечной мутации D835Y в тирозинкиназном домене гена *FLT3* (с.2503G>T, p.Asp835Tyr, dbSNP: rs121913488). В разделе SNP базы данных NCBI находим последовательность нуклеотидов гена *FLT3* в окрестности мутации (выделена серым):

ACCATGATAACGACACAACACAAAATAGCCGTATAAAAAATAAGTAGGAAAT
AGCAGCCTCACAATTGCCCCTGACAACATAGTTGGAATCACTCATGATAT [■]
TCGAGCCAATCCAAAGTCACATATCTTACCACITTTCCCGTGGGTGACAAGCA
CGTTCTTG GCGGCCAGGTCCTGTGTAACAC ACTGTCAAGAATGACAC

и выбираем аллель-специфичные прямые праймеры, флуоресцентный зонд и участок, комплементарный обратному праймеру (выделено жирным шрифтом).

Введем обозначения:

Праймер, соответствующий аллелю дикого типа, — FLT3_835Yn.
Его последовательность:

5'-CATAGTTGGAATCACTCATGATATC-3'

Праймер, соответствующий мутантному аллелю, — FLT3_835Ymt. Его последовательность:

5'-CATAGTTGGAATCACTCATGATAGA-3'

Зонд — FLT3 Fam. Его последовательность:

5'-Fam-ATATCTTCACCACTTTCCCGTGGGTGA- RTQ1-3

Общий праймер — FLT3_835com. Его последовательность:

5'-GTCTCTGTGAACACACTGTCAA-3'

Подбираем оптимальные условия для прохождения ПЦР:

95°—300 с

95°—20 с } 40 циклов

63°—50 с }

Типичная запись асПЦР в реальном времени показана на рис. 2.

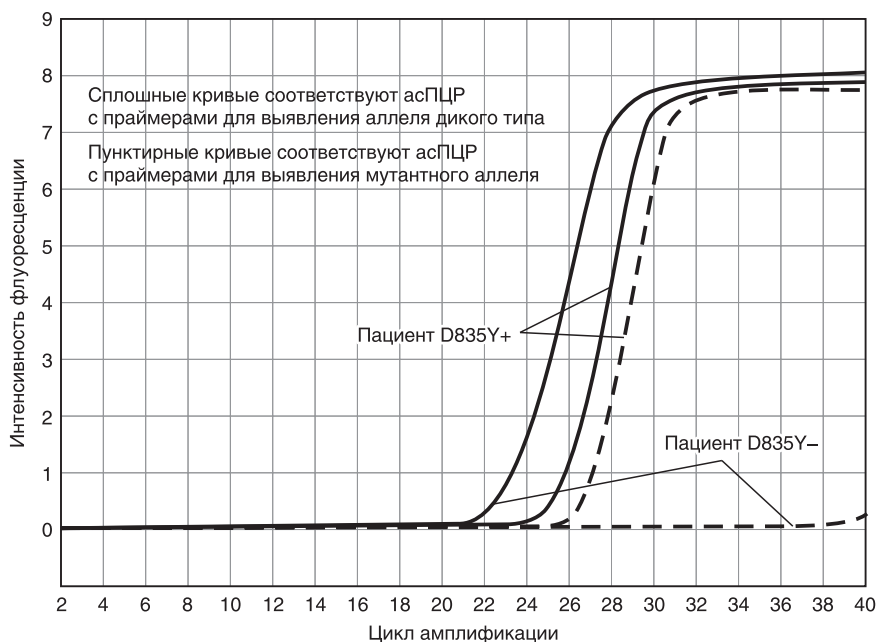


Рисунок 2. Кривые амплификации асПЦР в реальном времени.

Аналогичным образом мы разработали системы праймеров и зондов для выявления однонуклеотидных замен с помощью асПЦР для других маркеров ОМЛ [24—28], мутации *KIT* D816V, мультиплексные системы праймеров и зондов для выявления донорского химеризма после алло-ТГСК, для выявления маркеров болезни Гоше, болезни Вильсона—Коновалова и др.

Общие принципы определения химерных транскриптов

Химерные транскрипты — это аномальные РНК-продукты, которые образуются в результате структурных изменений хромосом (транслокаций, инсерций, инверсий или делеций). Химерные транскрипты играют важную роль в патогенезе лейкозов, так как они могут приводить к образованию aberrантных белков и изменению нормальной функции генов. Исследование химерных транскриптов необходимо при соответствующих данных стандартного цитогенетического исследования (СЦИ) или FISH при первичной диагностике и для определения МОБ. Химерные транскрипты часто наблюдаются у пациентов с лейкозами, такими как ХМЛ, ОЛЛ и ОМЛ (табл. 1). При ХМЛ химерные транскрипты возникают в результате транслокации между 9-й и 22-й хромосомами, что приводит к образованию филадельфийской хромосомной аномалии (Ph+). Эта аномалия приводит к появлению химерного транскрипта *BCR::ABL1*, который является характерным для ХМЛ и играет ключевую роль в развитии и прогрессировании заболевания. При ХМЛ в 95% случаев образуется химерный белок с молекулярной массой 210kD (p210) в результате слияния 13-го или 14-го экзона гена *BCR* (e13 или e14) и второго экзона гена *ABL1* (a2).

При острых лейкозах химерные транскрипты также могут возникать в результате различных хромосомных изменений. Например, при В-ОЛЛ, так же как при ХМЛ, выявляется t(9;22) и химерный транскрипт *BCR::ABL1*, однако в данном случае чаще всего слияние происходит между первым экзоном гена *BCR* (e1) и вторым экзоном гена *ABL* (a2). Полученный транскрипт (e1a2) кодирует химерный белок с молекулярной массой 190kD (p190). p190 *BCR::ABL1* обнаруживается у 65% взрослых и у 80% детей с Ph+ ОЛЛ, и только в единичных случаях при ХМЛ. Другие химерные транскрипты, такие как p230, p185 и др., также могут приводить к развитию Ph+ ОЛЛ или ХМЛ.

Кроме *BCR::ABL1* для онкодиагностики и определения МОБ активно применяют ПЦР-исследование химерных транскриптов *PML::RARA* / t(15;17) при ОПЛ; *CBFB::MYH11* / inv(16)(p13q22) и *RUNX1::RUNX1* (ранее обозначаемый как *AML1::ETO*) / t(8;21)(q22;q22) при ОМЛ с соответствующими генетическими аномалиями; *KMT2A::AFF1* (ранее обозначаемый как *MLL::AF4*) / t(4;11)(q21;q23) при ОЛЛ; *TCF3 (E2A)::PBX1* / t(1;19)(q23;p13) при взрослом и детском ОЛЛ из В-линейных предшественников; *ETV6::RUNX1 (TEL::AML1)* / t(12;21)(p13;q22) при В-линейном ОЛЛ у детей; *STIL::TAL1* / del(1)(p32p32) при Т-линейном ОЛЛ у детей. Принципы определения с помощью ПЦР, варианты всех вышепере-

численных транскриптов, олигонуклеотидные праймеры и пробы (зонды) для ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ), стандартизированные методики подробно изложены в рекомендациях ассоциации Europe Against Cancer (ЕАС, 2003 г.) [5]. Определение химерных транскриптов *KMT2A::MLLT3* / t(9;11)(p21;q23); *KMT2A::MLLT10* / t(10;11)(p12;q23); *KMT2A::MLLT1* / t(11;19)(q23;p13.3); *KMT2A::AFDN* / t(6;11)(q27;q23) и других перестроек гена *KMT2A* также возможно методом ПЦР-РВ, однако вариантов таких слияний внутри конкретных генов очень много [5]. Некоторые варианты транскриптов *KMT2A* можно определить при помощи стандартных наборов праймеров, для определения других требуется сложная процедура секвенирования, подбора и тестирования пациент-специфичных праймеров [29].

Остановимся более подробно на общих базисных принципах количественного определения химерных транскриптов методом ПЦР-РВ. Метод состоит из нескольких этапов: 1) выделение РНК; 2) обратная транскрипция с получением комплементарной ДНК (кДНК); 3) ПЦР-РВ с определением количества химерного транскрипта относительно контрольного/референсного гена (*ABL1*).

По нашим наблюдениям ключевыми моментами для получения достоверного количественного результата являются первые этапы анализа — качество доставленного в лабораторию материала, количество и качество выделенной РНК и этап обратной транскрипции. При взятии материала необходимо учитывать, что РНК крайне нестабильная молекула, которая подвергается быстрой деградации под действием РНКаз, поэтому оптимальной для выделения РНК являются пунктат костного мозга или кровь, взятые в пробирку с ЭДТА, или биоптаты, которые не подвергались длительному хранению или транспортировке. Из клеток или материала биоптата, которые подвергались замораживанию, также невозможно выделить адекватную по количеству и качеству РНК. В реалиях нашей страны, когда возможные сроки транспортировки в федеральные центры могут достигать 7 дней и более, для сохранения РНК в образце необходимо использовать пробирки с РНК-стабилизаторами. При необходимости длительного хранения материала для РНК-исследования хранению при температуре ниже -40°C подвергается либо выделенная РНК, либо лизат клеток в специальном денатурирующем растворе, который препятствует деградации РНК, например раствор D (см. методику выделения РНК по Хомчинскому).

Второй важный момент для диагностики — этап выделения РНК. Стандартная процедура выделения РНК по Хомчинскому (гуанидин тиоцианат-фенол-хлороформная экстракция) обеспечивает выделение РНК, достаточной по количеству и качеству, без примеси ДНК [30, 31]. Однако даже небольшое изменение pH реактивов или температурного

режима охлаждения, особенно в момент центрифугирования со смесью фенол/хлороформ, приводит к тому, что вместе с РНК выделяется существенное количество ДНК. Также большинство коммерческих наборов рассчитаны на одновременное получение ДНК и РНК, при этом опционально предлагается в дальнейшем использовать еще одну стадию инкубации с ДНКазами и расщепления ДНК. Однако на практике это малоприменимо, удорожает и удлинняет процесс и, более того, может привести к значительным потерям РНК в образце. В итоге в конечной пробе, которую исследователь берет для реакции ПЦР, обычно присутствует не только РНК (кДНК), но и примесь геномной ДНК. Так как стандартные праймеры к гену *ABL1* или к другим контрольным генам амплифицируют и ДНК, и РНК, примесь геномной в пробе ДНК приводит к завышению количества контрольного гена и соответственно к снижению относительного количества химерного транскрипта. Насколько примесь ДНК будет меньше, настолько адекватнее будет конечный количественный результат. Примесь ДНК можно оценить, либо поставив ПЦР-РВ без обратной транскрипции, либо используя разработанные в «НМИЦ гематологии» праймеры и пробы на *ABL1*, которые амплифицируют только РНК (кДНК) (рис. 3) [32].

Методика выделения суммарной РНК из ядерных клеток по Хомчинскому

- Раствор D (4 М гуанидинтиоцианат; 25 мМ цитрат натрия, рН7; 0,5% N-лаурилсаркозин; 0,1% 2-меркаптоэтанол); прогреть до полного растворения кристаллов. Свежевыделенный клеточный осадок (не более 10 млн клеток) встряхнуть и добавить к нему 800 мкл буфера D. С помощью 1-миллилитрового наконечника ресуспендировать лизат не менее 10 раз.
- Добавить 80 мкл 2М ацетата натрия рН 4—4,2. Перемешать.
- Добавить 800 мкл кислого фенола, рН 5, и перемешать.
- Добавить 200 мкл водонасыщенного хлороформа и перемешать на вортексе. Подержать 10—20 мин при -20°C до разделения фаз.
- Центрифугировать 20 мин при 4°C , 10000 g. Центрифуга должна быть охлаждена заранее.
- Подписать необходимое количество пробирок на 2 мл. В каждую пробирку внести по 800 мкл изопропанола.
- Очень осторожно, не взбалтывая, отобрать верхнюю водную фазу и перенести в пробирку с 800 мкл изопропанола. Перемешать на вортексе и подержать 1 час или оставить на ночь при -20°C .
- Центрифугировать 10 мин при 4°C , 10000 g. Удалить супернатант, не задев осадка.



Контрольный ген	кДНК (РНК)	Геномная ДНК
<i>B2M</i>	104 п. н.	1986 п. н.
<i>GUS</i>	100 п. н.	3559 п. н.
<i>ABL-EAC</i>	124 п. н.	687 п. н.
<i>ABL-N</i>	100 п. н.	139 708 п. н.

п. н. — пара нуклеотидов

Б

5'-GTCCACACTGCAATGTTTTGTG-3'
 5'-GAGTTCCAACGAGCGCTTCACTC-3'
 R@G 5'-CCAGTAGCATCTGACTTTGAGCCTCAG-3' BHQ1

В

Рисунок 3. А. Схематичное расположение праймеров ABL-N, разработанных в НМИЦ гематологии, и ABL-EAC, рекомендованных ЕАС, 2003. 1b, 1a, a2 и т. д. — экзоны гена *ABL1*. **Б.** Сравнение длин продуктов амплификации при использовании кДНК (РНК) и геномной ДНК, получаемых при помощи различных систем праймеров к контрольным генам. Системы праймеров B2M, GUS, ABL-EAC рекомендованы ЕАС, 2003. Система праймеров ABL-N для ПЦР-РВ разработана в НМИЦ гематологии. **В.** Последовательности праймеров/проб ABL-N.

- К осадку добавить 300 мкл буфера D и подержать 10 мин на шейкере для растворения осадка.
- Добавить 300 мкл изопропанола, перемешать на вортексе и подержать 30 мин или оставить на ночь при -20°C .
- Центрифугировать 10 мин при 4°C , 10000 g. Удалить супернатант, не задев осадка.
- К осадку добавить 600 мкл 75° этанола. Перемешать.
- Центрифугировать 5 мин при 4°C , 10000 g. Удалить спирт.
- Высушить осадок при комнатной температуре, оставив открытыми крышки пробирок.
- К осадку добавить 25 мкл деионизованной воды, ресуспендировать и инкубировать 15 мин при 56°C .
- Чтобы оценить количество выделенной РНК, измеряют оптическую плотность при 260 нм. Единица оптической плотности соответствует примерно 40 мкг/мл одноцепочечной РНК. Чтобы оценить каче-

ство выделенной РНК, нужно найти отношение оптических плотностей при длинах волн 260 и 280 нм. Величина этого отношения в пределах 1,8–2,0 свидетельствует о чистоте выделенной РНК. Хранят РНК 1 год при -70°C .

Для проведения реакции обратной транскрипции используют коммерческие наборы в соответствии с инструкцией производителя. Обычно в реакцию обратной транскрипции берут 2 мкг РНК или в случае определения МОБ максимальное количество в объеме 10 мкл. В качестве праймеров для обратной транскрипции используют случайные гексануклеотиды. Этап обратной транскрипции играет очень важную роль при количественном определении химерных транскриптов. При сниженной ферментативной активности обратной транскриптазы общее количество кДНК и количество химерного транскрипта будет снижено, что может привести к занижению относительного количества или ложноотрицательному результату.

Третий этап методики — количественная ПЦР-РВ с TaqMan-пробами. Этот метод позволяет амплифицировать и одновременно определить количество конкретного химерного транскрипта в образце кДНК. Обычно количество химерного транскрипта оценивают относительно контрольного (референсного) гена. Референсный ген экспрессируется во всех клетках организма примерно одинаково. Наиболее часто для этих целей в нашей стране и за рубежом применяется ген *ABL1*, хотя возможно и использование других референсных генов, таких как *IGF1*, *GUS*, *B2M*, *GAPDH* [4]. Для определения абсолютного количества *ABL1* или других референсных генов обязательно используют коммерческие калибраторы (стандарты) с известной копийностью соответствующего референсного гена. Минимально допустимым количеством контрольного гена при определении МОБ является 10000 копий, что соответствует чувствительности определения 10^{-4} . При положительном результате, то есть при обнаружении химерного транскрипта, количество копий контрольного гена не имеет значения. При первичной постановке ПЦР-РВ до лечения обычно определяется тип транскрипта и праймеры и пробы, которые в дальнейшем будут использованы при определении МОБ у данного пациента. *При количественном определении в процессе терапии (определение МОБ) реакция с химерным транскриптом обязательно ставится в 3 повторах.* Из материала кДНК (20 мкл) ставится четыре реакции ПЦР-РВ: одна реакция с референсным геном и три реакции с химерным транскриптом. Расчет относительного уровня экспрессии химерного транскрипта выполняется либо с использованием коммерчески доступных плазмид и построением с их помощью калибровочных кривых для химерного транскрипта и контрольного генов, либо с использованием метода delta Ct (ΔCt), который основан

на сравнении циклов амплификации для химерного транскрипта и референсного (контрольного) гена.

Ниже приведены шаги для выполнения расчета с использованием метода ΔCt :

1. Изучите данные ПЦР-РВ. Кривые, которые имеют нехарактерный вид без экспоненциальной фазы, в анализ не берутся. Выставите одинаковый пороговый цикл для референсного гена и химерного транскрипта. Определите пороговый цикл Ct или Cq (в зависимости от типа используемого прибора для ПЦР-РВ) для референсного гена и химерного транскрипта. Если используется несколько повторов — вычислите среднее значение Ct/Cq для референсного гена и химерного транскрипта.
2. Вычислите ΔCt для каждого образца, вычитая Ct референсного гена из среднего значения Ct транскрипта: $\Delta Ct = \text{среднее } Ct \text{ (транскрипт)} - Ct \text{ (референсный ген)}$.
3. Используя значение ΔCt , вычислите относительный уровень (%) экспрессии химерного транскрипта относительно референсного гена по формуле: Относительный уровень экспрессии = $100/2^{\Delta Ct}$.

При мониторинге МОБ количество транскрипта может быть очень незначительным, например несколько копий химерного транскрипта, что делает количественное определение затруднительным или невозможным. Для правильной оценки результата мы руководствуемся общими принципами количественной оценки ПЦР-РВ, предложенными van der Velden et al. (2003) [33].

Критерии положительного количественного ответа: имеется специфическая амплификация с началом подъема ранее 39-го цикла (среднее $Ct < 39$), при этом хотя бы в 2 из 3 повторов разброс значений Ct составляет менее 1 цикла, при этом количество копий транскрипта превышает две. При отсутствии калибраторов на химерный транскрипт такой подсчет можно выполнить относительно копий *ABL1*. Для этого относительное количество транскрипта умножаем на копияность *ABL1*. Например, относительное количество после выполнения анализа составило 0,02%, копияность *ABL1* составила 25 000 копий. $25\,000 \times 0,0002 = 5$ копий. Результат более 2 копий может быть признан положительным.

Критерии отрицательного ответа: абсолютное количество копий *ABL1* более 10 000, при этом амплификация с химерным транскриптом не происходит или подъем кривой амплификации происходит позже 39-го цикла.

Критерии положительного неколичественного (сомнительного) ответа: критерии положительного количественного ответа не соблюдены, однако имеется специфическая амплификация с началом подъема ранее

39-го цикла, хотя бы в одном повторе. При этом количество копий транскрипта превышает две.

Основные принципы определения Т- и В-клеточной клональности методом ПЦР.

Интерпретация данных клональности

Клональность Т- и В-лимфоцитов можно оценить при помощи ПЦР-анализа CDR3 — участка генов иммуноглобулинов (IG) и Т-клеточных рецепторов (TCR). CDR3 — уникальная для каждого Т- и В-лимфоцита область соединения (реаранжировки) V-D-J сегментов. Амплификацию генов IG и TCR проводят по протоколу Biomed-2, используя стандартные последовательности V, D, J праймеров, меченные флуоресцентной краской [34]. Можно исследовать все локусы генов IG и TCR, за исключением TCRA (альфа), который обладает слишком большим и разнообразным набором V- и J-генов. В норме (при поликлональной ситуации) все ПЦР-продукты будут разные по нуклеотидному составу и длине CDR3-области исследуемого локуса и при фрагментном анализе будут иметь профиль распределения Гаусса. При появлении клона лимфоцитов среди амплификатов доминирует один ПЦР-продукт, если перестройка прошла на одной хромосоме (моноаллельная перестройка), или два ПЦР-продукта, если перестройка прошла на двух гомологичных хромосомах (биаллельная перестройка). Сложность исследования заключается в том, что CDR3-области имеют только небольшие нуклеотидные различия, поэтому для их исследования требуются методы с высокой разрешающей способностью, например капиллярный электрофорез на автоматическом секвенаторе. В локусе TCRG длина CDR3 составляет примерно 5—15 нуклеотидов, в локусе IGH или TCRB — 20—30 нуклеотидов. В качестве анализируемого вещества используется ДНК, выделенная из моноклеарных или лейкоцитарных клеток крови или костного мозга; ДНК, выделенная из биоптатов и срезов с тканей, залитых в парафиновый блок (лимфатические узлы, селезенка, кожа и др.); ДНК, выделенная из клеток плевральной, спинномозговой жидкости, плазмы (свободно циркулирующая, сцДНК) и т. д. Метод предназначен для диагностики и мониторинга В-клеточных и Т-клеточных неходжкинских лимфом и лейкозов; дифференциальной диагностики опухолевой и реактивной лимфопролиферации. Основным показанием к назначению данного исследования является наличие лимфоидной пролиферации или инфильтрации, которая по данным иммунофенотипического, гистологического и иммуногистохимического исследования не может быть

однозначно трактована как опухолевая, определение принадлежности опухоли к В- или Т-линии (кроме острых лейкозов и Т-клеточной ангиоиммуобластной лимфомы), стадирование и мониторинг неходжкинских лимфом (выявление лейкемизации, поражения опухолью костного мозга и других органов и тканей).

В результате фрагментного анализа (капиллярного электрофореза) можно получить четыре варианта ответов: 1) поликлональный результат — ПЦР-продукты в форме нормального распределения по длине в диапазонах амплификации (рис. 4, А); 2) сомнительный моноклональный результат — моноклональный пик превышает поликлональный фон только в 2—3 раза, может соответствовать как реактивной клональности, так и низкому содержанию лимфоидных опухолевых клеток в образце (рис. 4, Б—В); 3) моноклональный результат — один или два четких пика (до четырех), которые находятся в диапазоне амплификации соответствующих праймеров (рис. 4, Г—Е) и превышают поликлональный фон более чем в 3 раза (в 6 раз для TCRB); 4) олигоклональный результат — несколько четких доминирующих пиков, обычно в количестве больше четырех. Если пики полностью доминируют над поликлональным фоном, то данный ответ не исключает наличия опухоли с несколькими субклонами, композитной лимфомы или присутствия наряду с опухолевыми лимфоцитами выраженного реактивного компонента (рис. 4, Е). При наличии олигоклональных пиков на поликлональном фоне ответ обычно соответствует неопуховым реактивным или возрастным изменениям (рис. 4, Ж—З). Олигоклональная амплификация также наблюдается в образцах с низким качеством или количеством ДНК (рис. 4, И), например ДНК, выделенная из кожи, из тканей, залитых в парафиновый блок, спинномозговой жидкости, малоклеточного пунктата костного мозга, ткани с малым количеством лимфоцитов (нелимфоидная опухоль, фиброзированная ткань). Обычно для плохой амплификации характерна низкая интенсивность флуоресценции, а при повторных амплификациях того же образца наблюдается амплификация других по размеру олигоклонов. Перед началом амплификации необходимо убедиться, что образец ДНК является адекватным по количеству и качеству для получения достоверного результата. Проверить количество и качество ДНК можно спектрофотометрически. Кроме того, для оценки качества ДНК и ее фрагментации в парафиновых блоках можно выполнить амплификацию генных продуктов различной длины: 100, 200, 300, 400 и 600 п. н. Оценку соотношения клональный пик / поликлональный фон лучше проводить по необработанным данным электрофореграммы, так как в ходе обработки данных программное обеспечение каждого прибора может изменять это соотношение. При интерпретации результатов фрагментного

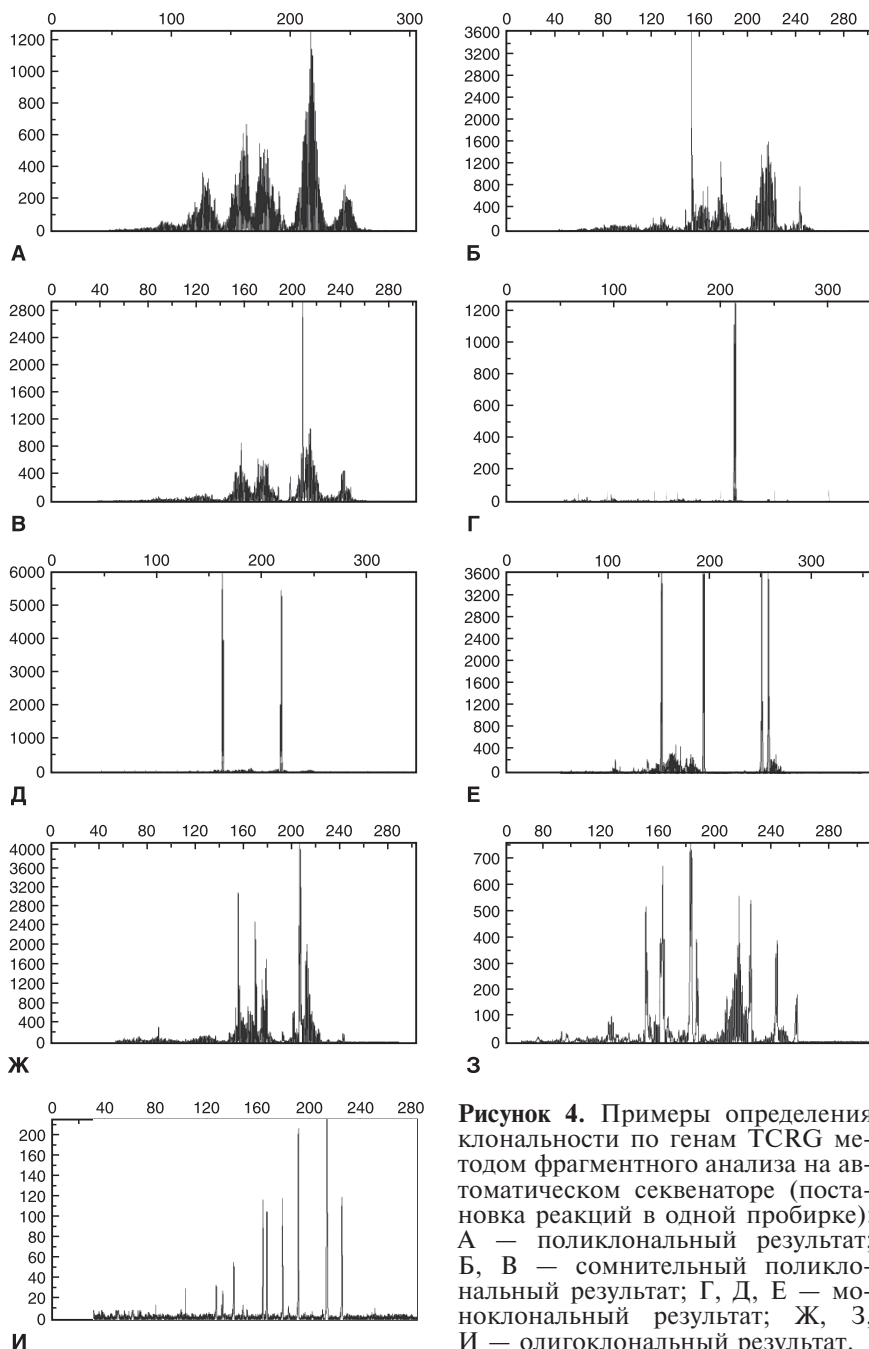


Рисунок 4. Примеры определения клональности по генам TCRG методом фрагментного анализа на автоматическом секвенаторе (постановка реакций в одной пробирке): **А** — поликлональный результат; **Б**, **В** — сомнительный поликлональный результат; **Г**, **Д**, **Е** — моноклональный результат; **Ж**, **З**, **И** — олигоклональный результат.

анализа необходимо учитывать диапазоны амплификации соответствующих праймеров (табл. 2).

Таблица 2. Особенности исследования клональности по отдельным локусам

Локус	Название пробирки: длина ПЦР-продуктов (п. н.)	Прямые/обратные праймеры	Особенности исследования
TCRD (дельта)	A: 120—280	Dδ2, Vδ1—Vδ6/ Jδ1—Jδ4, Dδ3	Ограниченный репертуар (олигоклональный характер амплификации). Исследование оправданно при ОЛЛ и подозрении на γδ-T-клеточную лимфому
TCRG (гамма)	A: 145—255	Vγ1, Vγ10/Jγ, Jγp	В реакции В часто определяются реактивные клоны; чтобы избежать этого, амплификацию можно проводить в одной пробирке
	B: 80—220	Vγ9, Vγ11/Jγ, Jγp	
TCRB (бета)	A: 240—285	Vβ2—Vβ24/Jβ1.1— Jβ1.6, Jβ2.2, Jβ2.6, Jβ2.7	Сложная мультиплексная реакция с большим количеством праймеров (23 Vβ-праймеров); амплификация плохо проходит, особенно в образцах, выделенных из парафиновых блоков
	B: 240—285	Vβ2—Vβ24/Jβ2.1, Jβ2.3, Jβ2.4, Jβ2.5	
	C: 170—210 (Dβ2) и 285—325 (Dβ1)	Dβ1, Dβ2/все Jβ	
IGHD	A: 110—420	DH1—DH6/ Jcons	Ограниченный репертуар (олигоклональный характер амплификации). Исследование оправданно при ОЛЛ
	B: 100—130	DH7/Jcons	
IGH (тяжелая цепь)	A — FRI: 310—360	VH1—VH6/Jcons	Локус IGH амплифицируется тремя системами праймеров, которые дублируют друг друга (FRI, FRII, FRIII). Соматические мутации генов IGH могут изменять область посадки праймеров при В-клеточных лимфомах, поэтому при четкой моноклональной картине, даже в одной из реакций, общий ответ определяется как моноклональный
	B — FRII: 250—295	VH1—VH7/Jcons	
	C — FRIII: 100—170	VH1—VH7/Jcons	
IGK (каппа)	A: 120—160 190—210 260—300	Vκ1—Vκ7/Jκ	Узкие диапазоны амплификации. Один праймер может взаимодействовать с несколькими генами Vκ и при наличии клональной реаранжировки может давать несколько клональных пиков
	B: 210—350 270—300 350—390	Vκ1—Vκ7, INTR/KDE	
IGL (лямбда)	A: 140—165	Vλ1/2, Vλ3/Jλ	Узкие диапазоны амплификации. Исследуется редко

Имеются некоторые особенности интерпретации клональности по отдельным локусам (табл. 1). Наиболее простыми для исследования и интерпретации считаются локусы генов IGН и TCRG, поэтому мы рекомендуем начинать исследование В-клеточной и Т-клеточной клональности с этих локусов (!) и в случае сомнительного или отрицательного результата исследовать локусы IGK и TCRB. Локус IGL исследуется редко, так как в большинстве случаев экспрессирующих лямбда-цепь иммуноглобулина В-клеточных лимфом выявляется клональная реаранжировка IGН и IGK/KDE. Локус TCRD и неполные реаранжировки IGН в силу своего ограниченного репертуара в норме имеют олигоклональный характер амплификации, и при зрелых лимфоидных опухолях исследование этих локусов не проводится. Выявление клональности по данным цепям должно расцениваться только в совокупности с клональностью по остальным локусам. При созревании Т-лимфоцита в норме реаранжировки проходят последовательно: сначала перестраивается локус генов TCRD, затем TCRG и неполные реаранжировки TCRB, после этого происходят полные реаранжировки TCRB и реаранжировки альфа-локуса TCR. Так как гены TCRD располагаются внутри локуса TCRA, то они вырезаются при реаранжировках TCRA. Таким образом, клональные продукты локусов TCRD редко обнаруживаются при TCR $\alpha\beta$ -лимфомах и исследование локуса TCRD оправданно только при подозрении на опухоль из $\gamma\delta$ -Т-лимфоцитов.

Чувствительность определения моноклональных клеток составляет 1—10% для Т-клеточной клональности, то есть клональность определяется при наличии более 1—10% моноклональных лимфоцитов от всех Т-лимфоцитов в образце [34—37]. Для В-клеточной клональности чувствительность определения составляет 1—5%, то есть клональность определяется при наличии более 1—5% клональных лимфоцитов от всех В-лимфоцитов в образце [34]. Чувствительность индивидуальна для каждого пациента и зависит от локуса и от того, какие V- и J-гены перестроены в опухолевых клетках, от разнообразия поликлонального фона. Если опухолевые клетки составляют более 20—30% от Т- или более 10% от В-лимфоцитов, то полностью доминирует моноклональный ПЦР-продукт и не возникает сложностей с интерпретацией результата.

При диагностике В-клеточных неходжкинских лимфом выявляемость клональности по локусам IGН, IGK и KDE, IGL достигает 99% и Т-клеточных неходжкинских лимфом по локусам TCRD, TCRG, TCRB — 94%. По отдельным локусам выявляемость клональности варьирует (табл. 3).

При некоторых нозологиях частота выявления клональности снижена. При опухолях с большим количеством соматических мутаций в

Таблица 3. Выявляемость клональности по отдельным локусам по протоколу Biomed-2 [24, 28, 29]

Исследуемый локус	В-клеточные лимфомы	Т-клеточные лимфомы
IGH	88%	5%
IGK и KDE	88%	5%
IGL	29%	2%
IGH/IGK и KDE/IGL	Bcero IG: 99%	Bcero IG: 6%
TCRD	9%	18%
TCRG	11%	89%
TCRB	16%	91%
TCRD/TCRG/TCRB	Bcero TCR: 27%	Bcero TCR: 94%

генах IGH — диффузной В-крупноклеточной лимфоме, фолликулярной лимфоме, множественной миеломе — частота выявления клональности по генам IGH не превышает 79—84%, и в случае отрицательного результата рекомендуется применять диагностику по локусам IGK/KDE, IGL [38]. Причина отрицательных результатов при Т-клеточных лимфомах — низкое содержание опухолевых Т-лимфоцитов в биоптате и выраженный реактивный компонент (например, ранние стадии и эритродермические формы грибовидного микоза, Т-клеточная ангиоиммунобластная лимфома) или отсутствие реаранжировок генов TCR (НК/Т-клеточная лимфома, анапластическая Т-крупноклеточная лимфома). Частота выявления клональности при Т-клеточной ангиоиммунобластной лимфоме и начальных стадиях Т-клеточных лимфом кожи, экстранодальной НК/Т-клеточной лимфоме составляет 60—70%. Для НК/Т-клеточных лимфом характерен аберрантный характер реаранжировок: может наблюдаться изолированная реаранжировка только в одном из локусов TCR, реже полное отсутствие клональных реаранжировок [39].

Определение клональности при острых лимфобластных лейкозах имеет ряд особенностей. Отличительной особенностью является то, что при В-ОЛЛ выявляются клональные реаранжировки как генов IG (в 98% случаев), так и генов TCR (TCRG — до 74% случаев). Это связано с активной работой рекомбиназного комплекса в ранних В-клеточных предшественниках. При Т-ОЛЛ выявляются в основном реаранжировки генов TCR (90—95% пациентов) и очень редко полные реаранжировки IGH (5—7% случаев), в единичных случаях — IGK [40, 41]. Наши данные по выявлению клональных реаранжировок генов гамма-, бета- и дельта-цепей TCR и генов тяжелой и легкой цепей IG при В- и Т-вариантах ОЛЛ представлены в табл. 4.

Таблица 4. Частота выявления клональных реаранжировок генов гамма-, бета- и дельта-цепей TCR и генов тяжелой и легкой цепей IG при В- и Т-вариантах ОЛЛ [42]

Реаранжировки	В-ОЛЛ (n = 34)	Т-ОЛЛ (n = 28)	
TCRG	VG – JG	74,3% (n = 26)	89,3% (n = 25)
TCRB	VB – JB (полные)	26,5% (n = 9)	50% (n = 14)
	DB – JB (неполные)	23,5% (n = 8)	46,4% (n = 13)
	Все TCRB	38,2% (n = 13)	60,7% (n = 17)
TCRD	VD – JD / DD2 – JD	17,6% (n = 6)	53,6% (n = 15)
	VD – DD3/ DD2 – DD3	47,1% (n = 16)	32,1% (n = 9)
	Все TCRD	55,9% (n = 19)	64,3% (n = 18)
IGH	VH – JHFR1/FR2/FR3 (полные)	73,5% (n = 25)	7,1% (n = 2)
	DH – JH (неполные)	26,5% (n = 9)	25% (n = 7)
	Все IGH	82,4% (n = 28)	28,6% (n = 8)
IGK	Vκ – Jκ	26,5% (n = 9)	0% (n = 0)
	Vκ – KDE / IntronRSS – KDE	26,5% (n = 9)	3,6% (n = 1)
	Все IGK	38,2% (n = 13)	3,6% (n = 1)

Еще одна отличительная черта ОЛЛ — возможно одновременное присутствие клональных продуктов с незавершенной реаранжировкой генов и производных от них клональных продуктов с завершенными реаранжировками, что объясняется продолжающимся процессом реаранжировок генов иммуноглобулинов и TCR в ранних клетках-предшественниках. Чаше других олигоклональность (наличие двух и более клонов) демонстрируют гены IGH: полные реаранжировки в 30–40% и неполные в 50–60% случаев, гены TCRD в 20–25% случаев [41]. При рецидиве ОЛЛ клональные реаранжировки могут частично изменяться, что связывают с преобладанием в рецидиве клона, который в дебюте имел минорный характер, но по каким-то причинам приобрел резистентность на фоне полихимиотерапии. По нашим данным, у пяти из шести (83%) пациентов отмечалось частичное несоответствие клональных реаранжировок дебюта и рецидива заболевания [41].

В-клеточная клональность редко (5–6%) выявляется при неопухолевых состояниях или Т-клеточных лимфомах [38, 39, 43]. Исключением является ангиоиммунобластная Т-клеточная лимфома, при которой выраженная В-клеточная моноклональность определяется в 20–30% случаев [39, 44] и патогенетически связана с активностью вируса Эпштейна—Барр. При классической лимфоме Ходжкина, несмотря на небольшое количество опухолевых клеток Березовского—Штернберга и Ходжкина, молекулярные методы позволяют выявить клональность

по реаранжировкам генов IGH, IGK с частотой 24—49% в парафиновых блоках и до 79% — в замороженных тканях, что также, возможно, связано с активацией В-лимфоцитов вирусом Эпштейна—Барр [45—47].

Т-клеточная клональность гораздо чаще носит реактивный характер. Клональность по генам TCRG выявляется в 11% случаев при В-клеточных лимфомах, а по генам TCRB — в 16% [39]. Таким образом, у части пациентов возможно одновременное выявление Т- и В-клеточной клональности, что представляет диагностическую дилемму как для патоморфолога, так и для клинициста. Кроме того, при Т-клеточных лимфомах мы часто сталкиваемся с полной или частичной сменой клональных реаранжировок при исследовании различных тканей (клональная вариабельность). По нашим данным, множественные реаранжировки генов TCRG и TCRB с различным их представительством в тканях обнаружены у 63% пациентов с периферическими Т-клеточными лимфомами неспецифицированными и у 76% пациентов с ангиоиммунобластной Т-клеточной лимфомой [43, 48]. При помощи селекции CD4+ и CD8+ клеток, маркеров точечной мутации G17V гена *RHOA* нами было убедительно показано, что при ангиоиммунобластной Т-клеточной лимфоме несовпадение (у 46% пациентов полное, у 30% пациентов частичное) клональных пиков в лимфоузлах и других тканях можно отнести на счет присутствия в крови или костном мозге CD8+ иммунных, реактивных Т-клеточных клонов, которые могут давать преимущественную амплификацию при малом количестве опухолевых Т-лимфоцитов [43, 49]. Таким образом, при периферических Т-клеточных лимфомах мы рекомендуем для первичной диагностики использовать лимфатический узел или другой очаг первичной локализации. При наличии в периферической крови, костном мозге, коже и т. д. клональных продуктов, отличных от выявляемых в лимфоузлах, их необходимо интерпретировать как реактивные.

В ходе нормального иммунного ответа, при аутоиммунных процессах в периферической крови появляется множество клонов Т- и В-клеток, но размеры этих клонов, как правило, не достигают пределов чувствительности метода (поликлональная или олигоклональная картина). Исключения из этого правила возможны, и прежде всего речь идет о Т-клеточной клональности в периферической крови. Так, показано, что в острой фазе инфекционного мононуклеоза до 10% CD8+ клеток могут быть моноклональны, а у 40% пациентов выявляется моноклональность по генам TCRG [50]. При активации инфекции, вызванной вирусом Эпштейна—Барр, особенно на фоне выраженной иммуносупрессии, можно наблюдать В- и Т-клеточную моноклональность. Ревматоидные заболевания, как правило, сопровождаются олигоклональ-

ной экспансией как CD8+, так и CD4+ лимфоцитов. При аутоиммунной гемолитической анемии до 50% пациентов имеют моноклональную картину реаранжировок генов TCR и клональную экспансию CD8+ лимфоцитов [51]. Выявление Т-клеточной клональности возможно при выраженной реакции «трансплантат против хозяина», сепсисе, выраженном инфекционном процессе, особенно при иммуносупрессии, на фоне полихимиотерапии и невозможности Т-лимфоцитов генерировать полноценный репертуар (разнообразие TCR) в ответ на иммунные стимулы. Отличительной особенностью Т-клеточного репертуара является его сужение с возрастом, когда происходит инволюция тимуса. Кроме того, хроническая антигенная стимуляция приводит к накоплению клональных цитотоксических CD8+CD57+ лимфоцитов. При исследовании периферической крови у 14,5% условно здоровых людей и доноров определяются моноклональные реаранжировки TCRG и неполные реаранжировки TCRB [52]. Таким образом, наличие клональности не обязательно означает наличие опухоли. Выявление Т-клеточной клональности в крови не является специфичным для Т-клеточной опухоли, поэтому интерпретация результатов определения клональности проводится только с учетом клинических данных, иммунофенотипирования. В-клеточная клональность редко демонстрирует реактивный характер, поэтому к выявлению В-клеточной клональности без признаков опухоли необходимо относиться с большой серьезностью. Рекомендуется дальнейшее обследование и активное наблюдение пациента.

Зачастую клональность по генам IG и TCR используют для стадирования опухоли, например для определения поражения костного мозга или других органов. Длина моноклонального ПЦР-продукта уникальна для опухолевого клона и неизменна во всех пораженных тканях у данного пациента. Стоит отметить, что для стадирования необходимо получить четкую клональную картину в первичном очаге поражения, в случае периферической лимфомы в лимфатическом узле, селезенке, коже и т. д., а затем уже сравнивать длину полученных клональных пиков с другими тканями. Изолированное исследование клональности в костном мозге, периферической крови, плевральной или спинномозговой жидкости и других тканях может привести к ложноположительным результатам.

ПЦР метод определения клональности является хорошим дополнением к классическим цитологическим, гистологическим и иммунофенотипическим методам в диагностике лимфатических опухолей. Однако клональные перестройки следует интерпретировать только с учетом данных клиники, морфологии и иммунофенотипирования.

Молекулярно-генетические исследования при остром миелоидном лейкозе (ОМЛ)

Объем и показания к молекулярно-генетическому исследованию при ОМЛ ежегодно расширяются и определяются рекомендациями российского и международных онкогематологических сообществ. Без молекулярно-генетических исследований в настоящее время невозможно классифицировать ОМЛ, стратифицировать на группы риска, а также адекватно лечить больных [53—56].

Для первичного молекулярно-генетического исследования необходимо использовать пунктат костного мозга, взятый в стерильную вакуумную пробирку с антикоагулянтом ЭДТА, минимальный объем — 2—2,5 мл. При невозможности выполнить пункцию костного мозга материалом для исследования может быть периферическая кровь при бластемии более 30%. Для всех пациентов рекомендуется не только хранение замороженных клеток, но также выделение и хранение ДНК и РНК из первичного материала.

Исследование вставок и делеций (инделов) в генах *FLT3* (ITD — внутренняя тандемная дупликация) (14—15-й экзоны, NM_004119), *NPM1* (12-й экзон, NM_002520.7) и *CEBPA* (1-й экзон, NM_004364.5) в срок 1—7 дней выполняется различными методами молекулярной диагностики. Золотым стандартом на сегодняшний день остается исследование вставок и делеций методом ПЦР с последующим фрагментным анализом [57—59]. Этот метод позволяет в короткие сроки получить результат с чувствительностью 1—5% и дать расчетные характеристики выявленным нарушениям: оценить длину вставки/делеции по количеству пар нуклеотидов (п. н.), вычислить аллельное отношение (AR — allelic ratio) и аллельную нагрузку (VAF — variant allele frequency). AR и VAF применяют для оценки опухолевой нагрузки. AR рассчитывают по формуле как отношение площади пика аллеля с мутацией (если он один) (*Smt*) или суммы площадей всех пиков аллелей с мутациями к площади пика дикого аллеля (*Swt*).

$$AR = \frac{Smt1 + Smt2 + Smt3}{Swt} *.$$

* Пример расчета AR для *FLT3*-ITD по данным электрофореграммы, представленной на рис. 5.

VAF рассчитывают как отношение суммы площадей пиков мутантного аллеля к суммарной площади всех пиков (суммы площади пика дикого аллеля и площадей всех пиков аллелей с мутациями), умноженное на 100%.

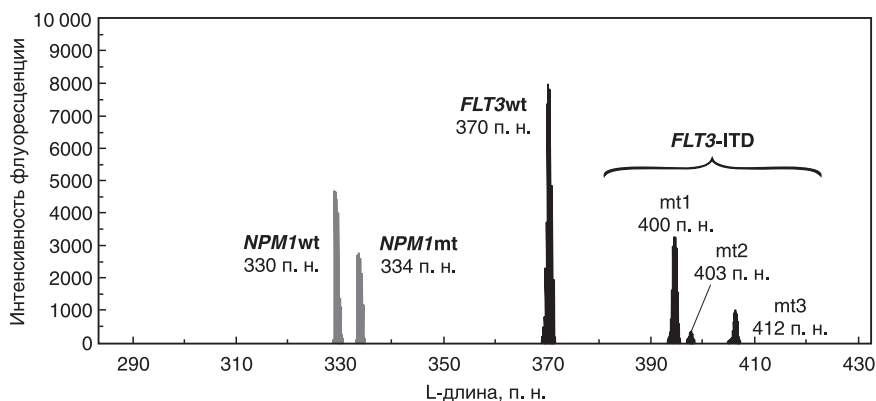


Рисунок 5. Результат разделения флуоресцентно меченных ПЦР-продуктов гена *NPM1* и *FLT3* методом фрагментного анализа. Слева показан пример вставки в *NPM1*. Пик нормального аллеля *NPM1* (*NPM1*-wt) имеет длину 330 п. н., пик мутантного аллеля (*NPM1*-mt) содержит вставку длиной 4 нуклеотида. Справа показан пример множественных *FLT3*-ITD, пик дикого аллеля (wt) визуализируется длиной 370 п. н., пики мутантных аллелей имеют длины 400 (mt1), 403 (mt2) и 412 (mt3) п. н. соответственно.

$$VAF(mt1) = \frac{S_{mt1}}{S_{mt1} + S_{mt2} + S_{mt3} + S_{wt}} \times 100\% **.$$

** Пример расчета VAF для пика mt1 *FLT3*-ITD по данным электрофореграммы, представленной на рис. 5.

Величина VAF рассчитывается при ПЦР-РВ и ВПС (высокопроизводительное секвенирование), может быть использована для сопоставления результатов исследования, проведенных различными методами. Принято рассчитывать VAF для оценки инделов в *CEBPA* и *NPM1*. Для *FLT3*-ITD возникают трудности при пересчете AR из VAF, поэтому рассчитывают обе величины, причем VAF указывают для каждого мутантного пика.

У трети пациентов обнаруживаются множественные вставки (субклоны) в гене *FLT3*, а также небольшой процент клеток с мутацией (1–5%), что усложняет интерпретацию результатов [60]. С целью повышения точности диагностики методом фрагментного анализа используют ПЦР-продукты 2–3 независимых амплификаций одного и того же участка гена.

Факторами благоприятного прогноза считаются вставка в гене *NPM1* (+4 пар оснований) и инделы в домене bZIP в *CEBPA* при нормальном кариотипе и отсутствии каких-либо неблагоприятных нарушений (мутаций в *FLT3*, *TP53*, *ASXL1* и др.) [55, 56]. Наследственный

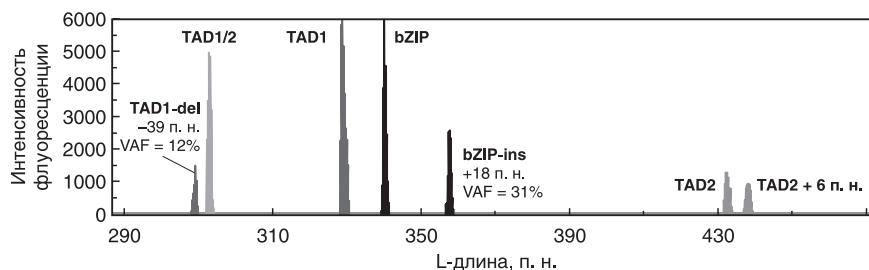


Рисунок 6. Результат разделения флуоресцентно меченных ПЦР-фрагментов гена *CEBPA*. Ген *CEBPA* содержит три ключевых домена (TAD1, TAD2, bZIP), и для их анализа используют амплификацию с флуоресцентными метками четырех цветов, включая область между TAD1 и TAD2 (TAD1/2), что позволяет увидеть на электрофореграмме четыре фрагмента разных цветов и длин. При наличии вставки или делеции в гене на электрофореграмме визуализируется дополнительный пик, по цвету совпадающий с фрагментом, в котором произошла мутация. На рисунке показан пример выявления нескольких вставок и делеции в гене *CEBPA* у одного пациента.

TAD1del — пик флуоресцентно меченного ПЦР-продукта домена TAD1, имеющего делецию 39 п. н.; TAD1/2 — пик ПЦР-продукта участка гена *CEBPA*, содержащего фрагменты доменов TAD1 и TAD2; bZIP — пик ПЦР-продукта домена bZIP гена *CEBPA*; bZIP-ins — пик флуоресцентно меченного ПЦР-продукта домена bZIP гена *CEBPA*, содержащего вставку длиной 18 п. н.; TAD2 — пик флуоресцентно меченного ПЦР-продукта домена TAD2; TAD2 + 6 п. н. — пик флуоресцентно меченного ПЦР-продукта домена TAD2, имеющий вставку длиной 6 п. н.

полиморфизм в виде вставки шести нуклеотидов в домене TAD2 *CEBPA* [61] и инделы в других доменах *CEBPA* или делеция в гене *NPM1* не являются фактором прогноза, но могут быть отражены в результатах исследования (рис. 6).

FLT3-ITD — фактор неблагоприятного прогноза (исключение при выявлении транслокации *PML::RARA* или *CBFB::MYH11* [62, 63]) и показание к назначению *FLT3*-ингибиторов (ингибиторы тирозинкиназ — ИТК) [53, 54, 56]. При отсутствии возможности применения таргетных препаратов *FLT3*-ITD будет иметь различное прогностическое значение в зависимости от величины AR и наличия или отсутствия вставки в гене *NPM1* [64]. Случай относят к группе высокого риска при выявлении *FLT3*-ITD с $AR \geq 0,5$ без мутации в *NPM1*. К группе промежуточного риска при выявлении *FLT3*-ITD с $AR \geq 0,5$ и одновременным выявлением мутации *NPM1* или *FLT3*-ITD с $AR < 0,5$ при отсутствии мутаций в гене *NPM1* и без других неблагоприятных нарушений. Благоприятный прогноз ассоциирован с $AR < 0,5$ *FLT3* и одновременно выявляемой мутацией в гене *NPM1*. В соответствии

с рекомендациями ELN (European LeukemiaNet) 2017 г. вычисление AR является необходимым условием для стратификации пациентов на группы риска, однако пересмотренные рекомендации 2022 г. относят все внутренние tandemные повторы в *FLT3*, независимо от величины AR, к группе промежуточного риска при условии применения ИТК [56].

Кроме *FLT3*-ITD в гене *FLT3* в 20% случаев встречаются точечные мутации в тирозинкиназных доменах *FLT3* (*FLT3*-TKD). Наиболее частой является мутация в положении p.D835, которая выявляется в 5—7% случаев, не учитывается при стратификации риска и, согласно большинству исследований, не считается фактором неблагоприятного прогноза, однако при обнаружении является показанием к назначению определенных ИТК (например, мидостаурина или гилтеритиниба). Некоторые мутации в *FLT3*-TKD (например, p.F691L) могут обуславливать резистентность к ИТК [65]. Мутации *FLT3*-TKD, так же как *FLT3*-ITD, относят к поздним онкогенным мутациям, поэтому они часто носят множественный и/или субклональный характер и для их полноценного исследования целесообразно применять метод ВПС.

Исследование мутаций в генах *NPM1*, *FLT3* (включая *FLT3*-ITD и p.D835), *CEBPA* проводят всем больным при первичном исследовании. В случае отсутствия мутаций в генах *NPM1*, *CEBPA* исследование больше не повторяют. Определение мутаций в гене *FLT3* проводят повторно при подозрении на рецидив или неэффективности проводимой терапии.

Если на момент диагностики была выявлена мутация в генах *NPM1*, *FLT3*, *CEBPA*, их исследование может быть проведено повторно после 1—2 курсов терапии при восстановлении кроветворения с целью оценки динамики редукции опухолевого клона или для решения вопроса о смене терапии или при подозрении на рецидив.

Первичная диагностика при соответствующих данных СЦИ/FISH включает исследование транскриптов химерных генов (*RUNX1::RUNX1T1*, *CBFB::MYH11* и перестройки *KMT2A*) методом обратной транскрипции с последующей ПЦР-РВ для верификации транслокации, оценки уровня транскрипта и последующего динамического наблюдения. Прогноз пациентов с *RUNX1::RUNX1T1*, *CBFB::MYH11* считается более благоприятным, даже при наличии мутации в *FLT3* (при применении ИТК) [63].

Перестройки гена *KMT2A* считаются неблагоприятным фактором прогноза. Ввиду большого количества возможных генных партнеров для *KMT2A* его исследование методом ОТ с ПЦР-РВ возможно для ограниченного числа химерных перестроек. В случае, если лаборатория располагает методом диагностики транскрипта химерного гена

KMT2A, его возможно рассматривать как дополнительный фактор оценки редукции опухолевого клона в процессе курсовой терапии [29].

Секвенирование по Сэнгеру или таргетное ВПС для верификации типа вставки в *NPM1*, локализации мутации в *FLT3*-TKD и *FLT3*-ITD, выявления нарушений последовательности в генах *CEBPA*, *RUNX1*, *TP53*, *KIT*, *IDH1*, *IDH2*, *TET2*, *WT1*, *DNMT3A*, *SRSF2*, *SF3B1*, *U2AF1*, *ZRSR2*, *ASXL1*, *EZH2*, *BCOR*, *STAG2* может быть выполнено в дополнение к оптимальному объему исследования (табл. 1). Для оценки клинической значимости и патогенности/доброкачественности выявленные изменения последовательности генов должны быть оценены по критериям ACMG/AMP [Американского колледжа медицинской генетики (ACMG) и Ассоциации молекулярной патологии (AMP)], подвергнуты глубокому анализу по актуальным базам данных (COSMIC, ClinGen, Onco-KB и др.) и/или проверены с помощью 3–5 различных программ предсказания (VEST, SIFT, PolyPhen2, MutationTaster, MutationAssessor и др.) [66, 67]. При планировании родственной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК), в случае выявления патогенной герминальной мутации в гене *RUNX1* или *CEBPA* у реципиента, необходимо исключить носительство соответствующей мутации у донора [68].

Мутация в гене *TP53* в 50% случаев выявляется совместно с комплексным нарушением кариотипа. Несмотря на то что эти пациенты уже будут отнесены к группе неблагоприятного прогноза, исследование мутационного статуса *TP53* необходимо для определения терапевтической стратегии, в частности назначения препаратов, более активных в отношении клона с мутацией в *TP53*.

Таким образом, при первичном исследовании и в ходе курсовой терапии ОМЛ рекомендовано молекулярное исследование генов, имеющих диагностическое значение (верификация диагноза или типа лейкоза, например химерные транскрипты), прогностическое значение (стратификация больных на группы риска — *FLT3*, *NPM1*, *CEBPA* и др.), терапевтическое значение (назначение определенных комбинаций химиотерапевтических, гипометилирующих и таргетных препаратов — *FLT3*, *TP53*, *IDH1*, 2 и др.)

Оценка МОБ возможна при наличии в арсенале лаборатории методик с высокой чувствительностью (10^{-4} – 10^{-5}). МОБ является сурrogатным маркером ответа пациента на проводимое лечение и полноты достигнутой ремиссии. Материалом для оценки МОБ является костный мозг, взятый в пробирку с ЭДТА после восстановления кровотока (количество лейкоцитов $\geq 1,5 \times 10^9/\text{л}$). Общеизвестные маркеры для оценки МОБ — химерные транскрипты (*RUNX1::RUNX1T1*, *CBFB::MYH11*, частые перестройки *KMT2A*) и стандартные вставки в

NPM1, обозначаемые А, В или D, составляющие 85% всех вставок, которые имеют определенный сайт встраивания и последовательность [3, 69, 70]. Оценку проводят после 2-го курса индукции, окончания консолидации (перед поддерживающей терапией), по окончании терапии или перед алло-ТГСК, каждые 3 месяца после окончания терапии, а также в другие сроки по показаниям. Известно, что транскрипты *RUNX1::RUNX1T1*, *CBFB::MYH11* длительно персистируют в костном мозге и/или в крови даже при полной ремиссии, что, возможно, ассоциировано с прелейкемическими клонами, поэтому особую настороженность у клинициста должен вызывать рост количества транскрипта более чем в 10 раз или слишком малое его снижение в сравнении с исходным уровнем, а также выявление его после алло-ТГСК. Прогностически крайне неблагоприятный фактор, если по окончании терапии определяется транскрипт / мутантный аллель *RUNX1::RUNX1T1*, *CBFB::MYH11*, *NPM1* в количестве более 2% или если от исходного уровня его количество снизилось менее чем в 1000—10 000 раз [56, 71]. На любом этапе после окончания терапии при достижении МОБ-негативной ремиссии повторное обнаружение маркера говорит о МОБ-позитивном рецидиве ОМЛ, а последующий 10-кратный рост мутантного VAF транскрипта/аллеля в крови или костном мозге обычно сопровождается рецидивом в среднем в течение 3 месяцев.

В качестве вспомогательных маркеров МОБ можно использовать другие химерные транскрипты, например *KMT2A* и мутацию *FLT3-ITD* [например, методы TD-ПЦР (tandem duplication ПЦР) или пациент-специфичная количественная ПЦР], однако в связи с отсутствием общепризнанной методики эти мутации не могут быть использованы как единственный маркер МОБ.

Для остальных точечных соматических мутаций в генах *RUNX1*, *TP53*, *IDH1*, *IDH2*, *TET2*, *WT1*, *DNMT3A*, *SRSF2*, *SF3B1*, *U2AF1*, *ZRSR2*, *ASXL1*, *EZH2*, *BCOR*, *STAG2* существует большая вероятность их обнаружения при ремиссии в прелейкемических клонах, что практически ограничивает возможность их использования в качестве МОБ-маркеров.

Особенности диагностики острого лимфобластного лейкоза

ОЛЛ характеризуется значительной гетерогенностью, что существенно затрудняет выбор наиболее значимых для диагностики молекулярно-генетических маркеров. В действующих российских клинических

рекомендациях по диагностике и лечению ОЛЛ приводится перечень молекулярно-генетических исследований [72, 73], но часть из рекомендованных тестов (например, выявление пациент-специфических перестроек и использование их в качестве молекулярного маркера для мониторинга минимальной остаточной болезни) доступны лишь для 2—3 лабораторий в нашей стране. Молекулярно-генетические маркеры Т-ОЛЛ имеют крайне ограниченную применимость. Единственное исключение — это генетический классификатор, учитывающий совместный статус мутаций в генах *NOTCH1*, *FBXW7*, *NRAS/KRAS*, а также мутации/делеции в *PTEN* [74, 75]. В связи с этим мы рекомендуем для этой группы пациентов проводить минимальный (по сравнению со всеми другими подгруппами) перечень тестов, более того, большинство из них отнесено к научно-исследовательским (табл. 1).

В 2016 г. *BCR::ABL1*-подобный ОЛЛ был включен экспертами Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) в качестве предварительной классификационной единицы в раздел В-лимфобластных лейкозов/лимфом классификации миелоидных новообразований и острых лейкозов [76]. В классификации ВОЗ 2022 г. данный вид ОЛЛ перешел в разряд основных классификационных групп [77], также эта подгруппа выделена и в международной консенсусной классификации (International consensus classification, ICC), предложенной экспертами в том же 2022 г. [78], *BCR::ABL1*-подобный ОЛЛ — это ОЛЛ, при котором отсутствует транслокация t(9;22)(q34;q11) или ее молекулярный аналог — химерный ген *BCR::ABL1*, но при этом профиль экспрессии определенных генов идентичен Ph-позитивному ОЛЛ. В научной литературе одновременно сосуществуют два термина, связанные с *BCR::ABL1*-подобным ОЛЛ: собственно *BCR::ABL1*-подобный ОЛЛ и Ph-подобный ОЛЛ. Первый термин был предложен группой исследователей из Нидерландов, второй — из США. Эти 2 термина связаны с общей технологией — экспрессионный анализ (gene expression profile, GEP), — но при этом общими в двух классификаторах оказались всего 9 зондов к 7 генам *CCND2*, *SH3BP5*, *ABL1*, *SOCS2*, *DUSP6*, *LST1*, *EGFL7*. Отдельные сходства и отличия приведены в табл. 5. Мы рекомендуем применять термин «*BCR::ABL1*-подобный ОЛЛ» («*BCR::ABL1-like*»), потому что именно он использован и экспертами ВОЗ и экспертами ICC, и именно в таком виде он включен в классификации ОЛЛ без указания на метод выявления данной подгруппы.

Отдельно следует подчеркнуть, что, если найдена гиперэкспрессия белка TSLPR методом проточной цитометрии, гиперэкспрессия РНК *CRLF2* методом ПЦР-РВ или делеция *IKZF1* методами ПЦР либо фрагментного анализа, это не означает, что выявлен *BCR::ABL1*-подобный ОЛЛ, согласно терминологии ВОЗ, ICC и авторов концепции

Таблица 5. *BCR::ABL1*-подобный ОЛЛ (*BCR::ABL1*-like) и Ph-подобный ОЛЛ (Ph-like). Сходства и различия [79, 80, 83, 84]

Методика	<i>BCR::ABL1</i> -подобный ОЛЛ	Ph-подобный ОЛЛ
Техническая платформа создания	U133A GeneChips (Affymetrix)	U133A Plus 2.0 GeneChips (Affymetrix)
Технология	Экспрессионный анализ	Экспрессионный анализ
Генетическая основа	110 (случайных) генов	257 (случайных) зондов
Математический аппарат анализа	Иерархический кластерный анализ	Предсказательный анализ микрочипов (РАМ)
Последующая модификация	Нет	Создание чипов низкой плотности (Taqman-LDA)
Химерные гены с участием киназ	Да	Да
Прогноз	Неблагоприятный	Неблагоприятный

BCR::ABL1-подобного ОЛЛ [77—80]. Эти признаки могут служить маркерами *BCR::ABL1*-подобного ОЛЛ, но встречаются и без него. Необходимо отметить, что делеции *IKFZ1* ухудшают прогноз *BCR::ABL1*-подобного ОЛЛ [80].

С другой стороны, у пациентов с *BCR::ABL1*-подобным ОЛЛ часто выявляются так называемые химерные гены с участием киназ (*kinase fusion genes*). Их выявление служит прямым доказательством наличия данного вида ОЛЛ. В группе *BCR::ABL1*-подобного ОЛЛ выделяют 3 основные подгруппы:

- 1) ABL-класс (к нему относят химерные гены с участием *ABL1*, *ABL2*, *CSF1R*, *PDGFRB*);
- 2) химерные гены с участием *JAK2* и *CRLF2*;
- 3) перестройки других киназ.

Иногда еще отдельно выделяют химерные гены с участием *EPOR*, в других случаях перестройки гена *EPOR* объединяют в подгруппу *JAK2* и *CRLF2*. Часто химерные гены с участием *JAK2*, *CRLF2* и/или *EPOR* сочетаются с мутациями, активирующими JAK-STAT сигнальный путь (гены *JAK1*, *JAK2*, *JAK3*, *CRLF2*, *IL7R*, *SH2B3*, *TYK2*, *IL2RB*) [81—84]. Хочется отметить, что не следует смешивать понятия точечной мутации и цитогенетической аберрации / химерного гена. Распределение пациентов в генетические подгруппы *BCR::ABL1*-подобного ОЛЛ в зависимости от возраста приведено в табл. 6.

Более подробно ознакомиться с данным типом ОЛЛ и алгоритмом его диагностического поиска вы можете в недавно опубликованном обзоре [86].

Таблица 6. Генетические подгруппы *BCR::ABL1*-подобного ОЛЛ у взрослых пациентов в общей группе и в зависимости от возраста установления диагноза [85]

Генетические нарушения	Частота генетических нарушений (%) в разных возрастных группах			
	Все больные (n = 194)	21—39 лет (n = 96)	40—49 лет (n = 62)	60—86 лет (n = 36)
<i>CRLF2</i> (+) <i>JAK2</i> WT	38,1	36,5	38,7	41,7
<i>CRLF2</i> (+) <i>JAK2</i> mut	12,9	14,6	8,1	16,7
<i>JAK2r</i>	7,2	6,3	9,7	5,6
Другие JAK-STAT	7,2	7,3	9,7	2,8
<i>EPORr</i>	5,2	9,4	—	2,8
ABL-класс	9,8	10,4	12,9	2,8
Другие киназы	4,1	5,2	3,2	2,8
Ras	3,6	2,1	4,8	5,6
Не выявлены	4,6	5,2	1,6	8,3
Неизвестно	7,2	3,1	11,3	11,1

CRLF2(+) *JAK2* WT — наличие перестроек гена *CRLF2*(+) при отсутствии мутаций в гене *JAK2*; *CRLF2*(+) *JAK2* mut — одновременное наличие перестроек гена *CRLF2*(+) и мутаций в гене *JAK2*; *JAK2r* — перестройки (химерные гены) с участием *JAK2*; другие JAK-STAT — другие мутации с вовлечением сигнального пути JAK-STAT; *EPORr* — перестройки (химерные гены) с участием *EPOR*; ABL-класс — перестройки (химерные гены) ABL-класс; другие киназы — перестройки (химерные гены) в других тирозинкиназных генах; Ras — мутации в генах семейства Ras.

Сочетание делеции в гене *IKZF1* с делецией как минимум в одном из трех генов *CDKN2A*, *CDKN2B*, *PAX5* и псевдоаутосомном регионе X-и/или Y-хромосом, получившем название PAR1, при обязательном отсутствии делеции в гене *ERG* позволяет выделить еще одну группу неблагоприятного прогноза ОЛЛ у детей — *IKZF1*плюс [87], которая включена в текущий протокол группы AIEOP-BFM в качестве отдельного стратификационного критерия.

Молекулярная диагностика миелопролиферативных новообразований (МПН)

Миелопролиферативные новообразования (МПН) впервые описаны достаточно давно — первичный миелофиброз (ПМФ) в 1879 г., истинная полицитемия (ИП) в 1982 г. и эссенциальная тромбоцитемия (ЭТ) в 1934 г. [88—91]. Объединены в одну нозологическую группу в работе «Некоторые размышления о миелопролиферативных синдромах», опубликованной в 1951 г. Уильямом (Зеевом) Дамешек в од-

ном из первых номеров журнала *Blood*, который он же и основал [92]. Клональная природа МПН была подтверждена в классических работах Филиппа Фиалкова по анализу экспрессии изоформ кодируемого X-хромосомой (одна из которых подвергается случайной инактивации в соматических клетках у лиц женского пола) фермента глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в клетках крови больных [93]. В дальнейших исследованиях при МПН были детально описаны приводящие к aberrантной пролиферации клеток миелоидного ряда молекулярные события, происходящие в генах нерецепторной тирозинкиназы *JAK2*, рецептора тромбопоэтина *MPL* и кальретикулина *CALR*. В 2005 г. сразу несколькими группами исследователей была обнаружена рекуррентная мутация V617F гена *JAK2* [94–97]. В 2006 г. были описаны рекуррентные мутации W515L/K в гене *MPL* [98]. В 2007 г. также были описаны мутации в 12-м экзоне гена *JAK2* для случаев ИП с отсутствием мутации V617F [99]. В 2013 г. впервые описаны делеции и вставки в гене *CALR*, и в дальнейшем было доказано, что эффект этих мутаций опосредован через рецептор тромбопоэтина (*MPL*) [100–103]. Мутационный профиль МПН может незначительно различаться для когорт пациентов из разных регионов, сохраняя при этом основные тенденции и соотношения. Пример такого профиля приведен в табл. 7.

Таблица 7. Мутационный профиль Ph-негативных МПН [104]

Генетические нарушения	Частота генетических нарушений (%)			
	Истинная полицитемия	Эссенциальная тромбоцитемия	Первичный миелофиброз	МПН, неклассифицируемое
<i>JAK2</i> V617F	90	38	48	64
Тройные негативные	—	26	15	22
<i>CALR</i>	—	33 (тип 1 : тип 2 = 48%:52%)	33 (тип 1 : тип 2 = 79%:21%)	11
<i>MPL</i>	—	3	3	3
<i>JAK2</i> экзон 12	6	—	1	
<i>JAK2</i> негативные	4	—	—	—

Кроме перечисленных «драйверных» мутаций при МПН описаны соматические мутации в генах эпигенетической регуляции (*ASXL1*, *EZH2*, *DNMT3A*, *TET2*, *IDH1*, *IDH2*), антионкогенов (*TP53*, *PPM1D*), транскрипционных факторов (*RUNX1*, *NFE2*), факторов сплайсинга (*SRSF2*, *U2AF1*, *SF3B1*, *ZRSR2*), а также других компонентов сигнальных путей (*SH2B3*, *CBL*, *NRAS/KRAS*, *PTPN11*) [105]. Эти соматиче-

ские мутации могут интерпретироваться как «другие клональные маркеры» при ИП (*TET2*, *ASXL1*, *SH2B3*, *SRSF2*, *IDH2*, *EZH2*), ЭТ (*TET2*, *ASXL1*) и ПМФ (*ASXL1*, *EZH2*, *SRSF2*, *U2AF1*, *IDH1*, *IDH2*). Исследование этих маркеров может быть целесообразно в тройных негативных случаях, при низкой аллельной нагрузке основных маркеров, а также в рамках исследовательских протоколов. Согласно современной консенсусной международной классификации [106], для диагностики МПН используются следующие критерии (молекулярные критерии выделены полужирным шрифтом).

Критерии истинной полицитемии

Основные критерии

1. Уровень гемоглобина более 165 г/л у мужчин, более 160 г/л у женщин, или гематокрит более 49% у мужчин, более 48% у женщин.
2. Мутация **V617F гена *JAK2*** или в экзоне 12.
3. Трехростковая гиперплазия: увеличение пролиферации элементов эритроидного, гранулоцитарного, мегакариоцитарного ростков миелопоэза.

Дополнительные критерии

1. Уровень эритропоэтина сыворотки ниже референсных значений.
Для установления диагноза ИП необходимо наличие всех 3 основных критериев или первых двух основных и 1 дополнительного.

Критерии эссенциальной тромбоцитемии

Основные критерии

1. Постоянно повышенное число тромбоцитов ($> 450 \times 10^9/\text{л}$).
2. Наличие в костном мозге пролиферации мегакариоцитов с преобладанием крупных и гигантских мегакариоцитов со зрелой морфологией. Отсутствие значительного увеличения или «левого сдвига» элементов гранулоцитопоэза либо эритроцитопоэза. Отсутствие фиброза костного мозга.
3. Отсутствие других миелопролиферативных заболеваний.
4. Наличие мутаций в генах ***JAK2***, ***MPL*** или ***CALR***.

Дополнительные критерии

1. Наличие других клональных маркеров или отсутствие причин реактивного тромбоцитоза.

Для установления диагноза ЭТ необходимо наличие всех 4 основных критериев или первых трех основных и 1 дополнительного.

Критерии первичного миелофиброза

Основные критерии

1. Пролиферация и атипия мегакариоцитов, сочетающиеся с ретикулиновым и/или коллагеновым фиброзом костного мозга; при отсутствии выраженного ретикулинового фиброза.
2. **Наличие мутаций *JAK2*, *MPL*, *CALR* или других клональных маркеров (*ASXL1*, *EZH2*, *TET2*, *IDH1/2*, *SRSF2*, *SF3B1*) или отсутствие реактивного фиброза.**
3. Отсутствие критериев ИП, ЭТ, *BCR::ABL I*+ хронического миелолейкоза, МДС или других МПН.

Дополнительные критерии

1. Анемия, не вызванная сопутствующими заболеваниями.
2. Лейкоцитоз $> 11 \times 10^9/\text{л}$.
3. Спленомегалия, определяемая пальпаторно.
4. Повышение активности лактатдегидрогеназы.
5. Лейкоэритробластоз.

Для установления диагноза ПМФ необходимо наличие всех 3 основных критериев и как минимум одного дополнительного.

Основные критерии миелопролиферативных новообразований, неклассифицируемых

1. Клинические и гематологические признаки.
2. **Наличие мутаций *JAK2*, *MPL*, *CALR* или других клональных маркеров (*ASXL1*, *EZH2*, *TET2*, *IDH1/2*, *SRSF2*, *SF3B1*).**
3. Отсутствие критериев ИП, ЭТ, ПМФ, *BCR::ABL I*+ хронического миелолейкоза, МДС или других МПН.

Для установления диагноза необходимо наличие всех 3 основных критериев.

Для исследования молекулярных маркеров МПН могут быть использованы разные методические подходы. Определение рекуррентных мутаций (*JAK2* V617F и *MPL* W515K/L) целесообразно проводить при помощи асПЦР. Стандартом исследования делеций-инсерций экзона 9 гена *CALR* является фрагментный анализ. Для обнаружения мутаций вне «горячих точек» (*JAK2*, экзон 12, и «другие клональные маркеры») необходимо использовать секвенирование по Сэнгеру или ВПС. Исследования молекулярных маркеров проводятся на момент диагностики заболевания. Однако методы, обладающие достаточной чувствительностью (асПЦР и ВПС) могут быть также использованы для мониторинга МОБ и контроля эффективности терапии. Приме-

нимость методов, а также их возможности и ограничения суммированы в табл. 8.

Таблица 8. Молекулярные маркеры МПН

Ген/мутация	Метод	Преимущества	Недостатки	Подходит для мониторинга
<i>JAK2/V617F</i>	асПЦР	Быстрота, дешевизна, высокая чувствительность		Да
<i>CALR</i> / делеции-инсерции экзона 9	Фрагментный анализ	Быстрота, дешевизна	Низкая чувствительность	Нет
– / –	Секвенирование по Сэнгеру		Низкая чувствительность, трудоемкость	Нет
– / –	ВПС	Высокая чувствительность	Дороговизна и долгое время ожидания при малых потоках	Да
<i>MPL</i> / <i>W515K/L</i>	АсПЦР	Быстрота, дешевизна, высокая чувствительность		Да
<i>JAK2</i> / экзон 12	Секвенирование по Сэнгеру		Низкая чувствительность, трудоемкость	Нет
– / –	ВПС	Высокая чувствительность	Дороговизна и долгое время ожидания при малых потоках	Да
<i>ASXL1</i> , <i>EZH2</i> , <i>IDH1</i> , <i>IDH2</i> , <i>SF3B1</i> и другие, где мало экзонов	Секвенирование по Сэнгеру		Низкая чувствительность, трудоемкость	Нет
– / –	ВПС	Высокая чувствительность	Дороговизна и долгое время ожидания при малых потоках	Да
<i>DNMT3A</i> , <i>TET2</i> , <i>RUNX1</i> и другие, где много экзонов	ВПС	Высокая чувствительность	Дороговизна и долгое время ожидания при малых потоках	Да

Рациональный алгоритм проведения молекулярно-генетических исследований для диагностики МПН предполагает следующую последовательность действий. **Сначала проводится асПЦР для выявления мутации V617F гена *JAK2*.** При отрицательном результате на том же материале (ДНК) проводят поиск делеций/инсерций гена *CALR*. При отрицательном результате первых двух исследований на том же материале

(ДНК) проводят поиск мутаций в гене *MPL*. В последнюю очередь секвенируют 12-й экзон гена *JAK2*. В тройных негативных случаях (без мутаций в генах *JAK2*, *CALR* и *MPL*) может быть целесообразно определение «других клональных маркеров».

Описаны случаи обнаружения мутаций в генах *CALR* или *MPL* одновременно с мутацией V617F гена *JAK2* [107]. Такие случаи крайне редки и ассоциированы с низкой аллельной нагрузкой мутации V617F гена *JAK2*. Клиническое значение двойных мутаций пока не определено. Таким образом, показаний для выполнения исследований одновременно на все молекулярные маркеры МПН не существует. Направление материала сразу на все анализы необоснованно загружает лаборатории бессмысленной работой и, учитывая, что выполнение значительной части анализов может не найти поддержки со стороны фондов медицинского страхования, еще и финансово обременяет пациента. Единственной мотивацией выполнения всех анализов сразу может быть заинтересованность частных лабораторий. Однако лоббирование интересов частных лабораторий несовместимо с целями настоящего руководства.

Выводы

- Постановка диагноза Ph-негативного МПН в соответствии с действующими рекомендациями требует обязательного определения соматических мутаций в генах *JAK2*, *MPL* и *CALR*, а также в очень редких случаях и поиска «других клональных маркеров».
- В большинстве случаев (~ 85%) окажется достаточно определить мутацию *JAK2* V617F, что может быть выполнено методом асПЦР с высокой эффективностью и минимальными затратами в большинстве локальных лабораторий.
- В ~ 15% случаев потребуются дополнительные исследования в следующем порядке: *CALR* → *MPL* → *JAK2*, экзон 12 → «другие клональные маркеры». Логистика диагностической службы должна быть выстроена так, чтобы при получении отрицательного результата последующие анализы выполнялись на исходно выделенной ДНК.
- Исследование мутаций в генах *CALR* и *MPL* при наличии мутации *JAK2* V617F может быть целесообразно только при низкой аллельной нагрузке (менее 1%) *JAK2* V617F. Диагностическое значение такого исследования требует уточнения.
- Исследование «других клональных маркеров» целесообразно в тройных негативных случаях и требует использования ВПС, экспертной интерпретации результатов и должно проводиться в крупных исследовательских центрах.

Исследование генов вариабельного региона тяжелой цепи иммуноглобулинов при В-клеточном хроническом лимфоцитарном лейкозе

Мутационный статус генов вариабельного региона тяжелой цепи иммуноглобулинов (immunoglobulin heavy chain variable region — *IGHV*) является важнейшим прогностическим фактором при В-клеточном хроническом лимфоцитарном лейкозе (далее в тексте — ХЛЛ). Еще в 1999 г. в двух независимых исследованиях было продемонстрировано, что у больных с генами *IGHV* без мутаций (нм-ХЛЛ), то есть при 98—100% сходства с герминальным геном, течение заболевания было крайне агрессивным и характеризовалось коротким временем до начала терапии, плохим ответом на химиотерапию и низкой общей выживаемостью. Напротив, в случаях с мутированными генами *IGHV* (м-ХЛЛ), то есть при сходстве с герминальным геном менее 98%, наблюдалась индолентная форма заболевания с хорошим ответом на терапию [108—110]. Пороговое значение 98% гомологии для разделения на клинические варианты нм-ХЛЛ/м-ХЛЛ было выбрано с целью исключения потенциальных полиморфизмов в герминальных генах *IGHV* [111]. Также исследования последних лет показали, что более трети пациентов с ХЛЛ имеют (квази)идентичные иммуноглобулиновые рецепторы, названные стереотипными. Было выявлено, что больные, отнесенные к одной и той же подгруппе стереотипных антигенных рецепторов (САР), демонстрируют схожие биологические особенности и, как следствие, одинаковое клиническое течение заболевания [112—118]. Принадлежность к некоторым таким подгруппам (CLL#2, CLL#8) является дополнительным фактором прогноза при ХЛЛ. Таким образом, определение мутационного статуса генов *IGHV* и стереотипии В-клеточного рецептора важно не только для общей оценки течения заболевания при ХЛЛ, но и для принятия терапевтических решений [119—121]. В настоящее время исследование мутационного статуса генов *IGHV* при ХЛЛ является обязательным в международной клинической практике, а также включено в действующие в РФ клинические рекомендации, одобренные Научно-практическим советом Минздрава РФ (при других лимфопролиферативных заболеваниях оно достоверной прогностической значимости не имеет) [122—125].

Важно отметить, что исследование генов *IGHV* следует выполнять однократно, в дебюте заболевания перед назначением терапии либо в рецидиве, если оно не было выполнено ранее. Исключением могут быть ситуации, когда необходимо подтвердить трансформацию

Рихтера либо при подозрении на другое лимфопролиферативное заболевание. Оптимальным является исследование периферической крови, взятой в стерильную вакуумную пробирку с антикоагулянтом ЭДТА (K_2 ЭДТА и K_3 ЭДТА пригодны равнозначно), минимальный объем — 5 мл. Содержание опухолевых лимфоцитов в образце должно быть не менее 5×10^9 /л и не менее 50% от общего количества лейкоцитов. Также возможно проведение анализа в костном мозге или биоптате лимфоузла при низком содержании опухолевых клеток в периферической крови.

Европейская исследовательская инициатива по изучению ХЛЛ (ERIC) рекомендует проводить амплификацию исследуемых фрагментов генов *IGHV* с помощью праймеров к лидерному региону, так как только в этом случае можно получить полную нуклеотидную последовательность гена и наиболее достоверно определить степень соматической гипермутации [123]. Тем не менее в некоторых случаях (низкая опухолевая нагрузка, предшествующая терапия, биологические особенности), когда амплификация клонального продукта с лидерных праймеров невозможна, допустимо использование праймеров к каркасному региону VH-FWR1 (которые рутинно применять не рекомендуется).

Секвенирование, в общем случае, производится методом Сэнгера, в настоящее время достаточно широко доступным. В редких случаях, когда данная методика не работает (высокий поликлональный фон, наличие двух перестроек с генами *IGHV* из одного семейства), возможно применение ВПС при наличии данной технологии в лаборатории.

Анализ и интерпретация результатов производятся с помощью инструмента IMGT/V-QUEST международной информационной системы IMGT — ImMunoGeneTics (www.imgt.org) [126].

В стандартных случаях (при обнаружении единственной перестройки) указывается процент идентичности исследуемого перестроенного гена и аллеля *IGHV* и его ближайшего герминального аналога. Классификация: нм-ХЛЛ $\geq 98\%$; м-ХЛЛ $< 98\%$. Хотя случаи в диапазоне 97—97,9% формально считаются м-ХЛЛ, их рекомендуют описывать как «пограничные»: следует проявлять особую осторожность в отношении точных прогностических выводов, и полученный результат необходимо рассматривать в совокупности с другими клиническими данными.

Также ERIC рекомендует каждый случай исследовать на принадлежность к основным подгруппам CAP. Особое внимание следует уделить подгруппе CLL#2, так как значительное число этих случаев имеет менее 98% сходства с герминальным геном, и при обычных условиях о

них бы следовало сообщить как о м-ХЛЛ. Тем не менее в настоящее время точно установлено, что пациенты, относящиеся к данной подгруппе САР, имеют значительно худшее течение заболевания, аналогично пациентам с нм-ХЛЛ и пациентам с нарушениями гена *TP53* [124]. Также повышенного внимания требуют случаи из подгруппы CLL#8, так как для них очень высок риск трансформации Рихтера [124]. Среди других САР для лечащих докторов может быть актуальной информация о наличии рецептора CLL#1 (ассоциация с агрессивным течением заболевания) и CLL#4 (напротив, индолентная форма ХЛЛ). Для определения стереотипии BCR используется онлайн-инструмент ARResT/Assign-Subsets [127].

Возможны случаи обнаружения у пациента одновременно нескольких перестроек генов *IGHV*. В таком случае результаты следует интерпретировать следующим образом:

- Продуктивная + непродуктивная перестройки — как в стандартных случаях, мутационный статус *IGHV* определяется продуктивной перестройкой.
- Две продуктивные перестройки с совпадающим статусом — как в стандартном случае.
- Две или более продуктивные перестройки с несовпадающим статусом — мутационный статус не определен (со своей стороны мы рекомендуем дообследовать пациента на наличие дополнительного лимфопролиферативного заболевания).

В случае обнаружения единичной непродуктивной перестройки мутационный статус *IGHV* также считается не определенным.

Приблизительно в 4—10% случаев ХЛЛ у пациентов обнаруживаются две перестройки (как правило, продуктивная и непродуктивная), в основе которых лежат гены *IGHV* одного семейства. В таких случаях секвенирование по Сэнгеру является нерезультативным, и выдается ответ «мутационный статус *IGHV* не определен». Однако при наличии технологии ВПС в лаборатории такие случаи разрешаются и анализируются аналогично вышеизложенным.

Таким образом, последовательность генов *IGHV* является идеальным клональным маркером для ХЛЛ: она определяется в момент появления каждого клона при ХЛЛ и, в отличие от других маркеров, остается стабильной во времени и не зависит от развития заболевания. Современные данные подтверждают важную прогностическую ценность иммуногенетического исследования при ХЛЛ и одновременно подчеркивают необходимость перехода от простого анализа мутационного статуса генов *IGHV* к определению стереотипии В-клеточного рецептора.

Молекулярно-генетическое исследование гена *TP53* методом секвенирования при В-клеточном хроническом лимфоцитарном лейкозе и других онкогематологических заболеваниях

Нарушения в гене *TP53* наблюдаются при всех видах злокачественных новообразований у человека и в большинстве случаев ассоциируются с резистентностью к стандартным методам терапии и наиболее неблагоприятным клиническим исходом [128, 129]. Среди онкогематологических заболеваний неблагоприятное влияние aberrаций *TP53* наиболее хорошо изучено при В-клеточном хроническом лимфоцитарном лейкозе (ХЛЛ), исследование мутационного статуса *TP53* включено в международные и отечественные рекомендации по терапии ХЛЛ для улучшения стратификации пациентов по степени риска и оптимизации терапии [130, 131].

Ранние исследования показали, что у больных ХЛЛ, имеющих del 17p, значительно снижена общая выживаемость по сравнению с пациентами с другими частыми для этого заболевания цитогенетическими нарушениями, такими как del 11q, tris 12 или del 13q [132]. Инактивация локуса *TP53*, обусловленная del 17p, часто связана с мутациями во втором аллеле этого гена. При этом мутации *TP53* могут выявляться и в отсутствие del 17p у значительного числа пациентов, что также ассоциируется с неблагоприятным исходом, сходным с наблюдаемым у больных ХЛЛ с del 17p [133—136]. Необходимость исследования мутационного статуса данного гена при ХЛЛ подтверждается огромным числом работ [136—140], показывающих резистентность к иммунохимиотерапии у пациентов, имеющих aberrации *TP53*. Прогностическое значение нарушений *TP53* в наши дни все более возрастает с появлением таргетных препаратов, в частности ингибиторов сигнального пути В-клеточного рецептора и антиапоптотических белков семейства BCL2, имеющих высокую эффективность у пациентов с дефектами *TP53*.

Также все больше доказательств о необходимости молекулярно-генетического исследования гена *TP53* появляется и при других гематологических опухолях. Так, например, больные мантийноклеточной лимфомой моложе 65 лет с мутациями в гене *TP53* расцениваются как пациенты крайне высокого риска, и для них рекомендуется оценка возможности выполнения алло-ТГСК в первой ремиссии после интенсивной индукционной терапии [141]. Современные классификации ВОЗ и ELN выделяют ОМЛ и МДС с нарушениями *TP53* в отдельные подгруппы высокого риска [55, 142]. Для других заболеваний данный

биомаркер еще не вошел в рутинную диагностическую практику, однако активно изучается.

Молекулярно-генетическое исследование *TP53* следует проводить перед началом первой и всех последующих линий терапии, так как возможно появление новых аномалий при рецидивах [143]. Возможны ситуации, когда анализ мутаций *TP53* не является необходимым, например когда использование соответствующих таргетных препаратов невозможно в связи с сопутствующими заболеваниями или недоступностью препарата, а также в случае уже задокументированной аберрации *TP53* (del 17p).

Для большинства пациентов с ХЛЛ оптимальным материалом является периферическая кровь, взятая в стерильную вакуумную пробирку с антикоагулянтом ЭДТА. Однако очень важным фактором, влияющим на результат исследования, является количество опухолевых клеток в крови, и это особенно актуально в случаях с низким количеством лимфоцитов (менее 10 тыс/мкл и/или менее 60–70% лимфоцитов в периферической крови). Такая ситуация обычно наблюдается при лимфоме из малых лимфоцитов. В таких случаях (а также при ОМЛ/МДС, В-мелкоклеточной лимфоме и других гематологических опухолях) альтернативным вариантом может быть материал, богатый опухолевыми клетками, например костный мозг, биоптат лимфатических узлов или другой биопсийный материал. Использование биоптатов, заключенных в парафиновые блоки (FFPE), возможно только в случае отсутствия свежего материала, поскольку в процессе фиксации тканей ДНК часто деградирует, что значительно усложняет исследование и зачастую приводит к появлению артефактов [144–146]. Поэтому любые варианты мутаций, обнаруженные в образцах ДНК из материала FFPE, должны быть подтверждены независимой ПЦР и тщательно проверены с использованием рекомендованных баз данных (описанных ниже) перед их непосредственной интерпретацией и выдачей заключения об определении мутации.

Для анализа рекомендуется использовать геномную ДНК, так как исследование РНК может привести к потере вариантов нонсенс-мутаций и мутаций сайтов сплайсинга [147]. Регион секвенирования гена *TP53* должен включать, как минимум, ДНК-связывающий домен и домен олигомеризации (экзоны 4–10), так как именно в них наблюдается наибольшее число мутаций. Оптимальным является анализ всей кодирующей области (экзоны 2–11) [148]. Кроме того, область исследования должна захватывать не менее +2/–2 интронных нуклеотидов, так как в них возможны мутации, нарушающие сайты сплайсинга и приводящих к трансляции неактивных белков. Возможно

применение двух технологий — классического секвенирования (методом Сэнгера) или ВПС.

Секвенирование методом Сэнгера в настоящее время является относительно дешевым, широко распространенным методом, который позволяет работать с индивидуальными образцами. Однако его значимым минусом является довольно низкая чувствительность — при его использовании невозможно обнаружить варианты с аллельной нагрузкой менее 10—15%. В данном случае необходимо проводить секвенирование исследуемых ампликонов строго в двух направлениях и тщательно исследовать полученные хроматограммы. Оптимальным программным обеспечением для анализа данных секвенирования гена *TP53* по Сэнгеру является онлайн-инструмент GLASS, созданный группой «TP53 network» в составе ERIC, позволяющий определять соматические мутации и получать стандартизированный в соответствии с рекомендациями Общества изучения вариаций генома человека (HGVS) результат [149, 150].

Секвенирование следующего поколения для анализа *TP53* может проводиться как в качестве отдельного исследования, так и в составе панели на несколько генов. Допустимы технологии как на основе создания ампликонов, так и на базе таргетного обогащения. При разработке собственных праймеров для библиотек на основе ампликонов необходимо убедиться, что праймеры могут эффективно покрывать сайты сплайсинга и не содержат потенциальных однонуклеотидных полиморфизмов. Существенным преимуществом ВПС перед секвенированием по Сэнгеру является возможность обнаружения субклонов с аллельной нагрузкой до 1%, однако при этом рекомендуется использование высокоточных ДНК-полимераз и уникальных молекулярных идентификаторов, чтобы снизить частоту субклональных артефактов. Для уверенной выдачи заключения минимальное покрытие (глубина секвенирования) должно быть не менее 100 прочтений для любого нуклеотида в интересующих регионах, а число прочтений, содержащих те или иные варианты, должно быть не менее 10. В идеале для лаборатории, заявляющей порог чувствительности обнаружения мутаций в 2%, покрытие должно составлять 1000—2000 прочтений.

Выявленные варианты должны быть описаны с использованием нomenclатуры HGVS, для стандартизации результатов предпочтительнее использовать транскрипт LRG_321.t1 (NM_000546.5). Полученные результаты рекомендуется проверять с помощью специализированного онлайн-инструмента Seshat, созданного на основе базы данных UMD TP53 [151]. Данный инструмент помогает пользователю создать полное описание каждого варианта в соответствии с HGVS, оценить их патогенность в соответствии с общими алгоритмами прогнозирования

и алгоритмами, разработанными специально для анализа гена *TP53*, а также получить функциональные и структурные данные для каждого варианта.

В отчет для лечащих врачей в обязательном порядке включаются все варианты, охарактеризованные в базе данных как патогенные / вероятно патогенные. Распространенные полиморфизмы и доброкачественные варианты вносить в заключение не следует (либо следует указать на их распространенность и доброкачественность).

При обнаружении редких вариантов, а также вариантов неясного значения рекомендуется повторить исследование для исключения аналитических ошибок. Если результат подтвержден, в отчете следует указать, что его значение неясно.

Замены, влияющие на сайты сплайсинга (+2/–2 интронных нуклеотида), считаются патогенными, поскольку они приводят к aberrантному сплайсингу мРНК. Значение остальных интронных мутаций не изучено, поэтому о них не следует сообщать в рутинной клинической практике, если только их функциональное влияние не доказано на уровне РНК или белка путем подтверждения наличия aberrантных транскриптов или укороченных белковых продуктов (что крайне редко выполняется в диагностических лабораториях).

При обнаружении синонимичных вариантов необходимо проверить в базе данных их потенциальное влияние на сплайсинг. Если такового влияния нет, о синонимичном варианте сообщать не нужно.

Инсерции и делеции, приводящие к образованию преждевременного стоп-кодона (варианты со смещением рамки считывания), а также инсерции внутри рамки считывания в пределах ДНК-связывающего домена рассматриваются как вероятно патогенные.

При обнаружении мутаций с аллельной нагрузкой, близкой к 50% (за исключением известных полиморфизмов), необходимо исследовать заведомо неопухолевый материал пациента на предмет герминальности полученного варианта.

При использовании технологии ВПС возможно обнаружение мутаций *TP53* с аллельной нагрузкой менее 10%. Важно понимать, что при интерпретации аллельной нагрузки не учитывается процентное соотношение опухолевых клеток в образце (особенно при работе с биоптатами тканей), а также возможная потеря в них фрагментов 17-й хромосомы. В настоящее время вопрос о клинической значимости обнаружения таких клонов остается открытым. Согласно рекомендациям ERIC, «диагностическим» порогом для ВПС также является порог чувствительности секвенирования по Сэнгеру (около 10%) [129]. Тем не менее о результатах с аллельной нагрузкой 5–10% также можно сообщить лечащему врачу, однако в заключении обязательно следует уточ-

нить, что клиническая значимость данного результата неизвестна в связи с малым количеством исследований в этой области.

Таким образом, нарушения в гене *TP53* при ХЛЛ и других онкогематологических заболеваниях тесно связаны с крайне неблагоприятным прогнозом и рефрактерностью к терапии, поэтому исследование мутационного статуса данного гена становится неотъемлемой частью рутинной молекулярно-генетической диагностики.

Исследование мутаций генов *BTK* и *PLCG2* у больных В-клеточным хроническим лимфолейкозом с резистентностью к ковалентным ингибиторам ВТК

Ингибиторы тирозинкиназы Брутона (иТКБ) показали высокую эффективность при лечении В-клеточного хронического лимфоцитарного лейкоза (далее в тексте — ХЛЛ) [152—159], в частности ибрутиниб, изменивший тактику лечения больных ХЛЛ. В настоящее время ибрутиниб является одним из ключевых эффективных препаратов в терапии рецидивирующего или рефрактерного ХЛЛ, а также в терапии 1-й линии, как в монорежиме, так и в комплексе с другими препаратами [131]. У большей части больных ХЛЛ ибрутиниб вызывает стойкие ремиссии, однако у некоторых больных развивается резистентность к этим препаратам, что приводит к прогрессии заболевания и неэффективности лечения. По данным Byrd et al. [154], в когорте больных с рецидивирующим или рефрактерным ХЛЛ, получавших ибрутиниб в качестве монотерапии, частота прогрессирования спустя 30 месяцев терапии составила 69%. По литературным данным, примерно у 80% больных с рецидивом ХЛЛ при резистентности к ибрутинибу обнаруживаются мутации в генах *BTK* и *PLCG2* [155, 160, 161], а у остальных 20% больных причина появления резистентности к ибрутинибу до сих пор не изучена [155, 162—164].

Ибрутиниб необратимо связывается с цистеином в кодоне 481 (Cys481) активного центра тирозинкиназы Брутона (ВТК), таким образом обеспечивая ее ингибирование и последующее блокирование сигналов активации выживания клеток ХЛЛ через путь NF-κB [165—168]. У больных это приводит к высокой частоте клинического ответа и длительной ремиссии. Передача сигналов В-клеточного рецептора (В cell receptor — BCR) имеет огромное значение для нормального развития В-клеток и адаптивного иммунитета. При некоторых В-клеточных лейкозах и лимфомах выживание и пролиферация опухолевых клеток обеспечивается за счет усиления антиапоптотических

сигналов через BCR [169, 170]. Мутации в кодоне С481 гена *BTK* приводят к утрате ковалентного взаимодействия ВТК с ибрутинибом, быстрому восстановлению активности фермента и, как следствие, прогрессии заболевания.

Рефрактерность к ибрутинибу в большинстве случаев связана с мутацией С481S в 15-м экзоне гена *BTK*, что соответствует заменам с.1441Т>А и с.1442G>С в гене *BTK* [155, 160, 162]. Однако встречаются и другие варианты мутаций гена в этом положении, такие как С481R (с.1441Т>С), С481F (с.1442G>Т), С481Y (с.1442G>А) [160, 165, 171]. Описаны и другие мутации в 11-м и 16-м экзонах гена *BTK*, такие как Т316А и L528W [160, 162, 169], а также в гене *PLCG2* (19, 20, 24-й экзоны), такие как р. L845F, R665W, S707Y и другие [165, 171–175], которые потенциально могут приводить к рефрактерности.

Исследование целесообразно только для тех больных ХЛЛ в рецидиве, которые получают терапию ибрутинибом. Проведение анализа возможно в периферической крови, костном мозге или биоптате лимфоузла. Выделение геномной ДНК из ядерных клеток крови или костного мозга больных осуществляется с помощью метода солевой экстракции [176].

Самые распространенные мутации С481S/F/Y/R в 15-м экзоне гена *BTK* исследуются с помощью тест-системы на основе аСПЦР-РВ. Для определения мутаций в 15-м экзоне гена *BTK* методом аСПЦР геномную ДНК амплифицируют в 7 отдельных реакциях с использованием праймеров, специфичных к гену *BTK* (для нормальных аллелей — с.1441Т; с.1442G; для мутантных аллелей — с.1441Т>А; с.1441Т>С; с.1442G>С; с.1442G>Т; с.1442G>А) с помощью ПЦР-системы реального времени «CFX 96 Touch» (Bio-Rad, USA) или «Rotor-Gene Q» (Qiagen, USA).

Все остальные мутации детектируются с помощью ВПС, и рассчитываются частоты аллельных вариантов (VAF). Фрагменты выбранных экзонов генов *BTK* (11, 15, 16 экзоны) и *PLCG2* (19, 20, 24 экзоны) амплифицируются с помощью специфичных праймеров для всех образцов. Полученный амплификат используется для приготовления библиотеки секвенирования с помощью наборов «Nextera XT DNA Library Prep» и «Nextera XT Index Kit v2» (Illumina, США) согласно инструкции производителя. Секвенирование проводят на генетическом анализаторе «MiSeq» (Illumina, США). Фильтрация данных, удаление служебных последовательностей, картирование прочтений, поиск и аннотирование вариантов осуществляется при помощи утилит Trimmomatic [177], BWA [178], SAMtools [179], Vardict [180] и Annovar [181].

Для определения наличия или отсутствия мутаций, а также для оценки относительной аллельной нагрузки мутаций в исследуемых об-

разцах с помощью асПЦР проводят сравнение кривых амплификаций и значений C_t нормального и мутантных аллелей и рассчитывают ΔC_t : образцы с высокой относительной аллельной нагрузкой ($\Delta C_t -3 \div 3$), с низкой относительной аллельной нагрузкой ($\Delta C_t 4 \div 7$) и образцы без мутаций ($\Delta C_t > 7$). Полученные отрицательные значения ΔC_t означают преобладание мутантного аллеля над нормальным аллелем.

Большинство мутаций в кодоне С481 гена *ВТК* у пациентов с рецидивом ХЛЛ детектируются спустя 2 года терапии ВТКи. Рекомендуется проводить регулярный мониторинг мутаций в генах *ВТК* и/или *PLCG2* с помощью асПЦР и ВПС каждые 3—6 месяцев начиная со второго года лечения данными препаратами у больных с ХЛЛ. Мониторинг мутаций и определение относительной аллельной нагрузки у больных с ХЛЛ до рецидива при лечении ВТКи позволит получить больше информации о времени появления мутаций. Своевременное выявление мутаций до клинического рецидива может быть основанием для изменения тактики лечения. Исследование мутационного статуса генов *ВТК* и *PLCG2* у пациентов с рефрактерным ХЛЛ, получающих терапию ВТКи, может помочь в разработке новых терапевтических стратегий.

Исследование свободно циркулирующей ДНК при гематологических новообразованиях

Изучение свободно циркулирующей ДНК (сцДНК) различных биологических жидкостей, в частности плазмы крови, при гематологических заболеваниях приобретает в последние годы все больший интерес. О существовании сцДНК известно уже достаточно давно. У человека впервые сцДНК и РНК выделена из плазмы здоровых доноров в 1948 г. [182], а первые исследования сцДНК у пациентов с опухолевыми заболеваниями датируются 1977 г. [183]. В 1997 г. сцДНК впервые исследована у пациентов с В-клеточными лимфопролиферативными заболеваниями (В-лимфомы и В-ОЛЛ) [184], в качестве маркера опухоли использовали клональные реаранжировки генов тяжелой цепи Ig, в качестве метода исследования — полиакриламидный гель-электрофорез: у 86% пациентов до лечения выявлена опухолевая сцДНК (соДНК), которая быстро элиминировалась после лечения, а персистенция соДНК была связана с резистентным течением и ранним рецидивом.

На сегодняшний день известно, что сцДНК представляет собой двухцепочечные фрагменты молекул ДНК, составляющие в длину в среднем от 130 до 170 п. н. и предположительно являющиеся результатом фрагментации нуклеосом гемопоэтических клеток нуклеазами

[185]. У пациентов с опухолевыми заболеваниями ссДНК в основном высвобождается в процессе апоптоза опухолевых клеток, а также некроза опухолевых клеток и путем активной клеточной секреции [186]. При этом показано, что высокая концентрация ссДНК не специфична для злокачественных новообразований. Повышение концентрации ссДНК также отмечается после интенсивных физических нагрузок [187], при инфекционных [188] и аутоиммунных заболеваниях [189].

За последнее десятилетие ссДНК была исследована при разных типах лимфом. Именно для лимфом исследование ссДНК представляет особый интерес, поскольку лимфомы являются крайне гетерогенными опухолями с большим генетическим разнообразием и различными исходами даже в рамках одного гистологического диагноза и протекают без поражения костного мозга и крови (относительно легкодоступных материалов для исследования молекулярно-генетических особенностей опухолевых клеток). Золотым стандартом диагностики лимфом является гистологическое исследование в сочетании с иммуногистохимическим анализом биоптата опухоли [190], однако исследование одного пораженного участка не отражает клональной гетерогенности опухоли в целом, в то время как различные опухолевые клоны реагируют на лечение по-разному и напрямую влияют на выживание пациентов. Кроме того, оценка эффективности лечения большинства лимфом основана на данных ПЭТ/КТ, имеющей серьезное ограничение — высокую частоту ложноположительных результатов, обусловленных воспалительными/инфекционными осложнениями и гиперплазией тимуса [191, 192], особенно у молодых пациентов.

Полученные в ходе исследований ссДНК и соДНК данные были использованы с целью получения информации о генетической гетерогенности опухоли при лимфомах и миеломе, для классификации лимфом, мониторинга во время лечения, прогнозирования рецидива и для оценки кривых выживаемости [193—214]. Такой подход представляется весьма актуальным, учитывая невозможность проведения повторных биопсий остаточных опухолевых образований после лечения, а также биопсии опухолевых образований различных локализаций у пациентов с распространенными стадиями лимфом. Тот же принцип оправдывает использование ссДНК при множественной миеломе, учитывая ее генетическую гетерогенность.

Однако следует помнить о том, что ввиду крайне малого количества ссДНК (и тем более соДНК) в плазме крови — из 3 мл крови можно выделить около 12 нг ссДНК — для исследования этих молекул требуются высокочувствительные и специфичные методы, а также особые

условия забора крови и срочная доставка в лабораторию для быстрой обработки материала (плазма должна быть отделена от клеток крови в течение не более 6 часов [44]). Минимальный объем крови, который требуется для выделения адекватного количества сцДНК — 10 мл (приблизительно 4—6 мл плазмы) [215—217]. Длительное хранение крови, интенсивное перемешивание крови в пробирке с антикоагулянтом после забора, тонкие иглы для венозного доступа приводят к разрушению клеток крови, повышению концентрации геномной ДНК в плазме крови и деградации сцДНК [215].

Наиболее приемлемыми методами для исследования сцДНК являются методы с применением ПЦР (асПЦР и цифровая капельная ПЦР) и ВПС [218]. В качестве мишени для исследования могут использоваться все те же маркеры, которые применяются при диагностике на опухолевом материале, — однонуклеотидные замены, короткие инсерции/делеции, химерные транскрипты, Т- и В-клеточная клональность, STR-профили и др. Методы с применением ПЦР экономически эффективны, относительно просты в использовании, дают быстрый результат, однако чаще всего пригодны для определения только одной мишени и могут служить для контроля МОБ на терапии (например, *MYD88* L265P при первичной лимфоме ЦНС, макроглобулинемии Вальденстрема, диффузной В-крупноклеточной лимфоме), но не для исследования генетической гетерогенности опухоли. Чувствительность метода, вероятнее всего, не превышает 0,5% (то есть можно выявить 1 молекулу сцДНК из 200 нормальных молекул сцДНК). Технология ВПС позволяет выполнить массовое параллельное секвенирование молекулы ДНК. В качестве универсальной опухолевой мишени для оценки МОБ при В-клеточных лимфомах могут использоваться клональные реаранжировки генов иммуноглобулинов (*Ig*). Исследование перестроек генов *Ig* может быть выполнено при помощи ВПС, а также при помощи ПЦР с последующим фрагментным анализом. Чувствительность этих методов также около 0,1—0,5% (1 из 100—200 нормальных). Наибольшее количество данных о сцДНК и сцДНК при помощи этих методов получено у пациентов с диффузной В-крупноклеточной лимфомой [194, 196—199, 202—204], но также есть данные при фолликулярной лимфоме [195—197], мантийноклеточной лимфоме [208], лимфоме Ходжкина [209—212], периферической Т-клеточной лимфоме [213, 214], первичной лимфоме ЦНС [201], множественной миеломе [195, 220, 221] и других гематологических заболеваниях, таких как Ph-негативные МПН [222], макроглобулинемия Вальденстрема [223], МДС, ОМЛ [224, 225] и др.

Учитывая описанную выше чувствительность методов для исследования сцДНК и особые требования к крови, из которой будет выпол-

нено выделение сцДНК, к отрицательному результату исследования соДНК следует относиться с осторожностью.

Отрицательный результат может свидетельствовать об отсутствии опухоли, но нельзя исключить:

- наличие опухолевых очагов на ранних стадиях пролиферации или капсулированных опухолевых очагов;
- вероятность деградации сцДНК до фрагментов слишком малого размера, недостаточного для выявления того или иного молекулярно-генетического таргета;
- избыток геномной сцДНК (воспаление, параллельный аутоиммунный процесс, химиотерапевтическое воздействие на здоровые клетки и др.) или неправильные условия забора крови и транспортировки в лабораторию.

Положительный результат свидетельствует о наличии опухоли и может быть использован для диагностики и определения прогноза.

Мониторинг химеризма после аллогенной трансплантации костного мозга методом STR-ПЦР

Анализ коротких tandemных повторов (short tandem repeats, STR) в настоящее время является самым удобным рутинным методом мониторинга химеризма благодаря высокой информативности за счет мультиаллельности локусов STR. В настоящее время хорошо изучены аллельные спектры более чем 5 тысяч локусов STR и выбраны наиболее универсальные информативные панели STR, подходящие как для судебной медицины, так и для мониторинга химеризма [226].

Принцип метода мультиплексной STR-ПЦР — в одной пробирке идет амплификация ДНК-мишеней локусов, находящихся обычно на разных хромосомах, при этом длина ампликонов находится в определенном диапазоне от 80 до 450 пар нуклеотидов. Праймеры для этих локусов помечены разными флуоресцентными красителями, что позволяет разнести ампликоны, близкие по длине, по разным каналам детекции флуоресценции. Амплифицированный продукт фракционируется при помощи капиллярного электрофореза. Детектор флуоресценции регистрирует интенсивность сигнала от каждого ампликона, а добавление в пробы размерного стандарта позволяет затем с помощью программного обеспечения получить STR-профиль, состоящий из ряда ампликонов вычисленной длины. Обработка данных проводится с помощью различных версий программного обеспечения GeneMapper®, GeneMarker® и других. Относительный количественный анализ доли маркеров реципиента/донора в образце отражает

долю ядерных клеток реципиента/донора в исследуемом материале пациента после алло-ТГСК [227]. Статус химеризма классифицируется следующим образом: «полный химеризм», когда выявляется только генотип донора; «смешанный химеризм», когда генотипы донора и реципиента выявляются совместно и генотип реципиента составляет не менее 1%; «микрохимеризм», когда генотип реципиента ниже 1%; и «расщепленный или сплит-химеризм», когда одновременно существует одна или несколько клеточных популяций реципиента и донора [228]. Чувствительность данного метода составляет от 1—5% в разных условиях, поэтому принято считать полным донорским химеризмом показатель от 95% донора в исследуемом образце [227, 229]. Метод STR-ПЦР — информативный, воспроизводимый при кросс-лабораторных исследованиях, не требующий построения калибровочных кривых или постановки контролей при каждом последующем мониторинге.

Уникальные маркеры для определения химеризма выявляются при сравнении профилей STR реципиента и донора (рис. 7). Поэтому обязательным первым шагом перед выполнением алло-ТГСК является выделение ДНК из клеток периферической крови / костного мозга реципиента и донора [230].

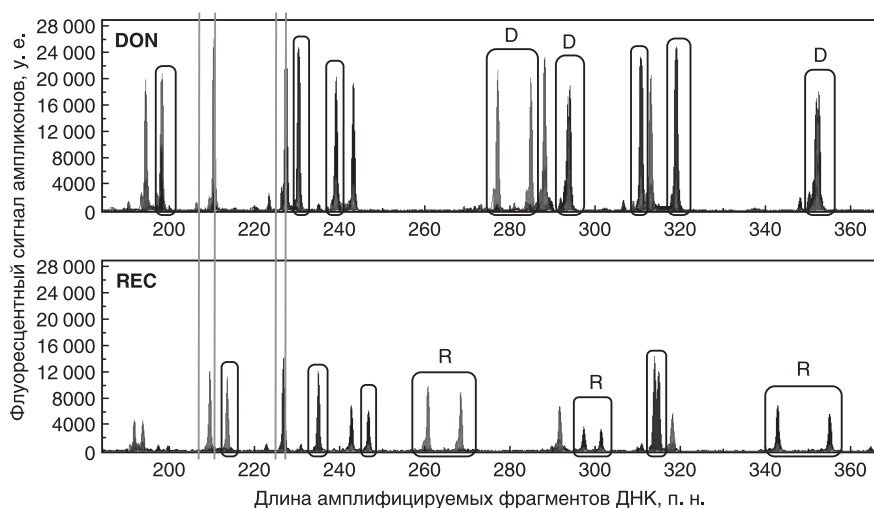


Рисунок 7. Выбор информативных маркеров реципиента и донора для последующего мониторинга химеризма (собственные данные авторов). Представлена электрофореграмма ПЦР-продуктов, полученных в мультиплексной STR-ПЦР. DON — STR-профиль донора; REC — STR-профиль реципиента; D — уникальные маркеры донора, отсутствующие у реципиента; R — уникальные маркеры реципиента.

Для проведения первичного исследования в ПЦР достаточно взять небольшое количество ДНК $\sim 1\text{--}5$ нг, однако для детекции минорной ДНК в образцах, анализируемых на химеризм, количество ДНК должно быть увеличено [231]. Важно, чтобы ДНК реципиента была получена из его здоровых клеток. Нельзя использовать в качестве референса реципиента ДНК из материала, содержащего большое количество бластов. В опухолевой ДНК часто наблюдается потеря гетерозиготности, проявляющаяся в исчезновении одного из аллелей в гетерозиготном STR-локусе [232] (рис. 8).

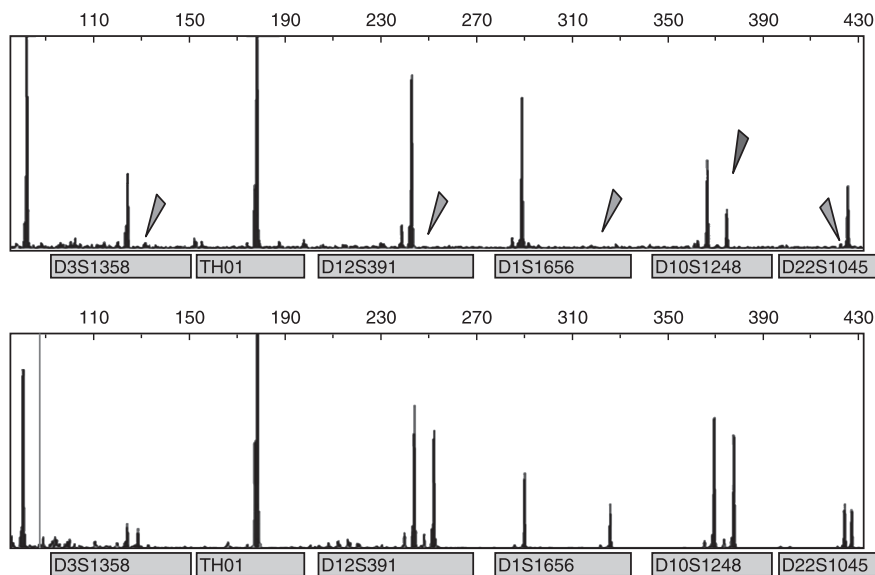


Рисунок 8. STR-профили ДНК одного пациента, полученные в дебюте заболевания (верхний трек) и в ремиссии (нижний трек) (собственные данные авторов). Стрелки указывают на утраченные в опухоли маркеры реципиента.

Крайне нежелательно использовать в качестве источника референсной ДНК буккальный эпителий пациента, собранный уже после трансплантации. Буккальный соскоб содержит, помимо эпителия, примесь лейкоцитов, причем доля лейкоцитов в соскобе непрогнозируема и колеблется от пациента к пациенту и от пробы к пробе, что после трансплантации может значительно осложнить поиск информативных маркеров реципиента (рис. 9) [233, 234].

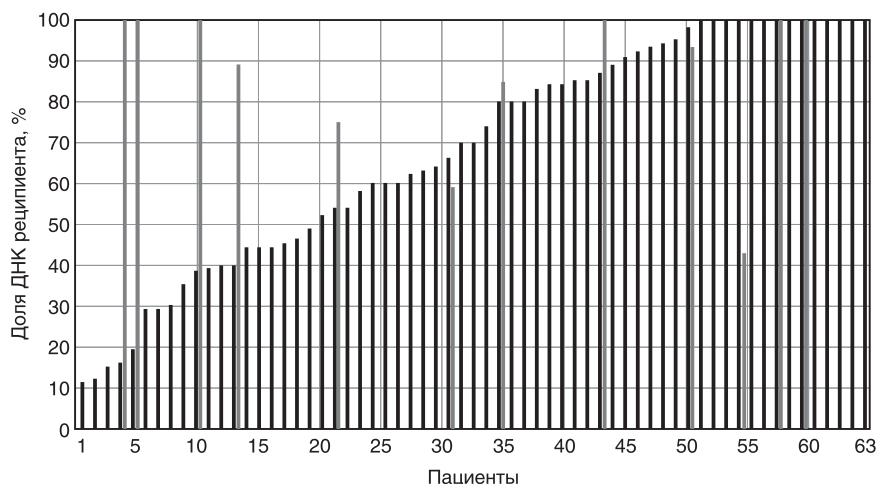


Рисунок 9. Диаграмма распределения доли ДНК реципиента в буккальном эпителии в когорте из 63 пациентов после алло-ТГСК [234]. Черные столбики отражают долю ДНК реципиента (%) в первичном измерении, серые столбики — у некоторых пациентов в повторном измерении через месяц.

Мониторинг химеризма в костном мозге или периферической крови пациента проводят на 30, 60, 90, 120, 180, 360-й дни после трансплантации, далее ежегодно в течение 5—10 лет в зависимости от клинического протокола. Необходимо заметить, что у части пациентов при мониторинге не совпадают значения химеризма в костном мозге и периферической крови, поэтому заменять один материал другим для данного анализа не рекомендуется [235, 236].

Расчет химеризма осуществляется по следующим формулам в зависимости от комбинаций аллелей донора и реципиента в STR-локусе [237] (рис. 10).

Наиболее точной калькуляция химеризма будет по маркерам, в которых все аллели донора и реципиента являются информативными (на рисунке 12 первые четыре варианта). В случае частичного совпадения аллелей донора и реципиента, что характерно для трансплантаций от гаплоидентичного донора, калькуляция химеризма будет менее точной за счет возможной неравноценной у донора и реципиента преимущественной амплификации одного из аллелей гетерозиготного локуса. По возможности рекомендуется использовать 3 или более маркеров, так как это позволяет сравнивать результаты и рассчитывать среднее значение. При правильной постановке всех этапов анализа и корректном выборе референсного материала дискордантность значений химе-

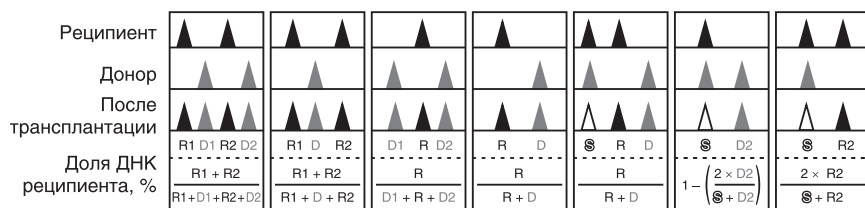


Рисунок 10. Формулы для расчета химеризма в зависимости от комбинации аллелей донора и реципиента [237]. R — информативные маркеры реципиента (черные); D — информативные маркеры донора (серые); S — неинформативные маркеры, совпадающие у донора и реципиента (полые).

ризма по разным локусам практически исключена. Расчет коэффициента вариации ($CV = \text{стандартное отклонение} / \text{среднее} \times 100$) общего % химеризма — это простой способ измерения вариативности между STR-маркерами. Коэффициент вариации ($CV \leq 5\%$) должен быть получен с использованием минимум 3 STR-маркеров.

Если получен $CV > 5\%$, то есть значения химеризма, рассчитанные по разным маркерам, отличаются от среднего арифметического значения более чем на 5%, должно быть проведено дальнейшее исследование STR-маркеров и определена причина дискордантности. В первую очередь из расчета необходимо исключить информативные маркеры донора, сопровождаемые побочными продуктами реакции (статтер-пики), совпадающими с информативными маркерами реципиента [237] (рис. 11).

Также необходимо проверить, находится ли высота полученных пиков флуоресценции ампликонов в рабочем диапазоне детекции флуоресценции прибора. Если флуоресцентный сигнал превышает рабочий диапазон, то высота пика флуоресценции может быть автоматически скорректирована до верхней границы этого диапазона. Таким образом, мажорные пики будут искусственно занижены, что приведет к завышению доли минорных пиков и гипердиагностике смешанного химеризма. Наилучшие условия для корректного расчета химеризма — минимальный флуоресцентный сигнал от минорного пика вдвое превышает порог шума, установленный в настройках секвенатора, флуоресцентный сигнал от мажорного пика флуоресценции более чем в 200 раз превышает порог шума и при этом находится в рабочем диапазоне детекции флуоресценции прибора. Предел чувствительности исследования химеризма методом STR-PCR в таких условиях составляет от 1%. Если мажорные пики значительно ниже, минорные пики невозможно детектировать [238]. И всегда необходимо помнить, что если по одному информативному маркеру мы получаем смешанную химеру,

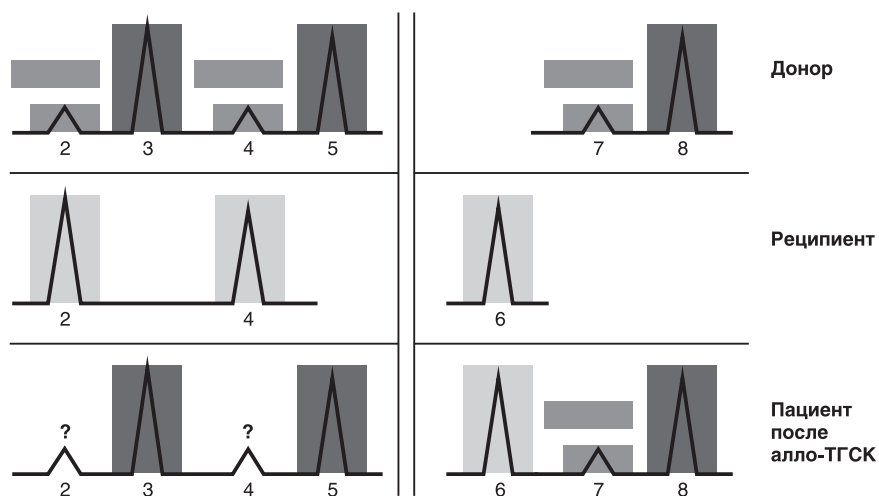


Рисунок 11. Схема локусов со статтер-пиками, нежелательных (слева) и приемлемых (справа) для калькуляции химеризма [237]. Статтер-пики, дополнительно отмеченные плашками сверху (2 и 4) при информативных маркерах донора (3 и 5), совпадают по длине с информативными маркерами реципиента (2 и 4). Статтер-пик (7) при маркере донора (8) не совпадает с маркером реципиента (6) и не мешает калькуляции химеризма.

а по другому полный донорский химеризм и все вышеперечисленные факторы, дающие ошибку калькуляции, исключены, то причиной discordантности может быть потеря гетерозиготности в рецидиве, а также делеция одного из двух одинаковых аллелей в гомозиготном локусе (рис. 12).

Мониторинг химеризма после второй и последующих трансплантаций от новых доноров желательно проводить, опираясь на референсные STR-профили как актуального, так и предыдущих доноров (рис. 13 и 14). В случае смешанной химеры с тремя генотипами формулы для расчета химеризма необходимо скорректировать с учетом вклада каждого кровотока.

Подтверждение сингенности (монозиготности) близнецов донора и реципиента методом STR-ПЦР

Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) от сингенного донора — редкий вид ТГСК. Отсутствие показаний для назначения иммуносупрессивной терапии, низкий риск отторжения трансплантата, а также развития реакции «трансплантат против хозяина»

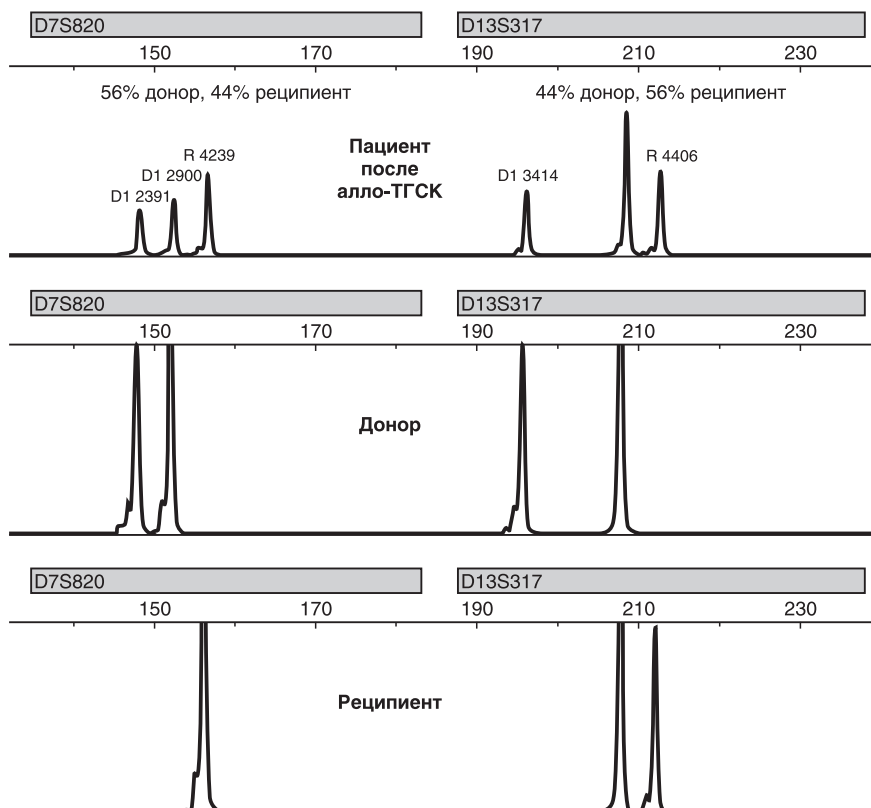


Рисунок 12. Пример дискордантности значений химеризма, определенных по двум STR-локусам у пациента с рецидивом В-ОЛЛ и моносомией по 7-й хромосоме по данным цитогенетического анализа. R, D1 – информативные маркеры реципиента и донора соответственно. Высоты информативных пиков в условных оптических единицах представлены непосредственно над пиками. По локусу D13S317 доля реципиента в смешанной химере 56%, донора — 44%. По локусу D7S820, расположенному на 7-й хромосоме, доля реципиента в смешанной химере 44%, донора — 56%. Объясняется дискордантность тем, что в опухолевых клетках благодаря моносомии по 7-й хромосоме амплифицируется только один оставшийся аллель из двух гомозиготных (собственные данные авторов).

являются преимуществами этого вида трансплантации. Подтверждение сингенности (монозиготности) близнецов донора и реципиента также осуществляется методом STR-ПЦР. При условии совпадения всех аллелей во всех исследуемых локусах STR-панели дается заключение о монозиготности близнецов (рис. 15).

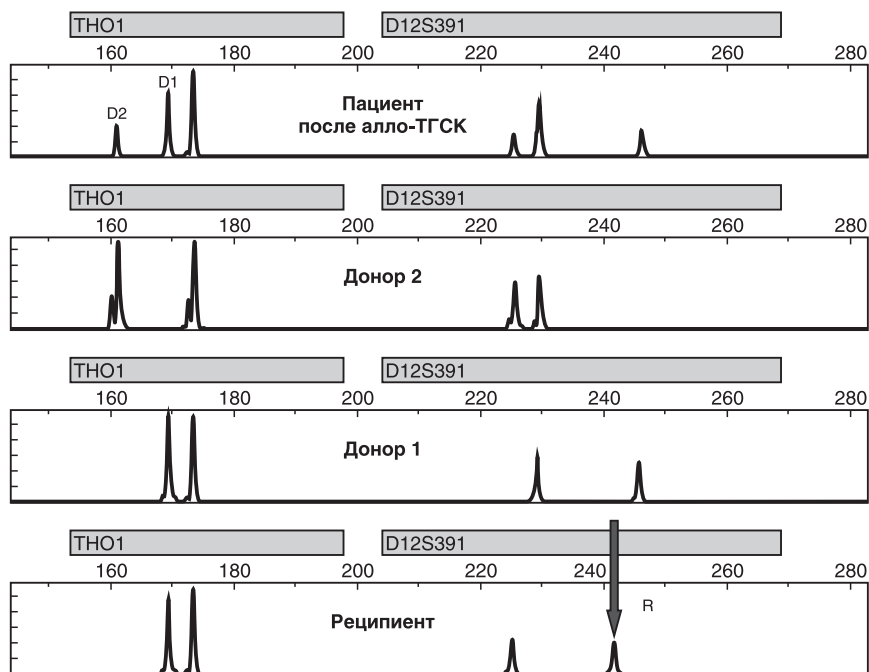


Рисунок 13. Смешанный химеризм в костном мозге пациента после трансплантации от второго донора (верхний трек). Выявлена химера из двух донорских генотипов. Маркеры реципиента отсутствуют (локус D12S391, справа). Доля первого донора $[D1/(D1+D2)]$ определяется по локусу THO1 (слева) (собственные данные авторов).

Ложноположительное заключение практически исключено. Нами было подсчитано, что вероятность случайного совпадения всех аллелей у дизиготных близнецов при использовании всех 19 маркеров панели COrDIS Plus составляет менее 10^{-13} . Для исключения ложноотрицательной оценки необходимо использовать в анализе ДНК из здоровых клеток, так как в опухолевой ДНК весьма вероятно изменение STR-профиля реципиента [232]. Дальнейший мониторинг химеризма в случае сингенной трансплантации невозможен ввиду отсутствия индивидуальных молекулярных маркеров [239, 240].

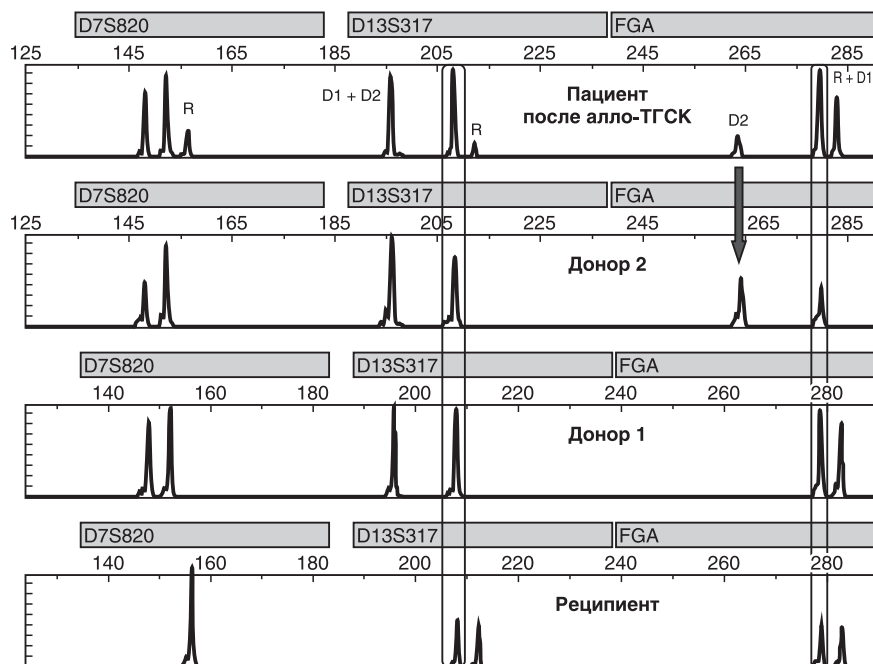


Рисунок 14. Смешанный химеризм в костном мозге пациента после трансплантации от второго донора (верхний трек). Выявлена химера из двух донорских и хозяйского генотипов с преобладанием первого донора. Долю реципиента удобно вычислить по локусу D13S317 (в середине) $[R/(R + D1 + D2)]$. Долю донора 2 удобно вычислить по локусу FGA (справа) $[D2/(D2 + R + D1)]$ (собственные данные авторов). Неинформативный аллель, общий для двух доноров и реципиента, выделен рамкой.

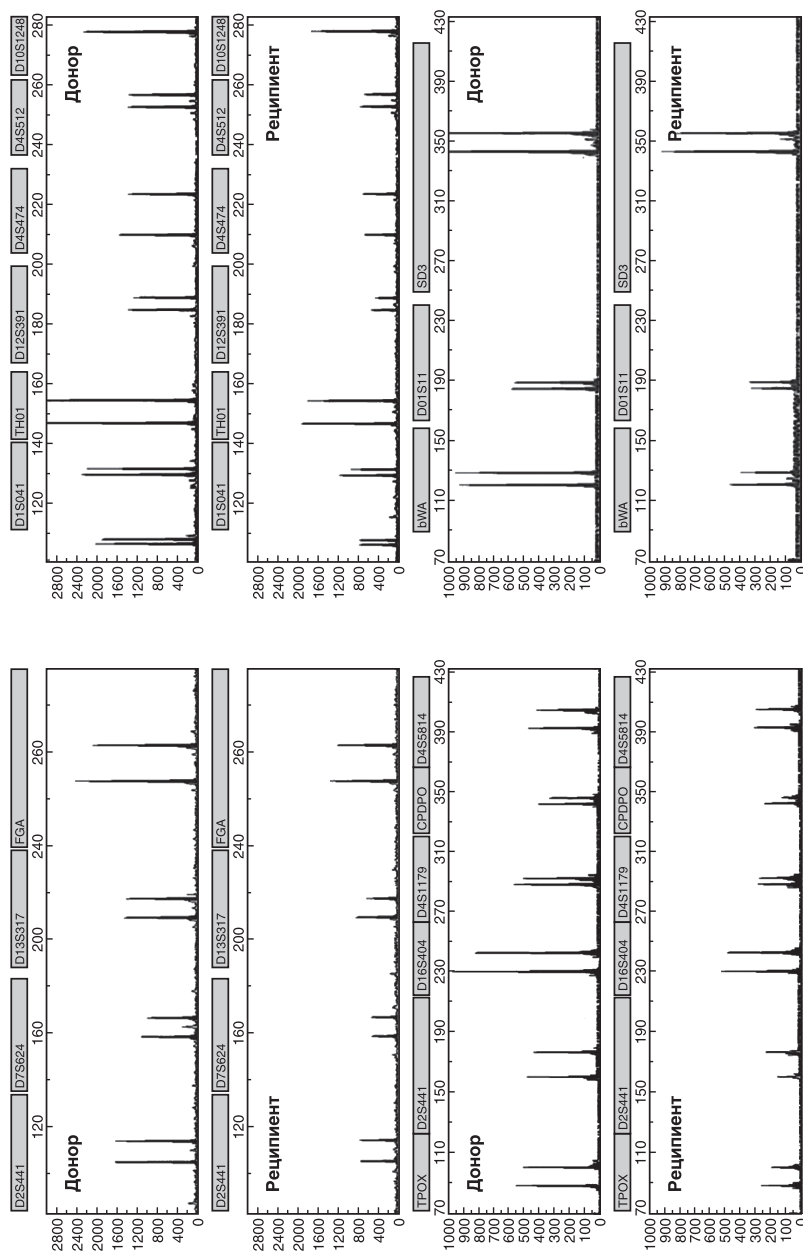


Рисунок 15. Генетические профили сингенных близнецов совпадают по всем STR-локусам (собственные данные авторов).

Литература

1. Chomczynski P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques* 1993; 15(3): 532—534, 536—537.
2. Esser KH, Marx W, Lisowsky T. MaxXbond: first regeneration system for DNA binding silica matrices. *Nat Methods* 2006; 3(1):1—2. DOI:10.1038/nmeth845.
3. van Dongen JJ, Macintyre E, Gabert J et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia* 1999; 13(12):1901—1928. DOI: 10.1038/sj.leu.2401592.
4. Beillard E, Pallisgaard N, van der Velden V et al. Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using ‘real-time’ quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) — a Europe against cancer program. *Leukemia* 2003; 17(12):2474—2486. DOI: 10.1038/sj.leu.2403136.
5. Gabert J, Beillard E, van der Velden V et al. Standardization and quality control studies of ‘real-time’ quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia — a Europe Against Cancer program. *Leukemia* 2003; 17(12):2318—2357. DOI: 10.1038/sj.leu.2403135.
6. Cross N, White H, Mueller M et al. Standardized definitions of molecular response in chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 2012; 26:2172—2175. DOI: 10.1038/leu.2012.104.
7. Цаур Г. А., Ольшанская Ю. В., Обухова Т. Н. и др. Цитогенетическая и молекулярно-генетическая диагностика онкогематологических заболеваний: позиция организации молекулярных генетиков в онкологии и онкогематологии. *Гематология и трансфузиология* 2023; 68(1):129—143.
8. Клинические рекомендации № 496 «Острые лимфобластные лейкозы». URL: https://cr.minzdrav.gov.ru/schema/496_1.
9. Клинические рекомендации № 129 «Агрессивные нефолликулярные лимфомы — диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома, первичная медиастинальная В-клеточная лимфома, лимфома Беркитта». URL: https://cr.minzdrav.gov.ru/schema/129_2.
10. Клинические рекомендации № 141 «Лимфома маргинальной зоны». URL: https://cr.minzdrav.gov.ru/schema/137_1.
11. Клинические рекомендации № 132 «Миелодиспластический синдром». URL: https://cr.minzdrav.gov.ru/schema/141_1.
12. Клинические рекомендации № 142 «Хронический миелоидный лейкоз». URL: [\[https://cr.minzdrav.gov.ru/schema/142_1\]](https://cr.minzdrav.gov.ru/schema/142_1).
13. Клинические рекомендации № 144 «Множественная миелома». URL: https://cr.minzdrav.gov.ru/schema/144_1.
14. Клинические рекомендации № 130 «Волосатоклеточный лейкоз». URL: https://cr.minzdrav.gov.ru/schema/130_1.

15. Клинические рекомендации № 140 «Макроглобулинемия Вальденстрема». URL: https://cr.minzdrav.gov.ru/schema/140_1.
16. Клинические рекомендации «Ph-негативные миелопролиферативные заболевания». URL: https://npngo.ru/biblioteka/klinicheskie_rekomendatsii__2022_god_?page=3.
17. Клинические рекомендации «Мастоцитозы». URL: https://npngo.ru/biblioteka/klinicheskie_rekomendatsii__2022_god_?page=2.
18. Kwok PY. Methods for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2001; 2:235—58. DOI: 10.1146/annurev.genom.2.1.235.
19. Kwok PY, Chen X. Detection of single nucleotide polymorphisms. *Curr Issues Mol Biol* 2003; 5(2):43—60. DOI: 10.21775/cimb.005.043.
20. Wertheim GB, Hexner E, Bagg A. Molecular-based classification of acute myeloid leukemia and its role in directing rational therapy: personalized medicine for profoundly promiscuous proliferations. *Mol Diagn Ther* 2012; 16(6):357—69. DOI: 10.1007/s40291-012-0009-0.
21. Matsuda K. PCR-based detection methods for single-nucleotide polymorphism or mutation: Real-time PCR and its substantial contribution toward technological refinement. *Adv Clin Chem* 2017; 80:45—72. DOI: 10.1016/bs.acc.2016.11.002.
22. Пичковская В. А., Февралева И. С., Ибрагимова М. М. и др. Детекция YMDD-мутации в ДНК вируса гепатита В с помощью аллель-специфической полимеразной цепной реакции. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология* 2004; 1:27—29.
23. Типы real-time PCR. URL: http://molbiol.ru/protocol/12_07_02.html.
24. Gorodetskiy VR, Sidorova YV, Ryzhikova NV et al. Rheumatology international. analysis of a single-institution cohort of patients with Felty's syndrome and T-cell large granular lymphocytic leukemia in the setting of rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 2021; 41(1):147—156.
25. Sidorova YV, Chernova NG, Kovrigina AM et al. Sensitivity quantitative allele specific RHOA G17V PCR for diagnosis, staging and minimal residual disease assessment in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *J Hematol Res* 2018; 5:6—15.
26. Чернова Н. Г., Сидорова Ю. В., Смирнова С. Ю. и др. Молекулярная диагностика ангиоиммунобластной Т-клеточной лимфомы. *Терапевтический архив* 2019; 91(7):63—69.
27. Сидорова Ю. В., Чернова Н. Г., Городецкий В. Р. и др. Точечные мутации генов STAT3 и STAT5B при Т-клеточном лейкозе из больших гранулированных лимфоцитов. *Вестник гематологии* 2019; 15(2):56—57.
28. Gorodetskiy V, Sidorova Y, Biderman B et al. STAT3 mutations in «gray-zone» cases of T-cell large granular lymphocytic leukemia associated with autoimmune rheumatic diseases. *Front Med (Lausanne)* 2022; 9:1000265. DOI: 10.3389/fmed.2022.1000265.
29. Burmeister T, Meyer C, Gröger D et al. Evidence-based RT-PCR methods for the detection of the 8 most common MLL aberrations in acute leukemias. *Leuk Res* 2015; 39(2):242—247. DOI: 10.1016/j.leukres.2014.11.017.

30. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162(1): 156—159.
31. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc* 2006; 1(2):581—585.
32. Февралева И. С., Глинщикова О. А., Сидорова Ю. В. и др. К вопросу о подборе праймеров контрольного гена для адекватной оценки экспрессии химерных транскриптов. *Гематология и трансфузиология* 2022; 67(2):313.
33. van der Velden VH, Hochhaus A, Cazzaniga G et al. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia* 2003; 17(6):1013—1034. DOI: 10.1038/sj.leu.2402922.
34. van Dongen JJ, Langerak AW, Brüggemann M et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia* 2003; 17(12): 2257—2317.
35. Сидорова Ю. В., Никитин Е. А., Пекло М. и др. Опыт использования полимеразной цепной реакции для определения Т-клеточной клональности. *Терапевтический архив* 2003; 75(7):48—52.
36. Сидорова Ю. В. Т-клеточная клональность в диагностике лимфопролиферативных заболеваний. Дис. ... канд. мед. наук. — М., 2004.
37. Никитин Е. А., Сидорова Ю. В., Рыжикова Н. В. и др. Определение Т-клеточной клональности по гамма-цепи Т-клеточного рецептора: окончательные данные. *Терапевтический архив* 2006; 78(7):52—57.
38. Evans PA, Pott Ch, Groenen PJ et al. Significantly improved PCR-based clonality testing in B-cell malignancies by use of multiple immunoglobulin gene targets. Report of the BIOMED-2 Concerted Action BHM4-CT98-3936. *Leukemia* 2007; 21(2):207—214.
39. Brüggemann M, White H, Gaulard P et al. Powerful strategy for polymerase chain reaction-based clonality assessment in T-cell malignancies Report of the BIOMED-2 Concerted Action BHM4 CT98-3936. *Leukemia* 2007; 21(2): 215—221.
40. van Dongen JJ, van der Velden VH, Brüggemann M, Orfao A. Minimal residual disease diagnostics in acute lymphoblastic leukemia: need for sensitive, fast, and standardized technologies. *Blood* 2015; 125(26):3996—4009.
41. Смирнова С. Ю., Сидорова Ю. В., Рыжикова Н. В. и др. Эволюция опухолевых клонов при остром лимфобластном лейкозе взрослых. *Acta Naturae* 2016; 8(4):108—118.
42. Смирнова С. Ю. Клональные реаранжировки генов тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов и генов Т-клеточного рецептора у пациентов с заболеваниями системы крови. Дис. ... канд. мед. наук. — М., 2019.
43. Langerak AW, Molina TJ, Lavender FL et al. Polymerase chain reaction-based clonality testing in tissue samples with reactive lymphoproliferations: usefulness and pitfalls. A report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia* 2007; 21(2):222—229.

44. Сидорова Ю. В., Никулина Е. Е., Чернова Н. Г. и др. Определение клональности методом ПЦР при ангиоиммуобластной Т-клеточной лимфоме. Клиническая онкогематология 2014; 7(2):192—196.
45. Сидорова Ю. В., Рыжикова Н. В., Смирнова С. Ю. и др. Определение В-клеточной клональности при лимфоме Ходжкина. Клиническая онкогематология 2014; 7(1):63—66.
46. Hebeda KM, Van Altena MC, Rombout P et al. PCR clonality detection in Hodgkin lymphoma. J Hematop 2009; 2(1):34—41.
47. Burack WR, Laughlin TS, Friedberg JW et al. PCR assays detect B-lymphocyte clonality in formalin-fixed, paraffin-embedded specimens of classical Hodgkin lymphoma without microdissection. Am J Clin Pathol 2010; 134(1):104—111.
48. Сидорова Ю. В., Чернова Н. Г., Рыжикова Н. В. и др. Клональные реаранжировки и опухолевые клоны при периферической Т-клеточной лимфоме. Acta Naturae 2015; 7(3):130—140.
49. Sidorova Y, Chernova N, Yakutik I, Smirnova SY. Quantitative allele-specific PCR for RHOA GLY17VAL mutation and T-cell clonality analysis in patients with angioimmunoblastic T-cell lymphoma. Oncohematology 2018; 12(4): 41—49.
50. Сидорова Ю. В., Никитин Е. А., Меликян А. Л. и др. Определение Т-клеточной клональности при инфекционном мононуклеозе методом ПЦР-SSCP-TCRγ. Гематология и трансфузиология 2004; 49(6):1—7.
51. Smirnova SJ, Sidorova JV, Biderman BV et al. Expansion of CD8+ cells in autoimmune hemolytic anemia. Autoimmunity 2016; 49(3):147—154.
52. Sidorova YV, Sychevskaya KA, Chernova NG et al. High incidence of clonal CD8+ T-cell proliferation in non-malignant conditions may reduce the significance of T-cell clonality assay for differential diagnosis in oncohematology. Clin Lymphoma Myeloma Leuk 2020; 20(4):203—208.
53. Клинические рекомендации № 131 «Острые миелоидные лейкозы». URL: https://cr.minzdrav.gov.ru/schema/131_1.
54. Клинические рекомендации № 586 «Острые миелоидные лейкозы. Дети». URL: https://cr.minzdrav.gov.ru/schema/586_1.
55. Döhner H, Wei AH, Appelbaum FR et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN. Blood 2022; 140(12):1345—1377. DOI: 10.1182/blood.2022016867.
56. Pollyea DA, Altman JK, Assi R et al. Acute myeloid leukemia, version 3.2023, NCCN clinical practice guidelines in oncology. J Natl Compr Canc Netw 2023; 21(5):503—513. DOI: 10.6004/jncn.2023.0025.
57. Kim Y, Lee GD, Park J et al. Quantitative fragment analysis of FLT3-ITD efficiently identifying poor prognostic group with high mutant allele burden or long ITD length. Blood Cancer J 2015; 5(8):e336. DOI: 10.1038/bcj.2015.61.
58. Benthaus T, Schneider F, Mellert G et al. Rapid and sensitive screening for CEBPA mutations in acute myeloid leukaemia. Br J Haematol 2008; 143(2): 230—239. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2008.07328.x.
59. De Kouchkovsky I, Abdul-Hay M. Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update. Blood Cancer J 2016; 6(7):e441. DOI: 10.1038/bcj.2016.50.

60. Abou Dalle I, Ghorab A, Patel K et al. Impact of numerical variation, allele burden, mutation length and co-occurring mutations on the efficacy of tyrosine kinase inhibitors in newly diagnosed FLT3-mutant acute myeloid leukemia. *Blood Cancer J* 2020; 10(5):48. DOI: 10.1038/s41408-020-0318-1.
61. Biggio V, Renneville A, Nibourel O et al. French alfa group. Recurrent in-frame insertion in C/EBPalpha TAD2 region is a polymorphism without prognostic value in AML. *Leukemia* 2008; 22(3):655—657. DOI: 10.1038/sj.leu.2404926.
62. Клинические рекомендации № 132 «Острый промиелоцитарный лейкоз». URL: https://cr.minzdrav.gov.ru/schema/132_1.
63. Kayser S, Kramer M, Martínez-Cuadrón D et al. Characteristics and outcome of patients with core-binding factor acute myeloid leukemia and FLT3-ITD: results from an international collaborative study. *Haematologica* 2022; 107(4): 836—843. DOI: 10.3324/haematol.2021.278645.
64. Döhner H, Estey E, Grimwade D et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood* 2017; 129(4):424—447. DOI: 10.1182/blood-2016-08-733196.
65. Capelli D, Menotti D, Fiorentini A et al. Overcoming resistance: FLT3 inhibitors past, present, future and the challenge of cure. *Cancers (Basel)* 2022; 14(17): 4315. DOI: 10.3390/cancers14174315.
66. Horak P, Griffith M, Danos AM et al. Standards for the classification of pathogenicity of somatic variants in cancer (oncogenicity): Joint recommendations of Clinical Genome Resource (ClinGen), Cancer Genomics Consortium (CGC), and Variant Interpretation for Cancer Consortium (VICC). *Genet Med* 2022; 24(5):986—998. DOI: 10.1016/j.gim.2022.01.001.
67. Preston CG, Wright MW, Madhav Rao R et al. ClinGen Variant Curation Interface: a variant classification platform for the application of evidence criteria from ACMG/AMP guidelines. *Genome Med* 2022; 14(1):6. DOI: 10.1186/s13073-021-01004-8.
68. Luo X, Feurstein S, Mohan S et al. ClinGen Myeloid Malignancy Variant Curation Expert Panel recommendations for germline RUNX1 variants. *Blood Adv* 2019; 3(20):2962—2979.
69. Wei H, Liu X, Wang Y et al. Optimized clinical application of minimal residual disease in acute myeloid leukemia with RUNX1-RUNX1T1. *Exp Hematol* 2021; 96:63—72.e3. DOI: 10.1016/j.exphem.2021.01.007.
70. Heuser M, Freeman SD, Ossenkoppele GJ et al. Update on MRD in acute myeloid leukemia: a consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party. *Blood* 2021; 138(26):2753—2767. DOI: 10.1182/blood.2021013626.
71. Сидорова Ю. В., Северина Н. А., Бидерман Б. В. и др. Мониторинг мутации FLT3-ITD методом TD-PCR. *Вестник гематологии* 2021; 17(2):78.
72. Клинические рекомендации № 529 «Острый лимфобластный лейкоз. Дети». URL: https://cr.minzdrav.gov.ru/schema/529_1.
73. Клинические рекомендации № 496 «Острые лимфобластные лейкозы». URL: https://cr.minzdrav.gov.ru/schema/496_1.
74. Trinquand A, Tanguy-Schmidt A, Ben Abdelali R et al. Toward a NOTCH1/FBXW7/RAS/PTEN-based oncogenetic risk classification of adult T-cell acute

- lymphoblastic leukemia: a Group for Research in Adult Acute Lymphoblastic Leukemia study. *J Clin Oncol* 2013; 31(34):4333—42. DOI: 10.1200/JCO.2012.48.5292.
75. Taj M, Moorman A, Hamadeh L et al. Prognostic value of oncogenetic mutations in pediatric T acute lymphoblastic leukemia: a comparison of UKALL2003 and FRALLE2000T protocols. *Leukemia* 2022; 36(1):263—266. DOI: 10.1038/s41375-021-01334-x.
76. Arber D, Orazi A, Hasserjian R et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 2016; 27(20):2391—2405. DOI: 10.1182/blood-2016-03-643544.
77. Alaggio R, Amador C, Anagnostopoulos I et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms. *Leukemia* 2022; 36(7):1720—1748. DOI: 10.1038/s41375-022-01620-2.
78. Arber DA, Orazi A, Hasserjian RP et al. International Consensus Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemias: integrating morphologic, clinical, and genomic data. *Blood* 2022; 140(11):1200—1228. DOI: 10.1182/blood.2022015850.
79. Den Boer ML, van Slegtenhorst M, De Menezes RX, et al. A subtype of childhood acute lymphoblastic leukaemia with poor treatment outcome: a genome-wide classification study. *The Lancet Oncology* 2009; 10(2):125-134. DOI: 10.1016/S1470-2045(08)70339-5.
80. Mullighan CG, Su X, Zhang et al. Deletion of IKZF1 and prognosis in acute lymphoblastic leukemia. *New Engl J Med* 2009; 360(5):470—480. DOI: 10.1056/nejmoa0808253.
81. Boer J, Marchante J, Evans W et al. BCR-ABL1-like cases in pediatric acute lymphoblastic leukemia: a comparison between DCOG/Erasmus MC and COG/St. Jude signatures. *Haematologica* 2015; 100(9):e354—357. DOI: 10.3324/haematol.2015.124941.
82. Roberts K, Morin R, Zhang J et al Genetic alterations activating kinase and cytokine receptor signaling in high-risk acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell* 2012; 22(2):153—166. DOI: 10.1016/j.ccr.2012.06.005.
83. Boer J, Steeghs E, Marchante J et al. Tyrosine kinase fusion genes in pediatric BCR-ABL1-like acute lymphoblastic leukemia. *Oncotarget* 2017; 8(3): 4618—4628. DOI: 10.18632/oncotarget.13492.
84. Harvey R, Mullighan C, Wang X et al. Identification of novel cluster groups in pediatric high-risk B-precursor acute lymphoblastic leukemia with gene expression profiling: correlation with genome-wide DNA copy number alterations, clinical characteristics, and outcome. *Blood* 2010; 116(23):4874—4884. DOI: 10.1182/blood-2009-08-239681.
85. Roberts KG, Gu Z, Payne-Turner D et al. High frequency and poor outcome of Philadelphia chromosome-like acute lymphoblastic leukemia in adults. *J Clin Oncol* 2017; 35(4):394—401. DOI: 10.1200/jco.2016.69.0073.
86. Цаур Г. А., Ольшанская Ю. В., Друй А. Е. BCR-ABL1-подобный острый лимфобластный лейкоз у детей. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2019; 18(1):112—126. DOI: 10.24287/1726-1708-2019-18-1-112-126.

87. Stanulla M, Dagdan E, Zaliouva M et al. IKZF1plus defines a new minimal residual disease-dependent very-poor prognostic profile in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 2018; 36(12):1240—1249. DOI: 10.1200/JCO.2017.74.3617.
88. Heuck G. Zwei Falle von Leukämie mit eigenthümlichem Blut- resp. Knochenmarksbefund (Two cases of leukemia with peculiar blood and bone marrow findings, respectively). *Arch Pathol Anat Physiol Virchows* 1879; 78:475—496.
89. Vaquez H. Sur une forme speciale de cyanose s'accompagnant d'hyperglobulie excessive et peristente (On a special form of cyanosis accompanied by excessive and persistent erythrocytosis). *C R Soc Biol (Paris)* 1892; 4:384—388.
90. Di Guglielmo G. Recherche di ematologia. I. Un caso di eritroleucemia. Megacariociti in circolo e loro funzione piastrinopoietico. *Folia Med (Pavia)* 1917; 13:386.
91. Epstein E, Goedel A. Hamorrhagische Thrombozythämie bei vascularer Schrumpfmilz (Hemorrhagic thrombocythemia with a vascular, sclerotic spleen). *Virchows Archiv A Pathol Anat Histopathol* 1934; 293:233—248.
92. Dameshek W. Some speculations on the myeloproliferative syndromes. *Blood* 1951; 6(4):372—375.
93. Adamson JW, Fialkow PJ, Murphy S et al. Polycythemia vera: stem-cell and probable clonal origin of the disease. *N Engl J Med* 1976; 295(17):913—916.
94. James C, Ugo V, Le Couédic JP et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* 2005; 434(7037): 1144—1148.
95. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ et al; Cancer Genome Project. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 2005; 365(9464):1054—1061.
96. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 2005; 352(17):1779—1790.
97. Levine RL, Wadleigh M, Cools J et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* 2005; 7(4):387—397.
98. Pikman Y, Lee BH, Mercher T et al. MPL W515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS Med* 2006; 3(7):e270.
99. Scott LM, Tong W, Levine RL et al. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N Engl J Med* 2007; 356:459—468.
100. Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ et al. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *N Engl J Med* 2013; 369(25): 2391—2405.
101. Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS et al. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med* 2013; 369(25):2379—2390.
102. Araki M, Yang Y, Masubuchi N et al. Activation of the thrombopoietin receptor by mutant calreticulin in CALR-mutant myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2016; 127(10):1307—1316.
103. Nivarthi H, Chen D, Cleary C et al. Thrombopoietin receptor is required for the oncogenic function of CALR mutants. *Leukemia* 2016; 30(8):1759—1763.

104. Maddali M, Kulkarni UP, Ravindra N et al. Mutation profile in BCR-ABL1-negative myeloproliferative neoplasms: a single-center experience from India. *Hematol Oncol Stem Cell Ther* 2022; 15(2):13–20. DOI: 10.1016/j.hemonc.2021.03.002.
105. Guijarro-Hernández A, Vizmanos JL. A broad overview of signaling in Ph-negative classic myeloproliferative neoplasms. *Cancers* 2021; 13(5):984.
106. Arber DA, Tefferi A. International Consensus Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemias: integrating morphologic, clinical, and genomic data. *Blood* 2022; 140(11):1200–1228.
107. Makarik TV, Abdullaev AO, Nikulina EE et al. Low JAK2 V617F allele burden in Ph-negative chronic myeloproliferative neoplasms is associated with additional CALR or MPL gene mutations. *Genes* 2021; 12(4):559. DOI: 10.3390/genes12040559.
108. Damle RN, Wasil T, Fais F et al. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999; 94:1840–1847.
109. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A et al. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999; 94: 1848–1854.
110. Nikitin EA, Malakho SG, Biderman BV et al. Expression level of lipoprotein lipase and dystrophin genes predict survival in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Lymph Leuk* 2007; 48(5):912–922.
111. Ghia P, Stamatopoulos K, Belessi C et al. ERIC recommendations on IGHV gene mutational status analysis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2007; 21:1–3. DOI: 10.1038/sj.leu.2404457.
112. Malcikova J, Stalika E, Davis Z et al. The frequency of TP53 gene defects differs between chronic lymphocytic leukaemia subgroups harbouring distinct antigen receptors. *Br J Haematol* 2014; 166:621–625. DOI: 10.1111/bjh.12893.
113. Strefford JC, Sutton LA, Baliakas P et al. Distinct patterns of novel gene mutations in poor-prognostic stereotyped subsets of chronic lymphocytic leukemia: the case of SF3B1 and subset #2. *Leukemia* 2013; 27:2196–2199. DOI: 10.1038/leu.2013.98.
114. Kanduri M, Marincevic M, Halldorsdottir AM et al. Distinct transcriptional control in major immunogenetic subsets of chronic lymphocytic leukemia exhibiting subset-biased global DNA methylation profiles. *Epigenetics* 2012; 7: 1435–1442. DOI: 10.4161/epi.22901.
115. Marincevic M, Mansouri M, Kanduri M et al. Distinct gene expression profiles in subsets of chronic lymphocytic leukemia expressing stereotyped IGHV4-34 B-cell receptors. *Haematologica* 2010; 95:2072–2079. DOI: 10.3324/haematol.2010.028639.
116. Papakonstantinou N, Ntoufa S, Chartomatsidou E et al. Differential micro-RNA profiles and their functional implications in different immunogenetic subsets of chronic lymphocytic leukemia. *Mol Med* 2013; 19:115–123. DOI: 10.2119/molmed.2013.00005.
117. Maura F, Cutrona G, Mosca L et al. Association between gene and miRNA expression profiles and stereotyped subset #4 B-cell receptor in chronic lympho-

- cytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2015; 56:3150—3158. DOI: 10.3109/10428194.2015.1028051.
118. Rossi D, Spina V, Bomben R et al. Association between molecular lesions and specific B-cell receptor subsets in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2013; 121(24):4902—4905. DOI: 10.1182/blood-2013-02-486209.
119. Fischer K, Bahlo J, Fink AM et al. Long-term remissions after FCR chemoimmunotherapy in previously untreated patients with CLL: updated results of the CLL8 trial. *Blood* 2016; 127:208—215.
120. Rossi D, Terzi-di-Bergama L, De Paoli L et al. Molecular prediction of durable remission after first-line fludarabine-cyclophosphamide-rituximab in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2016; 126:1921—1924.
121. Thompson PA, Tam CS, O'Brien SM et al. Fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab treatment achieves long-term disease-free survival in IGHV-mutated chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2016; 127:303—309.
122. Agathangelidis A, Psomopoulos F, Stamatopoulos K. Stereotyped B cell receptor immunoglobulins in B cell lymphomas. *Methods Mol Biol* 2019; 1956: 139—155. DOI: 10.1007/978-1-4939-9151-8_7.
123. Rosenquist R, Ghia P, Hadzidimitriou A et al. Immunoglobulin gene sequence analysis in chronic lymphocytic leukemia: updated ERIC recommendations. *Leukemia* 2017; 31(7):1477—1481. DOI:10.1038/leu.2017.125.
124. Бидерман Б. В., Судариков А. Б. Гены иммуноглобулинов и стереотипные антигенные рецепторы при хроническом лимфолейкозе и других лимфопролиферативных заболеваниях. *Гематология и трансфузиология* 2023; 68(1):70—79. DOI: 10.35754/0234-5730-2023-68-1-70-79.
125. Клинические рекомендации № 134 «Хронический лимфоцитарный лейкоз / лимфома из малых лимфоцитов». URL: https://cr.minzdrav.gov.ru/recommend/134_1.
126. Brochet X, Lefranc MP, Giudicelli V. IMGT/V-QUEST: the highly customized and integrated system for IG and TR standardized V-J and V-D-J sequence analysis. *Nucleic Acids Res* 2008; 36(Web Server issue):W503—508. DOI: 10.1093/nar/gkn316.
127. Bystry V, Agathangelidis A, Bikos V et al; European Research Initiative on CLL. ARResT/AssignSubsets: a novel application for robust subclassification of chronic lymphocytic leukemia based on B cell receptor IG stereotypy. *Bioinformatics* 2015, 31(23):3844—3846. DOI: 10.1093/bioinformatics/btv456.
128. Sabapathy K, Lane DP. Therapeutic targeting of p53: all mutants are equal, but some mutants are more equal than others. *Nat Rev Clin Oncol* 2018; 15:13—30. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-22-0332.
129. Malcikova J, Tausch E, Rossi D et al. ERIC recommendations for TP53 mutation analysis in chronic lymphocytic leukemia — update on methodological approaches and results interpretation. *Leukemia* 2018; 32:1070—1080. DOI: 10.1038/s41375-017-0007-7.
130. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D et al. iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL. *Blood* 2018; 131(25):2745—2760. DOI: 10.1182/blood-2017-09-806398.

131. Никитин Е. А., Бялик Т. Е., Зарицкий А. Ю. и др. Хронический лимфоцитарный лейкоз/лимфома из малых лимфоцитов. Клинические рекомендации. Современная онкология 2020; 22(3):24—44. DOI: 10.26442/18151434.2020.3.200385. 5.
132. Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2000; 343:1910—1916. DOI: 10.1056/NEJM200012283432602.
133. Zenz T, Eichhorst B, Busch R et al. TP53 mutation and survival in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2010; 28:4473—4479. DOI: 10.1200/JCO.2009.27.8762.
134. Rossi D, Cerri M, Deambrogi C et al. The prognostic value of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia is independent of Del17p13: implications for overall survival and chemorefractoriness. *Clin Cancer Res* 2009; 15:995—1004. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-08-1630.
135. Zenz T, Krober A, Scherer K et al. Monoallelic TP53 inactivation is associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia: results from a detailed genetic characterization with long-term follow-up. *Blood* 2008; 112:3322—3329. DOI: 10.1182/blood-2008-04-154070.
136. Malcikova J, Smardova J, Rocnova L et al. Monoallelic and biallelic inactivation of TP53 gene in chronic lymphocytic leukemia: selection, impact on survival, and response to DNA damage. *Blood* 2009; 114:5307—5314. DOI: 10.1182/blood-2009-07-234708.
137. Dicker F, Herholz H, Schnittger S et al. The detection of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia independently predicts rapid disease progression and is highly correlated with a complex aberrant karyotype. *Leukemia* 2009; 23: 117—124. DOI: 10.1038/leu.2008.274.
138. Stengel A, Kern W, Haeflrich T et al. The impact of TP53 mutations and TP53 deletions on survival varies between AML, ALL, MDS and CLL: an analysis of 3307 cases. *Leukemia* 2017; 31:705—711. DOI: 10.1038/leu.2008.274.
139. Gonzalez D, Martinez P, Wade R et al. Mutational status of the TP53 gene as a predictor of response and survival in patients with chronic lymphocytic leukemia: results from the LRF CLL4 trial. *J Clin Oncol* 2011; 29:2223—2229. DOI: 10.1200/JCO.2010.32.0838.
140. Stilgenbauer S, Schnaiter A, Paschka P et al. Gene mutations and treatment outcome in chronic lymphocytic leukemia: results from the CLL8 trial. *Blood* 2014; 123:3247—3254. DOI: 10.1182/blood-2014-01-546150.
141. Lin RJ, Ho C, Hilden PD et al. Allogeneic haematopoietic cell transplantation impacts on outcomes of mantle cell lymphoma with TP53 alterations. *Br J Haematol* 2019; 184(6):1006—1010. DOI: 10.1111/bjh.15721.
142. Khoury JD, Solary E, Abla O et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. *Leukemia* 2022; 36:1703—1719. DOI: 10.1038/s41375-022-01613-1.
143. Pospisilova S, Gonzalez D, Malcikova J et al. ERIC recommendations on TP53 mutation analysis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2012; 26:1458—1461. DOI: 10.1038/leu.2012.25.

144. Oh E, Choi YL, Kwon MJ et al. Comparison of accuracy of whole-exome sequencing with formalin-fixed paraffin-embedded and fresh frozen tissue samples. *PLoS One* 2015; 10:e0144162. DOI: 10.1371/journal.pone.0144162.
145. Williams C, Pontén F, Moberg C et al. A high frequency of sequence alterations is due to formalin fixation of archival specimens. *Am J Pathol* 1999; 155: 1467—1471. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)65461-2.
146. Edlund K, Larsson O, Ameur A et al. Data-driven unbiased curation of the TP53 tumor suppressor gene mutation database and validation by ultradeep sequencing of human tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109:9551—9556. DOI: 10.1073/pnas.1200019109.
147. Lykke-Andersen S, Jensen TH. Nonsense-mediated mRNA decay: an intricate machinery that shapes transcriptomes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2015; 16:665—677. DOI: 10.1038/nrm4063.
148. Leroy B, Ballinger ML, Baran-Marszak F et al. Recommended guidelines for validation, quality control, and reporting of TP53 variants in clinical practice. *Cancer Res* 2017; 77:1250—1260. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-16-2179.
149. Pal K, Bystry V, Reigl T et al. GLASS: assisted and standardized assessment of gene variations from Sanger sequence trace data. *Bioinformatics* 2017; 33: 3802—3804. DOI: 10.1093/bioinformatics/btx423.
150. den Dunnen JT, Dalgleish R, Maglott DR et al. HGVS recommendations for the description of sequence variants: 2016 update. *Hum Mutat* 2016; 37:564—569. DOI: 10.1002/humu.22981.
151. Seshat. An innovative tool to handle somatic and germline TP53 variants. URL: <http://vps338341.ovh.net>.
152. Byrd JC, Furman RR, Coutre SE et al. Targeting BTK with ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2013; 369:32—42. DOI: 10.1056/NEJMoa1215637.
153. O'Brien S, Furman RR, Coutre SE et al. Ibrutinib as initial therapy for elderly patients with chronic lymphocytic leukaemia or small lymphocytic lymphoma: an open-label, multicentre, phase 1b/2 trial. *Lancet Oncol* 2014; 15:48—58. DOI: 10.1016/S1470-2045(13)70513-8.
154. Byrd JC, Furman RR, Coutre SE et al. Three-year follow-up of treatment-naïve and previously treated patients with CLL and SLL receiving single-agent ibrutinib. *Blood* 2015; 125:2497—2506. DOI: 10.1182/blood-2014-10-606038.
155. Woyach JA, Ruppert AS, Guinn D et al. BTKC481S-mediated resistance to ibrutinib in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2017; 35:1437—1443. DOI: 10.1200/JCO.2016.70.2282.
156. Byrd JC, Brown JR, O'Brien S et al. Ibrutinib versus ofatumumab in previously treated chronic lymphoid leukemia. *N Engl J Med* 2014; 371:213—223. DOI: 10.1056/NEJMoa1400376.
157. Burger JA, Tedeschi A, Barr P.M et al. Ibrutinib as initial therapy for patients with chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2015; 373:2425—2437. DOI: 10.1056/NEJMoa1509388.
158. Barr PM, Robak T, Owen C et al. Sustained efficacy and detailed clinical follow-up of first-line ibrutinib treatment in older patients with chronic lymphocytic

- tic leukemia: extended phase 3 results from RESONATE-2. *Haematologica* 2018; 103:1502—1510. DOI: 10.3324/haematol.2018.192328.
159. McDermott J, Jimeno A. Ibrutinib for the treatment of chronic lymphocytic leukemia and mantle cell lymphoma. *Drugs Today (Barc)* 2014; 50:291—300. DOI: 10.1358/dot.2014.50.4.2133570.
160. Ahn IE, Underbayev C, Albitar A et al. Clonal evolution leading to ibrutinib resistance in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2017; 129:1469—1479. DOI: 10.1182/blood-2016-06-719294.
161. Woyach JA, Furman RR, Liu TM et al. Resistance mechanisms for the Bruton's tyrosine kinase inhibitor ibrutinib. *N Engl J Med* 2014; 370:2286—2294. DOI: 10.1056/NEJMoa1400029.
162. Woyach JA, Bojnik E, Ruppert AS et al. Bruton's tyrosine kinase (BTK) function is important to the development and expansion of chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Blood* 2014; 123:1207—1213. DOI: 10.1182/blood-2013-07-515361.
163. Kadri S, Lee J, Fitzpatrick C et al. Clonal evolution underlying leukemia progression and Richter transformation in patients with ibrutinib-relapsed CLL. *Blood Adv* 2017; 1:715—727. DOI: 10.1182/bloodadvances.2016003632.
164. Burger JA, Landau DA, Taylor-Weiner A et al. Clonal evolution in patients with chronic lymphocytic leukaemia developing resistance to BTK inhibition. *Nat Commun* 2016; 7:11589. DOI: 10.1038/ncomms11589.
165. Sedlarikova L, Petrackova A, Papajik T et al. Resistance-associated mutations in chronic lymphocytic leukemia patients treated with novel agents. *Front Oncol* 2020; 10:894. DOI: 10.3389/fonc.2020.00894.
166. Herman SE, Gordon AL, Hertlein E et al. Bruton tyrosine kinase represents a promising therapeutic target for treatment of chronic lymphocytic leukemia and is effectively targeted by PCI-32765. *Blood* 2011; 117:6287—6296. DOI: 10.1182/blood-2011-01-328484.
167. Ponader S, Chen SS, Buggy JJ et al. The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 thwarts chronic lymphocytic leukemia cell survival and tissue homing in vitro and in vivo. *Blood* 2012; 119:1182—1189. DOI: 10.1182/blood-2011-10-386417.
168. Herman SE, Mustafa RZ, Gyamfi JA et al. Ibrutinib inhibits BCR and NF- κ B signaling and reduces tumor proliferation in tissue-resident cells of patients with CLL. *Blood* 2014; 123:3286—3295. DOI: 10.1182/blood-2014-02-548610.
169. Burger JA, Wiestner A. Targeting B cell receptor signaling in cancer: preclinical and clinical advances. *Nat Rev Cancer* 2018; 18:148—167. DOI: 10.1038/nrc.2017.121.
170. Alu A, Lei H, Han X et al. BTK inhibitors in the treatment of hematological malignancies and inflammatory diseases: mechanisms and clinical studies. *J Hematol Oncol* 2022; 15:138. DOI: 10.1186/s13045-022-01353-w.
171. Albitar A, Ma W, DeDios I et al. Using high-sensitivity sequencing for the detection of mutations in BTK and PLC γ 2 genes in cellular and cell-free DNA and correlation with progression in patients treated with BTK inhibitors. *Oncotarget* 2017; 8:17936—17944. DOI: 10.18632/oncotarget.15316.

172. Kadri S, Lee J, Fitzpatrick C et al. Clonal evolution underlying leukemia progression and Richter transformation in patients with ibrutinib-relapsed CLL. *Blood Adv* 2017; 1:715—727. DOI: 10.1182/bloodadvances.2016003632.
173. Sharma S, Galanina N, Guo A et al. Identification of a structurally novel BTK mutation that drives ibrutinib resistance in CLL. *Oncotarget* 2016; 7:68833—68841. DOI: 10.18632/oncotarget.11932.
174. Jones D, Woyach JA, Zhao W et al. PLCG2 C2 domain mutations co-occur with BTK and PLCG2 resistance mutations in chronic lymphocytic leukemia undergoing ibrutinib treatment. *Leukemia* 2017; 31:1645—1647. DOI: 10.1038/leu.2017.110.
175. Liu TM, Woyach JA, Zhong Y et al. Hypermorphic mutation of phospholipase C, $\gamma 2$ acquired in ibrutinib-resistant CLL confers BTK independency upon B-cell receptor activation. *Blood* 2015; 126:61—68. DOI: 10.1182/blood-2015-02-626846.
176. Miller S, Dykes D, Polesky H. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16:1215. DOI: 10.1093/nar/16.3.1215.
177. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 2014; 30:2114—2120. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu170.
178. Li H, Durbin R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 2010; 26:589—595. DOI: 10.1093/bioinformatics/btp698.
179. Li H, Handsaker B, Wysoker A et al.; 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* 2009; 25:2078—2079. DOI: 10.1093/bioinformatics/btp352.
180. Lai Z, Markovets A, Ahdesmaki M et al. VarDict: a novel and versatile variant caller for next-generation sequencing in cancer research. *Nucleic Acids Res* 2016; 44:e108. DOI: 10.1093/nar/gkw227.
181. Wang K, Li M, Hakonarson H. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res* 2010; 38:e164. DOI: 10.1093/nar/gkq603.
182. Mandel P, Metais P. Les acides nucleiques du plasma sanguin chez l'homme. *C R Seances Soc Biol Fil* 1948; 142(3—4):241—243.
183. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res* 1977; 37(3):646—650.
184. Frickhofen N, Müller E, Sandherr M et al. Rearranged Ig heavy chain DNA is detectable in cell-free blood samples of patients with B-cell neoplasia. *Blood* 1997; 90(12):4953—4960.
185. Siravegna G, Mussolin B, Venesio T et al. How liquid biopsies can change clinical practice in oncology. *Ann Oncol* 2019; 30(10):1580—1590.
186. Anker P, Lyautey J, Lederrey C, Stroun M. Circulating nucleic acids in plasma or serum. *Clin Chim Acta* 2001; 313:143—146.
187. Breitbach S, Tug S, Simon P. Circulating cell-free DNA: an up-coming molecular marker in exercise physiology. *Sports Med* 2012; 42(7):565—586.

188. Rhodes A, Cecconi M. Cell-free DNA and outcome in sepsis. *Crit Care* 2012; 16(6):170.
189. Anker P, Stroun M. Immunological aspects of circulating DNA. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1075:34—39.
190. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* 2016; 127(20): 2375—2390.
191. Brink I, Reinhardt MJ, Hoegerle S et al. Increased metabolic activity in the thymus gland studied with 18F-FDG PET: age dependency and frequency after chemotherapy. *J Nucl Med* 2001; 42(4):591—595.
192. Cohen JB, Behera M, Thompson CA, Flowers CR. Evaluating surveillance imaging for diffuse large B-cell lymphoma and Hodgkin lymphoma. *Blood* 2017; 129(5):561—564.
193. Scherer F, Kurtz DM, Newman AM et al. Distinct biological subtypes and patterns of genome evolution in lymphoma revealed by circulating tumor DNA. *Sci Transl Med* 2016; 8(364):364ra155. DOI: 10.1126/scitranslmed.aai8545.
194. Rossi D, Diop F, Spaccarotella E et al. Diffuse large B-cell lymphoma genotyping on the liquid biopsy. *Blood* 2017; 129(14):1947—1957. DOI: 10.1182/blood-2016-05-719641.
195. Soloveva M, Solovev M, Nikulina E et al. Loss of heterozygosity in the circulating tumor DNA and CD138+ bone marrow cells in multiple myeloma. *Genes (Basel)* 2023; 14(2):351. DOI: 10.3390/genes14020351.
196. Смирнова С. Ю., Никулина Е. Е., Габеева Н. Г. и др. Свободно циркулирующая ДНК в плазме у пациентов с диффузной В-крупноклеточной лимфомой и В-клеточной лимфомой высокой степени злокачественности («double hit»/«triple hit»). *Клиническая онкогематология* 2023; 16(2):200—208.
197. Габеева Н. Г., Королева Д. А., Татарникова С. А. и др. Промежуточные результаты терапии первичной медиастинальной В-крупноклеточной лимфомы по протоколам «ПМЛ-16» и «ПМЛ-19». *Гематология и трансфузиология* 2022; 67(3):328—350.
198. Смирнова С. Ю., Никулина Е. Е., Рыжикова Н. В. и др. Свободно циркулирующая ДНК плазмы у пациентов с первичной медиастинальной лимфомой. *Гематология и трансфузиология* 2020; 65(S1):102—103.
199. Никулина Е. Е., Рисинская Н. В., Смирнова С. Ю. и др. Опухолевые маркеры в сцДНК у пациентов с гемобластозами. *Гематология и трансфузиология* 2022; 67(S2):62—63.
200. Camus V, Jardin F. Cell-free DNA and the monitoring of lymphoma treatment. *Pharmacogenomics* 2019; 20(18):1271—1282. DOI: 10.2217/pgs-2019-0099.
201. Fontanilles M, Marguet F, Bohers É et al. Non-invasive detection of somatic mutations using next-generation sequencing in primary central nervous system lymphoma. *Oncotarget* 2017; 8(29):48157—48168. DOI: 10.18632/oncotarget.18325.
202. Roschewski M, Dunleavy K, Pittaluga S et al. Circulating tumour DNA and CT monitoring in patients with untreated diffuse large B-cell lymphoma: a correlative biomarker study. *Lancet Oncol* 2015; 16(5):541—549.

203. Kurtz DM, Scherer F, Jin MC et al. Circulating tumor DNA measurements as early outcome predictors in diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2018; 36(28):2845—2853. DOI: 10.1200/JCO.2018.78.5246.
204. Herrera AF, Tracy S, Croft B et al. Risk profiling of patients with relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma by measuring circulating tumor DNA. *Blood Adv* 2022; 6(6):1651—1660. DOI: 10.1182/bloodadvances.2021006415.
205. Distler A, Lakhotia R, Phelan JD et al. A prospective study of clonal evolution in follicular lymphoma: circulating tumor DNA correlates with overall tumor burden and fluctuates over time without therapy. *Blood* 2021; 138(Suppl 1): 1328.
206. Sarkozy C, Huet S, Carlton VE et al. The prognostic value of clonal heterogeneity and quantitative assessment of plasma circulating clonal IG-VDJ sequences at diagnosis in patients with follicular lymphoma. *Oncotarget* 2017; 8: 8765—8774.
207. Delfau-Larue MH, van der Gucht A, Dupuis J et al. Total metabolic tumor volume, circulating tumor cells, cell-free DNA: distinct prognostic value in follicular lymphoma. *Blood Adv* 2018; 2:807—816.
208. Lakhotia R, Melani C, Dunleavy K et al. Circulating tumor DNA predicts therapeutic outcome in mantle cell lymphoma. *Blood Adv* 2022; 6:2667—2680.
209. Camus V, Stamatoullas A, Mareschal S et al. Detection and prognostic value of recurrent exportin 1 mutations in tumor and cell-free circulating DNA of patients with classical Hodgkin lymphoma. *Haematologica* 2016; 101:1094—1101.
210. Primerano S, Burnelli R, Carraro E et al. Kinetics of circulating plasma cell-free DNA in paediatric classical Hodgkin lymphoma. *J Cancer*. 2016; 7: 364—366.
211. Vandenberghe P, Wlodarska I, Tousseyn T et al. Non-invasive detection of genomic imbalances in Hodgkin/Reed-Sternberg cells in early and advanced stage Hodgkin's lymphoma by sequencing of circulating cell-free DNA: a technical proof-of-principle study. *Lancet Haematol* 2015; 2:e55—65.
212. Spina V, Bruscaggin A, Cuccaro A et al. Circulating tumor DNA reveals genetics, clonal evolution, and residual disease in classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 2018; 131:2413—2425.
213. Zhang W, Wang W, Han X et al. Circulating tumor DNA by high-throughput sequencing of T cell receptor monitored treatment response and predicted treatment failure in T cell lymphomas. *Int J Lab Hematol* 2021; 43:1041—1049.
214. Miljkovic MD, Melani C, Pittaluga S et al. Next-generation sequencing-based monitoring of circulating tumor DNA reveals clonotypic heterogeneity in untreated PTCL. *Blood Adv* 2021; 5:4198—4210.
215. Rossi D, Kurtz DM, Roschewski M et al. The development of liquid biopsy for research and clinical practice in lymphomas: report of the 15-ICML workshop on ctDNA. *Hematol Oncol* 2020; 38:34—37.
216. Huet S, Salles G. Potential of circulating tumor DNA for the management of patients with lymphoma. *JCO Oncol Pract* 2020; 16:561—568.
217. Schroers-Martin JG, Kurtz DM, Soo J et al. Determinants of circulating tumor DNA levels across lymphoma histologic subtypes. *Blood* 2017; 130:4018.

218. Lauer EM, Mutter J, Scherer F. Circulating tumor DNA in B-cell lymphoma: technical advances, clinical applications, and perspectives for translational research. *Leukemia* 2022; 36(9):2151—2164. DOI: 10.1038/s41375-022-01618-w.
219. Schroers-Martin JG, Alig S, Garofalo A et al. Molecular monitoring of lymphomas. *Annu Rev Pathol* 2023; 18:149—180. DOI: 10.1146/annurev-pathol-050520-044652.
220. Mithraprabhu S, Reynolds J, Turner R et al. Circulating tumour DNA analysis predicts relapse and improves risk stratification in primary refractory multiple myeloma. *Blood Cancer J* 2023; 13(1):25. DOI: 10.1038/s41408-023-00796-9.
221. Chiu BC, Zhang Z, Derman BA et al. Genome-wide profiling of 5-hydroxymethylcytosines in circulating cell-free DNA reveals population-specific pathways in the development of multiple myeloma. *J Hematol Oncol* 2022; 15(1): 106. DOI: 10.1186/s13045-022-01327-y.
222. Garcia-Gisbert N, Fernández-Ibarrondo L, Fernández-Rodríguez C et al. Circulating cell-free DNA improves the molecular characterisation of Ph-negative myeloproliferative neoplasms. *Br J Haematol* 2021; 192(2):300—309. DOI: 10.1111/bjh.17087.
223. Wu YY, Jia MN, Cai H et al. Detection of the MYD88L265P and CXCR4S338X mutations by cell-free DNA in Waldenström macroglobulinemia. *Ann Hematol* 2020; 99(8):1763—1769. DOI: 10.1007/s00277-020-04139-7.
224. Zhou X, Lang W, Mei C et al. Serial monitoring of circulating tumour DNA on clinical outcome in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukaemia. *Clin Transl Med* 2023; 13(7):e1349. DOI: 10.1002/ctm2.1349.
225. Zhu H, Feng G, Zhao N et al. Characterization of serous cell-free DNA in myelodysplastic syndromes. *Cell Transplant* 2022; 31:9636897221143363. DOI: 10.1177/09636897221143363.
226. Chia WC, Khoo TS, Abdul Wahid SFS et al. Multiplex STR panel for assessment of chimerism following hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). *Ann Hematol* 2019; 98(5):1279—1291. DOI: 10.1007/s00277-019-03626-w.
227. Дубняк Д. С., Рисинская Н. В., Дроков М. Ю., Судариков А. Б. Мониторинг химеризма после трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток. *Трансплантология* 2022; 14(4):488—499. DOI: 10.23873/2074-0506-2022-14-4-488-499.
228. Tozzo P, Delicati A, Zambello R, Caenazzo L. Chimerism monitoring techniques after hematopoietic stem cell transplantation: An overview of the last 15 years of innovations. *Diagnostics (Basel, Switzerland)* 2021; 11(4):621. DOI: 10.3390/diagnostics11040621.
229. Масликова У. В., Попова Н. Н., Дроков М. Ю., Хамаганова Е. Г. Несостоятельности трансплантата у реципиентов аллогенных гемопоэтических стволовых клеток: диагностика и лечение. *Вестник медицинского института «РЕАВИЗ». Реабилитация, врач и здоровье* 2023; 13(1):114—125. DOI: 10.20340/vmi-rvz.2023.1.TX.1.
230. Clark JR, Scott SD, Jack AL et al. Monitoring of chimerism following allogeneic haematopoietic stem cell transplantation (HSCT): Technical recommendati-

- ons for the use of Short Tandem Repeat (STR) based techniques, on behalf of the United Kingdom National External Quality Assessment Service for Leucocyte Immunophenotyping Chimerism Working Group. *Br J Haematol* 2015; 168(1):26—37. DOI: 10.1111/bjh.13073.
231. Blouin AG, Ye F, Williams J et al. A practical guide to chimerism analysis: Review of the literature and testing practices worldwide. *Hum Immunol* 2021; 82(11). DOI: 10.1016/j.humimm.2021.07.013.
232. Risinskaya N, Kozhevnikova Y, Gavrilina O et al. Loss of heterozygosity in the tumor DNA of de novo diagnosed patients is associated with poor outcome for B-ALL but not for T-ALL. *Genes (Basel)* 2022; 13(3):398. DOI: 10.3390/genes13030398.
233. Berger B, Parson R, Clausen J et al. Chimerism in DNA of buccal swabs from recipients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantations: implications for forensic DNA testing. *Int J Legal Med* 2013; 127(1):49—54. DOI: 10.1007/s00414-012-0687-5.
234. Risinskaya N, Yushkova A, Shikhveleva F et al. PB2174: On the robustness of the buccal epithelium for assessing recipient DNA profile in patients after hematopoietic stem cells transplantation. *Hemasphere* 2022; 6(Suppl): 2044—2045. DOI: 10.1097/01.HS9.0000851524.17499.cd.
235. Bach C, Steffen M, Roesler W et al. Systematic comparison of donor chimerism in peripheral blood and bone marrow after hematopoietic stem cell transplantation. *Blood Cancer J* 2017; 7(6):e566. DOI: 10.1038/bcj.2017.42.
236. Dubova O, Risinskaya N, Yushkova A et al. Discordance of chimerism in the blood and bone marrow as a possible sign of adverse outcome after allo-HSCT. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2022; 22(Suppl.2):S444—S445. DOI: 10.1016/S2152-2650(22)01667-6.
237. Warshawsky I, Chi HS. Engraftment analysis using short tandem repeats following allogeneic hematopoietic cell transplantation. In: Kottke-Marchant K, Davis BH (editors). *Laboratory hematology practice*. Chichester (UK): Wiley-Blackwell; 2012. P. 234—243.
238. Petinati N, Drize N, Sats N et al. Recovery of donor hematopoiesis after graft failure and second hematopoietic stem cell transplantation with intraosseous administration of mesenchymal stromal cells. *Stem Cells Int* 2018; 2018: 6495018. DOI: 10.1155/2018/6495018.
239. Kristt D, Stein J, Yaniv I et al. Assessing quantitative chimerism longitudinally: Technical considerations, clinical applications and routine feasibility. *Bone Marrow Transplant* 2007; 39(5):255—268. DOI: 10.1038/sj.bmt.1705576.
240. Weber-Lehmann J, Schilling E, Gradl G et al. Finding the needle in the haystack: Differentiating “identical” twins in paternity testing and forensics by ultra-deep next generation sequencing. *Forensic Sci Int Genet* 2014; 9:42—46. DOI: 10.1016/j.fsigen.2013.10.015.

Глава 8.

Лабораторная диагностика моноклональных иммуноглобулинопатий

Структура иммуноглобулинов. Особенности моноклональных иммуноглобулинов

Иммуноглобулины человека представляют собой семейство структурно сходных белков, обладающих функцией антител. Субъединица иммуноглобулина (Ig) содержит две тяжелые (H) цепи, молекулярная масса которых составляет 50—77 kD, и две легкие (L) цепи с молекулярной массой 22—25 kD. Характерной особенностью иммуноглобулинов является исключительное структурное и функциональное разнообразие. У человека в соответствии со структурой тяжелых цепей выявлено 5 классов иммуноглобулинов: IgG, IgA, IgM, IgD, IgE. Кроме того, выделяют 4 подкласса IgG (IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄) и два подкласса IgA (IgA₁, IgA₂). Легкие цепи представлены двумя вариантами (κ и λ), которым соответствуют два типа иммуноглобулинов каждого класса. При этом в каждой молекуле иммуноглобулина обе тяжелые и обе легкие цепи идентичны.

Структурное разнообразие иммуноглобулинов обеспечивает также существование разных молекулярных форм, молекулы IgG, IgD, IgE существуют только в виде мономеров, IgM секретируется в форме пентамера, а IgA представлен как мономерными, так и димерными формами.

Моноклональные иммуноглобулины (парапротеины) представляют собой продукт секреции одного клона В-лимфоцитов или плазматических клеток. Поэтому они являются пулом структурно гомогенных молекул, имеющих тяжелые цепи одного класса (подкласса), легкие цепи одного типа и идентичный антигенсвязывающий центр — идиотип.

Моноклональный белок может быть представлен структурно полноценными иммуноглобулинами, фрагментами иммуноглобулинов или сочетанием тех и других (табл. 1). Синтез моноклональных иммуноглобулинов очень часто сочетается с избыточной продукцией моноклональных свободных легких цепей иммуноглобулинов (СЛЦ), которые известны как белок Бенс Джонса.

Таблица 1. Характеристика моноклональной продукции

1-й вариант	2-й вариант	3-й вариант
Полные молекулы Ig: IgGκ IgGλ IgAκ IgAλ IgMκ IgMλ IgDκ IgDλ IgEκ IgEλ	Полные молекулы Ig и свободные моноклональные L-цепи (белок Бенс Джонса) того же типа (κ или λ)	Фрагменты Ig: свободные L-цепи (белок Бенс Джонса κ или λ), свободные H-цепи (α, γ, μ)

При множественной миеломе наиболее часто секретируются IgG (50—60% парапротеинов), реже IgA (20—25%) и изолированный белок Бенс Джонса (17—25%). Секреция IgD выявляется в 1—2% случаев, секреция IgM и IgE при миеломе встречается крайне редко. В некоторых случаях (около 1%) миеломные клоны не секретируют ни тяжелых, ни легких цепей, при этом они синтезируются и могут обнаруживаться в цитоплазме. При лимфомах и хроническом лимфолейкозе чаще наблюдается продукция моноклональных IgM, реже IgG. Часто наблюдается секреция белка Бенс Джонса, в том числе изолированная. Уровень секреции при этих заболеваниях, как правило, небольшой, часто следовой. Следовая изолированная секреция моноклональных СЛЦ (чаще λ-типа) наблюдается также при AL-амилоидозе. Особую группу образуют болезни тяжелых цепей (БТЦ). При этой патологии продукция патологического клона представлена структурно дефектными H-цепями, лишенными L-цепей, которые либо не синтезируются (БТЦ-γ, БТЦ-α), либо имеет место нарушение объединения их с дефектными H-цепями (БТЦ-μ).

Свойства моноклонального иммуноглобулина предопределяют возможное развитие ряда клинических проявлений, осложняющих течение заболевания и объединяемых термином синдром белковой патологии.

гии: гипервискозный синдром, иммунокомплексный синдром, синдром вторичного иммунодефицита, синдром Рейно, обусловленный криоглобулинемией. Отложение моноклональных иммуноглобулинов с формированием депозитов амилоидного или неамилоидного строения определяет клинические проявления — нефропатии, кардиопатии, нейропатии.

В некоторых случаях у пациентов с доказанным наличием моноклональной секреции при тщательном обследовании не находят признаков В-клеточной опухоли. Такие ситуации объединены понятием моноклональная гаммапатия неопределенного значения, которая у здоровых взрослых людей старше 50 лет выявляется приблизительно в 4,2% случаев, причем с возрастом частота ее выявления возрастает [1, 2].

С точки зрения характеристики парапротеина выделяют моноклональную гаммапатию неопределенного значения с секрецией IgG (около 70%), IgM (17%), IgA (около 11%). В качестве редких вариантов описаны биклональная гаммапатия (когда у пациента выявляются одновременно два разных клональных иммуноглобулина), а также идиопатическая протеинурия Бенс Джонса.

Принципы современной диагностики

Диагностика моноклональных иммуноглобулинопатий основана на сочетании нескольких методов исследования, позволяющих охарактеризовать качественные и количественные особенности патологических и нормальных иммуноглобулинов [3, 4].

«Золотым стандартом» выявления парапротеина является электрофорез с последующей иммунохимической идентификацией.

Электрофорез белков сыворотки

Электрофорез представляет собой разделение растворенных белковых молекул под действием постоянного электрического поля. Электрофорез может проводиться на различных носителях (гель агарозы, ацетат-целлюлозная пленка) или в жидкой фазе (капиллярный электрофорез).

Под действием электрического тока отрицательно заряженные белки сыворотки с разной скоростью движутся к положительно заряженному электроду (аноду), образуя шесть электрофоретических фракций. В образовании электрофоретических фракций участвуют только те белки, которые присутствуют в сыворотке в достаточной концентрации. Это альбумин и часть глобулинов: α_1 -антитрипсин, α_1 -липопротеин (зона α_1 -глобулинов), α_2 -макроглобулин, гаптоглобин (зона

α_2 -глобулинов), трансферрин, β -липопротеиды (зона β_1 -глобулинов), компонент комплемента С3 (зона β_2 -глобулинов), IgG (зона γ -глобулинов). Если при определенных патологических состояниях усиливается синтез или катаболизм некоторых белков сыворотки, то это приводит к соответствующим изменениям фракций, формируемых этими белками. В том случае, если усиливается синтез белков, не участвующих в образовании электрофоретических фракций в норме, они начинают появляться на электрофореграмме в виде отдельных полос или усиливают уже существующие фракции. К таким белкам относятся лизоцим, С-реактивный белок, церулоплазмин, фибронектин и др.

Характерной особенностью поликлональных иммуноглобулинов является гетерогенность структуры и, следовательно, заряда молекул, они отличаются различной подвижностью в электрическом поле, поэтому область их миграции (γ -зона) представляет собой широкое диффузное пятно без четких границ. Структурная идентичность моноклональных иммуноглобулинов обуславливает одинаковый электрический заряд молекул внутри пула, поэтому на электрофореграмме моноклональные иммуноглобулины образуют, как правило, узкую гомогенную, четко ограниченную полосу — так называемый М-градиент.

Интенсивность окрашивания каждой из электрофоретических фракций пропорциональна количеству образовавшего ее белка.

Количество белка в каждой из фракций оценивается с помощью денситометрии. Результаты денситометрии представлены в виде графика, на котором каждая белковая зона образует пик. Высота пика отражает интенсивность белковой фракции, а ширина — степень ее гетерогенности. По площади пика рассчитывается относительное (в процентах) и абсолютное (в весовых единицах) содержание белка в электрофоретических фракциях. Для расчета в весовых единицах необходимы данные о концентрации общего белка в образце (рис. 1).

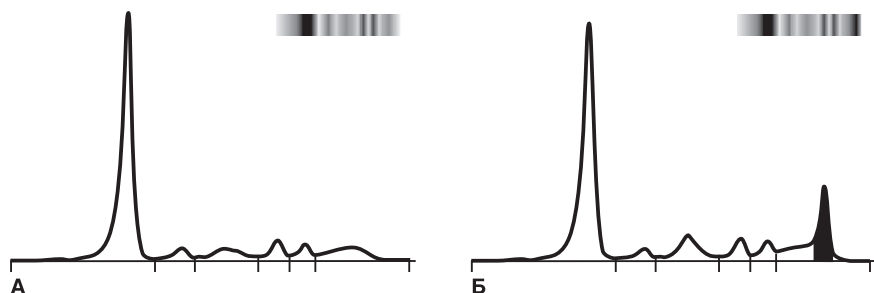


Рисунок 1. Электрофорез сыворотки. А. Норма. Б. М-градиент (выделен черным).

Преимуществом капиллярного электрофореза являются полная автоматизация и быстрота получения результатов. Отмечается преимущество капиллярного электрофореза при выявлении патологических белков, мигрирующих в β -зоне, за счет лучшего разделения. Кроме того, при капиллярном электрофорезе отсутствуют стартовые артефакты, иногда возникающие в агарозном геле, например при наличии криоглобулинов, и затрудняющие трактовку результатов.

Качественно выполненный электрофорез является высокоинформативным методом, который позволяет без больших затрат дать предварительную характеристику белков сыворотки или других биологических жидкостей. Однако всегда надо помнить о неспецифичности электрофореза — невозможности по его результатам сделать вывод о природе выявленной белковой полосы.

Электрофорез белков мочи

Электрофорез позволяет определить белковый состав мочи и классифицировать протеинурию по типам. Для электрофоретического анализа типа протеинурии в практической медицине используются два основных метода — разделение белков в соответствии с их электрофоретической подвижностью (зависит от заряда белка) и разделение в соответствии с молекулярной массой. Для выявления и количественного определения моноклонального белка при парапротеинемических гемобластозах разделение белков по электрофоретической подвижности является предпочтительным. Метод позволяет провести денситометрию электрофореграммы для количественного определения белковой фракции, образованной моноклональным белком, и иммунофиксацию (или иммунотипирование) для определения типа белка.

Протеинурия перегрузки (преренальная протеинурия) характеризуется наличием белка в моче при отсутствии органического или функционального поражения почек. Ее причина — повышенный синтез белка в крови, который свободно проходит через неповрежденный клубочковый фильтр и превышает реабсорбционную способность почек (проксимальных канальцев). Чаше протеинурия перегрузки коррелирует со специфической патологией. Белки, выявляемые при протеинурии перегрузки: свободные легкие и/или свободные тяжелые цепи иммуноглобулинов при моноклональных гаммапатиях, β_2 -микроглобулин при лимфопролиферативных заболеваниях, лизоцим — при остром миелоцитарном лейкозе, фрагменты гемоглобина — при внутрисосудистом гемолизе, миоглобин — при рабдомиолизе [5]. Белковый состав мочи на электрофореграмме при канальцевой протеинурии характеризуется наличием комплекса белков: α_1 -микроглобулина, ретинолсвязывающего белка, β_2 -микроглобулина. При поражении клубочков преимущественно стра-

дает процесс фильтрации. В зависимости от характера и степени повреждения клубочкового фильтра выделяют селективную и неселективную клубочковую протеинурию. При начальном повреждении гломерулярного аппарата с мочой выделяются в основном транспортные белки крови — альбумин и трансферрин (селективная протеинурия). При значительном его повреждении в моче появляются высокомолекулярные белки — иммуноглобулины (неселективная протеинурия). Наличие α_2 -макроглобулина в моче свидетельствует о постренальном типе протеинурии (индикатор наличия примеси крови в моче) (табл. 2).

Таблица 2. Белки-маркеры разных типов протеинурии

Тип протеинурии	Белки-маркеры	Молекулярный вес, кДа
Клубочковая	Альбумин	69
	Трансферрин	80
Неселективная клубочковая	Альбумин	69
	Трансферрин	80
	IgG	160
	IgA	175—350
Канальцевая	Альфа ₁ -микроглобулин	33
	Ретинолсвязывающий белок	21
	Бета ₂ -микроглобулин	12
	Лизоцим	14
	СЛЦ	25—50
Постренальная	Бета ₂ -микроглобулин	750

При В-клеточных лимфопролиферативных заболеваниях в моче чаще всего определяются моноклональные СЛЦ (белок Бенс Джонса). Их появление в моче связано с механизмом элиминации низкомолекулярных белков. У здоровых людей вырабатывается примерно 500 мг поликлональных СЛЦ в день. Имея низкий молекулярный вес (25 кДа κ -СЛЦ и 50 кДа λ -СЛЦ), они проходят через клубочковый фильтр, связываются с рецепторами эпителия проксимальных канальцев и путем эндоцитоза проникают в лизосомы эпителиальных клеток, где расщепляются до составляющих их аминокислот. Этот механизм является высокоэффективным процессом, и почти все 500 мг отфильтрованных поликлональных СЛЦ реабсорбируются в проксимальных канальцах и лишь < 10 мг в сутки СЛЦ экскретируются с мочой. Однако на протяжении своего пути легкие цепи в некоторых случаях способны повреждать различные участки нефрона. На это влияют индивидуальные структурные особенности легких цепей, которые определяются последовательностью аминокислот в вариабельном домене легких цепей и особенностью среды. Электрофо-

рез мочи позволяет грубо определить отдел повреждения нефрона. Так, при AL-амилоидозе и болезни отложения легких цепей в моче помимо белка Бенс Джонса, который, как правило, бывает в небольшом количестве, выявляются маркеры клубочковой протеинурии; при синдроме Фанкони, тубулоинтерстициальном нефрите и миеломной нефропатии — маркеры канальцевой протеинурии.

Электрофорез не является методом идентификации моноклонального белка, для определения типа белка используются иммунохимические методы — иммунофиксация в геле агарозы или иммунотипирование с использованием метода капиллярного электрофореза.

Иммунохимические методы

Идентифицировать белки на электрофореграмме без потери наглядности и четкости электрофоретической картины позволяют иммунофиксация в геле агарозы и иммунотипирование при капиллярном электрофорезе [6].

При проведении иммунофиксации на одной и той же пластине с агарозным гелем проводят несколько электрофоретических разделений исследуемого образца, после чего один из треков фиксируют сразу после окончания электрофореза (он служит контролем), а на поверхность остальных наносят антисыворотки определенной специфичности. В месте расположения белка, вступившего в реакцию с соответствующей антисывороткой, образуется нерастворимый преципитат, который полностью сохраняет форму и положение изучаемой фракции. После отмывания не прореагировавших с антисывороткой белков пластину окрашивают. Зону миграции белка уточняют при соотнесении положения преципитата с контрольной электрофореграммой (рис. 2).

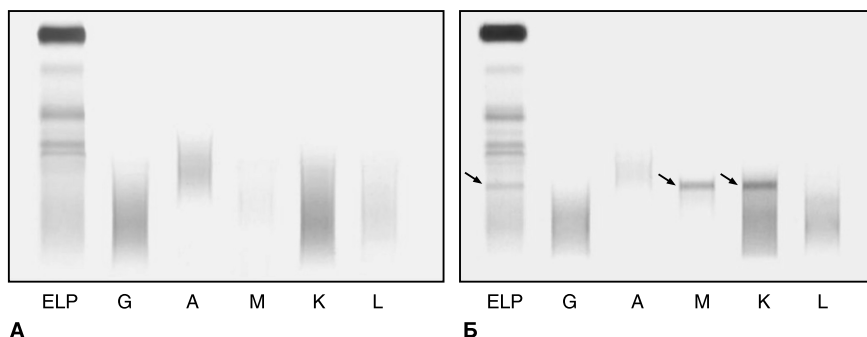


Рисунок 2. Иммунофиксация сыворотки. А. Норма. Б. Парапρωтеин IgMκ. ELP — контроль электрофореза; G, A, M — антисыворотки к тяжелым цепям иммуноглобулинов γ, α, μ; K, L — антисыворотки к легким цепям иммуноглобулинов κ, λ.

При иммунотипировании проводят капиллярный электрофорез до и после инкубации исследуемого образца с моноспецифическими антисыворотками. Идентификацию моноклонального иммуноглобулина проводят, регистрируя снижение или исчезновение белкового пика на денситограмме после добавления соответствующей антисыворотки (рис. 3, 4).

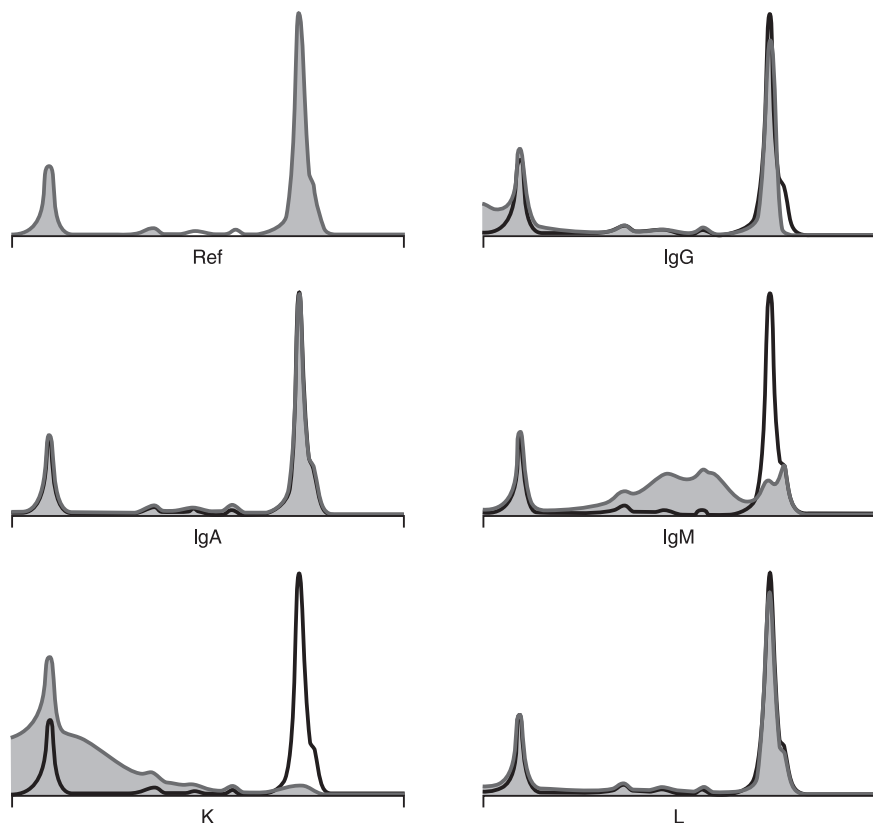


Рисунок 3. Иммунотипирование сыворотки. Выявлена двойная секрция IgMκ и IgGκ. Ref — исходная (референсная) денситограмма; G, A, M — антисыворотки к тяжелым цепям иммуноглобулинов γ, α, μ; K, L — антисыворотки к легким цепям иммуноглобулинов κ, λ.

Помимо высокой специфичности и разрешающей способности достоинством иммунопреципитационных методов является также высокая чувствительность, позволяющая выявить следовые М-градиенты, которые не видны на электрофореграмме.

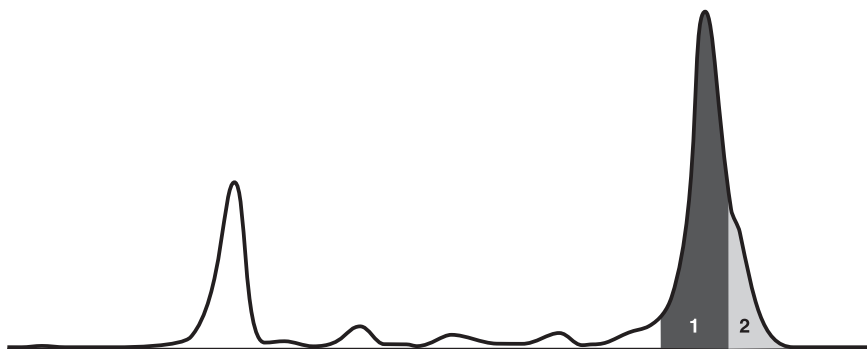


Рисунок 4. Электрофорез сыворотки. Выделены пики парапротеинов IgMκ и IgGκ. 1 — IgMκ; 2 — IgGκ.

Таким образом, проведение иммунофиксации и иммунотипирования необходимо для:

- 1) идентификации дополнительных белковых полос (М-градиентов), выявленных на электрофореграмме;
- 2) выявления и идентификации скрытых М-градиентов, когда моноклональный иммуноглобулин мигрирует в зоне α- или β-глобулинов и маскируется нормальными белками этих фракций, особенно при низком уровне продукции;
- 3) выявления и идентификации следовых М-градиентов, которые не видны на стандартной электрофореграмме.

Свободные легкие цепи иммуноглобулинов

Концентрация κ- и λ-СЛЦ в сыворотке зависит от баланса между продукцией и клиренсом. Ежедневно κ-СЛЦ секретируется примерно в два раза больше, чем λ-СЛЦ. При этом κ-СЛЦ представлены в основном мономерами, а λ-СЛЦ — димерами. Это приводит к более быстрой элиминации κ-цепей и повышению концентрации λ-СЛЦ в сыворотке. В норме соотношение концентраций κ/λ-СЛЦ в сыворотке находится в пределах 0,26—1,65. Содержание СЛЦ может заметно увеличиваться при инфекциях, аутоиммунных, хронических воспалительных заболеваниях, но соотношение концентраций κ/λ-СЛЦ чаще остается нормальным. Дисбаланс соотношения наблюдается при увеличении синтеза одного из типов СЛЦ, что является возможным признаком лимфопролиферативного заболевания.

С внедрением в диагностическую практику метода количественного определения СЛЦ в сыворотке появилась возможность значительно повысить чувствительность выявления низкого уровня секреции моно-

клональных СЛЦ. Короткий период полураспада СЛЦ в крови (2—4 часа для κ -цепей и 3—6 часов для λ -цепей) по сравнению с интактным иммуноглобулином (IgG — 21 сутки, IgA — 6 суток и IgM — 5 суток, IgD — 3 суток, IgE — 2 суток) дает возможность мониторинга прогрессирования заболевания или ответа на лечение в режиме реального времени [7]. С помощью этого метода приблизительно в 2/3 случаев несекретирующей множественной миеломы выявляются моноклональные СЛЦ. Внедрение теста в 2001 г. было прорывом в гематологии. За это время было высказано предположение, что анализ СЛЦ в сыворотке может заменить исследование мочи для выявления моноклональной секреции (электрофорез с иммунофиксацией). Однако накопленный опыт работы показывает, что каждый метод имеет свою точку приложения и исследование мочи сохраняет свою актуальность. В то время как выявленный М-градиент, образованный белком Бенс Джонса, однозначно является признаком клональности, только изменение соотношения κ/λ -СЛЦ таковым не является. Нарушение соотношения κ/λ -СЛЦ может наблюдаться при дефиците одной из легких цепей, при нефропатии. В то же время могут быть выявлены моноклональные легкие цепи в иммунофиксации при нормальном соотношении κ/λ -СЛЦ в сыворотке. Чаще такой вариант встречается при поражении почек, которое приводит к увеличению концентрации СЛЦ в сыворотке за счет нарушения выведения их с мочой. Другой вариант обусловлен вероятностью хук-эффекта, когда отмечается нормальное значение соотношения κ/λ -СЛЦ при наличии избытка антигена. Дополнительное разведение образца, несмотря на отсутствие в показаниях прибора избытка антигена, помогает решить данную проблему. Однако не всегда бывает ясно, какие образцы подлежат принудительному разведению, и высока вероятность получения некорректного результата. Несмотря на возможные проблемы при количественном определении СЛЦ, высокая чувствительность этого метода является ценным маркером для диагностики и наблюдения за пациентами с моноклональной гаммапатией.

Количественное определение СЛЦ обязательно:

- для диагностики и мониторинга заболеваний с низким уровнем моноклональной секреции, представленной преимущественно белком Бенс Джонса: AL-амилоидоз, болезнь отложения легких цепей, POEMS-синдром, несекретирующая миелома, солитарная плазмочитома;
- при миеломе с секрецией белка Бенс Джонса, если уровень секреции нельзя измерить с помощью денситометрии;
- при моноклональной гаммапатии неясного генеза, тлеющей миеломе — как независимый прогностический фактор.

Исследование ликвора

Исследование ликвора для выявления моноклонального иммуноглобулина проводят аналогично исследованию мочи. Оно так же включает в себя электрофоретическое исследование с дополнительным концентрированием при низком содержании общего белка в образце и последующую иммунофиксацию.

Особенности преаналитического этапа

Для выявления моноклональной секреции в большинстве случаев необходимо обязательное исследование сыворотки крови и мочи.

Сыворотку получают стандартно из венозной крови, взятой в пробирку с соответствующей маркировкой. После свертывания крови пробирку центрифугируют и отделяют сыворотку. Свертывание крови лучше проводить в термостате при температуре 37 °С. При подозрении на криоглобулинемию это условие должно выполняться обязательно, в противном случае криоглобулины могут быть утеряны со сгустком.

Гемолиз, хилез сыворотки вносят ограничения в использовании ряда методов, по возможности необходимо избегать исследования таких образцов.

Предпочтительнее исследование суточной мочи, лишь при первичном скрининге допускается исследование утренней порции мочи [3]. При сборе мочи емкость следует держать в прохладном месте.

При необходимости длительного хранения сыворотку и мочу замораживают при температуре не выше –20 °С. Повторное замораживание и оттаивание недопустимо.

Схема проведения исследования

Принципиально важным положением является то, что на основании данных какого-либо одного метода невозможно выявить секрецию моноклонального иммуноглобулина, а тем более охарактеризовать ее.

1. Электрофорез сыворотки крови и мочи с последующей иммунофиксацией или иммунотипированием. Алгоритм исследования показан на схеме (рис. 5, 6).
2. Денситометрия белков электрофореграммы с выделением парапротеина для его количественной оценки.
3. Оценка типа протеинурии по данным электрофореза мочи.
4. Определение содержания общего белка сыворотки крови и мочи биохимическими методами для количественной оценки парапротеина.
5. Количественное определение иммуноглобулинов трех основных классов (IgG, IgA, IgM) для оценки степени иммунодефицита, во

многих случаях может быть полезным также определение соотношения Ig κ- и λ-типа.

6. Определение СЛЦ по показаниям.

7. Исследование сыворотки для выявления криоглобулинов.

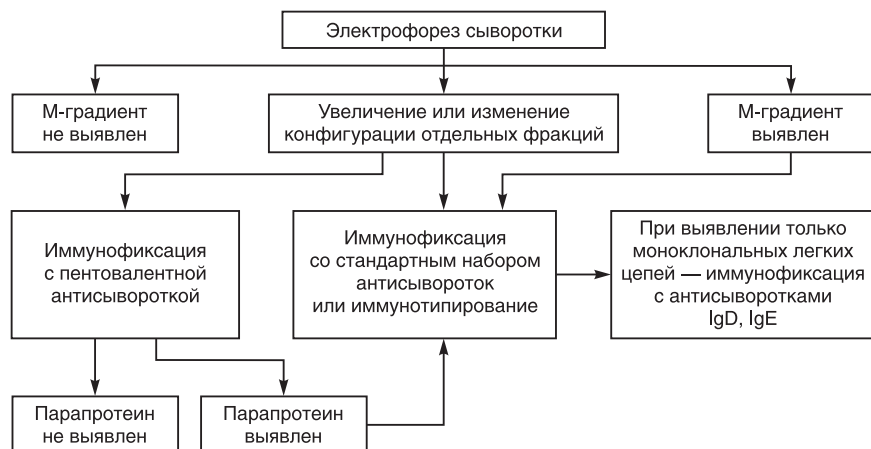


Рисунок 5. Алгоритм проведения электрофореза сыворотки.

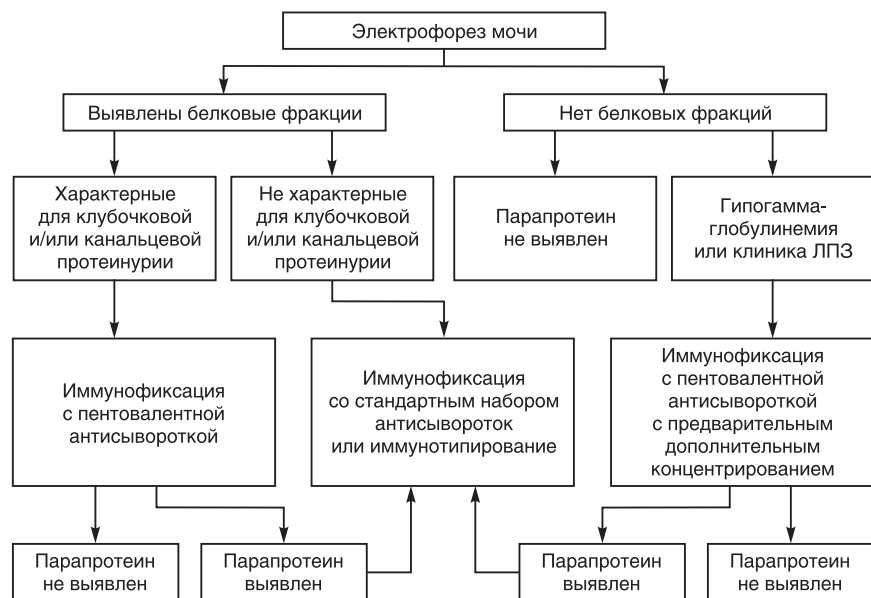


Рисунок 6. Алгоритм проведения электрофореза мочи. ЛПЗ — лимфопролиферативное заболевание.

Для успешной диагностики моноклональной иммуноглобулинопатии целесообразно проведение всего комплекса исследований с оценкой полученных данных и формулировкой заключения в одной лаборатории. Большое значение имеет применение адекватных методов исследования. Неоценимую помощь оказывает наличие доступного архива.

Показания к иммунохимическому исследованию белков

Показаниями к иммунохимическому исследованию принято считать клинические и лабораторные признаки, которые могут быть проявлением как непосредственно В-клеточных лимфопролиферативных заболеваний, в первую очередь парапротеинемических гемобластозов, так и связанного с ними синдрома белковой патологии:

- немотивированное ускорение СОЭ;
- гиперпротеинемия;
- нефропатия неясного генеза;
- нейропатия неясного генеза;
- синдром Рейно;
- кардиомиопатия, полисерозит, синдром мальабсорбции;
- частые инфекции;
- остеодеструкции, остеопороз;
- диагностически неясные случаи.

Динамическое наблюдение при наличии моноклональной секреции

Частота проведения иммунохимического анализа при моноклональной гаммапатии неопределенного значения

При мониторингировании моноклональной гаммапатии неопределенного значения стандартной рекомендацией является проведение контрольных исследований 1 раз в 3—4 месяца в течение первого года после ее обнаружения. При стабильном уровне парапротеина в дальнейшем контроль возможен 1 раз в 6—12 месяцев. При наличии факторов повышенного риска развития парапротеинемического гемобластоза (парапротеин не IgG-класса, уровень парапротеина выше 10 г/л, измененное соотношение СЛЦ в сыворотке, проявления синдрома белковой патологии) рекомендуются более частые обследования, частота которых устанавливается индивидуально по результатам стратификации риска [2, 8].

Частота проведения иммунохимического анализа при множественной миеломе

- На этапе диагностики.
- На этапе лечения — после каждых 2—3 курсов терапии.
- На этапе мобилизации и сбора гемопоэтических клеток крови.
- На этапе трансплантации аутологичных гемопоэтических клеток крови.
- На этапе наблюдения — каждые 3 месяца [9].

Достоверно измеримые маркеры при множественной миеломе

- Моноклональный белок в сыворотке ≥ 10 /л.
- Моноклональный белок в моче (белок Бенс Джонса) $\geq 0,2$ г в сутки.
- Концентрация одной из легких цепей (вовлеченной) в сыворотке выше 100 мг/л при наличии дисбаланса соотношения κ/λ -СЛЦ [10].

При наличии достоверно измеримых маркеров множественная миелома считается «измеряемым заболеванием».

Критерии ответа на терапию при множественной миеломе по данным иммунохимического анализа

В табл. 3 представлены данные иммунохимического анализа по оценке ответа на терапию. Согласно критериям международной рабочей группы по множественной миеломе (IMWG) и российским рекомендациям, оценка ответа включает не только данные иммунохимического анализа [9, 11].

Таблица 3. Критерии ответа на терапию при множественной миеломе по данным иммунохимического анализа

Критерии ответа	Моноклональный белок в сыворотке (1)	Условие	Моноклональный белок в моче (2)	СЛЦ
Строгий полный ответ	Нет	И	Нет	Соотношение концентраций κ/λ в норме
Полная ремиссия	Нет	И	Нет	
Очень хороший частичный ответ	Только при иммунофиксации или $\downarrow$ на 90% и более	Или	Только при иммунофиксации или экскреции белка Бенс Джонса $< 0,1$ г в сутки	

Таблица 3 (окончание). Критерии ответа на терапию при множественной миеломе по данным иммунохимического анализа

Критерии ответа	Моноклональный белок в сыворотке (1)	Условие	Моноклональный белок в моче (2)	СЛЦ
Частичный ответ	↓ на 50%	И	↓ суточной экскреции белка Бенс Джонса на 90% или до уровня < 0,2 г в сутки	Если 1 и 2 неизмеримо: уменьшение разницы между концентрацией вовлеченной и невовлеченной СЛЦ на 50% и более
Минимальный ответ	↓ на 25% (не более чем на 49%)	Или	↓ суточной экскреции белка Бенс Джонса на 50—89 %	
Прогрессия	↑ на 25% от наименьшего подтвержденного значения (абсолютное увеличение должно быть ≥ 5 г/л; если самое низкое значение было ≥ 50 г/л, абсолютное увеличение должно быть ≥ 10 г/л)	Или	↑ экскреции белка Бенс Джонса более чем на 0,2 г в сутки	Если 1 и 2 неизмеримо: увеличение разницы между концентрацией вовлеченной и невовлеченной СЛЦ более чем на 100 мг/л

Примечание:

- увеличение или уменьшение концентрации моноклонального белка по сравнению с исходными данными до начала лечения;
- если для оценки ответа используется более одного параметра, ответ учитывается по наименьшему уровню ответа;
- уровень СЛЦ для оценки ответа следует использовать, когда концентрация моноклонального белка в сыворотке и моче не поддается измерению;
- увеличение только концентрации СЛЦ в сыворотке при наличии измеряемого заболвания не является признаком прогрессии.

AL-амилоидоз. Оценка ответа на терапию по данным иммунохимического анализа

У большинства пациентов с AL-амилоидозом нет измеряемого моноклонального белка в сыворотке или моче. Поэтому рекомендуется последовательное использование СЛЦ в сыворотке во время мониторинга. Оценка гематологического ответа проводится преимущественно на основании концентрации СЛЦ и разницы между вовлеченной (амилоидогенной) и невовлеченной (нормальной) СЛЦ [12, 15].

Таблица 4. Критерии ответа на терапию при AL-амилоидозе

Критерий	СЛЦ
Полный ответ	Отсутствие парапротеина в сыворотке крови и моче по данным иммунофиксации. Концентрация и соотношение СЛЦ в норме.
Очень хороший частичный ответ	Уменьшение разницы концентраций вовлеченной и невовлеченной СЛЦ < 40 мг/л
Частичный ответ	Снижение разницы концентраций вовлеченной и невовлеченной СЛЦ на 50% и более
Отсутствие ответа	Снижение разницы между концентрацией вовлеченной и невовлеченной СЛЦ менее чем на 50% (если исходно концентрация СЛЦ выше 50 мг/л)

В 2022 г. рабочей группой ЕНА-ISA были утверждены новые критерии полного ответа при AL-A: содержание вовлеченной СЛЦ менее 20 мг/л или разница между вовлеченными и невовлеченными СЛЦ менее 10 мг/л.

Литература

1. Kyle RA, Larson DR, Therneau TM et al. Long-term follow-up of monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N Engl J Med* 2018; 378(3):241—249. DOI: 10.1056/NEJMoa1709974.
2. Kyle RA, Rajkumar SV. Monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Br J Haematol* 2006; 134(6):573—589. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2006.06235.x.
3. Tate J, Caldwell G, Daly J et al. Recommendations for standardized reporting of protein electrophoresis in Australia and New Zealand. *Ann Clin Biochem* 2012; 49:242—256. DOI: 10.1258/acb.2011.011158.
4. Booth RA, McCudden CR, Balion CM et al. Candidate recommendations for protein electrophoresis reporting from the Canadian Society of Clinical Chemists Monoclonal Gammopathy Working Group. *Clin Biochem* 2018; 51:10—20. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2017.10.013.
5. Rostagno A, Ghiso J. Biochemical analysis of myoglobinuria associated with rhabdomyolysis. *Acta Biochim Clin Latinoam* 2013; 47:17—24.
6. Варламова Е. Ю. Иммунохимические методы исследования в гематологии // Руководство по гематологии / под ред. А. И. Воробьева. М.: Ньюдиамед, 2002. Т. 1. С. 129—136.
7. Mead GP, Carr-Smith HD, Drayson MT et al. Serum free light chains for monitoring multiple myeloma. *Br J Haematol* 2004; 126:348—354. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2004.05045.x.
8. Stern S, Chaudhuri S, Drayson M et al; Haemato-Oncology Task Force of the British Society for Haematology and the UK Myeloma Forum. Investigation and management of the monoclonal gammopathy of undetermined significance: A British Society for Haematology Good Practice Paper. *Br J Haematol* 2023; 202(4):734—744. DOI: 10.1111/bjh.18866.

9. Менделеева Л. П., Покровская О. С., Рехтина И. Г. Протокол диагностики и лечения множественной миеломы //Алгоритмы диагностики и протоколы лечения заболеваний системы крови / под ред. В. Г. Савченко. М.: Практика, 2018. Т. 2. С. 405—496.
10. Caers J, Garderet L, Kortóm KM et al. European Myeloma Network recommendations on tools for the diagnosis and monitoring of multiple myeloma: what to use and when. *Haematologica* 2018; 103(11):1772—1784. DOI: 10.3324/haematol.2018.189159.
11. Kumar S, Paiva B, Anderson KC et al. International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual disease assessment in multiple myeloma. *Lancet Oncol* 2016; 17(8):328—346. DOI: 10.1016/S1470-2045(16)30206-6.
12. Muchtar E, Buadi FK, Dispenzieri A et al. Immunoglobulin light-chain amyloidosis: from basics to new developments in diagnosis, prognosis and therapy. *Acta Haematol* 2016; 135(3):172—190. DOI: 10.1159/000443200.
13. Comenzo RL, Reece D, Palladini G et al. Consensus guidelines for the conduct and reporting of clinical trials in systemic light-chain amyloidosis. *Leukemia* 2012; 26(11):2317—2325. DOI: 10.1038/leu.2012.100.
14. Bou Zerdan M, Nasr L, Khalid F et al. Systemic AL amyloidosis: current approach and future direction. *Oncotarget* 2023; 14:384—394. DOI: 10.18632/oncotarget.28415.
15. Wechalekar AD, Cibeira MT, Gibbs SD et al. Guidelines for non-transplant chemotherapy for treatment of systemic AL amyloidosis: EHA-ISA working group. *Amyloid* 2023; 30(1):3—17. DOI: 10.1080/13506129.2022.2093635.

И. В. Гальцева, Ю. О. Давыдова, Н. М. Капранов,
К. А. Никифорова, Л. П. Менделеева

Глава 9.

Диагностика и определение минимальной остаточной болезни при множественной миеломе методом проточной цитометрии

Введение

Множественная миелома (ММ) — заболевание, характеризующееся мультифокальной пролиферацией неопластических плазматических клеток (ПК), ассоциированное с секрецией моноклонального иммуноглобулина. Частота встречаемости ММ составляет приблизительно 1% от всех случаев злокачественных опухолей и 13% — от гемопэтических опухолей [1]. Согласно данным А. Д. Каприна и соавт., в 2019 г. зарегистрировано 4698 новых случаев ММ в РФ, а «грубый» показатель заболеваемости в 2019 г. составил 3,2 на 100 000 населения [2]. Возрастная медиана заболеваемости ММ составила 63 года [3].

Применение новых программ лечения, включающих современные лекарственные препараты, внедрение высокодозной химиотерапии с последующей ауто-ТСКК увеличили общую выживаемость пациентов с ММ стандартного риска до 7 лет и более [4], но у пациентов развиваются рецидивы заболевания. В связи с этим возникла необходимость в более глубокой оценке полноты ремиссии, что и было рекомендовано International Myeloma Working Group (IMWG) в 2016 г. [5].

Особое место в дифференциальной диагностике плазмоклеточных опухолей и определении минимальной остаточной болезни (МОБ) при ММ занимает многоцветная проточная цитометрия (МПЦ). МОБ —

это присутствие остаточных опухолевых клеток в костном мозге (КМ) в период полной ремиссии (ПР) после проведенной химиотерапии, которые можно выявить только с помощью высокочувствительных методов. Выявление МОБ у пациентов с ММ — значимый фактор прогноза, что подтверждено многочисленными исследованиями с помощью различных методов определения МОБ: МПЦ [6, 7], ПЦР или секвенирование нового поколения [8—10]. Так, в 2017 году И. В. Гальцева и соавт. показали, что у пациентов с ММ при отсутствии МОБ перед ауто-ТГСК или на 100-й день после ауто-ТГСК вероятность развития иммунохимического рецидива ниже, чем при выявляемой методом МПЦ МОБ ($p = 0,016$ и $p = 0,024$ соответственно) [9]. В исследовании М. В. Соловьева и соавт. показано, что у пациентов с МОБ-негативным статусом, определенным с использованием МПЦ на 100-й день после ауто-ТГСК, двухлетняя безрецидивная выживаемость (БРВ) была значимо выше, чем у пациентов с МОБ-позитивным статусом (52,9% против 37,2%, $p = 0,05$) [11]. Метаанализ, выполненный Munshi и соавт., продемонстрировал, что достижение МОБ-негативного статуса ассоциировано с лучшими показателями выживаемости как при лечении впервые выявленной ММ, так и рефрактерной формы или рецидивов ММ [12].

Иммунофенотип нормальных и миеломных плазматических клеток

ММ — заболевание, характеризующееся неопластической пролиферацией одного клона ПК. Миеломные клетки — это опухолевый аналог нормальных ПК, поэтому для них так же характерны экспрессия CD138 и высокая экспрессия CD38. Но вследствие генетических поломок, происходящих в миеломных клетках, на их поверхности начинают появляться белки, которые на нормальных ПК отсутствуют, и, наоборот, отсутствуют антигены, которые должны быть на нормальных ПК. Другим отличием миеломных клеток от нормальных ПК является их клональность. Нормальные ПК поликлональны и характеризуются тем, что каждый клон синтезирует определенный тип иммуноглобулина с уникальной антигенспецифичной областью. Как известно, иммуноглобулины состоят из тяжелой и легкой цепей, причем выделяют два типа легких цепей — κ и λ . Так как в процессе созревания В-клетки выбор легкой цепи происходит случайным образом, то и соотношение ПК с κ -легкой цепью к ПК с λ -легкой цепью будет примерно 1:1. По данным Marti и соавт., это соотношение κ : λ легких цепей иммуноглобулинов может в норме варьировать от 1:3 до 3:1 [13].

ИФТ популяции нормальных ПК описывается как CD138⁺CD38^{high}CD19⁺/-CD56-CD45⁺/-CD20-CD27⁺CD117-CD81⁺CD200^{dim}. При этом ПК должны быть поликлональными по внутриклеточным легким цепям иммуноглобулина κ и λ. Часто нормальные ПК могут иметь иммунофенотипические характеристики, характерные для миеломных клеток. По данным разных авторов, до 50% нормальных ПК могут не экспрессировать CD19, до 41% — иметь слабую или отрицательную экспрессию CD45, 26% — экспрессировать CD56, до 9% — нести на поверхности CD20 [15—18]. В редких случаях на нормальных ПК можно обнаружить одновременно два или три маркера, экспрессия которых характерна для миеломных клетках. Например, примерно 9—12% нормальных ПК могут иметь иммунофенотип CD19-CD56⁺ [15, 17, 18].

Пробоподготовка

Оптимальной методикой пробоподготовки, позволяющей добиться наибольшей чувствительности анализа, является предварительный лизис эритроцитов с последующей отмывкой и концентрированием ядросодержащих клеток КМ. Лизис эритроцитов осуществляется с помощью лизирующего раствора хлорида аммония без фиксирующих составляющих согласно инструкции производителя. Затем клетки необходимо осадить центрифугированием и отмыть в фосфатном буфере. Для анализа МОБ отбирают 3—5 млн клеток, если это возможно, а на этапе первичной диагностики ММ достаточно 500—700 тысяч клеток, которые окрашивают меченными флуорохромами моноклональными антителами. Для выделения ПК набор используемых моноклональных антител должен включать как минимум антитела против CD38, CD138 и CD45. Для анализа иммунофенотипа с целью отнесения ПК к нормальным или миеломным панель антител обязательно должна содержать как минимум антитела против CD19 и CD56, CD27, CD117. Другие маркеры, которые используются для оценки аберрантности иммунофенотипа ПК: CD27, CD28, CD117, CD20, CD81, CD200, CD33, CD54, CD307.

В НИИЦ гематологии для дифференциальной диагностики ММ и мониторинга МОБ используется панель моноклональных антител, позволяющая определять экспрессию 10 поверхностных маркеров: CD138, CD38, CD319, CD19, CD45, CD20, CD27, CD117, CD56, CD81. В затруднительных случаях, когда анализ поверхностных маркеров не дает четкого понимания, являются ли ПК аберрантными, выполняется определение соотношения κ:λ в исследуемой субпопуляции ПК. В таком случае пробирка будет включать антитела против мембранных антигенов CD19, CD38, CD56, CD27, CD45, CD138 и моноклональные

антитела к легким цепям κ и λ , которыми образец окрашивается внутриклеточно. Панель моноклональных антител представлена в табл. 1.

Таблица 1. Панель моноклональных антител для дифференциальной диагностики ММ и мониторинга МОБ, используемая в НМИЦ гематологии

Флуорохром	Пробирка 1		Пробирка 2	
	Антиген	Клон антитела	Антиген	Клон антитела
FITC	CD38	HIT2	λ	Поликлональные кроличьи
PE	CD19	SJ25C1	κ	
PE- Dazzle 594	CD319	162.1	—	—
PerCP-Cy5.5	7-AAD	—	CD38	HIT2
PE-Cy7	CD56	NCAM 16.2	CD56	NCAM 16.2
APC	CD117	104D2	CD19	SJ25C1
APC-R700	CD27	M-T271	CD27	M-T271
APC-Fire750	CD45	HI30	CD45	HI30
BV421	CD138	MI15	CD138	MI15
BV605	CD81	JS-81	—	—
BV650	CD20	2H7	—	—

7-AAD — 7-аминоактиномицин D; APC — алофикоцианин; APC-Fire750 — алофикоцианин Fire750; APC-R700 — алофикоцианин R700; BV — бриллиантовый фиолетовый; FITC — флуоресцеина изотиоцианат; PE — фикоэритрин; PE-Dazzle594 — фикоэритрин Даззл 594; PE-Cy7 — фикоэритрин-цианин 7; PerCP-Cy5.5 — перидинил-хлорофилл протеин-цианин 5.5.

Стратегия гейтирования

Детекция МОБ при множественной миеломе заключается в поиске популяции ПК, экспрессирующих aberrантное сочетание антигенов, не встречающееся на нормальных ПК.

Первой задачей гейтирования является выделение общей популяции ПК. Для этого выполняются следующие этапы (рис. 1, диаграммы 1—8):

1. Исключить из анализа агрегаты клеток (гейт «единичные события») на графике прямого светорассеяния по площади пика «FSC-A» (forward scatter) против прямого светорассеяния по высоте «FSC-H».
2. Для контроля качества сбора данных рекомендуется также установить гейт на диаграмме «SSC-A против time» (гейт «время»). Здесь показан равномерный сбор данных.
3. Исключить нежизнеспособные клетки по степени окрашивания ДНК-красителем 7-AAD (гейт «ядросодержащие события»).

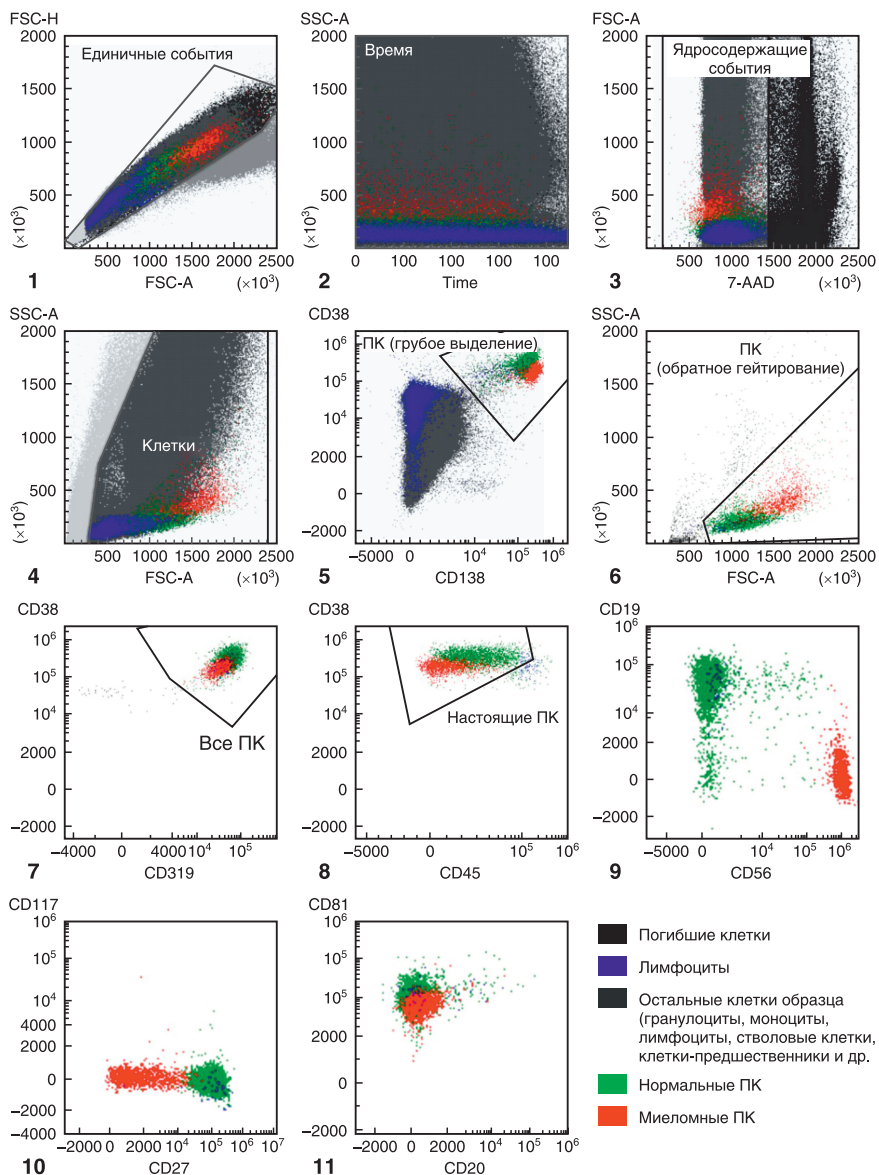


Рисунок 1. Стратегия выделения нормальных и aberrантных ПК. Собственные данные.

4. Исключить погибшие клетки, осколки разрушенных клеток и нелизированные эритроциты на диаграмме линейных шкал SSC-A и FSC-A (гейт «клетки»).
5. На диаграмме «CD138 против CD38» выделить все CD138⁺CD38⁺ события, захватывая также события с более низкой экспрессией CD138 и CD38 [гейт «ПК (грубое выделение)»].
Использование тактики выделения ПК на графике «CD38 против SSC-A» может привести к ложноотрицательному результату в случае, когда экспрессия CD38 на миеломных клетках низкая. Совместное применение CD38, CD138, CD45 и показателя SSC-A обеспечивает оптимальную точность и сходимость результатов независимо от исполнителя анализа. Важно, чтобы первый гейт для выделения ПК устанавливался на графике «CD38 против CD138», а не «CD38 против CD45», чтобы ПК с низкой или отсутствующей экспрессией CD45 не были случайно исключены [17].
6. На диаграмме линейных шкал SSC-A и FSC-A выбрать клетки, соответствующие по размерам ПК, моноцитам и лимфоцитам [гейт «ПК (обратное гейтирование)»].
7. На диаграмме «CD38 против CD319» выбрать клетки, с высокой плотностью экспрессирующие CD319 (гейт «все ПК»); если в панели антитело против CD319 отсутствует, то этот шаг пропускается.
8. На диаграмме «CD45 против CD38» выбрать клетки с высокой плотностью экспрессии CD38 и умеренной или низкой экспрессией CD45 (гейт «настоящие ПК»). CD45 не должен быть использован как маркер для исключения клеток, так как и нормальные, и миеломные ПК характеризуются вариабельной экспрессией CD45 [20].

Использование антител против CD319 не является обязательным, но при этом лишь совместное применение CD38, CD138, CD45 и показателя SSC-A обеспечивает оптимальную точность и сходимость результатов независимо от исполнителя анализа. Важно, чтобы первый гейт для выделения ПК устанавливался на графике «CD38 против CD138», а не «CD38 против CD45», чтобы ПК с низкой или отсутствующей экспрессией CD45 не были случайно исключены [18].

После правильного определения популяции всех ПК в образце КМ второй задачей анализа является разделение нормальных и миеломных ПК по экспрессии рекомендуемых антигенов (рис. 1, диаграммы 9—11). Нормальные ПК выделены зеленым цветом, аберрантные — красным.

Экспрессия антигенов на аберрантных ПК оценивается относительно экспрессии тех же антигенов на нормальных ПК. Руководство 2006 г. The Bethesda International Consensus Recommendations советует

для описания экспрессии антигенов использовать такие термины, как «сниженная», «нормальная» и «повышенная» по сравнению с нормальной референсной популяцией клеток [20]. Также для обозначения сниженной и повышенной экспрессии антигенов могут применять термины «dim», «high».

Количественный подсчет минимальной остаточной болезни, определение чувствительности, формирование заключения

В результате цитометрического анализа данных у пациентов с ММ делается заключение о наличии или отсутствии МОБ.

За популяцию миеломных клеток с аберрантным иммунофенотипом принимается гомогенная группа клеток, имеющих похожую экспрессию большинства изучаемых антигенов, а также близкие показатели прямого и бокового светорассеяния. В таком случае группу обнаруженных клеток называют кластером. В ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ заключение о наличии МОБ делается, только если обнаруженный кластер миеломных ПК состоит из 20 клеток и более. Размер популяции, принимаемой за минимальную, выбирается внутрилабораторно и зависит от возможностей проточных цитометров и опыта сотрудников, выполняющих анализ [16].

Когда кластер миеломных клеток обнаружен и включает более 20 клеток, то подсчитывают долю этой популяции от всех выявленных ПК и от всех ядросодержащих клеток образца. В заключении указывается, что МОБ выявлена, и представляется иммунофенотип популяции миеломных клеток. При наличии признаков значительного разведения образца периферической кровью (отсутствие или низкое количество В-клеточных предшественников, тучных клеток и эритроидных предшественников) рекомендуется повторное проведение пункции КМ.

Чтобы сделать заключение об отсутствии МОБ, следует оценить следующие параметры:

1. Адекватное качество образца КМ, отсутствие сгустков. При наличии признаков значительного разведения образца периферической кровью рекомендуется повторное проведение пункции КМ.
2. Отсутствие или наличие менее 20 ПК с аберрантным иммунофенотипом среди 2×10^6 ядросодержащих клеток.
3. При отсутствии кластера миеломных клеток обязательно указывается достигнутый порог детекции, или чувствительность исследования — минимальное количество опухолевых клеток, которое можно

обнаруживать в выполненном исследовании. Порог детекции (чувствительность) рассчитывается по следующей формуле:

$$\text{Чувствительность} = \frac{20 \text{ клеток (минимальная популяция)}}{\text{Количество собранных событий (клеток)}} \times 100\%.$$

МОВ-негативность не означает, что опухолевых клеток нет вообще и достигнуто полное отсутствие опухолевых клеток у пациента. МОВ-негативность означает, что в образце не найдено опухолевых клеток при указанной чувствительности метода и что опухолевые клетки могут персистировать, но в меньшем, чем чувствительность метода, количестве.

Согласно международным рекомендациям [16, 21], необходимым порогом чувствительности анализа МПЦ является 0,01—0,0001% (10^{-4} — 10^{-6}) и, чтобы достигнуть требуемой чувствительности, необходимо проанализировать не менее 2—5 млн событий (клеток).

Таким образом, множество факторов имеют значение для правильной оценки миеломных клеток, а именно: правильная стратегия гейтирования, хорошее знание иммунофенотипа нормальных и аберрантных ПК, корректная пробоподготовка. Нельзя забывать, что в течение терапии может наблюдаться селекция клонов опухолевых ПК с разным иммунофенотипом, поэтому необходимо применять широкую панель рекомендуемых моноклональных антител. Грамотная работа на каждом из этапов является гарантией точного и достоверного результата и как следствие более точной оценки ремиссии и прогноза заболевания.

Приложение 1
Пример заключения при диагностике ММ

ФИО: —
Год рождения: ---

ЛПУ: ---
Дата анализа: ---
Материал: Костный мозг

РЕЗУЛЬТАТ:

Кол-во проанализированных клеток	Кол-во плазматических клеток	% от всех клеток
57764	36363	62,951
Кол-во клеток с aberrантным фенотипом	% клеток с aberrантным фенотипом от плазматических клеток	% клеток с aberrантным фенотипом от всех клеток
36363	100,000	62,951

Иммунофенотип выявленной популяции aberrантных клеток:

маркеры	экспрессия	маркеры	экспрессия	маркеры	экспрессия
CD38	+	CD56	high	CD81	
CD138	+	CD27	+/-	CD269	
CD319	+	CD117	+	Kappa (cyt)	+
CD19	-	CD200	-/+	Lambda (cyt)	-
CD45	dim	CD20	-		

Заключение:
Выявлено 62,951% монотипических по внутриклеточной легкой цепи иммуноглобулина к плазматических клеток от всех клеток с aberrантным иммунофенотипом CD38⁺CD138⁺CD319⁺CD19⁻CD45^{dim}CD56^{high}CD27^{+/-}CD117⁺CD200^{-/+}CD20⁻, что может свидетельствовать в пользу неопластического заболевания из плазматических клеток (множественной миеломы).

Приложение 2
Пример отрицательного заключения при мониторинге МОБ ММ

ФИО: —
Год рождения: ---
Диагноз: Множественная миелома

ЛПУ: ---
Дата анализа: ---
Материал: Костный мозг

Этап лечения:
☐ 1 индукция
☐ мобилизация ГСК
☐ перед ауто-ТГСК

☒ после ауто-ТГСК
☐ поддерживающая терапия
☐ другой

РЕЗУЛЬТАТ:

Кол-во проанализированных клеток	Чувствительность, %
1234913	0,002
Кол-во плазматических клеток	% от всех клеток
1554	0,126

LOD = 0,002; LOQ = 0,004

Были исследованы маркеры:
Поверхностные CD38, CD138, CD319, CD19, CD45, CD56, CD27, CD200, CD117, CD20

Заключение:
МОБ не выявляется (при уровне чувствительности 0,002%).

Приложение 3

Пример положительного заключения при мониторинге МОБ ММ

ФИО: —

Год рождения: ---

Диагноз: Множественная миелома

ЛПУ: ---

Дата анализа: ---

Материал: Костный мозг

Этап лечения:

☐ 1 индукция

☐ мобилизация ГСК

☐ перед ауто-ТГСК

☐ после ауто-ТГСК

☐ поддерживающая терапия

☒ другое

РЕЗУЛЬТАТ:

Кол-во проанализированных клеток		Чувствительность, %
1160693		0,002
Кол-во плазматических клеток		% от всех клеток
1336		0,115
Кол-во клеток с аберрантным фенотипом	% от плазматических клеток	% от всех клеток
668	50	0,058

LOD = 0,002; LOQ = 0,004

Иммунофенотип выявленной популяции аберрантных клеток:

маркеры	экспрессия	маркеры	экспрессия	маркеры	экспрессия
CD38	+	CD56	+	CD81	
CD138	+	CD27	+	CD269	
CD319	+	CD117	-/+	Kappa (cyt)	
CD19	-	CD200	-	Lambda (cyt)	
CD45	-	CD20	-		

Заключение:
МОБ выявлена (0,058%).

Литература

1. Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. Lancet Oncol 2014; 15(12):e538—e548. doi:10.1016/S1470-2045(14)70442-5.

2. Каприн А. Д., Старинский В. В., Шахзадова А. О. и др. Злокачественные новообразования в России в 2019 году (заболеваемость и смертность). — М.: МНИОИ им. П. А. Герцена — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2020.

3. Соловьев М. В., Менделеева Л. П., Алексеева А. Н. и др. Эффективность терапии множественной миеломы в России (результаты многоцентрового проспективного исследования). Гематология и трансфузиология 2020; 65(1): 103—104.

4. Rajkumar SV. Multiple myeloma: 2016 update on diagnosis, risk-stratification, and management. The Am J Hematol 2016; 91(7):719—734. DOI:10.1002/ajh.24402.

5. Kumar S, Paiva B, Anderson KC et al. International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual disease assessment in multiple myeloma. Lancet Oncol 2016; 17(8):e328—e346. DOI:10.1016/S1470-2045(16)30206-6.

6. Paiva B, Vidriales M-B, Mateo G et al. The persistence of immunophenotypically normal residual bone marrow plasma cells at diagnosis identifies a good prognostic subgroup of symptomatic multiple myeloma patients. *Blood* 2009; 114(20): 4369—4372. DOI:10.1182/blood-2009-05-221689.
7. Rawstron AC, Child JA, de Tute RM et al. Minimal residual disease assessed by multiparameter flow cytometry in multiple myeloma: impact on outcome in the Medical Research Council Myeloma IX Study. *J Clin Oncol* 2013; 31(20):2540—2547. DOI:10.1200/JCO.2012.46.2119.
8. Martinez-Lopez J, Lahuerta JJ, Pepin F et al. Prognostic value of deep sequencing method for minimal residual disease detection in multiple myeloma. *Blood* 2014; 123(20):3073—3079. DOI:10.1182/blood-2014-01-550020.
9. Korde N, Mailankody S, Roschewski M et al. Minimal residual disease (MRD) Testing in newly diagnosed multiple myeloma (MM) patients: a prospective head-to-head assessment of cell-based, molecular, and molecular-imaging modalities. *Blood* 2014; 124(21):2105. DOI:10.1182/blood.V124.21.2105.2105.
10. Avet-Loiseau H, Corre J, Lauwers-Cances V et al. Evaluation of minimal residual disease (MRD) by next generation sequencing (NGS) is highly predictive of progression free survival in the IFM/DFCI 2009 trial. *Blood* 2015; 126(23):191. DOI:10.1182/blood.V126.23.191.191.
11. Соловьев М. В., Менделеева Л. П., Покровская О. С. и др. Множественная миелома: поддерживающая терапия после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток в зависимости от минимальной остаточной болезни. *Терапевтический архив* 2017; 89(7):25-31. DOI:10.17116/terarkh201789725-31.
12. Munshi NC, Avet-Loiseau H, Anderson KC et al. A large meta-analysis establishes the role of MRD negativity in long-term survival outcomes in patients with multiple myeloma. *Blood Adv* 2020; 4(23):5988—5999. DOI:10.1182/BLOODADVANCES.2020002827.
13. Marti GE, Rawstron AC, Ghia P et al. Diagnostic criteria for monoclonal B-cell lymphocytosis. *Br J Haematol* 2005; 130(3):325—332. DOI:10.1111/j.1365-2141.2005.05550.x.
14. Bataille R, Jégo G, Robillard N et al. The phenotype of normal, reactive and malignant plasma cells. Identification of “many and multiple myelomas” and of new targets for myeloma therapy. *Haematologica* 2006; 91(9):1234—1240.
15. Tembhare PR, Yuan CM, Venzon D et al. Flow cytometric differentiation of abnormal and normal plasma cells in the bone marrow in patients with multiple myeloma and its precursor diseases. *Leukemia Research* 2014; 38(3):371—376. DOI:10.1016/J.LEUKRES.2013.12.007.
16. Arroz M, Came N, Lin P et al. Consensus guidelines on plasma cell myeloma minimal residual disease analysis and reporting. *Cytometry B Clin Cytom* 2016; 90(1):31—39. DOI:10.1002/cyto.b.21228.
17. Peceliunas V, Janiulioniene A, Matuzeviciene R, Griskevicius L. Six color flow cytometry detects plasma cells expressing aberrant immunophenotype in bone marrow of healthy donors. *Cytometry B Clin Cytom* 2011; 80(5):318—323. DOI:10.1002/cyto.b.20601.

18. Flores-Montero J, de Tute R, Paiva B et al. Immunophenotype of normal vs. myeloma plasma cells: Toward antibody panel specifications for MRD detection in multiple myeloma. *Cytometry B Clin Cytom* 2016; 90(1):61—72. DOI: 10.1002/CYTO.B.21265.
19. Flores-Montero J, Sanoja-Flores L, Paiva B et al. Next Generation Flow for highly sensitive and standardized detection of minimal residual disease in multiple myeloma. *Leukemia* 2017; 31(10):2094—2103. DOI:10.1038/LEU.2017.29.
20. Paiva B, Gutiérrez NC, Rosiñol L et al. High-risk cytogenetics and persistent minimal residual disease by multiparameter flow cytometry predict unsustained complete response after autologous stem cell transplantation in multiple myeloma. *Blood* 2012; 119(3):687—691. DOI:10.1182/blood-2011-07-370460.
21. Stetler-Stevenson M, Paiva B, Stoolman L et al. Consensus guidelines for myeloma minimal residual disease sample staining and data acquisition. *Cytometry B Clin Cytom* 2016; 90(1):26—30. DOI:10.1002/cyto.b.21249.

Глава 10.

Методы дифференциальной диагностики острых форм порфирии

Биохимическая лабораторная диагностика является первостепенным этапом при обследовании пациента с подозрением на острую порфирию в первые дни заболевания. К сожалению, в клинической практике часто встречаются случаи ошибочной постановки диагноза таким пациентам, вследствие чего они не получают жизненно важную патогенетическую терапию. Более того, возможно ухудшение состояния пациента при назначении порфириногенных препаратов. Результатом может стать тяжелая инвалидизация пациента или летальный исход.

К острым формам порфирии относят острую перемежающуюся порфирию (ОПП), наследственную копропорфирию, variegate порфирию и очень редко встречающуюся в мировой практике форму порфирии, обусловленную дефицитом дегидратазы дельта-аминолевулиновой кислоты. Во время острого приступа заболевания у пациентов обнаруживается значительное увеличение содержания порфиринов и их предшественников — порфобилиногена (ПБГ) и дельта-аминолевулиновой кислоты (АЛК) в моче, кале и крови.

Цель биохимической лабораторной диагностики порфирий — обнаружить избыток порфиринов и их предшественников в моче и при выявлении каких-либо изменений провести дифференциальную диагностику различных форм порфирии, исследуя другие биологические образцы пациента.

Этапы лабораторной диагностики острой порфирии

Острую порфирию можно подозревать у любого пациента, поступающего в клинику с абдоминальными болями без объективно установленной причины, психическими нарушениями и периферической нейропатией. Для исключения или подтверждения диагноза рекомендуется провести ряд лабораторных исследований [1, 2].

Первоочередным тестом является качественный тест с реактивом Эрлиха, который позволит достаточно быстро опровергнуть диагноз, а в противоположном случае заподозрить у пациента острую порфирию. Тест прост в исполнении, не требует специального оборудования и дорогостоящих реактивов, производится на территории РФ (фирма «Агат» выпускает наборы «ПБГ-АГАТ») и отличается простотой в приготовлении, длительной стабильностью после вскрытия флаконов и низкой себестоимостью. Доступен для клинично-диагностических лабораторий любого уровня. При выполнении теста необходимо соблюдать ряд требований: следует проводить его в период острой фазы заболевания до начала терапии, использовать свежесобранную утреннюю мочу, защищенную от контакта со светом.

I. Качественный тест на выявление избытка порфобилиногена в моче

Исследование проводят с помощью реактива Эрлиха по методу Watson—Schwartz [3].

Принцип метода. ПБГ реагирует с реактивом Эрлиха, образуя в кислом растворе окрашенный продукт розово-красного цвета. Поскольку эта реакция может происходить с другими веществами, присутствующими в моче, в тесте используется экстракция и регулировка pH раствора для исключения влияния мешающих веществ.

Биоматериал. Тест проводится с использованием только свежесобранной мочи, защищенной от контакта со светом. Моча, собранная более чем за 4 часа до исследования, не может быть использована, поскольку концентрация ПБГ снижается на 20% в течение 24 часов при комнатной температуре. При хранении образца при -20°C уровень ПБГ в моче может быть стабилен в течение 6 месяцев.

Реагенты:

1. Реактив Эрлиха: 0,7 г пара-диметиламинобензальдегида растворить в 100 мл дистиллированной воды, а затем добавить 150 мл концентрированной соляной кислоты. Реагент должен храниться в темном

флаконе при 4—8 °С, при данных условиях он стабилен в течение 6 месяцев.

2. Насыщенный раствор ацетата натрия: 120 г CH_3COONa растворить в 100 мл горячей (70—80 °С) дистиллированной воды.
3. Смесь н-амилового и бензилового спиртов в соотношении 3:1.
4. Реагент сравнения: разбавить 150 мл концентрированной соляной кислоты в 100 мл дистиллированной воды.

Описание метода:

1. Добавить 0,5 мл реактива Эрлиха в стеклянную пробирку с 0,5 мл исследуемой мочи, перемешать. Добавить 1 мл насыщенного раствора ацетата натрия, перемешать. С помощью индикаторной бумаги проверить, что pH раствора находится в диапазоне от 4 до 5. Если в течение 3—4 мин содержимое пробирки приобретет розовый или красный цвет, то перейти к следующим пунктам исследования. Если окраска не появилась, то ПБГ не обнаружен.
2. Необходимо повторить процедуру из п. 1 с реагентом сравнения (заменив им реактив Эрлиха), чтобы исключить присутствие посторонних примесей, которые могут повлиять на результат. Если розовая окраска появится снова, то, вероятно, в моче содержится кислотный индикатор (например, метиловый красный), оказавшийся в моче после применения либо лекарственных препаратов, содержащих красители, либо легких алкогольных напитков, либо пищевых продуктов с различными добавками.
3. Для исключения уробилиногена как причины появления розовой окраски необходимо добавить 2 мл смеси н-амилового и бензилового спиртов в пробирку с содержимым из п. 1. Хорошо перемешать путем встряхивания и дать разделиться слоям. Комплекс уробилиногена с реактивом Эрлиха должен проэкстрагироваться в верхний органический слой. Розовая окраска нижнего водяного слоя указывает на присутствие ПБГ.

Этот тест почти всегда положителен при острых приступах порфирии. Однако иногда можно получить ложноположительный результат вследствие присутствия в моче посторонних веществ.

Отрицательный результат теста на ПБГ снижает вероятность, но окончательно не исключает диагноз острой порфирии. Объяснением тому может служить либо наличие в моче некоторых веществ-ингибиторов, которые приводят к ложноотрицательному результату, либо незначительное повышение концентрации ПБГ, которое может быть ниже предела чувствительности скринингового теста. Кроме того, при вариетатной порфирии, наследственной копропорфирии и в редких случаях при ОПП экскреция ПБГ в мочу может быстро снижаться и вернуться к норме в течение нескольких дней после острого приступа.

Таким образом, положительный результат качественного теста, а также отрицательный, если клинически диагноз острой порфирии до конца не отвергается, требует количественного подтверждения, поэтому необходимо перейти к следующему этапу диагностики.

II. Количественное определение порфобилиногена, дельта-аминолевулиновой кислоты в моче

Принцип метода [3]. Образец мочи последовательно проходит через две хроматографические колонки с ионообменной смолой. Первая из них связывает ПБГ, а вторая — АЛК. Путем промывания колонок дистиллированной водой удаляются все сопутствующие вещества. ПБГ и АЛК затем элюируются со смолы в соответствующих колонках, далее проводятся измерения поглощения при 555 нм продукта реакции элюента с реактивом Эрлиха на спектрофотометре.

Биоматериал. Требования, предъявляемые к образцу мочи, такие же, как и для качественного теста (см. п. I).

Реагенты:

1. Набор для определения АЛК и ПБГ фирмы BioSystems (Испания), включающий в состав ионообменные колонки и сопутствующие реагенты.
2. Дистиллированная вода.

Описание метода:

1. Поставить колонку, связывающую ПБГ, на колонку, связывающую АЛК, промыть колонки водой. Нанести 1,0 мл мочи и дать стечь. Промыть колонки дистиллированной водой по 10 мл 2 раза, полностью позволяя стечь каждой порции воды.
2. Разъединить колонки, верхнюю колонку (связывающую ПБГ) поставить на пробирку и добавить в колонку 4 мл уксусной кислоты (1 моль/л), собрать элюент и поместить в темное место.
3. Нижнюю колонку (связывающую АЛК) поставить на пробирку, добавить в колонку 10 мл 1 М раствора ацетата натрия. Собрать элюент, добавить к нему 0,2 мл ацетилацетона, хорошо перемешать и поставить в кипящую водяную баню на 10 минут. Остудить.
4. Смешать последовательно 1 мл элюента из колонок (пп. 2, 3) с равным объемом реактива Эрлиха (заранее приготовленного из реагентов набора), хорошо перемешать. Подождать развития окраски в течение 15 минут.
5. Измерить поглощение на спектрофотометре при 555 нм и рассчитать концентрации ПБГ и АЛК по приведенным в методике формулам. Референсные значения содержания в моче АЛК и ПБГ:
АЛК — 1,5—7,5 мг/л; ПБГ — 0—3,4 мг/л.

Получение нормальных результатов количественного теста на ПБГ и АЛК в моче фактически отвергает порфирию как причину острых симптомов. Больным с повышенным (более 5 норм) уровнем ПБГ и АЛК в моче ставится диагноз острая порфирия (ОПП, наследственная копропорфирия или variegate порфирия). При высоких значениях концентрации только АЛК без повышения уровня ПБГ предполагается порфирия с дефицитом АЛК-дегидратазы либо свинцовое отравление.

На следующем этапе диагностики необходимо провести исследования по дифференцированию ОПП от других форм острой порфирии. Различие между ОПП, variegate порфирией и врожденной копропорфирией выявляется при измерении порфиринов в кале.

III. Определение общих порфиринов в кале

Принцип метода [4]. Небольшое количество кала гомогенизируется в концентрированной соляной кислоте, а затем экстрагируется в эфире для удаления всех посторонних окрашенных соединений. Производные каротина и хлорофилла, а также другие окрашенные вещества переходят в эфирный слой, в то время как порфирины остаются в кислой водной фазе. Эта водная фаза затем сканируется на спектрофотометре. Концентрация общих порфиринов в кале рассчитывается исходя из поглощения водной фазы в области пика Soret и процента сухого веса образца кала.

Биоматериал. Для анализа требуется 10 г образца свежего кала. Образец должен быть защищен от света и храниться в холодном месте во время транспортировки. Если же время транспортировки составляет более 24 часов, образец следует заморозить.

Реагенты:

1. Концентрированная соляная кислота (11,6 моль/л).
2. Диэтиловый эфир (без примеси перекиси).
3. Дистиллированная вода.

Описание метода:

1. Для образца требуется одна полипропиленовая пробирка объемом 10 мл (для проведения экстракции) и предметное стекло (для взвешивания высушенного образца кала). Взвесить пробирку и стекло с точностью до 0,1 мг.
2. Определение процента сухого веса. Поместить около 300 мг каловой массы на стекло и взвесить с точностью до 0,1 мг. Положить в сушильный шкаф с $T = 150\text{ }^{\circ}\text{C}$ на 60 минут для сушки массы. Взвесить образец. Кал должен быть полностью сухим, то есть вес его не должен меняться при дальнейшем процессе сушки.

3. Экстракция. Поместить около 50 мг образца свежего кала в полипропиленовую пробирку и взвесить вместе с пробиркой с точностью до 0,1 мг. Добавить 1 мл концентрированной соляной кислоты в пробирку с калом и тщательно перемешать. Кал должен быть полностью гомогенизирован в кислоте. После добавления кислоты тест должен быть завершен в течение 1 часа. Затем добавить в пробирку 3 мл эфира, осторожно перемешать и в завершение добавить 3 мл дистиллированной воды; содержимое встряхнуть.
4. Центрифугировать содержимое и перенести нижний (водный кислотный) слой пипеткой в кювету.
5. Определить спектр поглощения кислотного слоя между 370 и 430 нм. Отлиновать подножие пика и определить поглощение (A) в области пика Soret (приблизительно при 406 нм) по отношению к этой линии.
6. Расчет.

$$\text{КОП} = (A/W) \times (148500/\% \text{ сухого веса}),$$

где КОП — концентрация общих порфиринов в мкмоль/кг сухого веса кала; A — высота пика поглощения образца по отношению к подножию пика; W — вес образца кала до высушивания в мг; % сухого веса — вес сухого образца / вес до сушки $\times 100$.

В норме концентрация общих порфиринов в кале меньше 200 мкмоль/кг сухого веса кала. Нормальная концентрация общих порфиринов в кале подтверждает диагноз ОПП. При вариегатной порфирии и врожденной копропорфирии эта концентрация увеличена во много раз. Правда, иногда при ОПП наблюдается небольшое увеличение концентрации общих порфиринов в кале.

Таким образом, в результате III этапа диагностируется ОПП, а дифференцировать вариегатную порфирию от копропорфирии можно с помощью следующего исследования.

IV. Спектрофлуориметрическое исследование плазмы

Принцип метода [4, 5]. Плазма пациентов с вариегатной порфирией, особенно в острый период, имеет уникальный спектр комплекса порфирин-пептид, который имеет пик испускания (эмиссии) приблизительно при 626—628 нм после возбуждения светом 405 нм, в отличие от плазмы пациентов с ОПП и наследственной копропорфирией, которые имеют пики эмиссии в области приблизительно от 618 нм до 622 нм.

Биоматериал. Плазма крови пациента.

Реагенты: Фосфатно-солевой буфер (PBS).

Описание метода:

Добавить к 1 мл плазмы 4 мл фосфатно-солевого буфера, перемешать и снять спектр эмиссии раствора в диапазоне 550—700 нм при длине волны возбуждения 405 нм.

В зависимости от расположения пика эмиссии в спектре плазмы пациента становится возможным разделить вариегатную форму от копропорфирии.

Таким образом, на основании результатов приведенных выше методов можно точно установить пациенту диагноз ОПП, наследственной копропорфирии, вариегатной порфирии и порфирии, обусловленной дефицитом АЛК-дегидратазы.

Заключение

Биохимическая лабораторная диагностика острых порфирий представляет собой состоящий из нескольких этапов процесс, результатом которого является точное определение формы заболевания в период его острого течения. Важнейшую задачу представляет проведение первого этапа — качественного скрининг-теста с реактивом Эрлиха, позволяющего подтвердить или опровергнуть предварительный диагноз «острая порфирия». Рекомендуется внедрить методику качественного теста в клиничко-диагностические лаборатории медицинских организаций 3-го уровня. На основании результатов качественного теста в совокупности с данными анамнеза и клинической картиной принимается решение о проведении дальнейших этапов диагностики для определения формы острой порфирии. Заключительным этапом, подтверждающим полученные результаты биохимических исследований, является ДНК-диагностика (см. главу «ДНК-диагностика порфирий»).

Литература

1. Di Pierro E, De Canio M, Mercadante R et al. Laboratory diagnosis of porphyria. *Diagnostics* 2021; 11(8):1343.
2. Anderson KE, Bloomer JR, Bonkovsky HL et. al. Recommendations for diagnosis and treatment of the acute porphyries. *Ann Intern Med* 2005; 142(6):439—450.
3. Карпова И. В., Сурин В. Л., Тагиев А. Ф., Пивник А. В. Лабораторная диагностика острой перемежающейся порфирии. *Проблемы гематологии и переливания крови* 1998; 1:43—48.
4. Blake D, Poulos V, Rossi R. Diagnosis of porphyria — recommended methods for peripheral laboratories. *Clin Biochem Rev* 1992; 13:S2—S25.
5. Enriquez de Salamanca R, Sepulveda P, Moran MJ et al. Clinical utility of fluorometric scanning of plasma porphyrins for the diagnosis and typing of porphyries. *Clin Exp Dermatol* 1993; 18(2):128—130.

Д. С. Селиванова

Глава 11.

Молекулярная диагностика порфирий

Порфирии — это группа моногенных наследственных заболеваний, связанных с нарушением процесса биосинтеза гема и накоплением в организме его предшественников. Порфирии также называют заболеваниями порфиринового обмена.

Классическая схема образования гема состоит из восьми последовательных реакций. На первом этапе из глицина и сукцинила-КоА синтезируется δ -аминолевулиновая кислота (АЛК), далее порфобилиноген, затем последовательно пять различных порфиринов, последний из которых, вступая в реакцию с атомом железа, образует металлопорфирин — гем (рис. 1). Порфирины представляют собой циклические тетрапирролы с различными концевыми группами. Все восемь стадий цепи биосинтеза гема катализируются специфическими ферментами. Каждая из восьми нозологических форм порфирий обусловлена дисфункцией определенного фермента на конкретной стадии каскада биосинтеза гема (табл. 1).

Мутации в генах, кодирующих ферменты системы синтеза гема, приводят к изменению структуры и снижению активности соответствующего фермента и, следовательно, неполному переходу промежуточных продуктов каскада на следующую стадию цепи синтеза. В связи с этим происходит накопление субстратов тех звеньев цепи, кото-

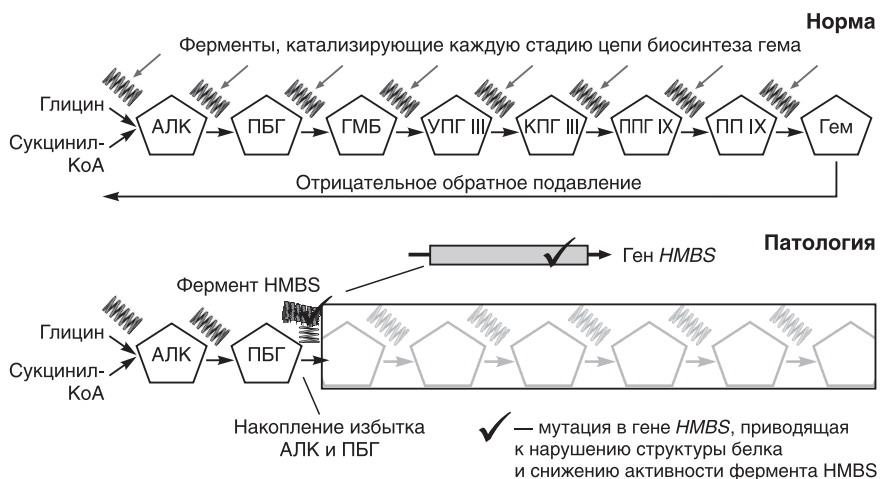


Рисунок 1. Схема биосинтеза гема и механизм развития порфирий на примере острой перемежающейся порфирии. HMBS — гидроксиметилбилансинтаза; АЛК — δ -аминолевулиновая кислота; ГМБ — гидроксиметилбилан; КПГ III — копропорфириноген III; ПБГ — порфобилиноген; ПП IX — протопорфирин IX + Fe; ППГ IX — протопорфириноген IX; УПГ III — уропорфириноген III.

Таблица 1. Биохимические и генетические детерминанты порфирий

Стадия цепи биосинтеза гема (субстрат)	Фермент, катализирующий данную стадию	Ген, кодирующий фермент	Тип порфирии
Глицин + сукцинил-КоА	АЛК-синтаза	<i>ALAS2</i>	Х-сцепленная протопорфирия
АЛК	АЛК-дегидратаза	<i>ALAD</i>	Порфирия дефицита АЛК-дегидратазы
Порфобилиноген	Гидроксиметилбилансинтаза	<i>HMBS</i>	Острая перемежающаяся порфирия
Гидроксиметилбилан	Уропорфириноген-III-синтаза	<i>UROS</i>	Врожденная эритропоэтическая порфирия (болезнь Гюнтера)
Уропорфириноген III	Уропорфириногендекарбоксилаза	<i>UROD</i>	Поздняя кожная порфирия
Копропорфириноген III	Копропорфириногеноксидаза	<i>CPOX</i>	Наследственная копропорфирия
Протопорфириноген IX	Протопорфириногеноксидаза	<i>PPOX</i>	Вариегатная порфирия

рые предшествуют реакции, катализируемой дефектным ферментом. В зависимости от того, на каком этапе каскада происходит нарушение, при каждой нозологической форме порфирии патогенез обусловлен токсическим воздействием на организм именно того набора порфиринов или их предшественников, которые оказались избыточными. Следует отметить, что в процессе синтеза гема участвуют не сами порфирины, а их восстановленная форма — порфириногены. На воздухе бесцветные порфириногены быстро окисляются до порфиринов, дающих красную флюоресценцию. Эта их особенность используется при скрининговом (ориентировочном) тесте на присутствие порфиринов в моче при подозрении на порфирию [1].

Типы порфирий. Классификация

Существуют различные варианты деления форм порфирий на группы [2].

1. В зависимости от ткани, где происходит преимущественное нарушение метаболизма порфиринов порфирии подразделяются на печеночные и эритропоэтические формы.

Печеночные формы порфирии:

- порфирия дефицита АЛК-дегидратазы;
- острая перемежающаяся порфирия;
- наследственная копропорфирия;
- varieгатная порфирия;
- поздняя кожная порфирия.

Эритропоэтические формы порфирии:

- X-сцепленная доминантная эритропоэтическая протопорфирия;
- врожденная эритропоэтическая порфирия (болезнь Гюнтера);
- эритропоэтическая протопорфирия.

Отличительной особенностью эритропоэтических порфирий является то, что они дебютируют, как правило, в детском возрасте и имеют клинику светочувствительности, фотодерматозов и нарушения гемопоэза.

2. По клиническому течению заболевания часто порфирии делят на острые формы порфирии и формы, протекающие с клиникой преимущественного поражения кожных покровов.

В клинике острых порфирий доминируют тяжелые неврологические нарушения, затрагивающие все отделы нервной системы. Активными метаболитами при острых формах порфирии, за исключением порфирии, обусловленной дефицитом АЛК-дегидратазы, являются АЛК и порфобилиноген. Механизм токсического воздействия этих веществ связан с сегментарной демиелинизацией нервных волокон и наруше-

нием нервной проводимости. Дебют острых порфирий, как правило, связан с воздействием на организм носителя мутантного гена провоцирующих факторов. Порфириногенные факторы приводят к повышенному потреблению гема (например, при активации системы цитохрома P450) [3] либо оказывают непосредственное стимулирующее воздействие на активность первого фермента цикла биосинтеза — АЛК-синтазы (например, прогестерон), в результате чего ускоряется синтез всех промежуточных продуктов метаболизма порфиринов, а в условиях недостаточной активности одного из ферментов цепи биосинтеза проявляется накоплением токсичных концентраций субстратов-предшественников.

Острые формы порфирии:

- порфирия дефицита АЛК-дегидратазы;
- острая перемежающаяся порфирия;
- наследственная копропорфирия;
- вариегатная порфирия.

При порфирии дефицита АЛК-дегидратазы и острой перемежающейся порфирии нет кожных проявлений. Это объясняется тем, что АЛК и порфобилиноген являются предшественниками порфиринов и не имеют родства к тканям дермы.

При снижении активности ферментов поздних этапов биосинтеза гема происходит накопление собственно порфиринов, избыток которых в дерме приводит к фототоксическим реакциям. В связи с этим такие острые порфирии, как наследственная копропорфирия и вариегатная порфирия, в своей клинике могут также иметь кожную симптоматику.

Формы порфирий, протекающие с поражением кожных покровов:

- X-сцепленная доминантная эритропоэтическая протопорфирия;
- врожденная эритропоэтическая порфирия;
- эритропоэтическая протопорфирия;
- поздняя кожная порфирия.

3. Унифицированная клиническая классификация:

- острые печеночные порфирии;
- эритропоэтические порфирии;
- хронические печеночные порфирии.

Диагностика

Лабораторная диагностика биохимическими методами

Лабораторная диагностика **острых порфирий** основывается на определении в моче избытка порфобилиногена и АЛК, а также порфиринов [4—8].

На сегодняшний день стандартом биохимической диагностики острых порфирий является количественное измерение порфобилиногена и уровня АЛК в моче методом ионообменной хроматографии. Обычно содержание порфобилиногена в 10—50 раз превышает верхнюю границу референсных значений, не оставляя сомнений в диагнозе. При нормальных уровнях порфобилиногена и АЛК мочи диагноз острой порфирии может быть исключен. При отсутствии возможности количественного измерения порфобилиногена и АЛК допустимо проведение качественного анализа свежей мочи на порфобилиноген с реактивом Эрлиха. Данный тест чувствителен при повышении уровня порфобилиногена в 5 и более раз, что соответствует биохимическим критериям атаки острой порфирии [9]. Более подробно описание биохимических методов диагностики острых порфирий изложено в главе «Методы дифференциальной диагностики острых форм порфирии».

Следует отметить, что образцы мочи для исследования должны быть собраны на высоте симптомов в посуду, защищенную от солнечного света (бумага, фольга), иначе результаты теста могут быть ложноотрицательными. При невозможности исследовать мочу немедленно во время атаки, моча должна быть собрана в лабораторную посуду, защищенную от попадания света (фольга, бумага) и заморожена (-18°C) до отправки в лабораторию. Целесообразно заморозить несколько образцов мочи. У большинства пациентов отмечается повышение концентрации порфобилиногена в моче и во время ремиссии. Однако при сравнении уровня экскреции порфобилиногена с мочой во время ремиссии и в период атаки у всех пациентов отмечается как минимум 2—4-кратное повышение содержания порфобилиногена во время атаки. Нужно иметь в виду, что порфобилиноген быстро разрушается под воздействием солнечного света, в то время как АЛК более стабильна, поэтому желательно исследовать оба метаболита. Во время атаки при острой перемежающейся порфирии, вариегатной порфирии и наследственной копропорфирии также повышены концентрации общих порфиринов в моче. Дифференциальная диагностика вышеуказанных трех форм острых порфирий основывается на биохимическом спектре нарушений порфиринового обмена [9].

Отметим также, что повышение экскреции АЛК, порфобилиногена и порфиринов в моче может быть выявлено не только у пациентов с острыми порфириями, но и у пациентов с различными заболеваниями печени или при отравлении тяжелыми металлами. Клинические проявления указанных состояний могут напоминать острые порфирии, однако содержание порфобилиногена в моче превышает норму не более чем в 2—3 раза [10]. При значительном повышении уровня АЛК в моче необходимо исключить свинцовое отравление.

Для диагностики **кожных форм порфирии** необходимо провести следующие исследования:

- определение общих порфиринов и их предшественников (АЛК и порфобилиноген) в моче;
- определение общих порфиринов в кале;
- определение общих порфиринов в плазме и исследование спектра ее поглощения при флуоресцентной спектроскопии.

Для подтверждения диагноза эритропоэтическая протопорфирия следует провести дополнительный тест — определение содержания общих порфиринов в эритроцитах. При повышенной их концентрации следует измерить соотношение свободного и Zn-связанного протопорфиринов. В случае значительного превышения концентрации свободного протопорфирина подтверждается диагноз эритропоэтическая протопорфирия. Если результаты всех перечисленных тестов у пациента с активными кожными нарушениями будут нормальными, то диагноз порфирии будет маловероятным. В случае же получения хотя бы одного или нескольких положительных результатов подтверждается диагноз кожной порфирии, форма которой определяется с помощью диагностических тестов [11].

ДНК-диагностика

Поиск мутаций в генах, ассоциированных с каждой из форм порфирии, позволяет верифицировать диагноз в любое время вне зависимости от степени клинических проявлений, а также проверить родственников пациента на предмет носительства патогенных генетических нарушений. При выявлении патогенных вариантов у бессимптомных родственников необходимо соблюдение профилактических мероприятий [12].

Для проведения генетического анализа необходим биологический материал от пациента с предполагаемым диагнозом порфирия. В качестве материала может выступать цельная кровь, взятая на ЭДТА, а также кровь на фильтрах или образцы тканей. Из этого материала выделяется ДНК, проводится амплификация всех функционально важных фрагментов гена, детерминирующего предполагаемую нозологическую форму порфирии. Продукты амплификации очищают и проводят секвенирование по Сэнгеру для определения первичной структуры интересующего гена. Если в результате выявляется нарушение, которое привело к развитию заболевания, то диагноз считается подтвержденным. Патогенность мутаций следует проверять по базам данных патогенных вариантов и полиморфизмов:

- HGMD: <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>

- Clinvar: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>
- gnomAD: <https://gnomad.broadinstitute.org/>

В случае отсутствия обнаруженного варианта в базах данных необходимо провести оценку с помощью калькулятора патогенности вариантов нуклеотидной последовательности (<http://calc.genesearch.ru/>). Для оценки патогенности миссенс-вариантов, приводящих к аминокислотным заменам, используют протеомные предсказательные программы, такие как SIFT, PolyPhen, Mutation Taster, Provean и другие.

Новые миссенс-мутации и синонимичные варианты, нарушающие сплайсинг, должны интерпретироваться с осторожностью, крайне рекомендуется проведение функционального анализа, доказывающего их патогенность.

Номенклатура найденных вариантов должна производиться согласно системе HGVS (The Human Genome Variation Society, <http://www.HGVS.org/varnomen>).

После генетического подтверждения диагноза можно проверять родственников больного на носительство именно того нарушения, которое определяет развитие порфирии в данной семье, то есть точно проверять наличие мутации, выявленной у больного.

Типы наследования порфирий

Острая перемежающаяся порфирия, наследственная копропорфирия, вариетатная порфирия и врожденная поздняя кожная порфирия обладают аутосомно-доминантной формой наследования, это означает, что для проявления заболевания достаточно, чтобы была нарушена одна из копий кодирующего гена.

Порфирия дефицита АЛК-дегидратазы и эритропорфирии наследуются аутосомно-рецессивно, то есть для проявления болезни требуется, чтобы были нарушены обе копии гена.

Х-сцепленная протопорфирия является Х-сцепленным доминантным заболеванием, то есть любое нарушение в гене всегда будет приводить к заболеванию.

Исходя из этого очевидно, что диагноз подтверждается в случае острой перемежающейся порфирии, наследственной копропорфирии, вариетатной порфирии и врожденной поздней кожной порфирии при наличии одного патогенного варианта каузативного гена в гетерозиготной форме. При Х-сцепленной протопорфирии для женщин достаточным является присутствие одного генетического нарушения в гетерозиготном состоянии, для мужчин одного нарушения в гемизиготной форме. А для порфирии дефицита АЛК-дегидратазы, врожденной эритропоэтической порфирии и эритропоэтической протопорфирии необходимо выявление в гене, обуславливающем заболевание, либо

одной мутации в гомозиготном состоянии, либо двух мутаций в гетерозиготном виде (компаунд).

Молекулярно-генетические детерминанты порфирий

Острая перемежающаяся порфирия

Острая перемежающаяся порфирия (ОПП) (OMIM: 176000) — наиболее распространенная нозология из группы острых порфирий. Частота встречаемости больных составляет от 1:10 000 до 1:50 000. Заболевание наследуется по аутосомно-доминантному типу.

В основе патогенеза ОПП лежат нарушения в гене фермента гидроксиметилбилансинтазы (HMBS, также известного как порфобилиногендезаминаза PBGD), третьего фермента цепи биосинтеза гема. Для ОПП характерна низкая пенетрантность. То есть болезнь может долгое время оставаться бессимптомной и переходить в клиническую стадию только в 10—15 % случаев. Интересно, что ОПП, как и другие острые печеночные порфирии, в подавляющем большинстве случаев впервые манифестирует в постпубертатном периоде.

Ген *HMBS* (OMIM: 609806, GeneID: 3145) расположен на 11-й хромосоме и включает в себя 15 экзонов. Существуют две альтернативные изоформы гидроксиметилбилансинтазы, одна из которых экспрессируется только в эритроидных клетках, а другая является всетканевой. Эритроидная мРНК *HMBS* начинается со второго экзона, стартовый кодон при этом расположен в третьем экзоне. Иницирующий кодон всетканевой изоформы находится в первом экзоне, однако мРНК не содержит экзон 2, который элиминируется из нее в результате альтернативного сплайсинга. Зрелая мРНК всетканевой изоформы кодирует полипептид, содержащий 361 аминокислотный остаток.

В мире известно более 400 различных мутаций, определяющих развитие острой перемежающейся порфирии. Среди типов мутаций преобладают миссенс- и нонсенс- мутации, а также микроделеции и микроинсерции, приводящие к сдвигу белковой рамки считывания. Кроме того, встречаются мутации сплайсинга и редко протяженные делеции или инсерции. Мутации локализованы в промоторной области всетканевой изоформы (перед первым экзоном), экзонах 1, 3—15, в прилегающих к экзонам интронных регионах и в регуляторной 3'-концевой нетранслируемой области гена.

Большинство известных патогенных вариантов являются уникальными [13]. Исключение составляют распространенные во всем мире и многократно возникавшие независимо нуклеотидные замены в «горячих точках» мутагенеза (в CpG-парах), а также доминирующие в некоторых странах мажорные мутации, характерные только для данного региона [14—17].

По нашим данным, у российских пациентов спектр мутаций состоит из 113 нарушений, которые локализованы в различных функционально значимых частях гена *HMBS*. Среди патогенных вариантов есть несколько доминирующих, они находятся в экзонах 3, 10 и 12. При условии несрочной ДНК-диагностики острой перемежающейся порфирии анализ значимых участков гена можно проводить последовательно, а не одновременно. В первую очередь целесообразно проводить скрининг на самые часто встречающиеся мутации, то есть определять первичную последовательность экзонов 3, 10 и 12 [18]. При отсутствии мутаций в этих регионах необходимо проводить секвенирование остальных функционально важных частей гена. Интроны 3, 5, 8, 11, 13 являются относительно короткими, поэтому возможно объединять экзоны 3—4, 5—6, 8—9, 11—12 и 13—14 парами в один амплифицируемый регион. Также возможно объединение для амплификации 5' и 3' регуляторных областей с первым и пятнадцатым экзонами соответственно.

Рекомендуемые референсные последовательности: NG_008093, NT_033899, NM_000190.

При расшифровке электрофореграмм и сравнении их с референсной последовательностью гена целесообразно фиксировать не только патогенные варианты, но и полиморфизмы. Точечные нуклеотидные замены в гетерозиготном состоянии, не являющиеся патогенными, являются доказательством наличия обоих аллелей гена в данном локусе. Эта информация может быть информативна при отсутствии патогенных мутаций, позволяя сделать вывод об отсутствии протяженных делеции в гене.

Если патогенные мутации не обнаружены, это может говорить:

- о том, что у пациента нет острой перемежающейся порфирии;
- о том, что мутация не может быть идентифицирована использованным методом.

Такие случаи крайне редки. Например, можно заподозрить наличие крупной делеции, что должно быть подтверждено определением точек разрыва, например, путем амплификации протяженных участков гена методом long-PCR или методами, чувствительными к наличию вариации числа копий генов (copy number variations, CNV), такими как мультиплексная амплификация лигазно-связанных проб (MLPA, multiplex ligation-dependent probe amplification). Секвенирование по Сэнгеру нечувствительно к CNV.

В том случае, если у пациента клинически и, что более важно, биохимически установлен диагноз острой порфирии, но не выявлены патогенные нарушения в гене гидроксиметилбилансинтазы, следует провести анализ генов *CPOX* и *PPOX*, детерминирующих развитие

наследственной копропорфирии и вариегатной порфирии соответственно.

Вариегатная порфирия

Вариегатная порфирия (OMIM 176200), называемая также копропорфирией, южноафриканской генетической порфирией и королевской болезнью, обусловлена недостаточностью протопорфириногеноксидазы, седьмого фермента цепи биосинтеза гема. Распространенность вариегатной порфирии в Южной Африке значительно выше (частота встречаемости — 3:1000 человек), чем где-либо еще (частота встречаемости — 0,3:100 000 человек). За исключением этого региона не отмечено расовой или географической предрасположенности к данному заболеванию. Вне Южной Африки вариегатная порфирия встречается реже, чем острая перемежающаяся порфирия. Заболевание наследуется по аутосомно-доминантному типу и обусловлено мутациями в гене протопорфириногеноксидазы (*PPOX*).

Ген *PPOX* (OMIM: 600923 GeneID: 5498) локализован на 1-й хромосоме, включает в себя 13 экзонов и кодирует белок, состоящий из 478 аминокислотных остатков. Стартовый кодон находится во втором экзоне. Ген имеет небольшую длину (около 5 тысяч пар нуклеотидов), и многие его экзоны разделены небольшими интронами, что позволяет объединить при амплификации и секвенировании все его функционально важные участки всего в шесть фрагментов.

Рекомендуемые референсные последовательности: NG_012877, NM_001122764.3.

Наследственная копропорфирия

Наследственная копропорфирия (OMIM 121300) — редкая нозологическая форма из группы острых печеночных порфирий (частота встречаемости — 0,1:100 000 человек), нередко протекающая с поражением кожных покровов из-за повышенной фоточувствительности. В основе патогенеза лежат мутации гена *CPOX*, кодирующего шестой фермент цепи биосинтеза гема — копропорфириногеноксидазу. В связи со снижением активности копропорфириногеноксидазы в организме накапливается избыточное количество копропорфирина, ответственного за возникновение фотосенсибилизации. Индукция АЛК-синтазы с последующим накоплением токсических концентраций АЛК объясняет развитие нейровисцеральных расстройств во время атак заболевания. Заболевание наследуется по аутосомно-доминантному типу.

Ген *CPOX* (OMIM: 612732, GeneID:2838) локализован на 3-й хромосоме и состоит из 7 экзонов, кодирующих белок в 454 аминокислотных остатка. Мутации могут располагаться во всех функциональных частях гена, поэтому необходимо определять первичную структуру промото-

ра, всех семи экзонов, всех зон сплайсинга, а также 3' регуляторной области.

В качестве референсных последовательностей рекомендуется использовать: NG_015994, NM_000097.

Известны также чрезвычайно редкие случаи выявления мутаций в гене копропорфириногенаоксидазы в гомозиготной форме или двух мутаций на разных аллелях (компаунд), что приводит к развитию редкой эритропоэтической формы порфирии — **гарденопорфирии** (OMIM: 618892), которая наследуется аутосомно-рецессивно.

Порфирия дефицита АЛК-дегидратазы

Порфирия дефицита АЛК-дегидратазы (OMIM 612740) — крайне редкая форма острых печеночных порфирий, ассоциированная с частичным дефицитом АЛК-дегидратазы — первого фермента системы биосинтеза гема. В мире описано всего порядка 10 пациентов с этим заболеванием.

Болезнь наследуется по аутосомно-рецессивному типу.

Данный тип порфирии ассоциирован с мутациями в гене *ALAD* (OMIM: 125270, GeneID: 210, синонимы *ALADH*, *PBGS*), кодирующего АЛК-дегидратазу. Ген локализован на длинном плече 9-й хромосомы, состоит из 12 экзонов, стартовый кодон находится во втором экзоне. Белок состоит из 733 аминокислотных остатков.

Известные мутации в гене *ALAD* находятся в разных экзонах. Поскольку мажорные мутации отсутствуют, для подтверждения или исключения диагноза порфирия дефицита АЛК-дегидратазы необходимо определить полную первичную последовательность всех кодирующих частей гена, зон сплайсинга и промоторной области. При выявлении нуклеотидных вариантов, отличающихся от референсной последовательности, необходимо очень внимательно относиться к интерпретации их патогенности. Для данного гена известны миссенс-замены, которые не считаются патогенными.

Рекомендуемые референсные последовательности: X64467.1, NM_000031.6.

Поздняя кожная порфирия

Поздняя кожная порфирия (OMIM 176100) — это один из наиболее распространенных типов порфирии. Расстройство возникает из-за низкого уровня фермента уропорфириноген-III-декарбоксилазы, ответственного за пятый этап синтеза гема. Заболевание характеризуется фотодерматозом и выделением большого количества уропорфирина с мочой.

Наиболее часто встречается **спорадическая форма** поздней кожной порфирии, которая возникает в зрелом возрасте и не детерминирована

генетически, то есть дефицит фермента обусловлен не нарушениями в кодирующем его гене, а другими факторами.

Второй тип поздней кожной порфирии — **наследственный**, на его долю приходится порядка 30% случаев поздней кожной порфирии. При этой форме дефицит уропорфириноген-III-декарбоксилазы обусловлен нарушениями в гене *UROD*. При наличии одной гетерозиготной мутации имеет место **поздняя кожная порфирия**, в то время как нарушения на обоих аллелях гена *UROD* приводят к **гепатоэритропоэтической порфирии**. Соответственно, наследственная поздняя кожная порфирия наследуется по аутосомно-доминантному типу, а гепатоэритропоэтическая порфирия — по аутосомно-рецессивному.

Ген уропорфириноген-III-декарбоксилазы *UROD* (OMIM: 613521, GeneID: 7389) локализован на 1-й хромосоме и включает в себя 10 экзонов; мРНК состоит из 367 кодирующих триплетов. Экзоны и интроны этого гена небольшой длины, что позволяет объединять их для амплификации. Для подтверждения или исключения диагнозов врожденная поздняя кожная порфирия и гепатоэритропоэтическая порфирия необходимо определение первичной последовательности всех десяти экзонов гена и всех зон сплайсинга.

Рекомендуемые референсные последовательности: NG_007122, NM_000374.4.

Эритропоэтическая протопорфирия

В основе эритропоэтической протопорфирии (OMIM: 177000) лежит дефект гена, кодирующего феррохелатазу (*FECH*) — последний фермент в биохимической цепи синтеза гема, в результате чего происходит накопление протопорфирина (преимущественно в эритроидной ткани).

Заболевание наследуется по аутосомно-доминантному типу, однако описаны и случаи аутосомно-рецессивного наследования. В случае аутосомно-доминантного типа наследования болезнь проявляется при наличии патогенного варианта на одном аллеле гена *FECH* и интронной замены с.315-48T>C (rs2272783) на другом аллеле. Интронная замена является функциональным полиморфизмом и встречается практически у всех пациентов с доминантной формой заболевания. При аутосомно-рецессивном типе наследования для развития болезни необходимы патогенные вариации на обоих аллелях гена, либо одна мутация в гомозиготном состоянии, либо две разные мутации в гетерозиготной форме (компаунд).

Ген *FECH* (OMIM: 612386 Gene ID: 2235, синонимы *EPP*, *EPPI*, *FCE*) расположен на 18-й хромосоме и состоит из 11 экзонов и 10 интронов. Зрелый белок состоит из 423 аминокислотных остатков.

Мутации могут быть локализованы во всех функциональных частях гена, поэтому при ДНК-диагностике эритропоэтической протопорфирии необходимо полное определение последовательности промотора, экзонов, зон сплайсинга и частично интрона 3 (для проверки точки с.315-48Т>С).

Рекомендуемые референсные последовательности: NG_008175, NM_001012515.2.

Врожденная эритропоэтическая порфирия

Врожденная эритропоэтическая порфирия, или **болезнь Гюнтера (эритропоэтическая уропорфирия)** (OMIM 263700), — редкая форма кожной порфирии, ассоциированная с частичным дефицитом уропорфириноген-III-синтазы, четвертого фермента каскада биосинтеза гема, приводящего к избыточному накоплению в организме уропорфирина I и других метаболитов цепи биосинтеза гема. Уропорфирин I и копропорфирин I содержатся в плазме, эритроцитах, моче и кале. Болезнь может еще с младенческого возраста проявляться светочувствительностью с поражением кожи, гемолитической анемией, эпизодами покраснения мочи и окрашиванием зубов в красный цвет. Частота встречаемости составляет менее 1 случая на 1 млн новорожденных. Заболевание обусловлено мутациями в гене *UROS*, кодирующем уропорфириноген-III-синтазу.

Врожденная эритропоэтическая порфирия наследуется по аутосомно-рецессивному типу.

Ген *UROS* (OMIM: 606938, GeneID: 7390) расположен на длинном плече 10-й хромосомы, включает в себя 10 экзонов, один из которых, первый, не является кодирующим. Белок состоит из 265 аминокислотных остатков. Для подтверждения или исключения диагноза болезнь Гюнтера необходимо определить полную первичную последовательность всех кодирующих частей гена (экзоны 2—10), зон сплайсинга и промоторной области.

Рекомендуемые референсные последовательности: NG_011557, NM_001324036.

Х-сцепленная доминантная эритропоэтическая протопорфирия

Х-сцепленная доминантная эритропоэтическая протопорфирия (OMIM: 300752) характеризуется накоплением протопорфирина IX и вызвана повышенной активностью АЛК-синтазы. Поскольку происходит накопление протопорфирина IX без сбоев в работе фермента феррохелатазы, весь доступный Fe^{2+} используется в производстве гема, заставляя фермент феррохелатазу использовать Zn^{2+} на его месте, вызывая тем самым накопление цинк-протопорфирина IX. Болезнь характеризуется появлением в раннем детстве тяжелой светочувстви-

тельности. У некоторых пациентов может развиваться заболевание печени или камни в желчном пузыре [19].

Развитие этого заболевания зависит от наличия мутации в последнем, одиннадцатом, экзоне гена *ALAS2* (OMIM: 301300, Gene ID: 212), кодирующего АЛК-синтазу — стартовый фермент каскада биосинтеза гема. Нарушения в других участках этого гена приводят к сидеробластной анемии.

Ген локализован на коротком плече X-хромосомы. Заболевание, как следует из названия, является X-сцепленным, доминантным. Встречается крайне редко.

Рекомендуемые референсные последовательности: NG_008983, NM_000032.5.

Литература

1. Карпова И. В., Пустовойт Я. С., Сурин В. Л. «Многоликая» острая порфирия. Редкий журнал 2017; 6:32—34.
2. Пустовойт Я. С., Кравченко С. К., Шмаков Р. Г., Савченко В. Г. Диагностика и лечение острых порфирий. Национальные клинические рекомендации. Национальное гематологическое общество, 2018.
3. Пустовойт Я. С., Сурин В. Л., Зингерман Б. В. и др. Российский реестр лекарственных препаратов, применяемых у больных с нарушениями порфиринового обмена. Гематология и трансфузиология 2015; 60(3):38—43.
4. Pischik E, Kauppinen R. An update of clinical management of acute intermittent porphyria. Appl Clin Genet 2015; 8:201—214.
5. Balwani M, Wang B, Anderson KE et al. Acute hepatic porphyrias: Recommendations for evaluation and long-term management. Hepatology 2017; 66(4): 1314—1322.
6. Stein P, Badminton M, Barth J et al. Best practice guidelines on clinical management of acute attacks of porphyria and their complications. Ann Clin Biochem 2013; 50(Pt 3):217—223.
7. Hift RJ, Meissner PN. An analysis of 112 acute porphyric attacks in Cape Town, South Africa: Evidence that acute intermittent porphyria and variegate porphyria differ in susceptibility and severity. Medicine (Baltimore) 2005; 84(1):48—60.
8. Woolf J, Marsden JT, Degg T et al. Best practice guidelines on first-line laboratory testing for porphyria. Ann Clin Biochem 2017; 54(2):188—198.
9. Савченко В. Г., Лукина Е. А., Пономарев Р. В. и др. Острые порфирии. Клинические рекомендации. — М., 2021.
10. Pischik E, Kazakov V, Kauppinen R. Is screening for urinary porphobilinogen useful among patients with acute polyneuropathy or encephalopathy? J Neurol 2008; 255(7):974—979.
11. Пустовойт Я. С., Галстян Г. М., Горгидзе Л. А. и др. Протоколы лечения нарушений порфиринового обмена // В кн.: Алгоритмы диагностики и

- протоколы лечения заболеваний системы крови. Под ред. В. Г. Савченко. — М.: Практика, 2018. Том 1, с. 287—332.
12. Yasuda M, Chen B, Desnick RJ. Recent advances on porphyria genetics: Inheritance, penetrance & molecular heterogeneity, including new modifying/causative genes. *Mol Genet Metab* 2019; 128(3):320—331.
 13. Paradisi I, Arias S. Marked geographic aggregation of acute intermittent porphyria families carrying mutation Q180X in Venezuelan populations, with description of further mutations. *J Inherit Metab Dis* 2010; 33(Suppl 3):S455—S463. DOI: 10.1007/s10545-010-9228-x.
 14. Schneider-Yin X, Hergersberg M, Goldgar DE et al. Ancestral founder mutation W283X in the porphobilinogen deaminase gene among acute intermittent porphyria patients. *Hum Hered* 2002; 54:69—81.
 15. Guillén-Navarro E, Carbonell P, Glover G et al. Novel HMBS founder mutation and significant intronic polymorphism in Spanish patients with acute intermittent porphyria. *Ann Hum Genet* 2004; 68:509—514.
 16. Thunell S, Floderus Y, Henrichson A, Harper P. Porphyria in Sweden. *Physiol Res* 2006; 55(Suppl 2):S109—S118.
 17. deRooy FW, Kavelaars FG, Koole-Lesuis H, Wilson JH. Evidence for an ancestral founder of the common R116W mutation in the hydroxymethylbilane synthase gene in acute intermittent porphyria in The Netherlands. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2009; 55(2):64—69.
 18. Селиванова Д. С., Гончарова М. В., Лучинина Ю. А. и др. Молекулярно-генетические аспекты острой перемежающейся порфирии в России. *Гематология и трансфузиология* 2022; 67(S2):135—136.
 19. Ducamp S, Schneider-Yin X, de Rooij F et al. Molecular and functional analysis of the C-terminal region of human erythroid-specific 5-aminolevulinic synthase associated with X-linked dominant protoporphyria (XLDPP). *Hum Mol Genet* 2013; 22(7):1280—1288. DOI: 10.1093/hmg/dd531.

И. В. Гальцева, Ю. О. Давыдова, Н. М. Капранов,
К. А. Никифорова, Е. А. Лукина, Е. А. Михайлова,
Е. Н. Паровичникова

Глава 12.

Диагностика клона ПНГ методом проточной цитометрии

Введение

Пароксизмальная ночная гемоглобинурия (ПНГ), или болезнь Маркиафавы—Микели, — редкое приобретенное гематологическое заболевание, в основе которого лежит мутация гена *PIG-A*. Этот ген кодирует фосфатидилинозитолгликан класса А — каталитическую субъединицу фермента фосфатидилинозитол-N-ацетилглюкозаминилтрансферазы, необходимой для синтеза N-ацетилглюкозаминилфосфатидилинозитола, первого промежуточного соединения в пути биосинтеза гликозилфосфатидилинозитола (GPI). К мембранному GPI-якорю прикрепляется ряд так называемых GPI-заякоренных белков, в том числе CD55, предотвращающий формирование C3-конвертазы в каскаде системы комплемента, и CD59, ингибирующий сборку мембран-атакующего комплекса. Таким образом, на поверхности клетки при ПНГ отсутствует ряд белков, в результате чего клетки становятся чувствительны к комплементу, что приводит к развитию хронических и острых эпизодов внутрисосудистого гемолиза, типичного для данного заболевания.

Частота встречаемости заболевания составляет 15,9 на 1 млн населения. Заболевание может быть диагностировано в любом возрасте, медиана возраста равняется 30 годам. Пятилетняя выживаемость составляет 65% [1—3].

При ПНГ соматическая мутация в X-сцепленном гене *PIG-A* происходит в стволовой гемопоэтической клетке, и поэтому эта мутация будет обнаружена во всех ее «потомках» — эритроцитах, гранулоцитах, моноцитах и лимфоцитах. Так как признаки аномалии свойственны всем гемопоэтическим клеткам, то наблюдается редукция гемопоэза и, как следствие, панцитопения [1—3]. Имеется ряд исследований, согласно которым клетки с мутацией гена *PIG-A* способны избегать иммунно-опосредованной деструкции, которая может элиминировать нормальные стволовые клетки. Тогда клетки с мутантным геном *PIG-A* получают преимущество в росте и становятся основным источником кроветворения. Эти клетки и их потомки называются ПНГ-клоном.

ПНГ-клон встречается не только при пароксизмальной ночной гемоглобинурии, имеющей четкую клиническую симптоматику, но также и у больных с костномозговой недостаточностью, а именно при апластической анемии (АА) и миелодиспластических синдромах (МДС). Около 40% пациентов с АА имеют ПНГ-клон. Некоторые исследования показывают, что пациенты с АА и ПНГ-клоном демонстрируют хороший ответ на иммуносупрессивную терапию, согласно другим исследованиям, у 10—20% пациентов с АА происходит клональная экспансия клона ПНГ с прогрессированием в клинически выраженную пароксизмальную ночную гемоглобинурию [4—7].

Диагностика

Ранние диагностические биохимические тесты основаны на восприимчивости эритроцитов у больных ПНГ к комплемент-опосредованному лизису: тест Хема и проба с раствором сахарозы. Эти тесты применяются и в настоящее время, однако они имеют недостаточно высокую чувствительность и специфичность. Оба эти теста не способны обнаружить малые клоны ПНГ, часто встречающиеся при АА и МДС.

В настоящее время «золотым стандартом» лабораторной диагностики клона ПНГ является метод высокочувствительной проточной цитофлуориметрии [8, 11—13].

Показания для исследования клона ПНГ:

- 1) при наличии у пациента признаков гемолиза (повышение активности ЛДГ, повышение числа ретикулоцитов, снижение уровня гаптоглобина) после исключения аутоиммунной гемолитической анемии (отрицательная проба Кумбса), при наличии гемоглобинурии или гемосидеринурии и почечной дисфункции;
- 2) у пациентов с костномозговой недостаточностью: АА, МДС (рефрактерная цитопения, гипопластический вариант МДС, а при наличии гемолиза — при любом варианте МДС);

- 3) при необъяснимом повышенном тромбообразовании в сочетании с гемолизом, любой цитопенией, отсутствием ответа на терапию антикоагулянтами, при наличии тромбоза в портальной, селезеночной венах и мезентериальных сосудах;
- 4) при АА и МДС у пациентов с подтвержденной ПНГ рекомендуется дальнейший мониторинг клона ПНГ (один-два раза в год, а при ухудшении состояния, при появлении признаков гемолиза — незамедлительно) [9, 10, 13, 14].

Для диагностики клона ПНГ методом проточной цитофлуориметрии исследуют 1—2 мл периферической крови, используя в качестве антикоагулянта ЭДТА или гепарин. Использовать костный мозг не рекомендуется, так как миелоидные предшественники имеют меньшую плотность GPI-заякоренных белков. Наличие ПНГ-клона на нейтрофилах подтверждается при потере ими GPI-заякоренного белка CD24, но и часть менее зрелых миелоцитов в норме не экспрессирует этот белок. Аналогичным образом ситуация обстоит и с экспрессией CD14 на моноцитах — на промоноцитах этот антиген не экспрессирован. Таким образом, при исследовании костного мозга не всегда есть возможность отличить нормальные, но менее зрелые миелоидные клетки от клеток с дефицитом GPI-связанных белков, возникшим в результате мутации в гене *PIG-A*. Поэтому для анализа необходимо использовать периферическую кровь, а не костный мозг.

На рис. 1, А—Б видно, что в крови популяции моноцитов и гранулоцитов имеют гомогенную экспрессию GPI-связанных CD14 и CD24 соответственно. А в костном мозге на рис. 1, В—Г в нижних левых прямоугольниках определяются предшественники нейтрофилов и моноцитов, а не ПНГ-клон.

Так как ПНГ-клон может обнаруживаться среди всех популяций клеток крови, то исследуют эритроциты, а также гранулоциты и моноциты. Вследствие быстрого гемолиза и проводимых трансфузий эритроциты не всегда репрезентативны, но их анализ обязателен. Гранулоциты и моноциты имеют короткую продолжительность жизни в периферической крови, и размер выявленного среди них ПНГ-клона коррелирует с количеством стволовых клеток с мутациями в гене *PIG-A*. Лимфоциты имеют более высокую продолжительность жизни и не подходят для диагностики ПНГ-клона [8, 13, 15].

В панель моноклональных антител для диагностики клона ПНГ должны входить следующие антитела:

1. Моноклональные антитела к линейно специфичным антигенам, не являющимся GPI-связанными и экспрессирующимся на зрелых клетках и отсутствующим на их предшественниках: к антигену

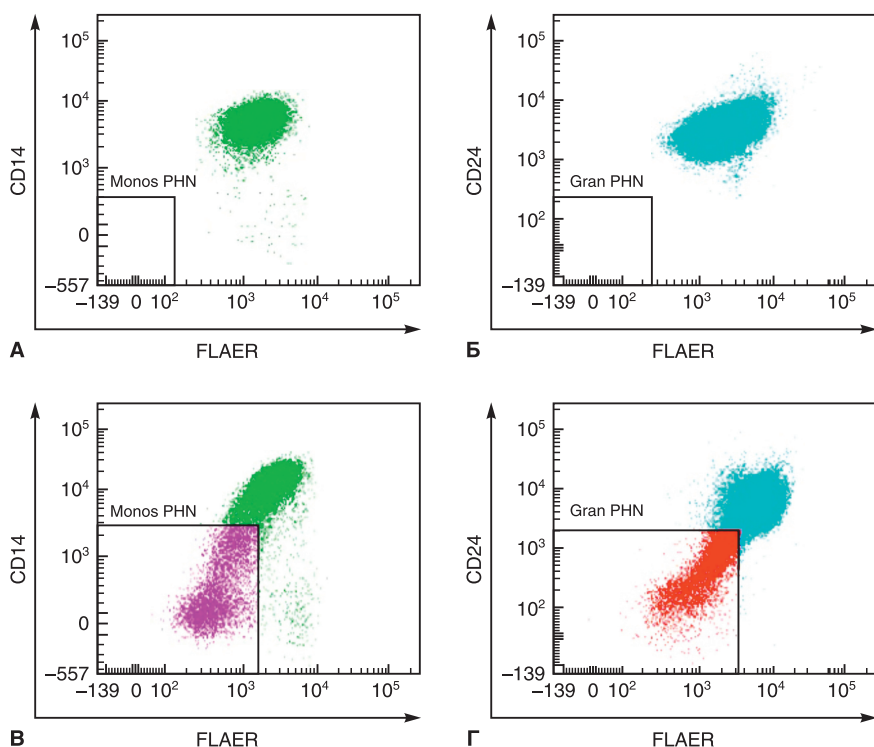


Рисунок 1. Сравнение крови (А и Б) и костного мозга донора В и Г. В — в левом нижнем прямоугольнике отмечены предшественники моноцитов, слабо экспрессирующие CD14. Г — в левом нижнем прямоугольнике отмечены предшественники нейтрофилов, слабо экспрессирующие CD24.

CD235a — для эритроцитов, к антигену CD15 — для гранулоцитов и к антигену CD64 — для моноцитов.

- Моноклональные антитела к GPI-связанным антигенам: к CD59 — для эритроцитов, к CD24 — для гранулоцитов, к CD14 — для моноцитов.
- Флуоресцентный аэролизин (ФЛАЕР). Аэролизин — это пороформирующий токсин, секретируемый бактериями *Aeromonas hydrophila* и вызывающий лизис клеток, использующий в качестве рецептора GPI-якорь. ФЛАЕР — это проаэролизин, меченный флуоресцентным красителем Alexa fluor 488, который связывается непосредственно с GPI-якорем, но не вызывает лизиса клеток.
- Моноклональное антитело к CD45 — общелейкоцитарному антигену, позволяющему отделить лейкоциты от нелизированных эритро-

цитов и дебриса при анализе гранулоцитов и моноцитов, а также при проведении обратного гейтирования и дополнительной селекции ПНГ-клона [13, 15].

В зависимости от конфигураций проточного цитофлуориметра применяются следующие наборы антител для 4- и 6-цветного анализа, представленные в табл. 1 и 2 с указанием флуорохромов и клонов антител.

Таблица 1. Рекомендуемые антитела для выделения эритроцитов

Антиген	Флуорохром	Рекомендуемые клоны	Производитель
CD235a	FITC	10F7MN	eBioscience
		YTH 89.1	Cedarlane
		KC16	BC
		JC159	DAKO
CD59	PE	OV9A2	eBio
		MEM-43	Invitrogen/EXBIO/Cedarlane

Таблица 2. Примеры панелей антител для диагностики ПНГ-клона, рекомендуемые для выделения клона на моноцитах и гранулоцитах

Популяция	Антиген	Флуорохром	Клон	Производитель
4-цветная для FC500 (1 лазер)				
Нейтрофилы	FLAER	FITC	—	Cedarlane
	CD24	PE	SN3 ALB9	eBio BC
	CD15	PerCp-Cy5.5	80H5	BC
	CD45	PECy7	J33	BC
Моноциты	FLAER	FITC	—	Cedarlane
	CD14	PE	61D3 RMO52 Tuk4 RMO52	eBio BC Invitrogen BC
	CD64	PerCp-Cy5.5	Clone 22	BC
	CD45	PECy7	J33	BC
5-цветная для FC500 (1 лазер) и Navios (3 лазера)				
Нейтрофилы + моноциты	FLAER	FITC	—	Cedarlane
	CD157	PE	SY11B5	eBio, BC, EXBIO, BD, Sysmex
	CD15	PerCp-Cy5.5	80H5	BC
	CD45	PE-Cy7	J33	BC
	CD64	ECD	Clone22	BC

Таблица 2 (окончание). Примеры панелей антител для диагностики ПНГ-клона, рекомендуемые для выделения клона на моноцитах и гранулоцитах

Популяция	Антиген	Флуорохром	Клон	Производитель
6-цветная для Navios (3 лазера)				
Нейтрофилы + моноциты	FLAER	FITC	—	Cedarlane
	CD24	PE	SN3 ALB9	eBio BC
	CD15	PerCp-Cy5.5	80H5	BC
	CD64	PE-Cy7	Clone 22 10.1	BC EXBIO
	CD14	APC-700	RMO52	BC
	CD45	KrOr	J33	BC
6-цветная для FACSCanto (2 лазера) (НМИЦ гематологии)				
Нейтрофилы + моноциты	FLAER	FITC	—	Cedarlane
	CD24	PE	ALB9	BC
	CD14	PerCP-Cy5.5	MцP9	BD
	CD15	APC	HI98	BD
	CD45	APC-Cy7	HI30	BioLegend
	CD64	PE-Cy7	10.1	BioLegend

Рекомендации к пробоподготовке, гейтированию, анализу

Допустимо хранение образцов крови при температуре 4—8 °С: для анализа эритроцитов не более 7 дней, для анализа лейкоцитов — не более 48 часов.

Эритроциты перед окрашиванием разводят в 100 раз фосфатным буфером и дважды отмывают после окрашивания. Перед анализом на проточном цитометре образцы обязательно нужно энергично встряхнуть, чтобы разбить образовавшиеся агрегаты эритроцитов.

Для анализа гранулоцитов и моноцитов можно использовать два подхода к пробоподготовке:

1. Lyse-wash-stain-wash (bulk lysis): сначала лизировать образец, а после окрашивать моноклональными антителами.
2. Stain-lyse-wash: окрашивать пробу цельной крови и лизис проводить после окрашивания [14].

Схема гейтирования эритроцитов представлена на рис. 2.

Порядок гейтирования должен быть следующим:

1. Установить первый гейт на популяцию эритроцитов (рис. 2, А) на диаграмме логарифмических шкал бокового (SSC) и прямого (FSC)

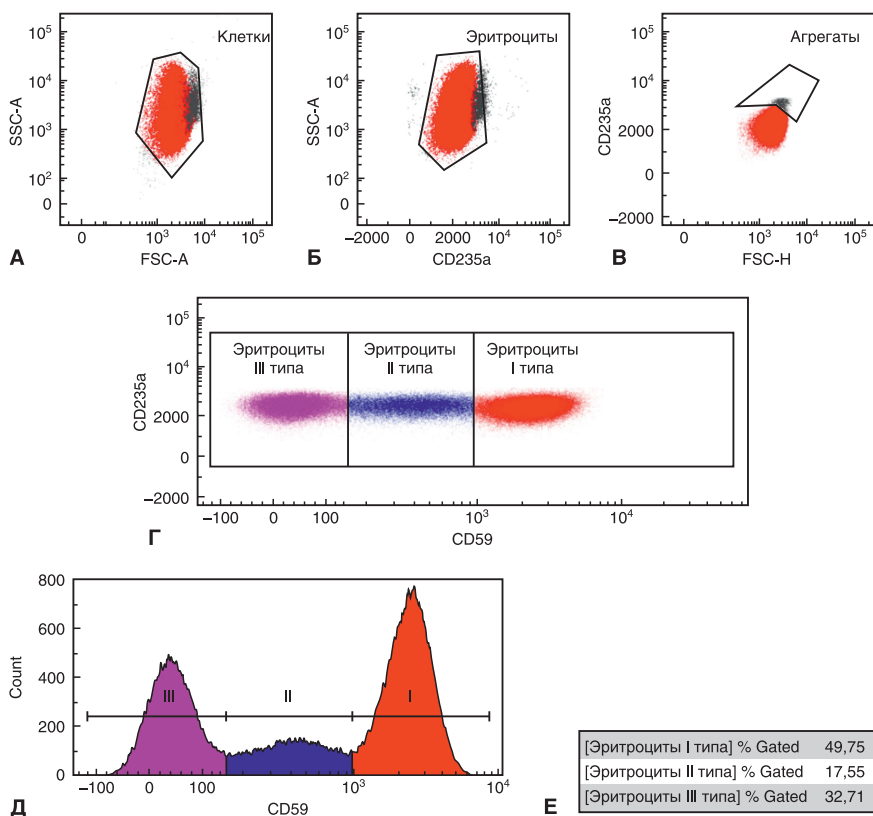


Рисунок 2. Схема гейтирования ПНГ-клона в популяции эритроцитов.

светорассеяний. Пороговый уровень (threshold) при исследовании эритроцитов обычно довольно низкий и должен быть подобран так, чтобы максимально исключить тромбоциты и дебрис, но сохранить популяцию эритроцитов.

2. С помощью второго гейта выбрать популяцию клеток с высокой экспрессией CD235a (рис. 2, Б).
3. Исключить из анализа агрегаты и дубли эритроцитов на диаграмме CD235a против FSC (рис. 2, В). Если доля агрегатов больше 2%, образец необходимо еще раз энергично встряхнуть.
4. На диаграмме CD235a против CD59 определить тип эритроцитов: тип I — с высокой экспрессией антигена CD59, тип II — с дефицитом антигена CD59, тип III — с отсутствием антигена CD59 (рис. 2, Г).

5. В ряде случаев, когда клон ПНГ очень большой, между эритроцитами разного типа граница может быть нечеткой. В таких случаях для отделения подтипов эритроцитов может помочь гистограмма (рис. 2, Д).

Цитометрический анализ гранулоцитов представлен на рис. 3.

Порядок проведения гейтирования следующий:

1. Исключить из анализа дубликаты клеток (рис. 3, А).
2. Исключить дебрис и нелизированные эритроциты на диаграмме линейных шкал бокового (SSC) и прямого (FSC) светорассеяния (рис. 3, Б).
3. Выбрать CD45-положительные события (CD45+) — лейкоциты на диаграмме CD45 против SSC (рис. 3, В).

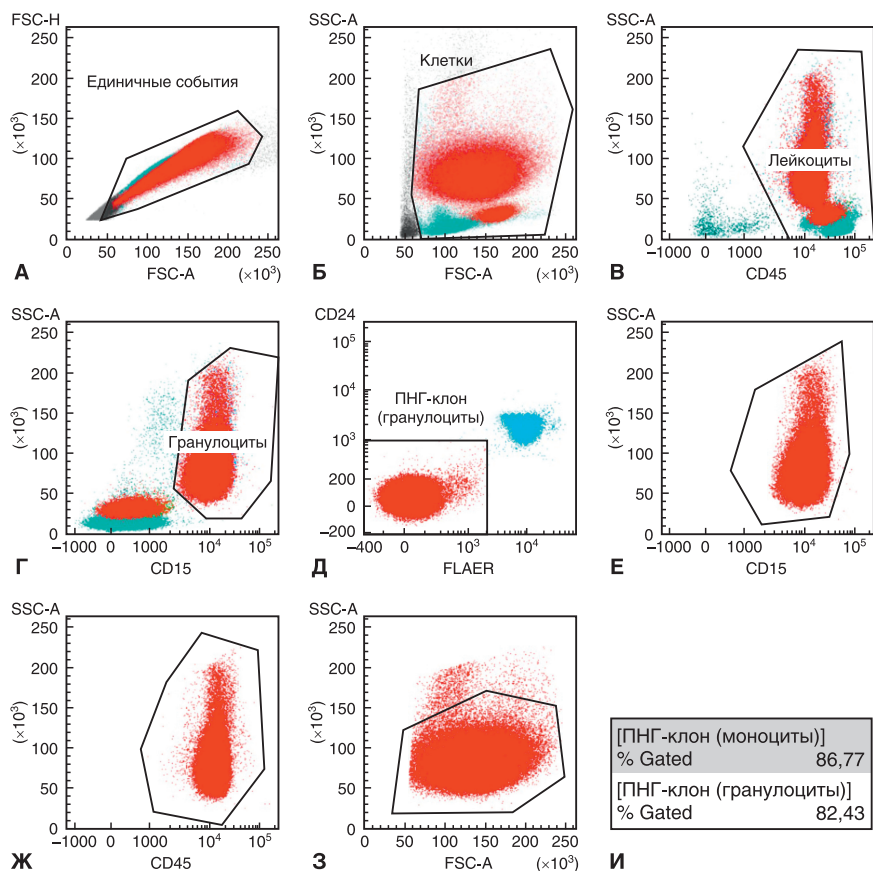


Рисунок 3. Схема гейтирования ПНГ-клона в популяции гранулоцитов.

4. Выбрать гранулоциты — клетки с высокими показателем SSC и уровнем экспрессии антигена CD15 (рис. 3, Г).
5. На диаграмме «FLAer против CD24» выбрать ПНГ-клон (клетки, с которыми не связались ни анти-CD24, ни ФЛАЕР) (рис. 3, Д).
6. Дополнительно можно провести обратное гейтирование на диаграммы «CD15 против SSC», «CD45 против SSC» и «FSC против SSC». ПНГ-клон должен равномерно распределиться в популяции гранулоцитов (рис. 3, Е—З).

Цитометрический анализ моноцитов представлен на рис. 4.

Порядок проведения гейтирования:

1. Первые этапы исключения дубликатов, дебриса и выбора CD45-положительных клеток — такие же как при анализе гранулоцитов

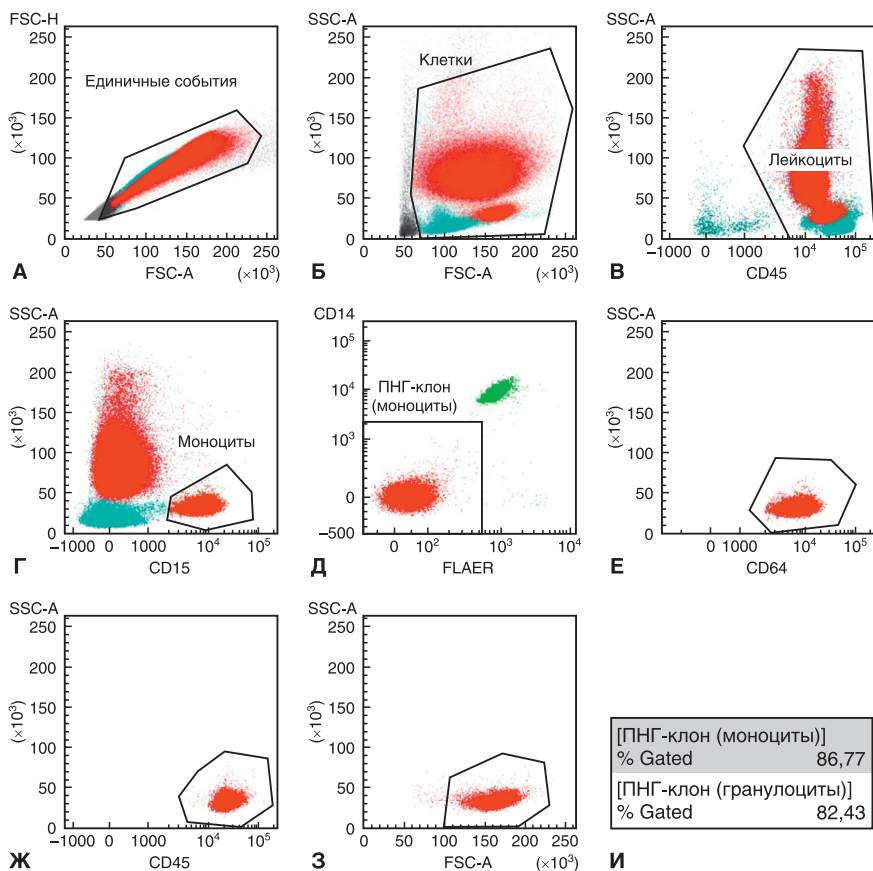


Рисунок 4. Схема гейтирования ПНГ-клона в популяции моноцитов.

- (рис. 4, А—В). После указанных этапов на диаграмме «CD64 против SSC» нужно выбрать популяцию моноцитов — клеток с высокой экспрессией CD64 и средними показателями параметра SSC (рис. 4, Г).
2. На диаграмме «Flaer против CD14» выбрать ПНГ-клон (рис. 4, Д).
 3. Также можно провести обратное гейтирование на диаграммы «CD64 против SSC», «CD45 против SSC» и «FSC против SSC». ПНГ-клон должен равномерно распределиться в популяции моноцитов (рис. 4, Е—З).

Аналогично оценке типов ПНГ-клонов в популяциях эритроцитов, в популяции нейтрофилов и моноцитов можно выделить два варианта клона ПНГ: с полным отсутствием (3-го типа) или с дефицитом GPI-якоря (2-го типа). ПНГ-клон 2-го типа в популяциях лейкоцитов наблюдается редко и, как правило, не указывается в заключении, но обязательно учитывается при подсчете доли клеток с ПНГ-ассоциированным иммунофенотипом. На рис. 5 стрелками показаны гранулоциты и моноциты 2-го типа с дефицитом GPI-якоря. ПНГ-клон с дефицитом GPI-якоря также должен быть учтен при подсчете размера клона ПНГ.

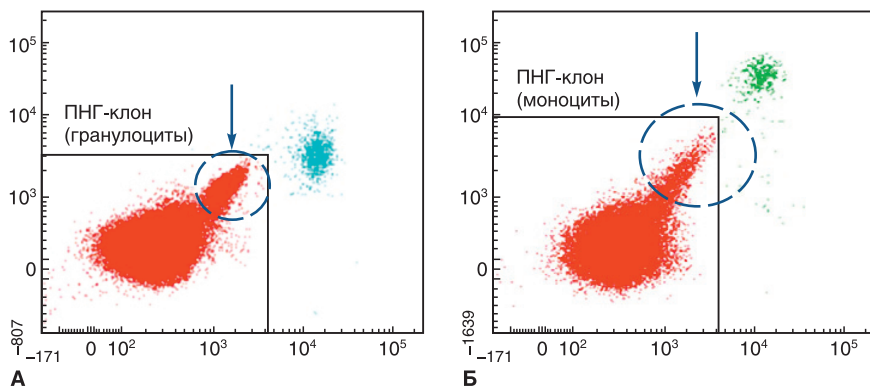


Рисунок 5. Пример ПНГ-клона с дефицитом GPI-якоря в популяциях нейтрофилов (А) и моноцитов (Б). Стрелкой и пунктирной линией обозначены гранулоциты (А) и моноциты (Б) 2-го типа с дефицитом GPI-якоря.

Сформированная популяция клеток ПНГ-клона должна состоять минимум из 20—50 клеток. Если выявляется клон небольшого размера (0,01—0,1%), то нужно собрать большее количество событий, например до 500 000 клеток, для повышения достоверности результата. Если ПНГ-клон не выявляется, то также нужно собрать наибольшее количе-

ство клеток (500 000—1 млн) для достижения достаточной чувствительности теста (0,01%) [13—15]. Если эритроциты II и III типа составляют более 1% эритроцитов, можно ограничить сбор 100 000 событий. Однако если обнаружено менее 1% эритроцитов с дефицитом или отсутствием CD59, следует собрать больше событий, чтобы получить статистически достоверное количество клеток с ПНГ (до 1 000 000), даже если среди эритроцитов III типа обнаружена всего одна клетка. Гранулоцитов и моноцитов в образце всегда меньше, чем красных кровяных телец. В большинстве случаев достаточен анализ 50 000 CD15-положительных событий и 10 000 CD64-положительных событий. Если обнаружено от 20 до 50 клеток с ПНГ-иммунофенотипом, то делается заключение об обнаружении «редких клеток с иммунофенотипом ПНГ, выявленных ниже уровня количественного определения».

В зависимости от размера выявленного ПНГ-клона относительно остальных клеток популяции (эритроцитов, гранулоцитов, моноцитов) делается один из следующих выводов.

1. Популяция > 1%: делается заключение о наличии клона ПНГ.
2. Популяция < 1%, но > 0,1%: делается заключение о наличии **минорного** клона ПНГ.
3. Популяция 0,01—0,1%: обнаружены единичные клетки с дефицитом GPI-якоря.

Показатели ПНГ-клона в популяции гранулоцитов, в популяции моноцитов и в популяции эритроцитов могут значительно отличаться, и тогда заключение делается по наибольшему ПНГ-клону в соответствующей ему популяции. Как правило, в гранулоцитах и моноцитах величина ПНГ-клона больше, чем в эритроцитах, и наиболее часто клон в гранулоцитах меньше клона ПНГ в моноцитах.

Литература

1. Hillmen P, Lewis SM, Bessler M et al. Natural history of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med* 1995; 333:1253—1258.
2. Hill A, DeZern AE, Kinoshita T et al. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Nat Rev Dis Prim* 2017; 3:17028.
3. Socie G, Mary JY, de Gramont A et al. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: long-term follow-up and prognostic factors. *French Society of Haematology. Lancet* 1996; 348:573—577.
4. Sugimori C, Chuhjo T, Feng X et al. Minor population of CD55-CD59- blood cells predicts response to immunosuppressive therapy and prognosis in patients with aplastic anemia. *Blood* 2006; 107:1308—1314.
5. Dunn DE, Tanawattanacharoen P, Boccuni P et al. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria cells in patients with bone marrow failure syndromes. *Ann Intern Med* 1999; 131:401—408.

6. Tichelli A, Gratwohl A, Nissen C et al. Late clonal complications in severe aplastic anemia. *Leuk Lymphoma* 1994; 12:167—175.
7. Фидарова З. Т., Михайлова Е. А., Гальцева И. В. и др. Динамика ПНГ-клона у больных апластической анемией в процессе иммуносупрессивной терапии. *Клиническая лабораторная диагностика* 2016; 8:490—494.
8. Фидарова З. Т., Михайлова Е. А., Гальцева И. В. и др. Определение ПНГ-клона у больных апластической анемией в процессе иммуносупрессивной терапии. *Гематология и трансфузиология* 2014; 1:68.
9. Кулагин А. Д., Лисуков И. А., Птушкин В. В. и др. Национальные клинические рекомендации по диагностике и лечению пароксизмальной ночной гемоглобинурии. *Онкогематология* 2014; 2:20—28.
10. Лисуков И. А., Кулагин А. Д., Афанасьев Б. В. Лечение пароксизмальной ночной гемоглобинурии. *Онкогематология* 2012; 3:49—54.
11. Гальцева И. В., Фидарова З. Т., Борисов В. И. и др. Новые возможности диагностики клона пароксизмальной ночной гемоглобинурии. *Гематология и трансфузиология* 2015; 2:6—9.
12. Sutherland DR, Anderson L, Keeney M et al. The ISHAGE guidelines for CD34+ cell determination by flow cytometry. *J Hematother* 1996; 5:213—226.
13. Borowitz MJ, Craig FE, Digiuseppe JA et al. Guidelines for the diagnosis and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and related disorders by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom* 2010; 78:211—230.
14. Sutherland DR, Keeney M, Illingworth A. Practical guidelines for the high-sensitivity detection and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom* 2012; 82:195—208.
15. Наумова Е. В., Почтарь М. Е., Кисиличина Д. Г. и др. Стандартизация диагностики пароксизмальной ночной гемоглобинурии с помощью проточной цитометрии. *Клиническая лабораторная диагностика* 2013; 7:54—58.

Глава 13.

Молекулярно-генетические основы и диагностика гемоглобинопатий

Гемоглобинопатии — группа наследственных заболеваний, характеризующихся качественными (аномальные гемоглобины), качественно-количественными (гипернестабильные аномальные гемоглобины) и количественными (талассемии и персистенции) нарушениями синтеза цепей гемоглобина. Гемоглобинопатии являются наиболее часто встречающимися моногенными наследственными заболеваниями в мире, что приводит к случаям сочетанного наследования нарушений в нескольких генах, кодирующих разные цепи гемоглобина. Возникновение сложных генотипов обуславливает чрезвычайно широкий спектр клинических и гематологических фенотипов [1]. Молекулярно-генетическая диагностика позволяет верифицировать направительный диагноз, что особенно важно при консультировании пар при планировании беременности, так как сложные сочетанные случаи могут иметь сложную схему наследования.

Нормальные гемоглобины и организация глобиновых генов

Гемоглобины (Hb) крови человека характеризуются гетерогенностью, как постоянной (несколько гемоглобинов присутствуют в организме

одновременно), так и переменной (гемоглобины сменяют друг друга в процессе развития организма). Переменная гетерогенность реализуется в эмбриональном и раннем послеродовом периоде, обеспечивая нормальную физиологическую реакцию организма на изменение условий в процессе онтогенеза [2].

Нормальные гемоглобины человека представляют собой тетрамеры металлопротеина, которые включают в себя пары α - и β -подобных цепей. Разные цепи гемоглобинов кодируются разными генами, сгруппированными в виде двух отдельных кластеров. Кластер генов α -подобных цепей расположен на конце хромосомы 16 (16p13.3), а кластер генов β -подобных цепей гемоглобина на хромосоме 11 (11p15.5) [3]. В каждом кластере активные гены располагаются в том же порядке, в котором они экспрессируются в процессе развития (рис. 1).

Кластер α -подобных цепей содержит четыре гена и три псевдогена (рис. 1). Ген *HBZ* кодирует ζ -цепи, он экспрессируется в течение первых 5 недель внутриутробного развития. Два высокоомологичных гена *HBA2* и *HBA1* кодируют α -цепи (α_2 , α_1), которые экспрессируются начиная с 6-й недели развития эмбриона и в постнатальном периоде в соотношении примерно 2:1 (α_2 : α_1). Ген *HBQ1* кодирует θ -цепь, которая практически не экспрессируется. Основным регуляторным элементом α -глобинового кластера является HS-40, расположенный перед его первым геном (*HBZ*) на расстоянии в 40 тысяч пар нуклеотидов (т. п. н.) [4].

Кластер генов β -подобных цепей гемоглобина содержит 5 генов и один псевдоген. Эмбриональный ген *HBE1* кодирует эмбриональные ε -цепи и экспрессируется в раннем эмбриогенезе. Два высокоомологичных гена *HBG2* и *HBG1* кодируют γ -цепи ($^G\gamma$ и $^A\gamma$), экспрессия которых приурочена к эмбриональному развитию и сходит на нет в течение первого года жизни. Гамма-цепи экспрессируются в соотношении 7:3 ($^G\gamma$: $^A\gamma$) у зрелого плода и в соотношении 4:6 после смены синтеза гемоглобина с фетального (остаточный синтез) на взрослый [5]. Ген *HBD* кодирует δ -цепи и экспрессируется после рождения в незначительном количестве. Ген *HBB* кодирует β -цепи, начинает экспрессироваться в эмбриогенезе, обеспечивает около 20% гемоглобина на момент рождения и больше 96% гемоглобина во взрослом возрасте. Регуляцию экспрессии генов β -глобинового кластера обеспечивает ряд элементов, локализованных перед геном *HBE1* (β -LCR) [6].

По современным представлениям, гены, кодирующие гемоглобины крови человека, возникли вследствие нескольких раундов дупликации и дальнейшей дивергенции от одного предкового гена [7]. Все гены глобиновых цепей имеют сходную организацию, состоят из трех экзонов и двух интронов. Гены β -глобинового кластера кодируют amino-

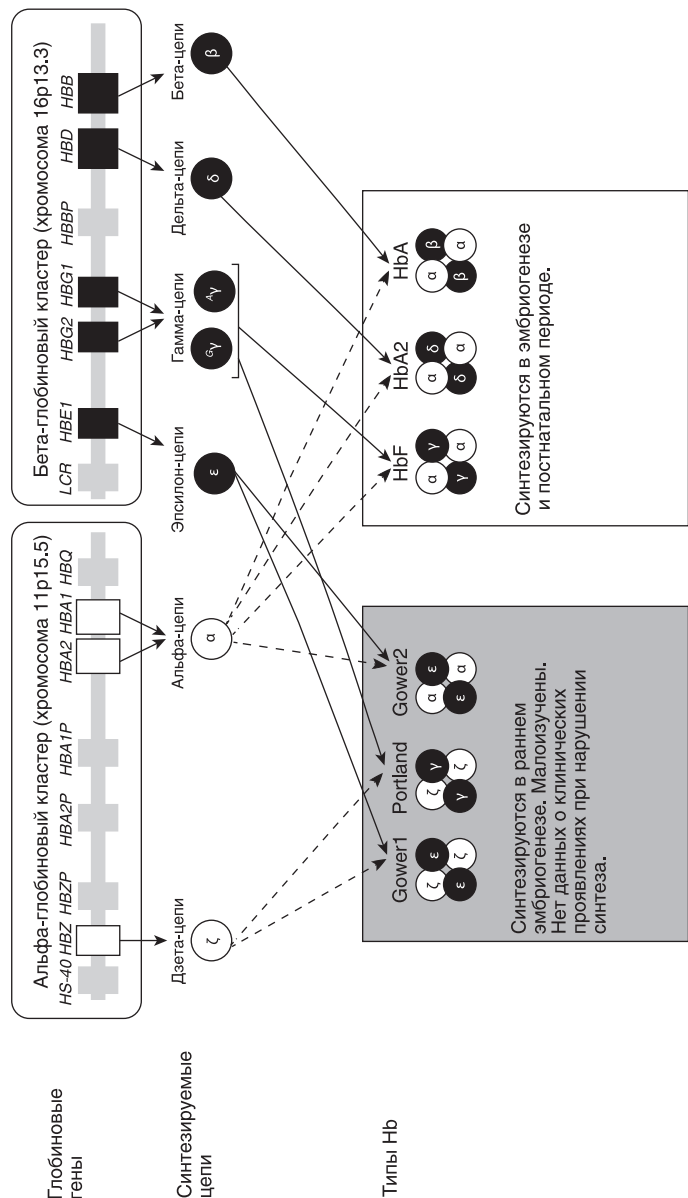


Рисунок 1. Организация глобиновых кластеров.

кислотные последовательности длиной 147 остатков, которые демонстрируют по крайней мере 60% сходства (95 консервативных аминокислотных остатков) между собой. Гены *HBG2* и *HBG1* возникли путем тандемной дупликации позже остальных генов кластера и поэтому имеют очень высокую степень гомологии, цепи $G\gamma$ и $A\gamma$ различаются всего одной аминокислотой. На уровне белка гемоглобина, образованные с участием $G\gamma$ и $A\gamma$ цепей, не различают (фетальный гемоглобин, см. ниже). Гены α -глобинового кластера кодируют аминокислотные последовательности длиной 142 остатка. Гены *HBA1* и *HBA2* кодируют идентичные аминокислотные последовательности. Эмбриональная ζ -цепь имеет гомологию с α -цепью более 60% (86 консервативных аминокислотных остатков).

В норме в эмбриогенезе синтезируются (рис. 1): три эмбриональных гемоглобина — Gower1 ($\zeta\epsilon$), Gower2 ($\alpha\epsilon$), Portland ($\zeta\gamma$), фетальный гемоглобин (HbF) ($\alpha^G\gamma$ и $\alpha^A\gamma$) и взрослый гемоглобин A (HbA) ($\alpha\beta$), доля которого в позднем эмбриональном периоде достигает 10—20%. После рождения начинается синтез незначительного количества гемоглобина A2 (HbA2) ($\alpha\delta$) и продолжается синтез HbA и HbF, но после первого года жизни доля HbF не превышает 1% (рис. 1).

Эмбриональные гемоглобины плохо изучены в связи с тем, что они не влияют на взрослый фенотип и крайне трудны для исследования [8]. Исследование генов, связанных с их синтезом (*HBZ* и *HBE1*), не представляет интереса в диагностическом плане, так как даже для уже выявленных нарушений этих генов неизвестно их клиническое значение.

Патогенез нарушений при гемоглинопатиях

Патогенез нарушений при гемоглинопатиях обусловлен снижением уровня или полным отсутствием нормального гемоглобина, что закономерно приводит к микроцитарной гипохромной анемии. Однако это далеко не единственное нарушение при гемоглинопатиях [9].

При качественных гемоглинопатиях фенотипические проявления в первую очередь зависят от свойств аномального гемоглобина. Изменения белковой последовательности могут приводить к изменению сродства к кислороду. Аномальные гемоглобины с пониженным сродством к кислороду приводят к анемии [10]. Повышение сродства к кислороду приводит к эритроцитозу [11]. Однако аномальное сродство гемоглобина к кислороду может быть полностью компенсировано и протекать бессимптомно.

Кроме того, нарушения в аминокислотной последовательности глобиновых цепей могут приводить к синтезу нестабильных гемогли-

нов, легко денатурирующих с образованием нерастворимых осадков (тельца Гейнца). Для ряда аномальных гемоглобинов показано, что процесс денатурации сопровождается образованием гемихромов, при этом гем образует соединения с участками глобиновой молекулы за пределами нормальных сайтов связывания. Связывание осажденных аномальных гемоглобинов с белками мембраны (преимущественно анионтранспортным белком) приводит к нарушению функций мембраны и гемолизу [12]. Также аномальные гемоглобины вызывают окислительный стресс клетки, продуцируя активные формы кислорода [13].

В ряде случаев нарушение аминокислотной последовательности повышает склонность гемоглобина к полимеризации (HbS) или кристаллизации (HbC), что изменяет реологические свойства эритроцитов [14].

В случае количественных нарушений одним из основных механизмов патогенеза является дисбаланс α -подобных и β -подобных цепей [15]. Для нормального синтеза гемоглобина соотношение α -подобных и β -подобных цепей должно быть 1:1. При альфа-талассемии количество β -подобных цепей больше, чем α -подобных, при бета-талассемии — наоборот. Это не только приводит к снижению синтеза нормальных гемоглобинов, но и к нарушению работы клетки из-за накопления избыточного количества мономеров глобиновых цепей одного типа. Во-первых, глобиновые мономеры продуцируют активные формы кислорода, что приводит к окислительному стрессу [16]. Во-вторых, они легче окисляются, чем цепи, содержащиеся в нормальном тетрамере гемоглобина. При их окислении образуются нерастворимые агрегаты. Показаны различия в клеточных дефектах при накоплении α - и β -цепей. Бета-цепи (накапливающиеся в избытке при альфа-талассемии) способны образовывать тетрамеры — гемоглобин Н (HbH). HbH нестабилен и, окисляясь, образует нерастворимые гемихромы (тельца Гейнца) [17], которые в этом случае также называются тельцами Н [18]. Их ассоциация с клеточной мембраной приводит к ее ригидности и повышению механической прочности относительно нормальных эритроцитов [19]. Цепи α -глобина (накапливаются при бета-талассемии) менее стабильны и не способны образовывать тетрамеры. В связи с этим их агрегаты чаще располагаются в ядре или рядом с ядерной мембраной, что, вероятно, приводит к апоптозу и неэффективному эритропоэзу [20]. Их ассоциация с клеточной мембраной приводит не только к ригидности, но и потере прочности мембраны [19].

Также гемоглобинопатии часто приводят к накоплению свободного железа и связанным с этим повреждениям [21].

Молекулярные детерминанты гемоглинопатий

В основе гемоглинопатий лежат точечные мутации, протяженные делеции, инсерции и дупликации в генах глобиновых кластеров. Было выявлено и охарактеризовано несколько сотен вариантов аномальных гемоглинов человека, а также мутации, влияющие на синтез глобиновых цепей. Подробный и обновляемый список можно найти в базе данных *HbVar* [22], в которую собирают информацию о выявленных мутациях в генах глобиновых кластеров и связанных с ними фенотипах. Также информацию можно найти в неспециализированных базах данных (www.hgmd.cf.ac.uk, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>).

Качественные нарушения (аномальные гемоглины)

Качественные изменения (синтез аномальных цепей гемоглибина) в основном обусловлены точечными мутациями, которые приводят к аминокислотным заменам в белковой последовательности (рис. 2). В очень редких случаях крупные делеции также могут приводить к синтезу аномальных гемоглинов, через образование химерных генов [23]. Небольшие инсерции и делеции могут приводить к синтезу аномальных цепей с укороченной [24] или удлиненной [25] белковой последовательностью или цепей с выпадением/добавлением аминокислот. Аномальные цепи могут образовывать тетрамер гемоглибина, достаточно стабильный для его выявления в периферической крови. Фенотипические проявления крайне разнородны — от бессимптомных до нестабильных вариантов, приводящих к гемолитической анемии. Тип наследования зависит от характера нарушения.

Описано более 300 нарушений в гене *HBB* и более 200 в генах *HBA2* и *HBA1*, вызывающих образование аномальных гемоглинов. Относительная малочисленность α -вариантов по сравнению с β -вариантами объясняется тем, что α -цепи кодируются сразу двумя генами и, если один из генов поврежден и приводит к образованию аномальных цепей, их доля по отношению к нормальным цепям ниже, чем в случае β -глобиновых цепей. Это уменьшает фенотипические проявления и, как следствие, снижает вероятность обнаружения [23].

Аномальные гемоглины, связанные с нарушениями в остальных генах (*HBG1*, *HBG2*, *HBD*), имеют меньшее диагностическое значение, так как практически не экспрессируются во взрослом возрасте.

Наиболее распространенными аномальными гемоглибами являются HbS, HbC, HbD и HbE. HbS, вызывающий серповидноклеточную анемию, самый изученный и распространенный. Он связан с мутацией в гене *HBB* (*HBB* p.Glu6Val). Для его выявления разработаны специальные методы [23].

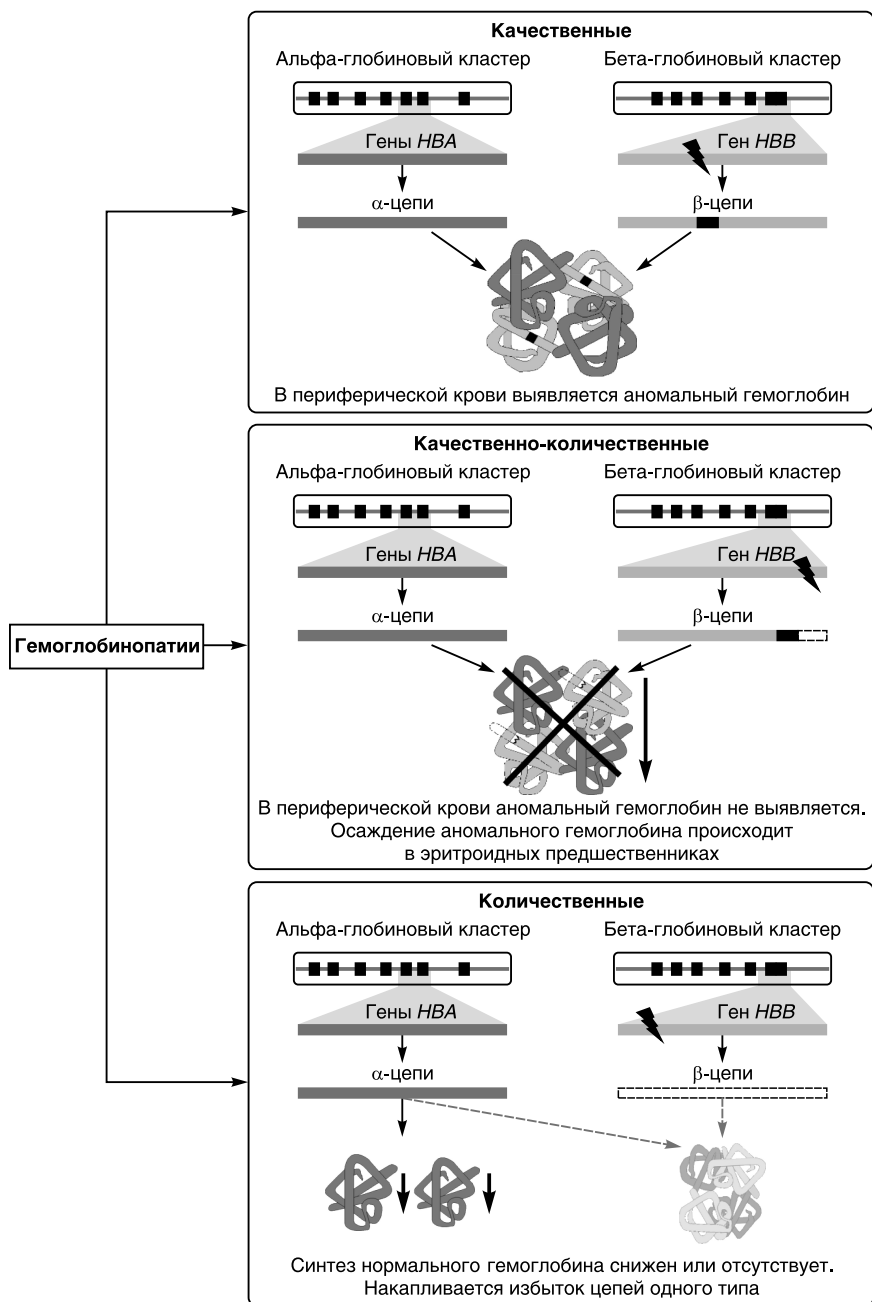


Рисунок 2. Классификация гемоглобинопатий (на примере гомозиготных нарушений гена *HBB*). Объяснения в тексте.

Также описан ряд аномальных цепей гемоглобина, которые синтезируются с химер между генами *HBD* и *HBB* [26], *HBG2* и *HBB* [27], *HBG2* и *HBG1* [28].

Качественно-количественные нарушения (гипернестабильные аномальные гемоглобины)

Некоторые генетические нарушения приводят к синтезу глобиновых цепей, которые образуют гипернестабильный тетрамер гемоглобина (рис. 2), деградирующего в эритроидных предшественниках. Такими нарушениями чаще всего бывают расположенные в конце нон-сенс-мутации и мутации сдвига рамки считывания. Такие аномальные гемоглобины настолько нестабильны, что вызывают внутрикостномозговой гемолиз. Они не выявляются в периферической крови и приводят к фенотипу бета-талассемии, но наследуются по доминантному типу.

Количественные нарушения (талассемии и персистенции)

Количественные нарушения (рис. 2) обусловлены точечными нуклеотидными заменами, микроинсерциями или микроделециями, приводящими к образованию преждевременных стоп-кодона, сдвигам белковой рамки считывания, нарушению сайтов сплайсинга или промоторной области гена. Также к количественным нарушениям приводит изменение числа копий гена, обусловленное масштабными делециями или дупликациями. Кроме того, количественные нарушения могут быть обусловлены изменениями в областях, регулирующих экспрессию генов глобиновых цепей на уровне кластера. Количественные нарушения наследуются по рецессивному типу.

Количественные нарушения α -глобинового кластера

Поскольку гены *HBA1* и *HBA2* кодируют идентичные аминокислотные последовательности, генетические нарушения в них приводят к идентичному фенотипу — альфа-талассемии. Отдельно стоят делеции, затрагивающие регуляторную область кластера.

Альфа-талассемия

Большая часть выявленных случаев альфа-талассемии связана с делециями [29]. Одной из причин частого нарушения копийности в этом регионе является высокая гомология не только генов *HBA1* и *HBA2*, но и фланкирующих их областей, что приводит к делециям и дупликациям этих генов путем неравного кроссинговера [29]. Дупликация α -генов не поводит к фенотипическим изменениям, однако может значительно модифицировать проявления малой бета-талассемии.

Описаны делеции, приводящие к потере одного (α^+) или двух (α^0) α -глобиновых генов. Менее распространены точечные мутации, вызывающие альфа-талассемию (α^T). Поскольку экспрессия гена *HBA2* в два раза выше, чем *HBA1*, мутации в нем будут иметь более серьезные последствия, чем мутации *HBA1*. Кроме того, мутации α^T в гене *HBA2* часто вызывают более серьезное снижение синтеза α -цепи, чем делеция α^+ .

При альфа-талассемии тяжесть проявления заболевания увеличивается с уменьшением числа функциональных α -глобиновых генов. Гетерозиготное носительство α^+ делеции ($-\alpha/\alpha$) приводит к бессимптомному носительству или легкой микроцитарной гипохромной анемии с нормальным уровнем HbA2 и HbF. Гомозиготное носительство α^+ делеции ($-\alpha/-\alpha$) и гетерозиготное носительство α^0 мутаций ($-\alpha/\alpha$) приводят к альфа-талассемии с минимальными проявлениями. Для таких пациентов характерна более выраженная микроцитарная гипохромная анемия с нормальным уровнем HbA2 и HbF. Гетерозиготные носители недеletionной альфа-талассемии ($\alpha\alpha^T/\alpha\alpha$) имеют переменные гематологические фенотипы от молчащего носительства до альфа-талассемии с минимальными проявлениями [30]. Сочетанное носительство α^0 и α^+ мутаций ($-/-\alpha$), α^0 и α^T мутаций ($-/\alpha^T\alpha$) и гомозиготная недеletionная альфа-талассемия ($\alpha^T\alpha/\alpha^T\alpha$) приводят к гемоглобинопатии H, обусловленной синтезом HbH, представляющего собой тетрамер β -глобиновых цепей. Для таких пациентов характерны микроцитарная гипохромная гемолитическая анемия от умеренной до тяжелой формы, легкая желтуха, умеренная гепатоспленомегалия [31]. Потеря всех четырех α -генов ($-/-$) приводит к Hb Bart's синдрому, вызывающему внутриутробную гибель плода или его гибель в первые часы после рождения [32].

Альфа-талассемия, вызванная мутациями за пределами α -генов

Описано более 10 крупных делеций с потерей регуляторной области α -кластера HS-40, но не затрагивающих α -гены [33]. Такие нарушения приводят к прекращению или снижению транскрипции обоих α -генов и обозначаются как $(\alpha\alpha)^{\text{del\_name}}$.

Количественные нарушения β -глобинового кластера

Количественные нарушения, вызванные мутациями в β -глобиновом кластере, классифицируются в соответствии с названием поврежденного гена. Есть нарушения, которые затрагивают только один из генов глобинового кластера, и нарушения, затрагивающие сразу несколько генов.

Количественные нарушения β -глобинового кластера, связанные с одним геном

Бета-талассемия

Мутации, приводящие к количественным изменениям в синтезе β -цепей, разделяют на ведущие к уменьшению (β^+ ; β^{++}) или полному прекращению (β^0) синтеза β -цепей гемоглобина [34]. Гетерозиготное носительство (малая талассемия) чаще всего протекает бессимптомно и характеризуется в первую очередь повышенным уровнем HbA₂. Однако выделяют молчащие мутации (β^{++}), при гетерозиготном носительстве которых гематологические показатели практически неотличимы от нормы. Фенотипы гомозигот и гетерозиготных компаундов двух мутаций включают большую (β^+/β^0 ; β^0/β^0) и промежуточную талассемию (β^+/β^+ ; β^+/β^{++} ; β^0/β^{++}). У пациентов с большой талассемией обычно в течение первых двух лет жизни развивается тяжелая анемия, требующая регулярных переливаний эритроцитарной массы. Пациенты с промежуточной талассемией не нуждаются в регулярных переливаниях крови и демонстрируют умеренную анемию, которая развивается в более позднем возрасте [34].

Дельта-талассемия

Ген *HBD* вносит незначительный вклад в образование гемоглобиновых цепей, и его нарушения не приводят к значимым клиническим проявлениям. Количественные нарушения выражаются в снижении уровня HbA₂, что может вносить путаницу при диагностике сочетанных случаев дельта- и бета-талассемии [35].

Гамма-талассемия

Выявленных мутаций, приводящих к гамма-талассемии, немного. Вероятно, это связано с тем, что, например, известная потеря гена *HBG2* даже в гомозиготном варианте приводит к лишь к незначительным фенотипическим проявлениям [36].

Количественные нарушения β -глобинового кластера, связанные с несколькими генами

Дельта-бета-талассемия

Делеции, захватывающие *HBB* и *HBD* гены, приводят к дельта-бета-талассемии [$G\gamma A\gamma(\delta \text{ в})^0$ и $G\gamma(A\gamma\delta \text{ в})^0$]. Фенотипические проявления гетерозиготных носителей сходны с малой бета-талассемией, однако могут характеризоваться значительным повышением уровня HbF при нормальном значении HbA₂. Такой вариант дельта-бета-талассемии классифицируется как делеционная форма персистенции HbF. Повышение уровня HbF в этих случаях опосредовано сохранившимися регуляторными энхансерными 3'-областями, локализованными рядом с точ-

кой разрыва [37]. В этом случае эритроцитарные индексы сходны с малой талассемией, хотя среднее содержание гемоглобина в эритроците (MCH) и средний эритроцитарный объем (MCV) несколько выше [38]. Гомозиготы имеют клиническое течение, сходное с малой или промежуточной бета-талассемией [36].

Эпсилон-гамма-дельта-бета-талассемия

Делеции, захватывающие весь β -глобиновый кластер, приводят к редкому заболеванию эпсилон-гамма-дельта-бета-талассемии. Гетерозиготные носители имеют типичную для малой бета-талассемии клиническую картину, но с нормальным уровнем HbA₂ и HbF. Однако в неонатальном периоде гетерозиготы по этому заболеванию анемичны, и иногда им требуется переливание крови [39]. Гомозиготное состояние для этого расстройства не встречается, по-видимому, потому, что это несовместимо с выживанием плода [40].

Нарушения локуса контроля β -глобинового кластера

Делеции, описанные в β -LCR, фенотипически сходны с эпсилон-гамма-дельта-бета-талассемией [6].

Персистенция фетального гемоглобина

Выше были описаны варианты дельта-бета талассемии, которые также вызывают делеционную персистенцию HbF. Неделеционные варианты персистенции HbF обусловлены функциональными полиморфизмами в промоторных областях генов *HBG2* и *HBG1* [41] или увеличением их копийности путем неравного кроссингвера [42].

Персистенция HbF имеет большое значение в модификации фенотипа других гемоглобинопатий [5].

Сочетанное наследование гемоглобинопатий

Так как дисбаланс субъединиц занимает центральное место в патофизиологии талассемий, сочетанное наследование различных гемоглобинопатий может приводить как к утяжелению, так и к облегчению клинических проявлений.

Кроме того, персистенция HbF может значительно облегчать проявления остальных гемоглобинопатий, поскольку HbF в этих случаях берет на себя функции HbA. Таким образом, после установления генетических детерминант заболевания следует сопоставить выявленные нарушения с фенотипическими проявлениями. В случае несоответствия, особенно при консультировании пар, желательно провести дополнительные молекулярно-генетические исследования на предмет возможного сочетания с другими нарушениями в глобиновых генах.

Генетические нарушения за пределами глобиновых кластеров, связанные с гемоглинопатиями

Выявлен ряд генетических нарушений в неглобиновых генах, которые могут вызывать или модифицировать гемоглинопатии. Например, нарушения в гене *AHSP* (кодирует белок, стабилизирующий α -глобин) приводят к альфа-талассемии [43]. Мутации в гене *KLF1* (кодирует эритроидный фактор Круппеля) могут снижать синтез β -глобина и вызывать бета-талассемию [44] или персистенцию HbF [45].

Молекулярные методы диагностики гемоглинопатий

Большое разнообразие новых молекулярно-генетических методов диагностики ставит перед выбором, какие из них использовать. Для выбора оптимальной стратегии диагностики генетических детерминант гемоглинопатий имеет фундаментальное значение оценка фенотипических проявлений, гематологические и биохимические исследования, а также семейный анализ [46].

Доступные на сегодняшний день молекулярно-генетические методы можно классифицировать следующим образом: методы, позволяющие выявить точечные или олигонуклеотидные нарушения; методы, выявляющие крупные делеции и дупликации; методы, выявляющие все типы генетических нарушений.

Методы, выявляющие крупные делеции и дупликации

- **Блоттинг по Саузерну** долгое время являлся золотым стандартом для выявления делеционных мутаций в кластере α -глобиновых генов [47]. В настоящее время из-за трудоемкости и необходимости использовать радионуклиды практически не применяется, уступив место более современным методам [29].
- Для выявления делеционных форм талассемии ранее также применялось **генное картирование с помощью рестриктаз** [48].
- **Гэл-ПЦР (gar-PCR)**. В основе метода лежит мультиплексная полимеразная цепная реакция (ПЦР) с использованием праймеров, фланкирующих известные точки разрывов при протяженных делециях. Этим методом можно выявить только те делеции, которые уже были описаны ранее. Он используется для поиска наиболее распространенных делеционных нарушений как в α - [40], так и в β -глобиновом [49] кластере.

- **Метод мультиплексной амплификации лигированных зондов (MLPA — multiplex ligation-dependent probe amplification)** на сегодняшний день является золотым стандартом для выявления как делеций, так и дупликаций. Разработаны коммерческие наборы реагентов для β - (SALSA MLPA KIT P102 HBB-MRC Holland) и α - (SALSA MLPA KIT P140 HBA) глобиновых кластеров. Этот метод массово применяется в настоящее время.

Методы, позволяющие выявить точечные или олигонуклеотидные нарушения

- **Секвенирование** генов глобиновых цепей **по Сэнгеру** является золотым стандартом для выявления точечных и олигонуклеотидных нарушений при диагностике гемоглобинопатий. Разработаны и описаны системы праймеров для α - и β -глобиновых генов [25], для δ -гена [35] и для γ -генов [5].
- **Аллельспецифичные системы праймеров для ПЦР (ARMS — amplification refractory mutation system)** используются для выявления высокочастотных точечных нарушений [50]. Они плохо подходят для использования за пределами талассемического пояса, где наблюдается широкий спектр нарушений глобиновых генов [46].
- **Обратный дот-блоттинг.** Разработаны коммерческие системы для выявления распространенных мутаций [51], но они так же, как и аллельспецифичные системы, мало пригодны для использования за пределами талассемического пояса.

Методы, выявляющие все типы генетических нарушений

- **ПЦР в реальном времени (real-time PCR).** Разработаны системы для детекции нарушения копийности генов для α -кластера [52] и β -кластера [53]. Также разработано множество коммерческих наборов для детекции распространенных мутаций с помощью аллельспецифичных зондов [54], но их использование, как уже упоминалось выше, ограничено популяциями, для которых характерны узкие спектры нарушений в глобиновых генах.
- **Секвенирование нового поколения (NGS — next generation sequencing).** Несмотря на работы, в ходе которых молекулярно-генетическая диагностика гемоглобинопатий была успешно проведена с помощью NGS [1, 55], этот метод до сих пор не получил широкого распространения. Целесообразность его использования в данном случае остается под вопросом из-за высокой стоимости анализа. В то же время малый размер глобиновых генов позволяет оперативно за короткие сроки и с меньшими затратами решать эти

задачи при помощи классического секвенирования по Сэнгеру для точечных мутаций и методом MLPA в случае делеционных вариантов.

Алгоритм молекулярно-генетической диагностики гемоглинопатий

Различные формы гемоглинопатий подозревают у пациентов с гипохромной микроцитарной анемией ($MCV < 78 \text{ мкм}^3$ и $MCH < 27 \text{ пг}$) после исключения железодефицитной анемии. Также для гемоглинопатий характерна гемолитическая анемия разной степени выраженности. Согласно современной практике [56] для уточнения направительного диагноза на последующую молекулярно-генетическую диагностику применяют капиллярный электрофорез гемоглинонов или высокоэффективную жидкостную хроматографию (рис. 3).

1. В случае выявления у пробанда гемоглинобина с аномальной подвижностью в зоне HbH предполагается гемоглинопатия H. В первую очередь исследуются α -гены, а также регуляторный элемент HS-40 на предмет делеций при помощи метода **MLPA (gap-PCR, real-time PCR)**. Если делеции не выявлены или обнаружено отсутствие только одной или двух копий α -гена, проводится **секвенирование по Сэнгеру** генов *HBA1* и *HBA2* для выявления точечных мутаций. Если гемоглинопатия H исключена, проводится секвенирование по Сэнгеру гена *HBB* для выявления аномальных гемоглинонов по β -цепи, имеющих подвижность, аналогичную HbH.
2. В случае выявления у пробанда гемоглинобина с аномальной подвижностью вне зоны HbH необходимо провести **секвенирование по Сэнгеру** генов *HBB*, *HBA2*, *HBA1*.
3. Если у пробанда аномальные пики не выявлены, а соотношение пиков HbA, HbF и HbA2 в пределах нормы (иногда наблюдается снижение HbA2), предполагается альфа-талассемия с минимальными проявлениями или бессимптомное носительство альфа-талассемии. Рекомендуется провести анализы на выявление делеций генов *HBA2*, *HBA1* и контрольного региона α -кластера с помощью **MLPA (gap-PCR, real-time PCR)** и в случае отсутствия делеций — **секвенирование по Сэнгеру** генов *HBA2*, *HBA1*. Если альфа-талассемия исключена, можно предположить носительство мутации β^{++} в гене *HBB*, эpsilon-гамма-дельта-бета-талассемию или нарушения в β -LCR. Для подтверждения проводится **секвенирование по Сэнгеру** гена *HBB* и поиск делеций в β -кластере с помощью **MLPA (gap-PCR, real-time PCR)**.

4. Если у пробанда при отсутствии аномальных пиков также полностью отсутствует HbA, предполагается гомозиготная дельта-бета-талассемия. Рекомендуется исследование на делеции генов *HBB* и *HBD* методом **MLPA (gap-PCR, real-time PCR)**. Если дельта-бета-талассемия исключена, предполагается большая талассемия. Для выявления генетической основы бета-талассемии проводится **секвенирование по Сэнгеру** гена *HBB*.
5. Если у пробанда, при отсутствии аномальных пиков, уровень HbA и HbA2 нормальный, но повышен уровень HbF, предполагается гетерозиготная дельта-бета-талассемия. Необходимо провести диагностику делеций генов *HBB*, *HBD* методом **MLPA (real-time PCR)**. Если делеция δ -и β -генов не выявлена, наиболее вероятно сочетанное носительство гемоглинопатии с персистенцией HbF, поэтому целесообразно провести секвенирование по Сэнгеру генов *HBB1* и *HBB2*.
6. При отсутствии аномальных пиков и повышенном HbA2 ($> 3,5\%$) вероятны различные формы гетерозиготного носительства бета-талассемии (малая талассемия). Поиск точечных мутаций в гене *HBB* осуществляется при помощи **секвенирования по Сэнгеру**. При их отсутствии проводится исследование на протяженные делеции β -глобинового кластера методами **MLPA (real-time PCR)**.

Литература

1. Achour A, Koopmann TT, Baas F, Harteveld CL. The evolving role of next-generation sequencing in screening and diagnosis of hemoglobinopathies. *Front Physiol* 2021; 12:686689. DOI: 10.3389/fphys.2021.686689.
2. Топунов А. Ф., Петрова Н. Э. Гемоглобины: эволюция, распространение и гетерогенность. *Успехи биологической химии* 2001; 41:199—228.
3. Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, Nagel RL (editors). *Disorders of hemoglobin: genetics, pathophysiology, and clinical management*. Cambridge: Cambridge University Press; 2001. 1282 p.
4. Vernimmen D, Marques-Kranc F, Sharpe JA et al. Chromosome looping at the human α -globin locus is mediated via the major upstream regulatory element (HS -40). *Blood* 2009; 114(19): 4253—4260. DOI: 10.1182/blood-2009-03-213439.
5. Manca L, Masala B. Disorders of the synthesis of human fetal hemoglobin. *IUBMB Life* 2008; 60(2):94—111. DOI: 10.1002/iub.4.
6. Joly P, Lacan P, Garcia C et al. A novel deletion/insertion caused by a replication error in the β -globin gene locus control region. *Hemoglobin* 2011; 35(4):316—322. DOI: 10.3109/03630269.2011.571331.
7. The evolutionary history of globin genes: insights from marsupials and monotremes. In: Deakin JE, Waters PD, Marshall Graves JA (editors). *Marsupial genetics*

- and genomics. Dordrecht: Springer Netherlands; 2010.P. 415—433. DOI: 10.1007/978-90-481-9023-2_20.
8. He Z, Russell JE. Expression, purification, and characterization of human hemoglobins Gower-1 ($\xi 2\epsilon 2$), Gower-2 ($\alpha 2\epsilon 2$), and Portland-2 ($\xi 2\beta 2$) assembled in complex transgenic—knockout mice. *Blood* 2001; 97(4):1099—1105. DOI: 10.1182/blood.v97.4.1099.
 9. Schrier SL. Thalassemia: pathophysiology of red cell changes. *Annu Rev Med* 1994; 45:211—218. DOI: 10.1146/annurev.med.45.1.211.
 10. Mañú Pereira MD, Ropero P, Loureiro C, Vives Corrons JL. Low affinity hemoglobinopathy (Hb Vigo) due to a new mutation of beta globin gene (c200 A>T; Lys>Ile). A cause of rare anemia misdiagnosis. *Am J Hematol* 2017; 92(4):E38—E40. DOI: 10.1002/ajh.24649.
 11. Hartevelde CL, Groeneveld JH, van Dam B et al. Hb zoeterwoude [$\beta 23(B5)Val \rightarrow Ala$]: a new β -globin variant found in association with erythrocytosis. *Hemoglobin* 2005; 29(1):11—17. DOI: <https://doi.org/10.1081/HEM-47053>.
 12. Ideguchi H. Effects of abnormal Hb on red cell membranes. *Rinsho Byori* 1999; 47(3):232—237.
 13. Winterbourn CC. Oxidative denaturation in congenital hemolytic anemias: the unstable hemoglobins. *Semin Hematol* 1990; 27(1):41—50.
 14. Adachi K, Ding M, Wehrli S et al. Effects of different $\beta 73$ amino acids on formation of 14-stranded fibers of Hb S versus double-stranded crystals of Hb C-Harlem. *Biochemistry* 2003; 42(15):4476—4484. DOI: 10.1021/bi026740x.
 15. Shang X, Xu X. Update in the genetics of thalassemia: What clinicians need to know. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2017; 39:3—15. DOI: 10.1016/j.bpobgyn.2016.10.012.
 16. Shinar E, Rachmilewitz EA. Oxidative denaturation of red blood cells in thalassemia. *Semin Hematol* 1990; 27(1):70—82.
 17. Rachmilewitz EA, Thorell B. Hemichromes in single inclusion bodies in red cells of beta thalassemia. *Blood*; 39(6):794—800. DOI: 10.1182/blood.V39.6.794.794.
 18. Rund D, Rachmilewitz E. Pathophysiology of α - and β -thalassemia: therapeutic implications. *Semin Hematol* 2001; 38(4):343—349. doi: 10.1016/s0037-1963(01)90028-9.
 19. Schrier SL, Rachmilewitz E, Mohandas N. Cellular and membrane properties of alpha and beta thalassemic erythrocytes are different: implication for differences in clinical manifestations. *Blood* 1989; 74(6):2194—21202. DOI: 10.1182/blood.V74.6.2194.2194.
 20. Polliack A, Yataganas X, Rachmilewitz EA. Ultrastructure of the inclusion bodies and nuclear abnormalities in β -thalassemic erythroblasts. *Ann N Y Acad Sci* 1974; 232(0):261—282. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1974.tb20591.x.
 21. Shalev O, Repka T, Goldfarb A et al. Deferiprone (L1) chelates pathologic iron deposits from membranes of intact thalassemic and sickle red blood cells both in vitro and in vivo. *Blood* 1995; 86(5):2008—2013. DOI: 10.1182/blood.V86.5.2008.bloodjournal8652008.

22. Hardison RC, Chui DHK, Giardine B et al. HbVar: A relational database of human hemoglobin variants and thalassemia mutations at the globin gene server. *Hum Mutat* 2002; 19(3):225—233. DOI: 10.1002/humu.10044.
23. Гемоглобинопатии и талассемические синдромы / под ред. А. Г. Румянцев, Ю. Н. Токарева, Н. С. Сметаниной. М.: Практическая медицина, 2015. 448 с.
24. Petkov GH, Simjanovska L, Tchakarova P, Efremov GD. Hb Stara Zagora: a new hyper-unstable hemoglobin causing severe hemolytic anemia. *Hemoglobin* 2005; 29(4):249—256. doi: 10.1080/03630260500307766.
25. Demidova E, Salomashkina V, Selivanova D et al. Hb Ryazan: an elongated C-terminal β -chain due to a new frameshift mutation, HBB: c.396delG p.Val133Trpfs*25. *Hemoglobin* 2023; 47(2):97—101. doi: 10.1080/03630269.2023.2202326.
26. Ribeiro ML, Cunha E, Gonçalves P et al. Hb Lepore-Baltimore (δ 68Leu- β 84Thr) and Hb Lepore-Washington-Boston (δ 87Gln- β IVS-II-8) in Central Portugal and Spanish Alta Extremadura. *Hum Genet* 1997; 99(5):669—673. DOI: 10.1007/s004390050426.
27. Ojwang PJ, Nakatsuji T, Gardiner MB et al. Gene deletion as the molecular basis for the Kenya-G γ -HPFH condition. *Hemoglobin* 1983; 7(2):115—123. DOI: 10.3109/03630268309048641.
28. Sukumaran PK, Nakatsuji T, Gardiner MB et al. Gamma thalassemia resulting from the deletion of a γ -globin gene. *Nucleic Acids Res* 1983; 11(13):4635—4643.
29. Harteveld CL, Higgs DR. Alpha-thalassaemia. *Orphanet J Rare Dis* 2010; 5:13. DOI: 10.1186/1750-1172-5-13.
30. Xiong F, Sun M, Zhang X et al. Molecular epidemiological survey of haemoglobinopathies in the Guangxi Zhuang Autonomous Region of southern China. *Clin Genet* 2010; 78(2):139—148. DOI: 10.1111/j.1399-0004.2010.01430.x.
31. Galanello R, Cao A. Alpha-thalassemia. *Genet Med* 2011; 13(2):83—88. DOI: 10.1097/GIM.0b013e3181fcb468.
32. Chui DH. Alpha-thalassemia: Hb H disease and Hb Barts hydrops fetalis. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1054:25—32. DOI: 10.1196/annals.1345.004.
33. Higgs DR, Wood WG. Long-range regulation of α globin gene expression during erythropoiesis. *Curr Opin Hematol* 2008; 15(3):176—183. DOI: 10.1097/MOH.0b013e3282f734c4.
34. Thein SL. The molecular basis of β -thalassemia. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2013; 3(5):a011700. DOI: 10.1101/cshperspect.a011700.
35. Morgado A, Picanço I, Gomes S et al. Mutational spectrum of delta-globin gene in the Portuguese population. *Eur J Haematol* 2007; 79(5):422—428. DOI: 10.1111/j.1600-0609.2007.00949.x.
36. Huisman TH, Reese AL, Gardiner MB et al. The occurrence of different levels of G γ chain and of the A γ T variant of fetal hemoglobin in newborn babies from several countries. *Am J Hematol*; 14(2):133—148. DOI: 10.1002/ajh.2830140205.
37. Edward HL, Morrison T, Milton JN, et al. Analysis of ($\delta\beta$)0-thalassemia and HPFH deletions suggest a hierarchy of cis-acting elements regulating fetal he-

- moglobin gene expression. *Blood* 2014; 124:54. DOI: 10.1182/blood.V124.21.54.54.
38. Shiokawa S, Yamada H, Takihara Y et al. Molecular analysis of Japanese $\delta\beta$ -thalassaemia. *Blood* 1988; 72(5):1771—1776.
39. Rooks H, Bergounioux J, Game L et al. Heterogeneity of the epsilon gamma delta beta-thalassaemias: characterization of three novel English deletions. *Br J Haematol* 2005; 128(5):722—729. doi: 10.1182/blood.V104.11.3609.3609.
40. Gallienne AE, Dréau HM, McCarthy J et al. Multiplex ligation-dependent probe amplification identification of 17 different β -globin gene deletions (including four novel mutations) in the UK population. *Hemoglobin* 2009; 33(6):406—416. doi: 10.3109/03630260903344564.
41. Forget BG. Molecular basis of hereditary persistence of fetal hemoglobin. *Ann N Y Acad Sci* 1998; 850:38—44. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1998.tb10460.x.
42. Harano K, Harano T, Kutlar F, Huisman TH. Gamma-globin gene triplication and quadruplication in Japanese newborns. Evidence for a decreased in vivo expression of the 3'-A gamma-globin gene. *FEBS Lett* 1985; 190(1):45—49. DOI: 10.1016/0014-5793(85)80424-5.
43. Pissard S, Vasseur C, Toutain F et al. Unstable alpha hemoglobin stabilizing protein as a cause of thalassemia: proof of concept. *Blood* 2009; 114(22):462. DOI: 10.1182/blood.V114.22.462.462.
44. Nitta T, Kawano F, Yamashiro Y et al. A new Krüppel-like factor 1 mutation (c.947G > A or p.C316Y) in humans causes β -thalassaemia minor. *Hemoglobin* 2015; 39(2):121—126. DOI: 10.3109/03630269.2015.1008702.
45. Borg J, Papadopoulos P, Georgitsi M et al. Haploinsufficiency for the erythroid transcription factor KLF1 causes hereditary persistence of fetal hemoglobin. *Nat Genet* 2010; 42(9):801—805. DOI: 10.1038/ng.630.
46. Clark BE, Thein SL. Molecular diagnosis of haemoglobin disorders. *Clin Lab Haematol* 2004; 26(3):159—176. DOI: 10.1111/j.1365-2257.2004.00607.x.
47. Kattamis AC, Camaschella C, Sivera P et al. Human alpha-thalassemia syndromes: detection of molecular defects. *Am J Hematol* 1996; 53(2): 81—91. DOI: 10.1002/(SICI)1096-8652(199610)53:2<81::AID-AJH5>3.0.CO;2-#.
48. Embury SH, Miller JA, Dozy AM et al. Two different molecular organizations account for the single α -globin gene of the α -thalassaemia-2 genotype. *J Clin Invest* 1980; 66(6):1319—1325. DOI: 10.1172/JCI109984.
49. Craig JE, Barnetson RA, Prior J et al. Rapid detection of deletions causing $\delta\beta$ thalassemia and hereditary persistence of fetal hemoglobin by enzymatic amplification. *Blood* 1994; 83(6):1673—1682. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood.V83.6.1673.1673>.
50. Ye S, Dhillon S, Ke X et al. An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Res* 2001; 29(17):E88. DOI: 10.1093/nar/29.17.e88.
51. Maggio A, Giambona A, Cai SP et al. Simultaneous typing of hemoglobin S, hemoglobin C, and seven mediterranean β -thalassaemia mutations by covalent reverse dot-blot analysis: application to prenatal diagnosis in Sicily. *Blood* 1993; 81(1):239—242. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood.V81.1.239.239>.

52. Colosimo A, Gatta V, Guida V et al. Application of MLPA assay to characterize unsolved α -globin gene rearrangements. *Blood Cells Mol Dis* 2011; 46(2): 139—144. DOI: 10.1016/j.bcmd.2010.11.006.
53. Ke LY, Chang JG, Chang CS et al. Rapid screening for deleted form of β -thalassemia by real-time quantitative PCR. *J Clin Lab Anal* 2017; 31(1):e22019. DOI: 10.1002/jcla.22019.
54. Huang Q, Wang X, Tang N et al. Simultaneous genotyping of α -thalassemia deletion and nondeletion mutations by real-time PCR-based multicolor melting curve analysis. *J Mol Diagn* 2017; 19(4):567—574. DOI: 10.1016/j.jmoldx.2017.04.003.
55. Shang X, Peng Z, Ye Y et al. Rapid targeted next-generation sequencing platform for molecular screening and clinical genotyping in subjects with hemoglobinopathies. *EBioMedicine* 2017; 23:150—159. DOI: 10.1016/j.ebiom.2017.08.015.
56. Traeger-Synodinos J, Harteveld CL, Old JM et al. EMQN Best Practice Guidelines for molecular and haematology methods for carrier identification and prenatal diagnosis of the haemoglobinopathies. *Eur J Hum Genet* 2015; 23(4): 426—437. DOI: 10.1038/ejhg.2014.131.

Глава 14.

Молекулярно-генетическая диагностика гемофилии

Общие положения

Среди коагулопатий, обусловленных дефицитом различных факторов каскада свертывания крови, наиболее актуальными в плане проведения молекулярно-генетической диагностики являются гемофилии А (OMIM: 306700) и В (OMIM: 306900).

Это наследственные заболевания, обусловленные дефицитом или отсутствием факторов свертывания крови FVIII в случае гемофилии А (кодированного геном *F8*, OMIM: 300841) или FIX в случае гемофилии В (кодированного геном *F9*, OMIM: 300746). Тяжесть заболевания определяется степенью патогенности мутации в генах, кодирующих соответствующий фактор свертывания. Обе гемофилии являются X-сцепленными рецессивными заболеваниями и проявляются преимущественно по мужской линии. Женщины обычно являются гетерозиготными носительницами, но в ряде случаев у них может быть снижен уровень активности фактора. Тяжесть гемофилии определяется по уровню остаточной активности FVIII или FIX (FVIII:C и FIX:C): тяжелая (< 1%), среднетяжелая (1—5%) или легкая (< 40%). Обе гемофилии имеют схожие симптомы и характеризуются кровотечениями, особенно в крупные суставы (локтевые, коленные, голеностопные), которые в конце концов приводят к развитию гемофилической артропатии. Редкие

жизнеугрожающие кровотечения (например, в головном мозге или других внутренних органах) могут происходить при любой форме тяжести заболевания, но наиболее часто встречаются при тяжелой форме. При тяжелой форме гемофилии обычными являются спонтанные кровотечения, у пациентов со среднетяжелой и легкой формой фенотип более мягкий, однако при травмах и операциях также возможны серьезные кровотечения [1].

Гемофилии встречаются во всех этнических группах, гемофилия А встречается чаще, чем гемофилия В. Соотношение пациентов с тяжелой, средней и легкой формой заболевания, а также распространенность и частота возникновения точнее всего описаны для стран, в которых ведется национальный регистр. Наиболее надежные оценки были получены в Великобритании, где распространенность гемофилии А составляет 12,8 на 100 000 мужчин, а гемофилии В — 2,7 на 100 000 мужчин [2]. По последним данным, в Великобритании примерно 30% пациентов с гемофилией А имеют тяжелую форму, около 12% — среднетяжелую и около 57% — легкую форму. Примерно 24% пациентов с гемофилией В имеют тяжелую форму, около 23% — среднетяжелую и 53% — легкую форму, однако доля пациентов со среднетяжелой формой повышена из-за эффекта основателя в Ирландии [3]. Чаще всего в литературе приводят данные по распространенности 10 на 50 000 — 10 на 10 000 мужчин, однако оценки варьируют в зависимости от доступности диагностики, регистрации и лечения. Так, в странах с высоким уровнем доходов эта оценка составляет 12,8 на 100 000 мужчин, в то время как в странах с низким уровнем доходов она составляет лишь 6,6 на 100 000 мужчин. В случае с гемофилией В ситуация схожая. В среднем частота встречаемости составляет 1 на 30 000 мужчин, однако варьирует от 2,7 на 100 000 мужчин в странах с высоким уровнем доходов населения до 1,2 на 100 000 мужчин в странах с низким уровнем доходов. В трех странах (Ирландия, Македония и Венгрия) распространенность гемофилии В значительно выше, чем в остальных странах, вероятно, из-за эффекта основателя [4]. Частота возникновения мутаций *de novo*, приводящих к гемофилии А в Великобритании, составила 0,6 на 100 000 мужчин в год (0,19 на 100 000 мужчин с тяжелой формой заболевания), а в случае гемофилии В — 0,19 на 100 000 мужчин в год (0,034 на 100 000 мужчин с тяжелой формой) [2].

Примерно в 30—50% случаев пациенты с диагностированной гемофилией А или В не имеют семейной истории, а их матери не являются носительницами патогенного варианта. В этих случаях мутация в гене *F8* или *F9* могла появиться *de novo*. Альтернативным объяснением может являться генетический мозаицизм в яйцеклетках матери. В этом

случае лишь часть яйцеклеток несет патогенный вариант, но в периферической крови, которая чаще всего является материалом для генетического исследования, он выявляться не будет. В связи с этим женщинам с единственным сыном с гемофилией при следующих беременностях следует проводить пренатальную диагностику для плода мужского пола.

В редких случаях гемофилия может клинически проявляться и у женщин. В результате асимметричной инактивации нормальной X-хромосомы у носительниц дефектного гена может наблюдаться уровень фактора, сравнимый со среднетяжелой или легкой формой гемофилии у мужчин. При группе крови, отличной от 0(I), у женщин также может снижаться уровень FVIII [5]. В случае гомозиготного носительства мутации, гетерозиготного компаунда или кариотипа X0 (синдром Шерешевского—Тернера) может наблюдаться тяжелая форма гемофилии. Даже при нормальном уровне факторов свертывания у женщин-носительниц могут наблюдаться гемартрозы и аномальные кровотечения [6].

FVIII и FIX активируются во время фазы распространения процесса свертывания крови, формируя комплекс для активации FX. Дефицит любого из них нарушает активацию FX, приводя к нарушению «тромбинового взрыва» и субоптимальной продукции тромбина и, соответственно, недостаточной плотности сгустка [3].

Существует три основных клинических сценария, которые приводят к диагностированию гемофилии: наличие семейной истории заболевания, наличие аномальных кровотечений у пациента или его близких родственников либо аномальные результаты коагуляционных тестов при скрининге [3].

В случае семейной истории гемофилии можно определить статус носительства у женщин и девочек из этой семьи и на ранних стадиях поставить диагноз мальчикам. К облигатным носительницам относятся дочери отцов с гемофилией, матери нескольких сыновей с гемофилией и матери одного сына с гемофилией при наличии других родственников с данным заболеванием по материнской линии (например, брата или дяди). В случае, когда у женщины рождается лишь один сын с гемофилией, она необязательно является облигатной носительницей, так как мутация могла возникнуть *de novo*. К потенциальным носительницам относятся женщины, у которых в семье есть хоть один родственник с гемофилией по материнской линии. Уровень активности фактора (FVIII или FIX) у женщин не отражает носительство мутации, так как он снижен до значений $< 40\%$ лишь примерно в 30% случаев. Единственный метод, позволяющий однозначно установить статус носительства у женщин, — это проведение молекулярно-генетиче-

ского анализа для выявления мутаций в генах *F8* или *F9*. Проведение данного вида диагностики значительно облегчается при наличии материала от пациента с гемофилией из данной семьи. В случае если пробанд недоступен для тестирования, то молекулярно-генетическую диагностику можно провести для членов его семьи, имеющих максимальный риск носительства мутации (например, мать пробанда или его дочь). Однако если патогенный вариант не будет выявлен, в заключении должно быть четко отражено, что невозможность выявить мутацию с помощью существующих методик не исключает статуса носительства [3].

У новорожденных с гемофилией редко наблюдаются тяжелые кровотечения, однако внутричерепные кровоизлияния возникают значительно чаще, чем в общей популяции, и в основном в результате инструментального вмешательства при вагинальных родах и/или при тяжелых родах, чего следует избегать у носительниц мутаций в генах *F8* или *F9*. Данный вид кровотечения у новорожденных может указывать на наличие гемофилии и на необходимость дальнейших исследований. Наличие необычных симптомов кровотечений у мальчиков может свидетельствовать о гемофилии. Обычно у детей с тяжелой или среднетяжелой формой гемофилии наблюдается легкая синяковость в возрасте 8—10 месяцев. В течение первого года жизни, особенно в период, когда ребенок начинает ползать и/или ходить, могут возникать мышечные кровотечения или кровоизлияния в суставы. У детей с легкой формой кровоточивость может не наблюдаться до взрослого возраста при отсутствии травм или необходимости в операции [3].

Для гемофилии характерно увеличение АЧТВ, удлинение времени свертывания крови при сохранении других показателей (протромбинового и тромбинового времени, концентрации фибриногена по Клауссу, количества тромбоцитов) в пределах нормальных значений. Изолированное удлинение активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ) может указывать на среднетяжелую или легкую форму гемофилии, которые могут быть не выявлены до взрослого возраста. Дальнейшее подтверждение диагноза проводят с помощью анализа на волчаночный коагулянт и измерения уровня активности факторов свертывания, входящих во внутренний каскад свертывания (FXII, FXI, FIX и FVIII). Во всех случаях выявления гемофилии в семье в ходе обследования требуется дальнейший тщательный сбор семейного анамнеза для выявления других потенциальных пациентов с гемофилией и определения статуса носительства у женщин из этой семьи [1, 3].

Одним из важнейших критериев постановки диагноза гемофилия является остаточный уровень свертывающей активности FVIII и FIX.

Эти измерения проводятся с помощью одностадийного клоттингового или хромогенного метода. Одностадийный клоттинговый метод основан на тесте АЧТВ, а остаточный уровень активности фактора вычисляется на основе сравнения АЧТВ плазмы пациента (смешанной с плазмой, дефицитной по соответствующему фактору) со стандартной кривой, полученной путем разведения стандартной плазмы или нормальной пулированной плазмы, смешанной с дефицитной плазмой. Хромогенный анализ основан на измерении количества FXa в плазме пациента, которое пропорционально уровню функционального FVIII или FIX. В данном методе концентрация FXa измеряется с использованием хромогенного субстрата, специфичного к FXa. Интенсивность цвета при этом отражает уровень образовавшегося FXa. Хромогенный анализ не требует наличия плазмы, дефицитной по фактору свертывания, и более устойчив к ряду преаналитических переменных (например, ко времени между взятием крови и проведением анализа), чем одностадийный клоттинговый метод. Однако последний более распространен и дешевле. Хромогенный метод особенно полезен при определении среднетяжелой или легкой формы гемофилии А, так как некоторые типы мутаций в *F8* приводят к значительным расхождениям в результатах определения остаточной активности FVIII разными методами [1, 3].

При выявленном снижении активности FVIII или FIX выполняют определение специфического ингибитора к сниженному фактору [1].

Итоговый диагноз гемофилии устанавливается при наличии как минимум двух из трех критериев: 1) отсутствие приобретенных коагулопатий; 2) снижение активности FVIII/FIX ниже 50%; 3) наличие мутаций генов FVIII или FIX [1].

Знание конкретного патогенного варианта в семье делает возможным проведение пренатальной диагностики на разных уровнях развития плода: преимплантационного генетического тестирования на уровне эмбриона до переноса его в матку, исследования ворсин хориона в 10–12-й неделе беременности или амниоцитов на более поздних стадиях. Преимплантационное генетическое тестирование позволяет выбрать для экстракорпорального оплодотворения эмбрион без генетического нарушения. Результаты тестирования ворсин хориона позволяют принять решение о прерывании беременности на ранней стадии. Амниоцентез позволяет установить наличие или отсутствие генетического нарушения у плода, однако на этой стадии беременности добровольное прерывание зачастую невозможно. Генетическое консультирование должно включать в себя обсуждение рисков процедуры взятия материала при проведении пренатальной диагностики [3].

Гемофилия А

Ген *F8*, кодирующий фактор FVIII, локализован на длинном плече X-хромосомы (Xq28). Он имеет протяженность в 187 тысяч пар нуклеотидов (тпн) и состоит из 26 экзонов, кодирующих мРНК длиной в 9 тысяч нуклеотидов (тн). Зрелый белок FVIII состоит из 2332 аминокислот. Синтезируется FVIII преимущественно в эндотелиальных клетках синусоидных капилляров печени, а также в гепатоцитах и клетках Купфера (резидентных макрофагах выстилки синусоидов печени).

Стратегия и методы генетического тестирования пробандов

Из-за большого размера гена *F8* раньше его секвенирование представляло проблему, в связи с чем зачастую использовали более экономичную экспрессную методологию, основанную на семейном анализе полиморфизмов в гене *F8*, позволяющую осуществлять маркировку дефектного аллеля и проследивать его пути в родословной. В данном гене не так много полиморфизмов, встречающихся с достаточной частотой и обладающих высоким уровнем гетерозиготности, позволяющих с большой разрешающей способностью маркировать дефектный аллель, поэтому для проведения семейной диагностики рекомендуется использовать как внутригенные, так и внегенные варианты, расположенные, по возможности, как можно ближе к гену *F8* [7–9].

Наиболее распространенными нарушениями при тяжелой форме гемофилии А являются инверсия интрона 22 (*inv22*), встречающаяся примерно в 40–50% случаев, и более редкая инверсия интрона 1 (*inv1*, 2–5% случаев). В редких случаях инверсии встречаются и у пациентов со среднетяжелой формой заболевания. Предполагают, что чаще всего инверсии происходят во время сперматогенеза из-за несбалансированности по размеру X и Y хромосом, из-за чего становится возможной внутрихромосомная рекомбинация. В случае *inv22* рекомбинация происходит между регионом длиной в 9,5 тпн интрона 22 и одной из двух его внегенных копий, первая из которых находится в прямой, а вторая в противоположной ориентации по отношению к локусу гена *F8*, причем в инверсии значительно чаще принимает участие вторая из них [10]. В случае с *inv1* гомологичная рекомбинация происходит между последовательностью длиной в 1,2 тпн, расположенной в интроне 1, и ее внегенной копией, находящейся в противоположной ориентации [11]. Матери пациентов с инверсиями практически всегда являются носительницами.

Для детекции *inv22* используются два основных метода — полимеразная цепная реакция (ПЦР) длинных фрагментов (LR-PCR, long-range PCR, [12, 13]) и инвертированная ПЦР (IS-PCR, inverse-shifting PCR [14, 15]). *Inv1* определяется с помощью стандартной ПЦР или IS-PCR [11, 16]. Тестирование должно проводиться с использованием положительного и отрицательного контрольных образцов.

У остальных пациентов с тяжелой, среднетяжелой или легкой формой гемофилии А выявляются однонуклеотидные замены, микроделеции, микроинсерции или, реже, вариации числа копий генов (copy number variations, CNVs). В настоящее время в международных базах данных (f8-db.eahad.org, www.hgmd.cf.ac.uk, www.cdc.gov/ncbddd/hemophilia/champs.html) описано более 3500 различных патогенных вариантов в гене *F8*, приводящих к гемофилии А. Большая часть описанных патогенных вариантов уникальна, то есть они были встречены только у одного пациента.

После исключения инверсий при тяжелой и среднетяжелой форме гемофилии А далее проводят полный скрининг всех функционально важных регионов гена *F8* (все кодирующие экзоны, фланкирующие их интронные участки, промоторная 5'-область) в зависимости от доступных ресурсов методом ПЦР с последующим секвенированием по Сэнгеру [16—19] или высокопроизводительным секвенированием (NGS, next-generation sequencing [20—23]) для выявления миссенс-, нонсенс-мутаций, мутаций сплайсинга, микроделетий и микроинсерций.

При анализе методом секвенирования по Сэнгеру наличие генного варианта должно быть подтверждено секвенированием с двух праймеров, прямого (5') и обратного (3').

Результаты, полученные в ходе высокопроизводительного секвенирования, должны быть подтверждены секвенированием по Сэнгеру.

В случае отсутствия амплификации конкретного экзона или нескольких соседствующих экзонов у пробанда можно заподозрить наличие крупной делеции, что должно быть подтверждено определением точек разрыва или методами, чувствительными к наличию CNV, такими как мультиплексная амплификация лигазно-связанных проб (MLPA, multiplex ligation-dependent probe amplification) [24, 25]. Секвенирование по Сэнгеру нечувствительно к CNV у носителей.

Если патогенный вариант не был выявлен, можно предположить наличие крупных инсерций, которые могут быть подтверждены с помощью MLPA.

Современные достижения в лечении гемофилии посредством внутривенного введения различных препаратов экзогенного фактора FVIII значительно улучшили качество жизни больных за последние годы, однако данный вид терапии привел к появлению одного из самых се-

резных осложнений гемофилии А — выработке аллоантител анти-FVIII, ингибирующих активность фактора FVIII у 10—15% ранее не леченных больных [26, 27]. Ингибитор обнаруживается преимущественно у пациентов с тяжелой формой заболевания, но может появляться также при среднетяжелой и легкой формах, если эндогенный FVIII имеет эпитопы, отличные от таковых на терапевтическом факторе [28]. В настоящее время понимание патофизиологических механизмов, ведущих к возникновению ингибиторных антител, вышло на новый качественный уровень. Стало очевидным, что это многофакторный процесс, в нем участвуют клетки разных типов, цитокины и другие иммунные регуляторные молекулы, степень участия и действие которых определяются как генетическими, так и негенетическими факторами. Тем не менее надежно прогнозировать иммунный ответ больного на введение препарата фактора и риск развития ингибитора все еще невозможно.

Гемофилия В

Ген *F9* локализован на длинном плече X-хромосомы (Xq27). Он имеет протяженность в 33 тпн и состоит из 8 экзонов, кодирующих мРНК длиной в 2,8 тпн. Она кодирует незрелый протеин, состоящий из 461 аминокислоты, который посттрансляционно процессируется в зрелый белок из 415 аминокислот. FIX синтезируется в гепатоцитах, является витамин-К-зависимым фактором для карбоксилирования остатков глутаминовой кислоты фосфолипидсвязывающего Gla-домена.

Стратегия и методы генетического тестирования пробандов

Гемофилия В генетически гетерогенна с преобладанием миссенс-мутаций. Инверсий, как в *F8*, при гемофилии В не встречается за отсутствием гомологичных последовательностей, которые могли бы рекомбинировать. В случае гемофилии В сразу проводят полный скрининг всех функционально важных регионов гена *F9* в зависимости от доступных ресурсов методом ПЦР с последующим секвенированием по Сэнгеру [29, 30] или высокопроизводительным секвенированием (NGS, next-generation sequencing [20—23]) для выявления миссенс-, нонсенс-мутаций, мутаций сплайсинга, делеций и инсерций.

Результаты, полученные в ходе высокопроизводительного секвенирования, должны быть подтверждены секвенированием по Сэнгеру.

При анализе методом секвенирования по Сэнгеру наличие генного варианта должно быть подтверждено секвенированием с двух направлений — прямого (5') и обратного (3').

В случае провала амплификации конкретного экзона или протяженного участка у пробанда можно заподозрить наличие крупной делеции, что должно быть подтверждено определением точек разрыва или методами, чувствительными к наличию CNV, такими как мультиплексная амплификация лигазно-связанных проб (MLPA) или количественной ПЦР в реальном времени [31, 32]. Секвенирование по Сэнгеру нечувствительно к CNV у носителей.

Если патогенный вариант не был выявлен, можно предположить наличие крупных инсерций, которые могут быть подтверждены с помощью MLPA или количественной ПЦР в реальном времени.

Известные варианты в гене *F9* (свыше 1200) опубликованы в международных базах данных (f9-db.eahad.org, www.hgmd.cf.ac.uk). Мутации, приводящие к отсутствию белка или его сильному укорочению, при гемофилии В не так распространены, как в гене *F8*, что объясняет различие в частоте возникновения ингибитора — < 10% случаев по сравнению с 30% при гемофилии А. При среднетяжелой и легкой форме гемофилии В ингибитор практически никогда не развивается.

Существует подтип гемофилии В — гемофилия В Лейден, которая характеризуется низким уровнем фактора IX до половозрелости, который затем с возрастом повышается практически до нормальных значений. Данная форма заболевания вызывается патогенными вариантами в промоторе гена *F9*, в участках, связывающихся с транскрипционными факторами, в том числе с андрогеновым рецептором (AR), что влияет на экспрессию гена. Был также описан еще один подтип заболевания — гемофилия В Бранденбург, при котором повреждаются сразу два сайта связывания — для HNF4α и для AR, обуславливая такую форму гемофилии В, при которой не наблюдается улучшения клинической картины при воздействии тестостерона [33].

Классификация и описание вариантов

Для классификации генетических вариантов при менделевских заболеваниях, к которым относятся гемофилии, были разработаны рекомендации Американской коллегией медицинских генетиков (The American College of Medical Genetics and Genomics, ACMG) [34]. В России на их основе было разработано Руководство по интерпретации данных, полученных методами массового параллельного секвенирования (MPS) [35], а также калькулятор патогенности вариантов нуклеотидной последовательности (calc.genomereasearch.ru).

Новые миссенс-мутации и синонимичные варианты, нарушающие сплайсинг, должны интерпретироваться с осторожностью, крайне ре-

комендуется проведение функционального анализа, доказывающего их патогенность.

Номенклатура найденных вариантов должна производиться согласно системе HGVS (The Human Genome Variation Society, www.varnomen.hgvs.org/).

Написание отчета

Лабораторный отчет должен включать информацию, позволяющую однозначно идентифицировать пациента, выявленный вариант с использованием стандартизированной номенклатуры с указанием геномного референса, ограничения метода и интерпретацию результатов исследования в форме, понятной для врача [36].

Стратегии в случае, если патогенный вариант не был выявлен

Примерно в 0,6% случаев у пациентов с тяжелой формой гемофилии А и в 2,9% случаев у пациентов со среднетяжелой или легкой формой гемофилии А при исследовании геномной ДНК не выявляется патогенный вариант в гене *F8* при использовании стандартных методов, то есть покрывающих все кодирующие и регуляторные регионы гена [37].

Примерно в 1,1% случаев среднетяжелой и легкой гемофилии В при исследовании геномной ДНК не выявляется патогенный вариант в гене *F9* при использовании стандартных методов, то есть покрывающих все кодирующие и регуляторные регионы гена [37].

У пациентов с диагнозом гемофилии А или В без выявленного патогенного варианта в кодирующих регионах генов *F8* или *F9*, соответственно, можно рекомендовать анализ интронных регионов секвенированием по Сэнгеру или с помощью NGS для выявления глубоких интронных вариантов, нарушающих сплайсинг, которые могут приводить к развитию заболевания [38—41]. Глубокие интронные варианты должны интерпретироваться с осторожностью, крайне рекомендуется проведение функционального анализа, доказывающего их патогенность.

В случае, если иные генетические причины не найдены, может быть рекомендовано проведение анализа других генов с помощью таргетного, полноэкзомного или полногеномного секвенирования, а также анализ геномных перестроек [37].

У пациентов с подтвержденным диагнозом гемофилии А, но без экзонных или интронных вариантов в *F8*, возможно определение несбалансированности специфичной экспрессии микро-РНК, что может приводить к даунрегуляции *F8* и фенотипу гемофилии А. Однако не-

обходимо дальнейшее изучение роли микро-РНК в патогенезе гемофилии А [42—44].

Герминальный и соматический мозаицизм также может осложнять генетическую диагностику гемофилии [45]. В частности, этот вариант нужно учитывать в случае диагностики носительства у матери пациента с гемофилией.

У пациентов с фенотипом гемофилии А или женщин с низким уровнем фактора необходимо исключить другие диагнозы, среди которых:

- приобретенная гемофилия;
- тип 2N болезни Виллебранда, при котором наблюдается изолированный низкий уровень FVIII:C;
- сочетанный дефицит FV и FVIII, к которому приводят генетические нарушения в генах *LMAN1* или *MCFD2* [46];
- другие типы болезни Виллебранда [47].

Литература

1. Гемофилия. Клинические рекомендации. Национальное общество детских гематологов, онкологов. Национальное гематологическое общество. 2023. URL: cr.minzdrav.gov.ru/schema/127_2.
2. UKHCDO. Annual Report. Bleeding disorder statistics for 2014/2015. URL: http://www.ukhcdo.org/wp-content/uploads/2019/04/2015_UKHCDO_Annual_Report_2014_15_Data.pdf.
3. Berntorp E, Fischer K, Hart DP et al. Haemophilia. Nat Rev Dis Primers 2021; 7:45. DOI: 10.1038/s41572-021-00278-x.
4. Stonebraker JS, Bolton-Maggs PH, Michael Soucie J et al. A study of variations in the reported haemophilia B prevalence around the world. Haemophilia 2012; 18:e91—e94.
5. Jeanne M, Piquet Y, Ivanovic Z et al. Variations of factor VIII: C plasma levels with respect to the blood group ABO. Transfus Med 2004; 14:187—188.
6. James PD, Mahlangu J, Bidlingmaier C et al. Evaluation of the utility of the ISTH-BAT in haemophilia carriers: a multinational study. Haemophilia 2016; 22: 912—918.
7. Сурин В. Л., Лукьяненко А. В., Лучинина Ю. А. Исследование полиморфизма AluI в интроне 1 гена фактора VIII свертывания крови человека: новый маркер для диагностики носительства гемофилии А. Генетика 2007; 43(4): 560—566.
8. Сурин В. Л., Лукьяненко А. В., Лучинина Ю. А. Характеристика двух новых эффективных внегенных микросателлитных маркеров для диагностики носительства гемофилии А. Генетика 2007; 43(6):831—840.
9. Surin VL, Zhukova EL, Krutov AA et al. Simple and convenient detection of a HindIII polymorphic site in intron 19 of factor VIII using PCR. Nucleic acids research 1990; 18:3432.

10. Lakich D, Kazazian HH, Antonarakis SE, Gitschier J. Inversions disrupting the factor VIII gene are a common cause of severe haemophilia A. *Nat Genet* 1993; 5:236—241. DOI:10.1038/ng1193-236.
11. Bagnall RD, Waseem N, Green PM, Giannelli F. Recurrent inversion breaking intron 1 of the factor VIII gene is a frequent cause of severe hemophilia A. *Blood* 2002; 99:168—174. DOI:10.1182/blood.V99.1.168.
12. Liu Q, Nozari G, Sommer SS. Single-tube polymerase chain reaction for rapid diagnosis of the inversion hotspot of mutation in hemophilia A. *Blood* 1998; 92:1458—1459.
13. Bagnall RD, Giannelli F, Green PM. Int22h-related inversions causing hemophilia A: a novel insight into their origin and a new more discriminant PCR test for their detection. *J Thromb Haemost* 2006; 4:591—598.
14. Rossetti LC, Radic CP, Larripa IB, De Brasi CD. Developing a new generation of tests for genotyping hemophilia-causative rearrangements involving int22h and int1h hotspots in the factor VIII gene. *J Thromb Haemost* 2008; 6:830—836.
15. Pan TY, Chiou SS, Wang CC, Wu SM. Separation of intron 22 inversion type 1 and 2 of hemophilia A by modified inverse-shifting polymerase chain reaction and capillary gel electrophoresis. *Talanta* 2014; 130:328—335.
16. Green PM, Bagnall RD, Waseem NH, Giannelli F. Haemophilia A mutations in the UK: results of screening one-third of the population. *Br J Haematol* 2008; 143:115—128.
17. Santacroce R, Acquila M, Belvini D et al. The AICE-genetics study group. Identification of 217 unreported mutations in the F8 gene in a group of 1,410 unselected Italian patients with hemophilia A. *J Hum Genet* 2008; 53:275—284.
18. Pshenichnikova O, Salomashkina V, Poznyakova J et al. Spectrum of causative mutations in patients with hemophilia A in Russia. *Genes* 2023; 14:260. DOI: 10.3390/GENES14020260.
19. Salomashkina VV, Pshenichnikova OS, Perina FG, Surin VL. A founder effect in hemophilia A patients from Russian Ural region with a new p.(His634Arg) variant in *F8* gene. *Blood Coagulation Fibrinolysis* 2022; 33:124—129. DOI: 10.1097/MBC.0000000000001073.
20. Bastida JM, Del Rey M, Lozano ML et al. Design and application of a 23-gene panel by next-generation sequencing for inherited coagulation bleeding disorders. *Haemophilia* 2016; 22(4):590—597. DOI: 10.1111/hae.12908.
21. Bastida JM, González-Porras JR, Jiménez C et al. Application of a molecular diagnostic algorithm for haemophilia A and B using next-generation sequencing of entire *F8*, *F9* and *VWF* genes. *Thromb Haemost* 2017; 117:66—74. DOI: 10.1160/TH16-05-0375.
22. Lyu C, Xue F, Liu X et al. Identification of mutations in the F8 and F9 gene in families with haemophilia using targeted high-throughput sequencing. *Haemophilia* 2016; 22:e427—e434. DOI: 10.1111/hae.12924.
23. Simeoni I, Stephens JC, Hu F et al. A high-throughput sequencing test for diagnosing inherited bleeding, thrombotic, and platelet disorders. *Blood* 2016; 127:2791—2803. DOI: 10.1182/blood-2015-12-688267.

24. Payne AB, Bean CJ, Hooper WC, Miller CH. Utility of multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) for hemophilia mutation screening. *J Thromb Haemost* 2012; 10:1951—1954.
25. Belvini D, Salvato R, Radossi P, Tagariello G. Multiplex ligation-dependent probe amplification as first mutation screening for large deletions and duplications in haemophilia. *Haemophilia* 2017; 23:e124—e132.
26. Garagiola I, Palla R, Peyvandi F. Risk factors for inhibitor development in severe hemophilia A. *Thromb Res* 2018; 168:20—27. DOI: 10.1016/j.thromres.2018.05.027.
27. Astermark J, Donfield SM, Gomperts ED et al. The polygenic nature of inhibitors in hemophilia A: results from the Hemophilia Inhibitor Genetics Study (HIGS) Combined Cohort. *Blood* 2013; 121:1446—1454. DOI: 10.1182/blood-2012-06-434803.
28. Goodeve AC, Williams I, Bray GL, Peake IR. Relationship between factor VIII mutation type and inhibitor development in a cohort of previously untreated patients treated with recombinant factor VIII (Recombinate™). *Thromb Haemost* 2000; 83:844—848. DOI: 10.1055/s-0037-1613931.
29. Li T, Miller CH, Driggers J et al. Mutation analysis of a cohort of US patients with hemophilia B. *Am J Hematol* 2014; 89:375—379.
30. Сурин В. Л., Демидова Е. Ю., Селиванова Д. С. и др. Молекулярно-генетическое исследование гемофилии В в России: мутационный анализ. *Генетика* 2016; 52(4):466—473.
31. Casaña P, Haya S, Cid AR et al. Identification of deletion carriers in hemophilia B: quantitative real-time polymerase chain reaction or multiple ligation probe amplification. *Transl Res* 2009; 153:114—117. DOI: 10.1016/j.trsl.2008.12.006.
32. Costa C, Jouannic JM, Stieltjes N et al. Quantitative real-time PCR assay for rapid identification of deletion carriers in hemophilia. *Clin Chem* 2004; 50:1269—1270. DOI: 10.1373/clinchem.2004.031609.
33. Бескоровайная Т. С., Забненкова В. В., Зинченко Р. А. и др. Гемофилия В Лейден: литературные и собственные данные. *Генетика* 2021; 57(10):1121—1130.
34. Richards S, Aziz N, Bale S et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 2015; 17:405—424.
35. Рыжкова О. П., Кардымон О. Л., Прохорчук Е. Б. и др. Руководство по интерпретации данных последовательности ДНК человека, полученных методами массового параллельного секвенирования (MPS) (редакция 2018, версия 2). *Медицинская генетика* 2019; 18:3—23. DOI: 10.25557/2073-7998.2019.02.3-23.
36. Claustres M, Kožich V, Dequeker E et al. European Society of Human Genetics. Recommendations for reporting results of diagnostic genetic testing (biochemical, cytogenetic and molecular genetic). *Eur J Hum Genet* 2014; 22:160—170. DOI: 10.1038/ejhg.2013.125.

37. Konkle BA, Johnsen JM, Wheeler M et al. Genotypes, phenotypes and whole genome sequence: approaches from the My Life Our Future haemophilia project. *Haemophilia* 2018; 24(Suppl 6):87–94.
38. Jourdy Y, Janin A, Fretigny M et al. Recurrent *F8* intronic deletion found in mild hemophilia A causes Alu exonization. *Am J Hum Genet* 2018; 102:199–206.
39. Pezeshkpoor B, Zimmer N, Marquardt N et al. Deep intronic ‘mutations’ cause hemophilia A: application of next generation sequencing in patients without detectable mutation in *F8* cDNA. *J. Thromb Haemost* 2013; 11:1679–1687.
40. Castaman G, Giacomelli SH, Mancuso ME et al. Deep intronic variations may cause mild hemophilia A: intronic mutations in mild hemophilia A. *J Thromb Haemost* 2011; 9:1541–1548.
41. Bach E, Wolf B, Oldenburg J et al. Identification of deep intronic variants in 15 haemophilia A patients by next generation sequencing of the whole factor VIII gene. *Thromb Haemost* 2015; 114:757–767.
42. Jankowska KI, McGill J, Pezeshkpoor B et al. Clinical manifestation of hemophilia A in the absence of mutations in the *F8* gene that encodes FVIII: role of microRNAs. *Transfusion* 2020; 60:401–413.
43. Sarachana T, Dahiya N, Simhadri VL et al. Small ncRNA expression-profiling of blood from hemophilia A patients identifies miR-1246 as a potential regulator of factor 8 gene. *PLoS One* 2015; 10:e0132433. DOI: 10.1371/journal.pone.0132433.
44. Rosset C, Vieira IA, Salzano FM, Bandinelli E. A germline variant affects putative miRNA-binding sites at the *F8* 3’UTR and acts as a potential haemophilia A phenotype modifier in Southern Brazilian patients. *Haemophilia* 2016; 22: e327–e329. DOI: 10.1111/hae.12953.
45. Kasper CK, Buzin CH. Mosaics and haemophilia. *Haemophilia* 2009; 15: 1181–1186.
46. Spreafico M, Peyvandi F. Combined FV and FVIII deficiency. *Haemophilia* 2008; 14:1201–1208. DOI: 10.1111/j.1365-2516.2008.01845.x.
47. Boylan B, Rice AS, De Staercke C et al. Inhibitor Research Study Investigators. Evaluation of von Willebrand factor phenotypes and genotypes in Hemophilia A patients with and without identified *F8* mutations. *J Thromb Haemost* 2015; 13:1036–1042. DOI: 10.1111/jth.12902.

Д. М. Чернецкая

Глава 15.

Молекулярно-генетическая диагностика болезни Виллебранда

Классификация болезни Виллебранда

Болезнь Виллебранда (БВ) — это наследственная коагулопатия, проявляющаяся и у мужчин, и у женщин. Болезнь обусловлена нарушениями в гене фактора фон Виллебранда (*VWF*), которые ведут к снижению количества в кровеносном русле или нарушению функций фактора фон Виллебранда (*vWF*). Две основные функции *vWF* — это защита от распада фактора свертывания VIII (*FVIII*) и связывание тромбоцитов с эндотелием сосуда при его повреждении [1, 2].

БВ делят на 3 типа. Типы 1 и 3 БВ количественные: тип 1 вызван снижением количества *vWF* в кровяном русле, а тип 3 — отсутствием фактора [1, 3].

Тип 2 БВ характеризуется качественными нарушениями *vWF* и делится на 4 подтипа в зависимости от того, какая именно функция фактора нарушена.

Три подтипа из четырех связаны с нарушением функции связывания тромбоцитов с эндотелием сосуда, которое может происходить тремя путями: тип 2А ассоциирован со снижением аффинности фактора к тромбоцитам, тип 2В — с повышением аффинности к тромбоцитам, а тип 2М вызывается снижением связи с коллагеном эндотелия сосуда [1, 2, 4].

Нарушение функции защиты FVIII от распада вызвано снижением возможности vWF связываться с FVIII и классифицируется как тип 2N [5].

Терапия БВ в России проводится преимущественно концентратами vWF, в легких случаях используют транексамовую кислоту или гормональные контрацептивы для уменьшения кровотечений [1, 6, 7]. За рубежом распространено применение десмопрессина как основной линии терапии легких форм БВ. Десмопрессин позволяет вывести vWF из депо в эндотелии сосуда в кровеносное русло, поэтому его не используют при типе 3 в силу неэффективности, поскольку фактор при этом типе отсутствует [8]. Десмопрессин опасен при типе 2В БВ, так как может приводить к тромбозам [7, 8]. При типе 2N эффективность терапии десмопрессином будет зависеть от мутации, вызвавшей болезнь [5].

Разные типы и подтипы БВ характеризуются разным наследованием. Типы 3 и 2N наследуются рецессивно, то есть для проявления симптомов необходимо нарушение обоих аллелей гена *VWF* [4, 9]. Остальные типы (1, 2А, 2В, 2М) наследуются доминантно [4, 9], и для проявления болезни достаточно нарушения одного аллеля. Следует, однако, отметить, что тип 1 БВ обладает неполной пенетрантностью [4], то есть заболевание может проявляться не у всех носителей мутаций.

Для каждого типа и подтипа разработаны алгоритмы диагностики, тем не менее некоторые анализы, считающиеся классическими для установления конкретного подтипа, являются труднодоступными и в настоящее время практически не применяются.

Для дифференциации подтипов 2А/2М, которые оба ведут к снижению связи тромбоцитов с эндотелием сосуда, но на разных этапах, используется метод электрофореза мультимеров. У подтипа 2А распределение мультимеров соответствует нормальному, а у подтипа 2М отсутствуют высокомолекулярные мультимеры [10–12].

На практике анализ мультимеров проводят очень редко, скорее с научными целями, так как терапия при подтипах 2А и 2М не имеет существенных различий, и некоторые исследователи считают разделение данных подтипов избыточным, так как страдает одна и та же функция vWF [11]. Дополнительное затруднение в классификацию вносят случаи частичной потери высокомолекулярных мультимеров, как в случае носителей мутации p.Arg1374Cys. Исследователи затрудняются отнести БВ, вызванную данной мутацией, к подтипу 2А или 2М именно по признаку неполной потери высокомолекулярной фракции мультимеров [11]. Если все же необходимо различить данные подтипы, а анализ мультимеров недоступен, на помощь приходит молекулярно-генетический анализ, который во многих случаях позволяет решить эту задачу, опираясь на накопленные в литературе данные.

Для подтипа 2N БВ важна дифференциальная диагностика, отличающая его от гемофилии А, поскольку достаточно часто ставится ошибочный диагноз на основании коагулологических данных, а именно по снижению прокоагулянтной активности FVIII (FVIII:C) при нормальных или незначительно сниженных значениях антигена vWF (vWF:Ag) и активности vWF (vWF:RCo) [3, 5]. При подтипе 2N БВ терапия так же, как и при гемофилии А, проводится концентратом FVIII, но требует присутствия в препарате vWF во избежание тромбозов [3, 5, 7]. Анализ, которым рекомендуется подтверждать подтип 2N БВ, — это связывание vWF с FVIII (vWF:FVIIIb). Этот анализ практически нигде не проводят [5].

Молекулярно-генетический анализ гена *VWF* позволяет проверить наличие нарушений, соответствующих подтипу 2N БВ. Знание конкретной мутации, ассоциированной с этим вариантом заболевания, важно, потому что оно позволяет определить, будет ли эффективна терапия десмопрессинном. Так, при распространенной мутации p.Arg854Gln она эффективна, а при других (Cys1060Arg, Arg816Trp и Thr791Met) — нет [5, 13—15]. Следует, однако, отметить, что эта информация актуальна в основном для зарубежных клиницистов, поскольку в России десмопрессин для терапии БВ не применяется [1].

Молекулярно-генетическую дифференциальную диагностику подтипа 2N БВ и гемофилии А рекомендуют больным с направительным диагнозом «легкая форма гемофилии А» (в основном мужчинам), у которых молекулярно-генетический анализ гена *F8*, проведенный по стандартной схеме с помощью секвенирования по методу Сэнгера, не выявил отклонения от нормы. Отсутствие нарушений не является в этом случае абсолютным доказательством отсутствия гемофилии А в силу ограничения возможностей метода исследования (не выявляются возможные глубинные интронные мутации, а также масштабные делеции у женщин), однако позволяет заподозрить подтип 2N БВ. Важная категория пациентов, направляемых на установление подтипа 2N БВ, это женщины с отклонениями в коагулограмме, планирующие беременность. Подтверждение подтипа 2N БВ позволит не проводить пренатальную диагностику, рекомендуемую при носительстве гемофилии А, так как наследование подтипа 2N БВ рецессивное.

Дифференциальная диагностика подтипа 2В важна для выбора терапии, так как при данном подтипе возможно тромбообразование в силу высокой аффинности vWF к тромбоцитам [8]. Данный подтип диагностируют в рутинной практике с помощью анализа агрегации тромбоцитов с низкими дозами ристомидина [12]. Этот анализ более доступен, чем электрофорез мультимеров или vWF:FVIIIb, тем не менее его выполняют редко. В то же время молекулярно-генетическая диагнос-

тика в данном случае позволяет решить проблему быстро и с минимальными затратами, поскольку необходимо проанализировать только небольшой участок гена *VWF*. Доминантное наследование подтипа 2В БВ обуславливает актуальность селекции эмбрионов при ЭКО или проведение пренатальной диагностики статуса плода относительно заболевания (биопсия хориона или амниоцентез).

Таким образом, наиболее важной задачей является определение типов 2В и 2N БВ, так как их дифференциальная диагностика влияет на выбор терапии. Для планирования семьи актуальна диагностика типов БВ с доминантным наследованием (тип 1, подтипы 2А, 2В, 2М).

Молекулярно-генетический анализ гена *VWF* для выявления разных типов и подтипов БВ методом Сэнгера

Ген *VWF* локализован на 12-й хромосоме (12p13.31), состоит из 52 экзонов и имеет частичную копию (псевдоген), дублирующую экзоны и интроны 23—34, расположенную на 22-й хромосоме. Большой размер гена (~178 тысяч пар нуклеотидов, кодирующие аминокислотные остатки, нумеруются от 1 до 2813, начиная со стартового метионина [9]) усложняет молекулярно-генетический анализ и делает затруднительной генную терапию. На данный момент ее не практикуют на людях, хотя имеются пилотные разработки на мышах [17].

При подборе праймеров для молекулярно-генетического анализа необходимо учитывать наличие псевдогена, чтобы избежать его одновременного прочтения с геном *VWF*. Отличить последовательность гена и псевдогена не составляет особого труда, поскольку последовательность псевдогена содержит типичные нуклеотидные замены. Предложенная в данном разделе методика учитывает эту особенность.

Для разных типов и подтипов БВ характерна разная локализация мутаций в гене *VWF*.

Количественные нарушения (типы 1 и 3 БВ) могут быть обнаружены по всему гену, однако наследование у типа 1 доминантное (с неполной пенетрантностью) и для его верификации достаточно одной мутации, а у типа 3 — рецессивное, для его установления необходимо выявить две мутации [4]. Мутации типа 3 БВ чаще, чем мутации, характерные для других типов, целиком деактивируют аллель гена (ноль-мутации) [9]. Это свойственно таким нарушениям, как микроделеции и микроинсерции, сдвигающие белковую рамку считывания (frameshift-мутации), нонсенс-мутации, мутации зоны сплайсинга, а также крупным делециям/инсерциям и некоторым миссенс-мутациям [9, 16].

Нарушения, вызывающие подтип 2В БВ, локализованы только в области, кодирующей домен A1, отвечающий за связывание с рецептором на мембране тромбоцита $GP1\alpha$, то есть в пределах экзона 28 [4, 9, 12, 18].

Нарушения, характерные для типа 2М, могут быть обнаружены в экзонах 17, 27—31, 52 [9, 16].

Нарушения, ассоциированные с типом 2А, встречаются в экзонах 12, 14—16, 26, 28, 51, 52 [9, 16].

При подтипе 2N БВ мутации могут находиться в зоне между Ser764 и Arg1035, которая охватывает домен D' и часть домена D3. Нарушения локализованы в экзонах с 17-го по начало 28-го [5]. Анализ этих экзонов позволяет выявить нарушения, связанные с подтипом 2N. Поскольку он наследуется рецессивно, то для установления диагноза необходимо найти два нарушения. В случае, если анализ экзонов 17—28 выявил только одно нарушение, рекомендуется провести анализ остальных экзонов гена *VWF*, так как подтип 2N также будет наблюдаться при одной мутации, нарушающей связывание с FVIII, а вторая ноль-мутация может быть локализована в любой части гена [5].

Таким образом, для верификации подтипов 2 БВ рекомендуется анализировать соответствующие им экзоны гена *VWF*. Верификация типов 1 и 3, а также недифференцированной БВ может потребовать анализа всего гена.

Интерпретация результатов молекулярно-генетического анализа гена *VWF*

Обнаруженные нарушения гена *VWF* интерпретируют согласно литературным данным. Для этого нарушение находят в международных базах данных, таких как GnomAD, NCBI ClinVar, EAHAD, HGMD, LOVD3 и изучают приведенные в них ссылки на статьи.

Трактовка результатов молекулярно-генетического анализа бывает однозначной, когда найденная мутация или сочетание мутаций было неоднократно описано в литературе и его патогенное действие хорошо изучено. Интерпретация может быть затруднена, если обнаруженные нарушения встречены впервые или если наблюдаемые симптомы не соответствуют известному по литературе патогенному эффекту мутаций.

При интерпретации найденных нарушений важно учитывать доминантный (тип 1, подтипы 2А, 2В, 2М,) и рецессивный (тип 3, подтип 2N) пути наследования, характерные для разных типов и подтипов БВ [4].

При обнаружении двух мутаций остается вопрос, локализованы они на одном аллеле или на разных. Утверждать, что они находятся на разных аллелях, возможно в случае гомозиготы по данной мутации. В случае обнаружения двух гетерозиготных мутаций (компаунда) требуется семейный анализ родственников (предпочтительно родителей пациента, в некоторых ситуациях — брата или сестры). Обнаружение одного варианта из двух указывает на расположение мутаций на разных аллелях, а обнаружение обоих вариантов или их совместное отсутствие — на расположение на одном аллеле. При этом желательно, чтобы у родственников были найдены оба нарушения, чтобы исключить возможность возникновения мутации *de novo*.

В случае впервые выявленного нарушения варианты, связанные со сдвигом рамки считывания, нонсенс-мутации, мутации зоны сплайсинга, со всей очевидностью являются патогенными и в гомозиготной форме или при сочетании с аналогичными известными дефектами должны вызывать тип 3 БВ, так как при этом полностью дезактивируются оба аллеля. При обнаружении новых миссенс-мутаций, приводящих к аминокислотным заменам, рекомендуется использовать предсказательные протеомные программы, такие как MutationTaster, SIFT, PolyPhen, Provean, программы, опирающиеся на структуру vWF (можно найти в базе данных Protein Data Bank), и др. В основном такие программы позволяют с определенной степенью вероятности определить патогенность, но не специфическое изменение свойств vWF, поэтому их функциональность, как и точность предсказания, в известной мере ограничена. Примерно в той же степени сложно интерпретировать патогенность делеций и инсерций, не вызывающих сдвиг рамки считывания (inframe-вариации).

Для описания свойств vWF с новой мутацией можно использовать весь комплекс редких анализов (электрофорез мультимеров, оценка vWF:FVIIIB и агрегации тромбоцитов с низкими дозами ристомидина) или функциональный анализ мутантного аллеля, получающий в последнее время все более широкое распространение.

Приведенные выше рекомендации относятся к молекулярно-генетической диагностике БВ с использованием метода секвенирования по Сэнгеру. Однако при отсутствии точечных нарушений в гене *VWF* нельзя полностью исключить БВ, так как в гене может иметься протяженная гетерозиготная делеция или инсерция, которую можно обнаружить методом MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification), или глубокие интронные мутации, нарушающие правильный сплайсинг, для выявления которых целесообразнее всего использовать анализ мРНК (в формате секвенирования кДНК). Общая схема алгоритмов молекулярно-генетической диагностики БВ приведена на рис. 1.

В заключение следует отметить, что теоретически на развитие БВ могут влиять не только очевидные мутации, но и функциональные полиморфизмы гена *VWF*. Подобный механизм генетического предопределения БВ рассмотрен в работе, в которой приводится гипотеза, что сочетание двух полиморфизмов, которые поодиночке безвредны, дает патогенный эффект [19].

Таким образом, накопленный мировой опыт позволяет во многих случаях адекватно интерпретировать результаты молекулярно-генетического анализа гена *VWF* и устанавливать дифференциальный диагноз БВ. Однако если речь идет о новых, не встречавшихся ранее мутациях или сочетаниях разных мутаций, то для выяснения их реальных функциональных особенностей и соответствующих им типов или подтипов заболевания необходимо использовать комплексный подход, учитывающий как клинические данные, так и результаты всех ключевых лабораторных исследований.

Литература

1. Зозуля Н. И., Кумскова М. А., Лихачева Е. А., Свирина П. В. Клинические рекомендации по диагностике и лечению болезни Виллебранда. Национальное гематологическое общество, 2018 г. URL: https://npngo.ru/uploads/media_document/287/847cfff8-3420-4475-93ee-b1832519bb46.pdf.
2. Мельник А. А. Болезнь фон Виллебранда. Принципы лабораторной диагностики. Лабораторна діагностика 2018; 1(80):39—47.
3. Мамаев А. Н., Свирина П. В., Зозуля Н. И. и др. Способ диагностики болезни Виллебранда (субтип 2N). Патент на изобретение RU 2657794 C1. URL: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=37373642>.
4. James PD, Connell NT, Ameer B et al. ASH ISTH NHF WFH 2021 guidelines on the diagnosis of von Willebrand disease. Blood Adv 2021; 5(1):280—300. DOI: 10.1182/bloodadvances.2020003265.
5. Seidizadeh O, Peyvandi F, Mannucci PM. Von Willebrand disease type 2N: an update. J Thromb Haemost 2021; 19(4):909—916. DOI: 10.1111/jth.15247.
6. Игнатьев С. В., Владимирова С. Г., Ивашкина Е. П. и др. Угрожающие жизни кровотечения у пациентов с болезнью Виллебранда и опыт их купирования. Тромбоз, гемостаз и реология 2016; 1:77—80.
7. Лихачева Е. А., Полянская Т. Ю., Зоренко В. Ю. Клинические рекомендации по диагностике и лечению болезни Виллебранда. Национальное гематологическое общество, 2014 г. URL: https://npngo.ru/uploads/media_document/87/e4a9def0-5362-448d-8bc3-aa85ab6f4f40.pdf.
8. Connell NT, Flood VH, Brignardello-Petersen R et al. ASH ISTH NHF WFH 2021 guidelines on the management of von Willebrand disease. Blood Adv 2021; 5(1):301—325. DOI: 10.1182/bloodadvances.2020003264.
9. Goodeve AC. The genetic basis of von Willebrand disease. Blood Rev 2010; 24(3):123—134. DOI: 10.1016/j.blre.2010.03.003.

10. Sadler JE. A revised classification of von Willebrand disease. For the Subcommittee on von Willebrand Factor of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Thromb Haemost* 1994; 71(4):520—525.
11. Penas N, Pérez-Rodríguez A, Torea JH et al. von Willebrand disease R1374C: type 2A or 2M? A challenge to the revised classification. High frequency in the northwest of Spain (Galicia). *Am J Hematol* 2005; 80(3):188—196. DOI: 10.1002/ajh.20470.
12. Sadler JE, Budde U, Eikenboom JC et al. Update on the pathophysiology and classification of von Willebrand disease: a report of the Subcommittee on von Willebrand Factor. *J Thromb Haemost* 2006; 4(10):2103—14. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2006.02146.x.
13. Federici AB, Mazurier C, Berntorp E et al. Biologic response to desmopressin in patients with severe type 1 and type 2 von Willebrand disease: results of a multi-center European study. *Blood* 2004; 103(6):2032—2038. DOI: 10.1182/blood-2003-06-2072.
14. Mazurier C, Gaucher C, Jorieux S, Goudemand M. Biological effect of desmopressin in eight patients with type 2N ('Normandy') von Willebrand disease. Collaborative Group. *Br J Haematol* 1994; 88(4):849—854. DOI: 10.1111/j.1365-2141.1994.tb05127.x.
15. Nishino M, Girma JP, Rothschild C et al. New variant of von Willebrand disease with defective binding to factor VIII. *Blood* 1989; 74(5):1591—1599.
16. Goodeve A. Diagnosing von Willebrand disease: genetic analysis. *Hematol Am Soc Hematol Educ Program* 2016; 2016(1):678—682. DOI: 10.1182/asheducation-2016.1.678.
17. Heijdra JM, Cnossen MH, Leebeek FWG. Current and emerging options for the management of inherited von Willebrand disease. *Drugs* 2017; 77(14):1531—1547. DOI:10.1007/s40265-017-0793-2.
18. Ruggeri ZM, Pareti FI, Mannucci PM et al. Heightened interaction between platelets and factor VIII/von Willebrand factor in a new subtype of von Willebrand's disease. *N Engl J Med* 1980; 302(19):1047—1051. DOI: 10.1056/NEJM198005083021902.
19. Sacco M, Lancellotti S, Ferrarese M et al. Noncanonical type 2B von Willebrand disease associated with mutations in the VWF D'D3 and D4 domains. *Blood Adv* 2020; 4(14):3405—3415. DOI: 10.1182/bloodadvances.2020002334.
20. Laffan MA, Lester W, O'Donneell JS et al. The diagnosis and management of von Willebrand disease: a United Kingdom Haemophilia Centre Doctors Organization guideline approved by the British Committee for Standards in Haematology. *Br J Haematol* 2014; 167(4):453—465. DOI: 10.1111/bjh.13064.
21. Leebeek FW, Eikenboom JC. Von Willebrand's Disease. *N Engl J Med* 2016; 375(21):2067—2080. DOI: 10.1056/NEJMra1601561.

**Лабораторные методы
исследований при проведении
сопроводительной терапии
в лечении заболеваний
системы крови**

Глава 16.

Скрининговые тесты оценки плазменного гемостаза в клинической практике

Общие положения

Лабораторная диагностика нарушений плазменного звена системы гемостаза является важной клинической задачей. В арсенале профильных гемостазиологических лабораторий доступно множество исследований, позволяющих достоверно оценить характер и степень выраженности нарушений свертывания крови. Однако одномоментное проведение всех возможных коагуляционных тестов каждому больному — практически невыполнимая задача. Поэтому особенностью коагулологических исследований является наличие базовых (скрининговых) тестов, результаты которых в совокупности с клиническими данными и анамнезом больного указывают направление дальнейшего диагностического поиска и определяют выбор адекватной тактики лечения (рис. 1).

Для выявления нарушений плазменного гемостаза на этапе первичного обследования больного традиционно используются скрининговые тесты, способные осуществлять комплексную оценку состояния всех путей коагуляционного каскада (рис. 2) и доступные в лабораториях любого уровня оказания медицинской помощи [1—3]. К таким тестам относятся:

- протромбиновое время (ПВ) или его производное протромбин по Квику, интегрально оценивающее «внешний путь» свертывания крови;

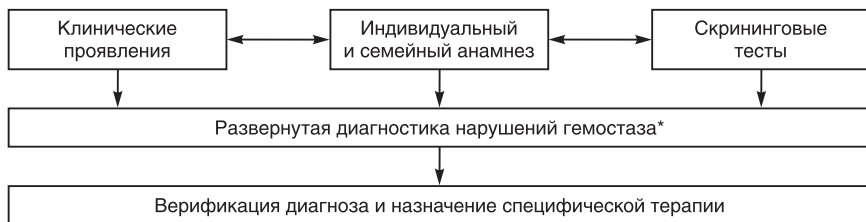


Рисунок 1. Алгоритм диагностики нарушений плазменного гемостаза.

* Развернутая диагностика нарушений плазменного гемостаза (тесты факторной диагностики и специальные тесты) выполняется после сбора жалоб, данных анамнеза и получения результатов скрининговой коагулограммы.

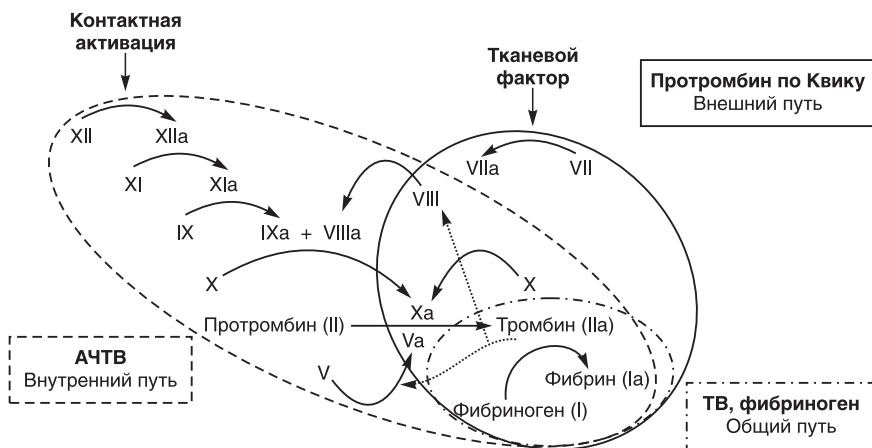


Рисунок 2. Классическая схема коагуляционного каскада описывает последовательность реакций протеолитической активации факторов свертывания крови, возникающих при контакте крови с отрицательно заряженной поверхностью (каолин, стекло) *in vitro*, — «внутренний путь» (тест АЧТВ), или при добавлении избытка тканевого тромбопластина *in vitro* — «внешний путь» (тест протромбин по Квику). Тесты ТВ и фибриноген оценивают «общий путь» свертывания крови [5].

- активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), интегрально оценивающее «внутренний путь» свертывания крови;
- тромбиновое время (ТВ) и фибриноген, которые характеризуют «общий путь» и конечный этап свертывания крови.

К наиболее частым причинам изменений результатов скрининговых тестов относятся: изолированный или комбинированный дефицит факторов свертывания крови, действие специфических и неспецифических ингибиторов, терапия антикоагулянтами (табл. 1) [4].

Таблица 1. Интерпретация результатов скрининговых тестов при патологии отдельных компонентов плазменного гемостаза и терапии антикоагулянтами

ПВ	АЧТВ	ТВ	Фибриноген	Причина изменения результатов / комментарий
Удлинено	Норма	Норма	Норма	● Дефицит FVII. ● Эффект волчаночного антикоагулянта*. ● Прямые ингибиторы FXa (ПВ более чувствительно, чем АЧТВ)
Норма	Удлинено	Норма	Норма	● Дефицит FVIII, FIX, FXI, FXII, ПК, ВМК. ● Дефицит vWF (часто ведет к снижению активности FVIII). ● Эффект волчаночного антикоагулянта. ● Прямые ингибиторы FIIa (АЧТВ более чувствительно, чем ПВ). ● Низкомолекулярный гепарин (при передозировке). ● Нефракционированный гепарин
Удлинено	Удлинено	Норма	Норма	● Дефицит FII, FV, FX. ● Дефицит FV + FVIII. ● Дефицит FII, FVII, FIX, FX (витамин-К-зависимые факторы). ● Непрямые антикоагулянты (антагонисты витамина К). ● Эффект волчаночного антикоагулянта. ● Тяжелая патология печени
Удлинено	Удлинено	Удлинено	Снижен	● Гипо- и дисфибриногенемия. ● Массивная трансфузионная терапия (гемодилюционная коагулопатия). ● Тяжелая патология печени. ● ДВС-синдром
Норма	Норма	Норма	Норма	● Дефицит FXIII (при наличии геморрагического синдрома)

* В редких случаях волчаночный антикоагулянт вызывает изолированное удлинение ПВ, как правило, в сочетании с удлинением АЧТВ, однако чаще всего определяется только изолированное удлинение АЧТВ.

F — фактор свертывания крови; vWF — фактор фон Виллебранда; ВМК — высокомолекулярный кининоген; ДВС — диссеминированное внутрисосудистое свертывание; ПК — прекалликреин.

Для достоверности полученных результатов скрининговых исследований необходимо соблюдение требований к преаналитическому этапу, на долю которого приходится до 70% всех лабораторных ошибок (табл. 2) [6].

Таблица 2. Требования к преаналитическому этапу исследования крови

Внелабораторный преаналитический этап	Лабораторный преаналитический этап
● Кровь сдается утром строго натощак, после 8–12-часового ночного периода голодания. ● Жгут используется с соблюдением техники наложения и временным интервалом не более 1 минуты. ● Кровь забирается в одноразовые пластиковые вакуумные пробирки с консервантом — 3,2% цитратом натрия в соотношении 9:1. ● Недопустимо взятие первой порции крови в пробирку для оценки системы гемостаза. ● Забор крови из центрального венозного катетера допустим в исключительных случаях с соблюдением соответствующих правил. ● Транспортировка образцов цельной крови не должна превышать 2 часов при температуре 18–24 °С	● Центрифугирование выполняется при ускорении 2000 g в течение 10 минут при температуре 18–24 °С (для диагностики волчаночного антикоагулянта требуется двойное центрифугирование). ● Допускается однократное замораживание плазмы до –30 °С с возможностью хранения до 2 недель, при температуре –70 °С — от 6 месяцев до 2 лет. ● Замороженную плазму следует разморозить при 37 °С на водяной бане (водяном термостате) в течение 3–5 минут

Протромбиновое время

ПВ (секунды) — один из основных скрининговых тестов, применяемых для определения суммарной протеолитической активности факторов «внешнего пути» свертывания крови, мониторинга терапии пероральными антикоагулянтами непрямого действия и оценки синтетической функции печени. Однако у него есть некоторые недостатки, обусловленные низкой воспроизводимостью из-за нестандартизованности тромбопластинового реагента для выполнения анализа, а также использованием разных тест-систем и анализаторов. Поэтому на сегодняшний день с целью стандартизации метода рекомендуется выражать ПВ в % активности факторов «внешнего пути» от нормы (протромбин по Квику, %), определяемой по калибровочному графику в автоматическом режиме. Данный тест применим в случае необходимости диагностики дефицита факторов и заболеваний печени [1–3].

Для контроля антикоагулянтной терапии антагонистами витамина К рекомендовано определение другого производного от ПВ расчетного лабораторного показателя — международное нормализованное отношение (МНО).

$$\text{МНО} = (\text{ПВ исследуемой плазмы} / \text{ПВ нормальной плазмы})^{\text{МИЧ}},$$

где МИЧ — международный индекс чувствительности — показатель, который характеризует заявленную производителем чувствительность тромбопластина и стандартизует его относительно международного стандарта (значение указывается в паспорте к реактивам каждой серии). Таким образом, результаты МНО могут быть достоверно сопо-

ставимы при определении в разных лабораториях с использованием различных реагентов и тест-систем.

Значения МНО и протромбина по Квику имеют обратную корреляцию — снижение протромбина по Квику соответствует повышению МНО и наоборот.

Интерпретация результатов

Причины удлинения ПВ (снижение протромбина по Квику и повышение МНО):

- Дефицит факторов протромбиназного комплекса FII, FV, FVII¹, FX (наследственный или приобретенный).
- Дефицит витамин-К-зависимых факторов FII, FVII, FIX, FX (может сочетаться с удлинением АЧТВ за счет снижения активности FIX).
- Терапия непрямыми антикоагулянтами (антагонисты витамина К).
- Терапия прямыми ингибиторами FXa (ПВ более чувствительно, чем АЧТВ, и зависит от используемых реагентов).
- Передозировка нефракционированного гепарина².
- Гипо- и дисфибриногенемия.
- Эффект волчаночного антикоагулянта (часто сочетается с удлинением АЧТВ).
- Нарушение синтетической функции печени.
- ДВС-синдром (стадия гипокоагуляции).
- Массивная трансфузионная терапия (гемодилюционная коагулопатия).
- Преаналитические ошибки.

Причины укорочения ПВ (повышение протромбина по Квику и снижение МНО):

- Массивные травмы (избыточное поступление тканевого фактора в кровоток).
- Последние недели беременности.
- Прием пероральных контрацептивов.
- ДВС-синдром (стадия гиперкоагуляции).
- Терапия концентратами факторов протромбинового комплекса.
- Преаналитические ошибки.

¹ Изолированное удлинение ПВ без изменений других показателей плазменного гемостаза свидетельствует о дефиците FVII.

² Для снижения действия гепарина производители добавляют в реагент инактиватор гепарина (полибрен или гепариназу), что делает тест ПВ нечувствительным к терапевтическим дозам гепарина.

Активированное частичное тромбопластиновое время

АЧТВ (секунды) — базовый диагностический тест для оценки «внутреннего пути» свертывания крови, контроля антикоагулянтной терапии (нефракционированным гепарином), выявления дефицита факторов свертывания крови и действия специфических (антитела к FVIII и FIX) и неспецифических (волчаночный антикоагулянт) ингибиторов. Тест АЧТВ практически не стандартизован, а отдельные реагенты могут отличаться разной чувствительностью к изменениям системы гемостаза [1—3]. Так, один реагент может обладать высокой чувствительностью к клинически значимому дефициту факторов свертывания крови и действию нефракционированного гепарина (стандартный АЧТВ-реагент), а другой — к эффекту волчаночного антикоагулянта (чувствительный к эффекту волчаночного антикоагулянта АЧТВ-реагент), что необходимо учитывать при выполнении соответствующей диагностической задачи.

АЧТВ относится к важным в клинической практике тестам, поскольку выявляет относительно часто встречающиеся наследственные коагулопатии — гемофилию А и В (дефицит FVIII и FIX).

Интерпретация результатов

Причины удлинения АЧТВ:

- Дефицит FVIII, FIX, FXI, FXII, ПК, ВМК (наследственный или приобретенный).
- Дефицит FII, FV, FX (наследственный или приобретенный) (удлинение АЧТВ сочетается с удлинением ПВ).
- Дефицит vWF (часто ведет к снижению активности FVIII).
- Эффект волчаночного антикоагулянта.
- Терапия нефракционированным гепарином¹.
- Терапия прямыми ингибиторами FIIa (АЧТВ более чувствительно, чем ПВ, и зависит от используемых реагентов).
- Передозировка низкомолекулярного гепарина².
- Терапия непрямыми антикоагулянтами (умеренное снижение АЧТВ за счет снижения активности FIX).
- Гипо- и дисфибриногенемия.
- ДВС-синдром (стадия гипокоагуляции).

¹ Признаком адекватной терапии считается удлинение АЧТВ в 1,5—2 раза (терапевтический диапазон).

² Для контроля терапии препаратами низкомолекулярного гепарина необходимо определение анти-Ха активности.

- Преаналитические ошибки.

Причины укорочения АЧТВ:

- Повышение активности FVIII (FVIII — острофазный белок, часто повышается при воспалении)¹.
- ДВС-синдром (стадия гиперкоагуляции).
- Резистентность FVa к активированному протеину С.
- Преаналитические ошибки.

Тромбиновое время

ТВ (секунды) — третий по значимости скрининговый тест, который характеризует конечный этап свертывания крови — превращение фибриногена в фибрин под действием тромбина [1—3]. ТВ определяется в основном количеством и качеством фибриногена, а также присутствием гепарина в плазме (комплекс «гепарин—антитромбин» быстро нейтрализует добавленный тромбин, и время образования сгустка удлинится). Тест не стандартизован, в разных лабораториях могут использоваться различные концентрации тромбина и установлены свои нормы для теста ТВ, рекомендованные производителем реагентов.

Интерпретация результатов

Причины удлинения ТВ:

- Гипо- и дисфибриногенемия.
- Терапия прямыми ингибиторами FIIa.
- Терапия нефракционированным гепарином.
- Терапия фибринолитиками.
- Действие вторичных ингибиторов (продукты деградации фибрина/фибриногена, парапротеины, антитела к тромбину).
- Преаналитические ошибки.

Причины укорочения ТВ:

- Гиперфибриногенемия.
- ДВС-синдром (стадия гиперкоагуляции).
- Преаналитические ошибки.

Фибриноген

Фибриноген (по Клаусу, г/л) — важный диагностический тест базовой коагулограммы, отражающий процесс фибринообразования под действием тромбина и формирования фибриновой сети (фибриновая

¹ Значительное повышение активности FVIII компенсаторно может нормализовать АЧТВ при слабом дефиците FIX, FXI и FXII.

основа тромба), что позволяет обеспечить полноценный гемостаз. Кроме коагулологической функции фибриноген является острофазным белком (достигает 10 г/л и более при бактериальных инфекциях, тяжелых травмах), показателем белково-синтетической функции печени (снижается при патологиях печени различной этиологии), маркером патологии сердечно-сосудистой системы (отмечается прямая корреляция между уровнем фибриногена и риском развития инфаркта миокарда и инсульта) и опухолевых новообразований (при раке легкого может достигать 17 г/л) [1]. Концентрация фибриногена может зависеть от курения и алкоголя, индекса массы тела, физической нагрузки, пола, расы, стресса и гормонального статуса человека.

Интерпретация результатов

Причины снижения уровня фибриногена:

- Гипо- и дисфибриногенемия.
- Нарушение синтетической функции печени.
- ДВС-синдром.
- Гемобластозы (острый промиелоцитарный лейкоз).
- Значительные физические нагрузки.
- Действие лекарственных препаратов (стрептокиназа, урокиназа, L-аспарагиназа, фенобарбитал).
- Преаналитические ошибки.

Причины повышения уровня фибриногена:

- Инфекционные, воспалительные и аутоиммунные процессы.
- Беременность.
- Прием оральных контрацептивов.
- Онкологические заболевания.
- Ишемический инсульт, инфаркт миокарда.
- Преаналитические ошибки.

Производители оборудования и реагентов как для скрининговых, так и для большинства других лабораторных исследований регламентируют свои референсные значения (указаны в бланке результатов), что следует учитывать при интерпретации результатов из сторонних медицинских учреждений.

Коррекционные пробы

Удлинение АЧТВ и/или ПВ может быть обусловлено истинным дефицитом факторов свертывания крови или действием циркулирующих аутоантител (специфического ингибитора и/или волчаночного антикоагулянта).

С целью дифференциальной диагностики причин изменения результатов выполняются коррекционные пробы (микс-тест по АЧТВ и микс-тест по ПВ), которые заключаются в смешивании исследуемой плазмы больного с пулированной нормальной плазмой в соотношении 1:1, с последующей инкубацией смеси в течение 2 часов при температуре 37 °С и определением АЧТВ и/или ПВ полученной смеси [4]. Если показатели достигают референсных значений (есть коррекция), то причиной их исходного удлинения служит дефицит одного или нескольких факторов свертывания. Если же удлинение времени образования сгустка в данных тестах сохраняется (нет коррекции), то делается вывод о присутствии в плазме больного ингибиторов коагуляции (рис. 3, 4) [4, 7].

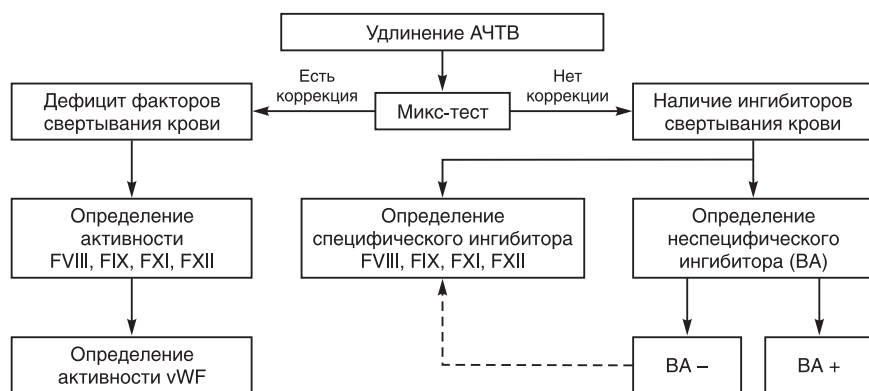


Рисунок 3. Алгоритм дифференциальной диагностики причин удлинения АЧТВ. ВА — волчаночный антикоагулянт.

В случае изолированного удлинения АЧТВ в качестве критерия коррекции рекомендуется использовать индекс циркулирующего антикоагулянта (ИЦА, индекс Рознера), который заключается в выполнении математического расчета на основании следующих данных: АЧТВ нормального контроля (результат внутрилабораторного контроля качества), АЧТВ больного (результат, полученный при выполнении скринингового исследования) и АЧТВ mix [определяется после инкубации смеси плазмы больного и пулированной нормальной (контрольной) плазмы в течение 2 часов при температуре 37 °С].

$$\text{ИЦА (\%)} = \frac{\text{АЧТВ mix} - \text{АЧТВ нормального контроля}}{\text{АЧТВ больного}} \times 100.$$

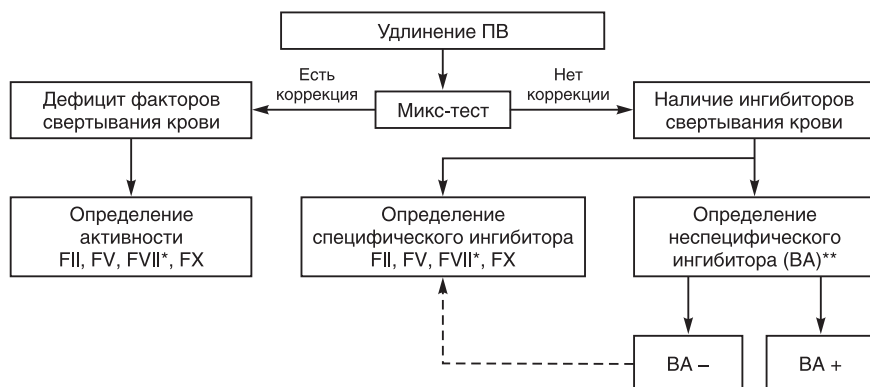


Рисунок 4. Алгоритм дифференциальной диагностики причин удлинения ПВ (снижения протромбина по Квику). BA — волчаночный антикоагулянт.

* Изолированное удлинение ПВ без изменений других показателей плазменного гемостаза свидетельствует о дефиците FVII.

** В редких случаях волчаночный антикоагулянт вызывает изолированное удлинение ПВ, как правило, это сочетается с удлинением АЧТВ.

Значение ИЦА $\leq 15\%$ свидетельствует о наличии коррекции и истинном дефиците факторов внутреннего пути; ИЦА $> 15\%$ — отсутствие коррекции, что указывает на необходимость выполнения дифференциальной диагностики между действием специфических ингибиторов и эффектом ВА [7, 8].

Результаты коррекционных проб с учетом анамнестических и клинических данных позволяют сформулировать предварительный диагноз и направить больного в профильное учреждение (где проводится развернутая диагностика нарушений гемостаза и консультация гематолога) для уточнения диагноза и определения дальнейшей тактики лечения.

Таким образом, лабораторная диагностика нарушений системы гемостаза заключается в проведении поэтапных лабораторных исследований, требующих применения современных методик и актуальных алгоритмов. Изменения плазменного звена гемостаза могут стать причиной развития как геморрагических, так и тромботических событий, которые возникают у больных с самыми разными заболеваниями. Поэтому умение грамотно использовать в своей клинической практике скрининговые коагулологические исследования дает врачу больше возможностей для своевременного выявления и лечения различных нарушений свертывания крови.

Литература

1. Долгов В. В., Вавилова Т. В., Свирин П. В. Лабораторная диагностика нарушений гемостаза. — Тверь: Триада, 2019. — 400 с.
2. Вавилова Т. В. Как построить программу лабораторного обследования больного с нарушениями в свертывании крови. Атеротромбоз 2017; 2:95—108. DOI: 10.21518/2307-1109-2017-2-95-108.
3. Берковский А. Л., Сергеева Е. В., Простакова Т. М. и др. Скрининговые тесты плазменного гемостаза: методическое руководство. — М., 2016. — 68 с.
4. Key N, Makris M, Lillicrap D (editors). Practical hemostasis and thrombosis. — 3d edition. — Chichester, UK: Wiley-Blackwall, 2017. — 496 p.
5. Добровольский А. Б., Титаева Е. В. Лабораторная диагностика нарушений системы гемостаза — скрининговые тесты. Российский кардиологический журнал 2015; 3(119):52—57. DOI: 10.15829/1560-4071-2015-3-52-57.
6. Козлов А. А., Берковский А. Л., Сергеева Е. В. и др. Преаналитический этап в гемостазиологии. — М.: Принт, 2011. — 48 с.
7. Benzon HT, Park M, McCarthy RJ et al. Mixing studies in patients with prolonged activated partial thromboplastin time or prothrombin time. Anesth Analg 2019; 128(6):1089—1096. DOI: 10.1213/ANE.0000000000003457.
8. Суренков А. А., Орел Е. Б., Зозуля Н. И. и др. Особенности клинико-лабораторной диагностики редкой коагулопатии — приобретенной гемофилии. Гематология и трансфузиология 2022; 67(4):535—550. DOI: 10.35754/0234-5730-2022-67-4-535-550.

Глава 17.

Интегральные методы оценки гемостаза в гематологической практике

Интегральные методы исследования гемостаза у больных с гемобластозами позволяют оценить характер нарушений свертывания крови, выбрать тот или иной метод лечения, мониторировать его эффективность [1]. Для них в большинстве случаев не требуется центрифугирования крови, они могут выполняться непосредственно у постели больного, а результаты исследования могут быть получены в течение короткого промежутка времени. В отличие от традиционных коагулологических тестов, эти методы оценивают не активность отдельных факторов свертывающей или противосвертывающей систем, а всю систему в целом как результат взаимодействия этих факторов. Традиционные методы исследования гемостаза оценивают время образования сгустка, но не дают прямой информации о самом процессе и о качестве образовавшегося сгустка.

Если результатом хронометрических тестов является образование нитей фибрина и сгустка без участия тромбоцитарного компонента, то интегральные тесты позволяют оценить кинетику тромбообразования, качество фибринового сгустка, функциональную активность тромбоцитов и фибринолиз [2]. Ключевой вопрос острых нарушений гемостаза — образуется ли достаточный и стабильный сгусток в результате взаимодействия всех плазматических факторов, ингибиторов, тромбо-

цитов и фибринолитических агентов в цельной крови. Интегральные методы позволяют врачу быстро принять правильное решение относительно функционального состояния гемостаза пациента. В настоящее время тромбоэластографами и/или тромбоэластометрами должны быть оснащены все отделения анестезиологии и реанимации в России [3].

Тромбоэластография (ТЭГ) — метод, основанный на графической регистрации изменений вязкости и упруго-эластических свойств крови в процессе образования фибринового сгустка. Тромбоэластограмма, в отличие от классических клоттинговых исследований, отображает все стадии формирования тромба, а также фибринолиз [4]. Ротационная тромбоэластография является усовершенствованной и переработанной формой классической тромбоэластографии. В 2003 г. метод был переименован в ротационную тромбоэластометрию (РОТЭМ). ТЭГ распространена в Северной Америке, РОТЭМ преимущественно используется в Европе.

В основе ТЭГ и РОТЭМ лежат одни и те же фундаментальные принципы работы, имеется сходство в оборудовании, получаемых изображениях, но есть и различия. В отличие от ТЭГ, в РОТЭМ предусмотрено не ручное, а автоматическое пипетирование исследуемых образцов; ТЭГ измеряет эластичность сгустка крови при движении кюветы, РОТЭМ — при движении оси; передача сигнала при ТЭГ электромеханическая, а при РОТЭМ — оптическая. Параметры, регистрируемые ТЭГ и РОТЭМ, схожи (рис. 1):

- R (Reaction time) в ТЭГ или CT (Clotting time) в РОТЭМ — время от начала свертывания до образования первых волокон фибрина, в мин;

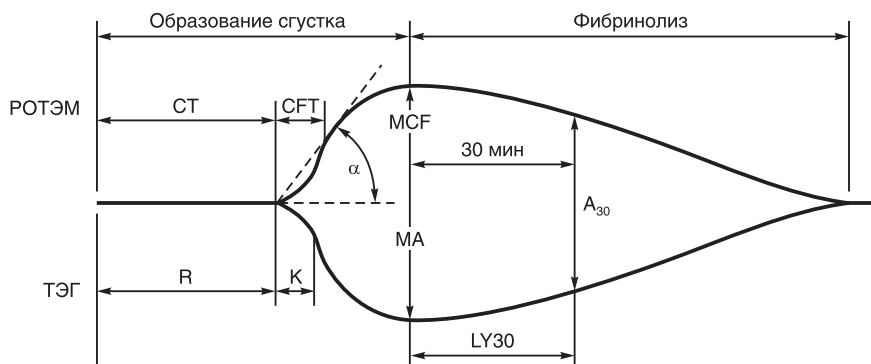


Рисунок 1. Основные параметры ТЭГ и РОТЭМ. В зависимости от уменьшения или увеличения временных и амплитудных показателей можно судить о гипо- или гиперкоагуляционном состоянии системы гемостаза.

- К (ТЭГ) или CFT (Clot formation time) в РОТЭМ — время изменения амплитуды свертывания, его нарастания или замедления, в мин;
- угол α (в ТЭГ и РОТЭМ) — отражает скорость свертывания крови, процесс полимеризации фибрина, в градусах;
- МА (Maximum amplitude) в ТЭГ или MCF (Maximum clot firmness) в РОТЭМ — максимальная амплитуда кривой, характеризующая плотность образовавшегося сгустка, зависящая от функции и количества тромбоцитов, от концентрации фибриногена, содержания XIII фактора свертывания крови, в мм;
- LY30, LY45, LY60 (ТЭГ и РОТЭМ) — оценка фибринолиза.

Главное различие между ТЭГ и РОТЭМ — в активаторах, используемых при выполнении тестов. ТЭГ может выполняться:

- 1) без добавления активаторов (нативная ТЭГ с цитратной кровью, рис. 2);

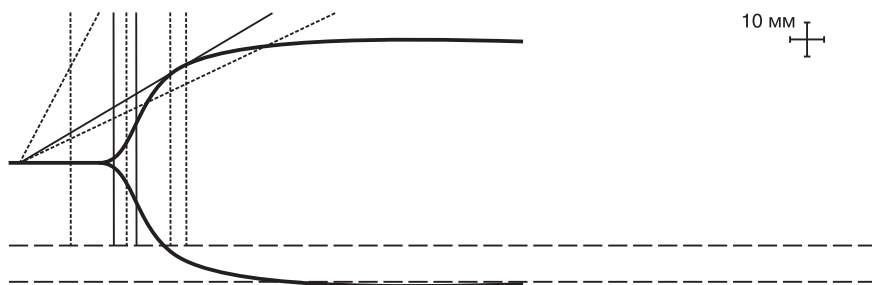


Рисунок 2. Тромбоэластограмма цитратной крови — нативная ТЭГ.

- 2) с гепариназой или с полибреном, что позволяет устранить влияние гепарина в исследуемом образце крови. Таким образом, можно следить за эффективностью терапии низкомолекулярными и нефракционированными гепаринами (рис. 3);
- 3) rapid TEG — добавление 8% каолина и тканевого фактора ускоряет процесс свертывания почти в 2 раза;
- 4) функциональный фибриноген — используется ингибитор рецепторов GPIIb/IIIa тромбоцитов (абциксимаб, цитохалазин D) для блокирования функции тромбоцитов, что позволяет оценить вклад фибрина в прочность сгустка (рис. 4);
- 5) активный фибриноген — образование фибринового сгустка в гепаринизированной крови с помощью батроксобина (рис. 4).
- 6) platelet mapping позволяет оценить эффективность применения антиагрегантов: аспирина, который ингибирует арахидоновую кислоту, и клопидогрела, который подавляет АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов.

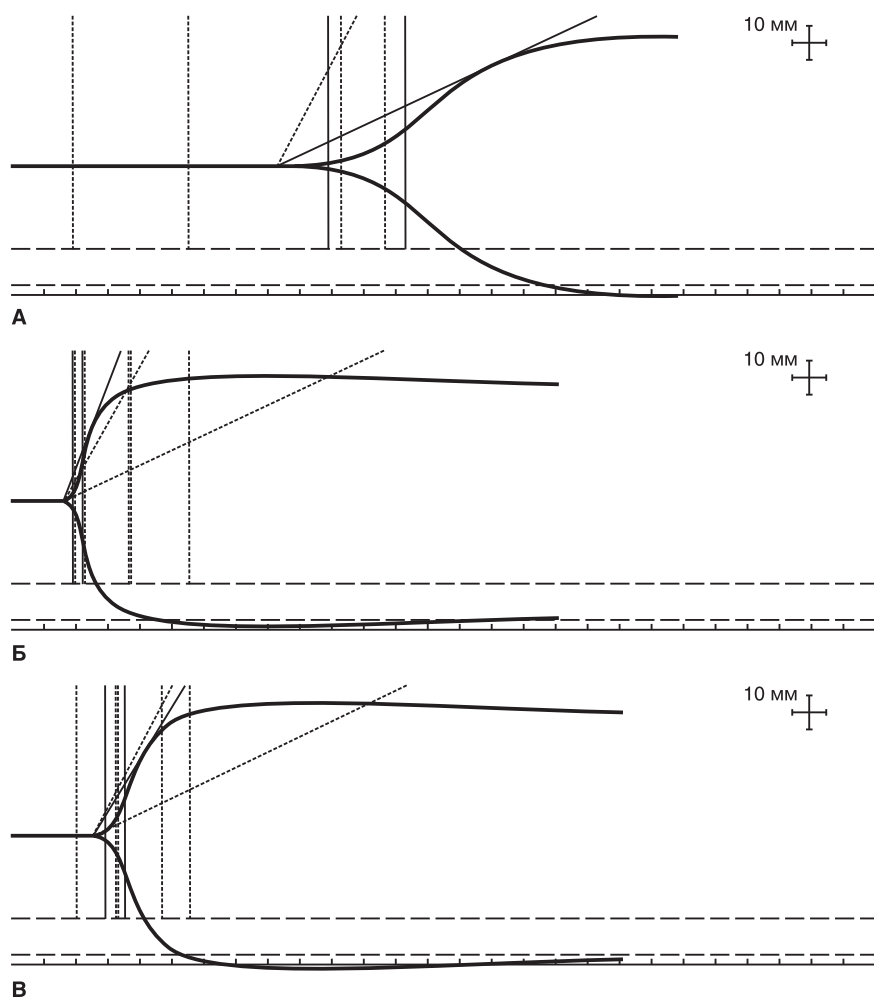


Рисунок 3. Тромбоэластограммы больного, получающего инфузию гепарина. А — нативная проба (гипокоагуляция); Б — ингибирование гепарина гепариназой (гиперкоагуляция); В — ингибирование гепарина полибреном (гиперкоагуляция).

Для оценки эффективности антиагрегантной терапии цельной крови метод тромбоэластографии использует тест Platelet Mapping с добавлением индукторов арахидоновой кислоты и/или АДФ (рис. 5). Для этого выполняется стандартная ТЭГ с цельной кровью, затем отдельно ТЭГ с добавлением арахидоновой кислоты или АДФ. По формуле

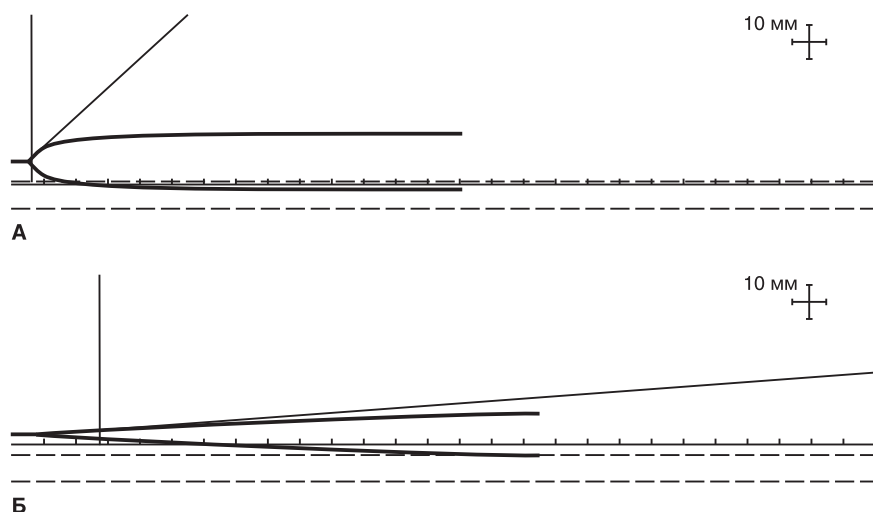


Рисунок 4. А — ТЭГ с реактивом на функциональный фибриноген (Functional Fibrinogen Reagent для TEG 5000) MA_{FF} 12,5 мм; Б — ТЭГ гепаринизированной крови и батроксобином $MA_{БАТРОКС}$ 5 мм. В обоих тестах выявлено снижение функции фибриногена.

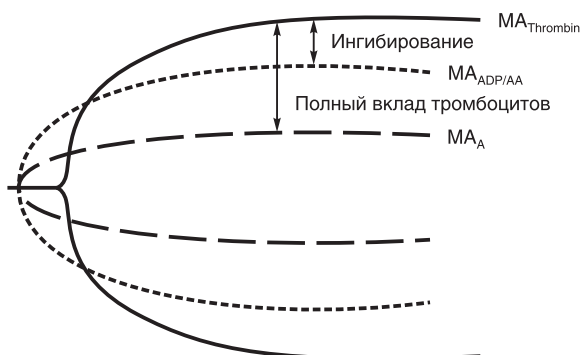


Рисунок 5. Тест Platelet Mapping. Максимальная активация сгустка крови каOLIном ($MA_{Thrombin}$), активация фибринового сгустка рептилазой без участия тромбоцитов (MA_A) и добавление индукторов агрегации тромбоцитов арахидоновой кислоты либо АДФ ($MA_{ADP/AA}$).

$$\frac{MA_{ADP/AA} - MA_{Fibrin}}{MA_{Thrombin} - MA_{Fibrin}} \times 100\%$$

рассчитывается процент ингибирования тромбоцитов.

В отличие от ТЭГ, РОТЭМ всегда выполняется только с активаторами, которые позволяют оценить функционирование отдельных звеньев гемостаза.

- **EXTEM** оценивает активацию по внешнему пути посредством добавления к образцам крови тканевого фактора, чувствителен к дефициту факторов внешнего пути свертывания, дефициту фактора XIII, фибринолизу, нарушению полимеризации фибриногена (рис. 6, А).
- **INTEM** оценивает активацию по внутреннему пути посредством добавления к образцам крови эллаговой кислоты, чувствителен к дефициту факторов внутреннего пути свертывания, дефициту фактора XIII, эффектам гепарина, фибринолизу (рис. 6, Б).
- **АРТЕМ** — детекция скрытого фибринолиза и гиперфибринолиза путем добавления к образцам крови тканевого фактора и апротинина, выполняется в сравнении с тестом EXTEM.
- **FIBTEM** — оценивает вклад фибриногена в плотность сгустка, выполняется путем добавления цитохалазина D, который нейтрализует функцию тромбоцитов, выполняется в сравнении с тестом EXTEM.
- **НЕРТЕМ** — оценивает наличие или отсутствие гепарина в образце крови, выполняется с добавлением эллаговой кислоты и гепариназы, не чувствителен к низкомолекулярным гепаринам.

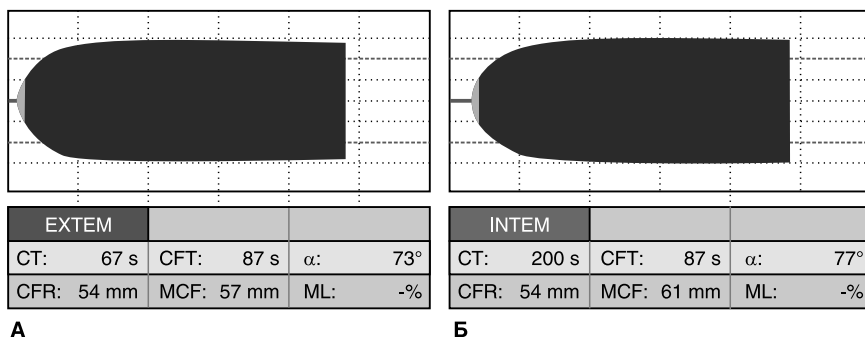


Рисунок 6. Ротационная тромбоэластометрия нормальной крови.

РОТЭМ — это четырехканальный ротационный тромбоэластометр, который имеет ряд различных активаторов и модификаторов процесса свертывания крови.

Тест EXTEM выполняется с тканевым фактором. Реактив содержит также небольшое количество гепариназы. С помощью EXTEM оценивается патология внешнего пути свертывания (оценка факто-

ров свертывания VII, X, V, II, I), аналогично протромбиновому индексу.

Тест INTEM содержит эллаговую кислоту, которая стимулирует внутренний путь свертывания (оценка факторов свертывания XII, XI, IX, VIII, X, V, II). Реактивы для теста INTEM не содержат гепариназы, поэтому он более чувствителен к присутствию гепарина в образце крови, чем тест EXTEM.

Хотя ТЭГ и РОТЭМ являются схожими методами, результаты, получаемые при их использовании, нередко разнятся, что объясняется различными активаторами свертывания. Получение детальной информации в диагностике нарушений гемостаза важно для проведения целенаправленной терапии.

Для детекции нарушений полимеризации фибрина используются две пробы EXTEM/FIBTEM, сравниваются между собой параметры MCF (рис. 7). Значение MCF_{FIBTEM} менее 9 мм является показанием для коррекции гипофибриногемии.

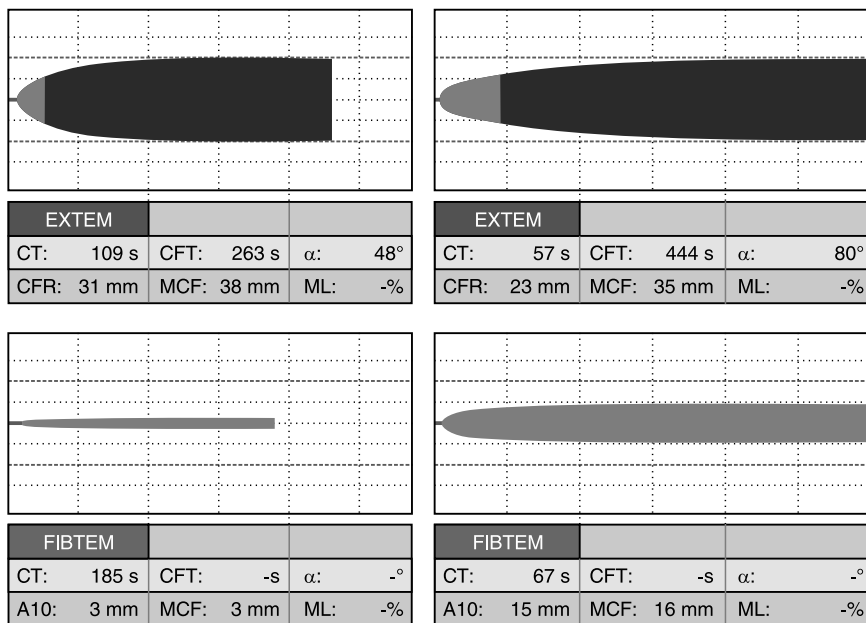


Рисунок 7. Ротационная тромбоэластометрия у больного с геморрагическим синдромом.

Общая амплитуда MCF снижена в обоих тестах EXTEM. Для проведения дифференциальной диагностики выполнены тесты FIBTEM. Справа функция полимеризации фибрина не нарушена, т. к. MCF_{FIBTEM} 16 мм (норма 9–25 мм), а слева функция фибриногена резко снижена (MCF_{FIBTEM} 3 мм). Таким образом, можно судить о функциональном нарушении фибриногена на изображении слева и о патологии тромбоцитарного звена гемостаза на изображении справа.

На РОТЭМ можно оценить только наличие больших доз нефракционированного гепарина (НФГ) или его передозировку (рис. 8). Для мониторинга терапии низкомолекулярным гепарином можно использовать метод ТЭГ, сравнивая нативную пробу и пробу с гепариназой или полибренном. Этот метод подходит для пациентов с тромбоцитопениями, когда важно получать антикоагуляционный эффект без увеличения АЧТВ до значений в 1,5–2 раза выше нормы, или для пациентов, у которых АЧТВ не увеличивается ввиду дефицита анти-тромбина III.

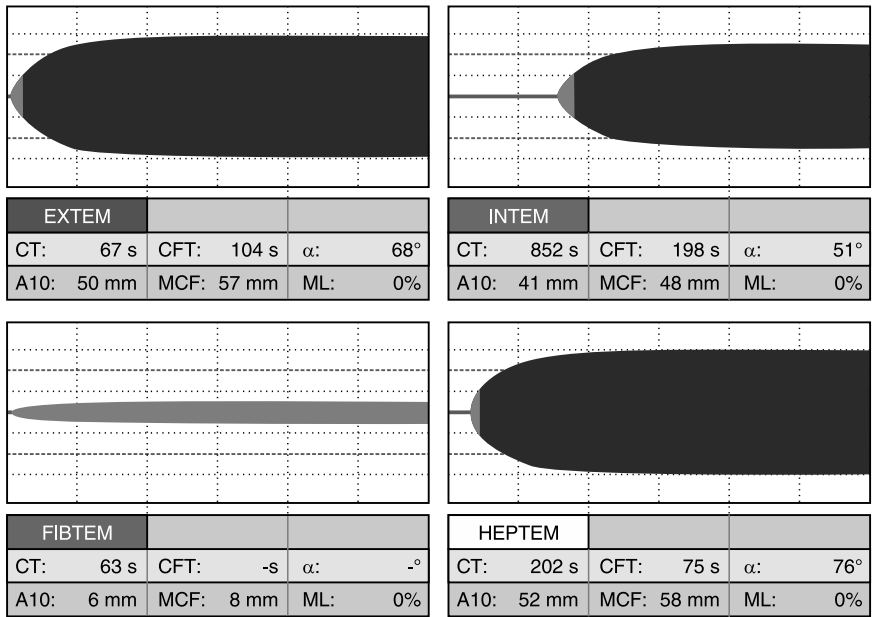


Рисунок 8. Ротационная тромбозластометрия при передозировке гепарина. В тесте INTEM удлинение времени начала образования сгустка. При добавлении гепариназы в тесте HEPTEM достигнута нормокоагуляция.

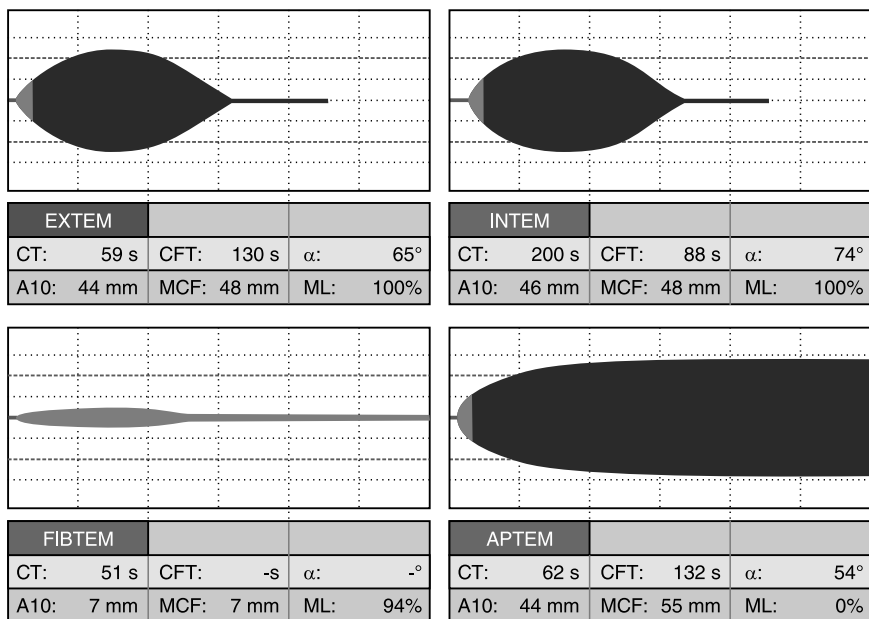


Рисунок 9. Ротационная тромбоэластометрия при выраженном фибринолизе. Во всех тестах происходит лизис сгустка крови. При добавлении ингибитора фибринолиза аprotинина в тесте APTEM достигнута нормокоагуляция.

С помощью РОТЭМ, сравнивая между собой EXTEM и APTEM (апротинин), можно выявить скрытый фибринолиз, а также оценить эффективность фибринолитической терапии (рис. 9). Важно диагностировать скрытый фибринолиз и функциональный фибриноген у больных острым промиелоцитарным лейкозом в дебюте заболевания. При выявленном скрытом фибринолизе необходима терапия транексамовой кислотой из расчета 15 мг/кг/сут.

С помощью интегральных тестов ТЭГ и РОТЭМ можно дифференцировать функциональные нарушения тромбоцитарного звена или фибриногена.

Распространенным классическим методом является определение фибриногена по методу Клаусса, основанное на исследовании времени образования сгустка при добавлении тромбина в высокой концентрации к разбавленной в 10–20 раз плазме. Тест выполняется на коагулометрах, при этом логарифм времени образования сгустка обратно пропорционален логарифму концентрации функционального фибриногена. Калибровочная кривая показывает укорочение времени свертывания при увеличении концентрации фибриногена.

Функциональную оценку полимеризации фибрина можно определять с помощью ТЭГ или с помощью РОТЭМ. В обоих этих методах максимальная амплитуда кривой, отражающая эластичность, прочность образовавшего сгустка (МА в ТЭГ или MCF в РОТЭМ), определяется функциями тромбоцитов и фибриногена. Подавление функции тромбоцитов с помощью цитохалазина D, являющегося ингибитором реорганизации цитоскелета (в тесте FIVTEM при РОТЭМ), или антагониста рецепторов GPIIb/IIIa абциксимаба (ReoPro®) (в тесте «Функциональный фибриноген» при ТЭГ), а также активатора внешнего пути свертывания (тканевой фактор) позволяет вычленивать из максимальной амплитуды «вклад» тромбоцитов и оценить величину функционального фибриногена. В ряде случаев результаты измерения концентрации фибриногена в плазме и функционального фибриногена могут различаться. Образование сгустка нарушается раньше, чем происходит выраженное снижение концентрации фибриногена в плазме.

На количественное определение фибриногена может влиять инфузионная терапия. При переливании коллоидных растворов нарушается процесс полимеризации фибрина, в результате чего концентрация фибриногена, определенная по методу Клаусса, может оказаться завышенной. Метод определения фибриногена по Клауссу чувствителен также к гипо-, дис- и гиперфибриногенемии, продуктам деградации фибрина, которые влияют на процесс полимеризации мономеров фибрина и могут быть причиной ложных низких результатов. Поэтому в европейских руководствах по лечению коагулопатии при массивной травме рекомендуется начинать корректировать фибриноген плазмы при снижении его концентрации ниже 1,5–2 г/л и ориентироваться не только на концентрацию фибриногена в плазме, но и на величину функционального фибриногена, определяемого по данным тромбоэластометрии.

Наибольшие расхождения между плазменной концентрацией фибриногена, определенной по методу Клаусса, и функциональным фибриногеном по ТЭГ/РОТЭМ выявляются у больных с тромбоцитозом. Стандартные дозы абциксимаба/цитохалазина D, используемые в тестах «Функциональный фибриноген» и FIVTEM, не полностью ингибируют тромбоциты, и, следовательно, максимальная амплитуда будет варьировать и зависеть от количества оставшихся тромбоцитов, завышая уровень функционального фибриногена.

Методом определения активного фибриногена является тест с батроксобином.

В отличие от классического теста на функциональный фибриноген, выполняемого с цитратной плазмой, тест с батроксобином выполняется с гепарином, благодаря которому, с одной стороны, не могут быть активированы тромбоциты, а с другой, на результаты теста не влияет

наличие гепарина в крови у больного и его можно выполнять больным, уже получающим гепарин. Для того чтобы нейтрализовать гепарин, тест с реактивами Наemonetics® рекомендуется выполнять с гепариной, а в тесте FIBTEM гепаринолаз исходно присутствует в стандартном реактиве. В гепаринизированной крови в тесте с батроксобином тромбоциты вообще не участвуют в формировании сгустка и максимальной амплитуды, следовательно, их количество в крови не влияет на определяемую концентрацию функционального фибриногена.

Изменения параметров ТЭГ/РОТЭМ могут рассматриваться как показания для терапии факторами и/или компонентами крови.

Значения МА в тесте функционального фибриногена (ТЭГ) или MCF в тесте FIBTEM (РОТЭМ) менее 9 мм являются показанием к переливанию криопреципитата или концентрата фибриногена. При этом данные ТЭГ/РОТЭМ предпочтительнее измерения концентрации фибриногена плазмы, поскольку позволяют оценить не только количество фибриногена, но и его полимеризацию и функцию. По полученным значениям можно рассчитать необходимую дозу концентрата фибриногена или количество доз криопреципитата, необходимых для коррекции гипофибриногенемии, а также дозу концентрата протромбинового комплекса.

$$\begin{aligned} & \text{Доза концентрата фибриногена, г} = \\ & = \frac{(\text{целевой FIBTEM}_{\text{MCF}} - \text{имеющийся FIBTEM}_{\text{MCF}}) \times 0,5 \times \text{масса тела}}{70}. \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} & \text{Количество доз криопреципитата} = \\ & = \frac{(\text{целевой FIBTEM}_{\text{MCF}} - \text{имеющийся FIBTEM}_{\text{MCF}}) \times \text{масса тела}}{24}. \end{aligned}$$

Доза концентрата протромбинового комплекса:

$$\text{EXTEM}_{\text{CT}} = 81-100 \text{ сек} \text{ — доза } 7,5 \text{ МЕ/кг};$$

$$\text{EXTEM}_{\text{CT}} = 101-120 \text{ сек} \text{ — доза } 15 \text{ МЕ/кг};$$

$$\text{EXTEM}_{\text{CT}} > 120 \text{ сек} \text{ — доза } 22,5 \text{ МЕ/кг}.$$

Литература

1. Saner FH. Rotational thrombelastometry: a step forward to safer patient care? Crit Care 2014; 18:706.
2. Marcucci CE, Schoettker P. Perioperative Hemostasis. Coagulation for Anesthesiologists. Viscoelastic Tests of Hemostasis 2015; 25—45.
3. Приказ Министерства здравоохранения РФ от 15 ноября 2012 г. N 919н.
4. Lang T, Bauters A, Braun SL et al. Multi-centre investigation on reference ranges for ROTEM thromboelastometry. Blood Coagul Fibrinolysis 2005;16:301—310.

Глава 18.

Экспресс-методы лабораторных исследований при неотложных состояниях в гематологии

Исследование кислотно-щелочного и газового состава крови

Анализ кислотно-щелочного состояния (КЩС) и газового состава крови — лабораторное исследование, которое проводится с целью определения pH, парциальных давлений кислорода (pO_2) и углекислого газа (pCO_2), процентного содержания O_2 , сатурации крови кислородом (sO_2) и концентрации анионов бикарбоната (HCO_3^-). Анализ оценивает КЩС крови и эффективность газообмена — подачу легкими в кровь кислорода и устранение углекислого газа из крови [1]. Определение КЩС необходимо для оценки тяжести состояния, а также для правильного выбора методов респираторной поддержки, что является крайне важным в условиях гематологических стационаров и отделения реанимации [2].

Общие положения

Современные анализаторы позволяют контролировать равновесие гомеостаза у реанимационных пациентов, располагаясь в непосредственной близости от отделений реанимации, хирургии и анестезиологии. Анализаторы позволяют проводить измерения pH, парциального

давления газов (pO_2 и pCO_2), электролитов (K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Cl^-), метаболитов (лактат — Lac, глюкоза — Glu, общий билирубин — tBil), оксиметрию [общий гемоглобин — tHb, степень насыщения кислородом гемоглобина (сатурация) sO_2], измерение подфракций гемоглобина (доля оксигемоглобина — FO_2Hb , доля карбоксигемоглобина — FCONb, доля метилированного гемоглобина — FMetHb, доля дезоксигемоглобина — FHHb, доля фетального гемоглобина — FHbF); **рассчитывать** параметры: осмоляльность — mOsm, общее содержание кислорода — $ctO_{2,c}$, общее содержание углекислого газа — $ctCO_{2,c}$, парциальное давление кислорода при 50% насыщении крови — $p50,e$, фактический избыток/дефицит оснований — ABE,c, стандартный избыток/дефицит оснований SBE,c, концентрацию ионов бикарбоната в крови — $sHCO_3^-(P),c$, концентрацию ионов бикарбоната в плазме стандартизированной крови (стандартный бикарбонат) — $sHCO_3^-(P, st),c$, относительный физиологический шунт (процент или фракция венозной крови, которая не оксигенируется при протекании по легочным капиллярам) — Fshunt (T),e, напряжение кислорода в альвеолярном воздухе — $pO_2(A,T),e$, артериально-альвеолярную разницу кислородного напряжения — $pO_2(A-a),e$, артериально-альвеолярное отношение кислородного напряжения — $pO_2(a/A,T),e$. Все параметры вычисляются в единицах СИ.

Тип анализируемых проб: артериальная или венозная кровь, сыворотка, ликвор, моча и выпотные жидкости.

Для взятия *венозной* крови используют **шприцы**, содержащие не менее 30 МЕ натрия-гепарина или Ca^{2+} сбалансированного литий-гепарина.

Для взятия *артериальной* крови используют **шприцы**, содержащие Ca^{2+} сбалансированный литий-гепарин (в этом случае кровь набирается из артериального катетера) или **артериальные капилляры** с Ca^{2+} сбалансированным литий-гепарином (в этом случае кровь набирается при пункции бедренной или лучевой артерий).

Для получения *сыворотки* используют «сухую» биохимическую пробирку без антикоагулянта.

Биологические интервалы параметров, определяемые анализаторами газов крови, собраны в табл 1.

Таблица 1. Показатели и значения КЩС и газового состава крови

Показатель	Нормальные значения	Ацидоз	Алкалоз
pH	Артерия: 7,35—7,45. Вена: 7,32—7,42. Капилляр: 7,30—7,42. Сыворотка: 7,32—7,42	< 7,35	> 7,45

Таблица 1 (продолжение). Показатели и значения КЩС и газового состава крови

Показатель	Нормальные значения	Ацидоз	Алкалоз
pCO ₂ (мм рт. ст.)	Артерия: 35—45. Вена: 41—51. Капилляр: 41—51	> 45	< 35
HCO ₃ ⁻ (мМоль/л)	Артерия: 22—28. Вена: 26—32. Капилляр: 26—32	< 22	> 26
ABE (мМоль/л)	Артерия: -2 — +3. Вена: -2 — +3. Капилляр: -3 — +4	< -2	> +2
		Причины повышенного уровня	Причины пониженного уровня
pO ₂ (мм рт. ст.)	Артерия: 80—100. Вена: 24—40. Капилляр: 35—45	При проведении оксигенотерапии	Пневмония. Тромбоэмболия легочной артерии (ТЭЛА). Пневмоторакс. Отек легких. Приступ бронхиальной астмы. Острый респираторный дистресс-синдром взрослых. Фиброзирующий альвеолит. Хронические обструктивные заболевания легких
sO ₂ (%)	Артерия: 95—99. Вена: 40—70. Капилляр: 40—70	Завышенная подача кислорода аппаратом ИВЛ или аппаратом экстракорпоральной мембранной оксигенации (ЭКМО)	Нарушение поглощения кислорода. Причины: Обструкция дыхательных путей. Травма грудной клетки. Нервно-мышечные заболевания (например, синдром Гийена—Барре, миастения). Препараты, подавляющие дыхательный центр (например, опиоиды, героин). Тяжелая пневмония. ТЭЛА. Отек легких. Приступ бронхиальной астмы и другие заболевания легких (например, фиброз). Пневмоторакс. Врожденный цианотический порок сердца
Глюкоза (мМоль/л)	3,3—6,0	Гипергликемия: сахарный диабет. Эпидемический энцефалит. Сифилис ЦНС. Гиперфункция щитовидной железы, коры и мозгового слоя надпочечников, гипопифиз. Травмы и опухоли головного	Гипогликемия: Сахарный диабет при передозировке инсулина. Инсулинома. Заболевания ЦНС

Таблица 1 (продолжение). Показатели и значения КЩС и газового состава крови

Показатель	Нормальные значения	Ацидоз	Алкалоз
Глюкоза (ммоль/л)	3,3—6,0	мозга. Эпилепсия. Следствие некоторых видов лекарственной терапии	
Лактат (ммоль/л)	0,5—1,6	Метаболический ацидоз. Тканевая гипоксия. Острые кровотечения. Тяжелая острая застойная сердечная недостаточность. Инфекции. Цирроз печени. Лейкозы, анемии. Подострый инфекционный эндокардит. Сахарный диабет	Анемия различных видов. Резкое снижение массы тела
K ⁺ (ммоль/л)	3,4—5,1	Гиперкалиемия: повышенное поступление калия извне. Нарушение выделения почками. Выход электролита из клеток. Встречается при ацидозе (смещении pH в кислую сторону)	Гипокалиемия: потери калия при различных заболеваниях ЖКТ (язвенный колит, панкреатит), различных кишечных инфекциях, которые манифестируют многократной диареей или рвотой. Первичный и вторичный гиперальдостеронизм. Эндокринные заболевания (тиреотоксикоз, болезнь или синдром Иценко—Кушинга, генетически обусловленная дисфункция коры надпочечников). Болезни почек (интерстициальный нефрит, почечный канальцевый ацидоз), протекающие с канальцевой дисфункцией. Изменения соотношения калия между интерстицием и клеткой — переход из внеклеточного пространства K ⁺ внутрь клеток. Встречается при алкалозе (смещении pH в щелочную сторону). Применение в высоких дозах глюкокортикоидов
Na ⁺ (ммоль/л)	136—146	Гипернатриемия: дегидратация. Солевая перегрузка. Несахарный диабет.	Гипонатриемия: прием диуретиков. Диарея. Сердечная недостаточность. Заболевания печени, почек, синдром

Таблица 1 (окончание). Показатели и значения КЩС и газового состава крови

Показатель	Нормальные значения	Ацидоз	Алкалоз
Na ⁺ (ммоль/л)	136—146	Почечные заболевания, протекающие с олигурией. Гиперальдостеронизм	неадекватной секреции антидиуретического гормона (АДГ)
Ca ²⁺ (ион) (ммоль/л)	1,05—1,34	Гиперкальциемия: избыток витамина D. Первичный гиперпаратиреоз (повышение выработки паратиреоидного гормона паращитовидными железами). Доброкачественные аденомы паращитовидных желез. Злокачественные новообразования. Метастазы в костях. Множественная миелома. Ацидоз	Гипокальциемия: ожоговая болезнь. Переливание цитратной крови (связывание кальция цитратом). Гиперосмолярные состояния (итоговое изменение pH). Гипопаратиреоз и псевдогипопаратиреоз (понижение продукции паратиреоидного гормона). Дефицит магния. Синдром полиорганной недостаточности. Панкреатит. Послеоперационный период. Сепсис. Травма. Дефицит витамина D. Алкалоз
Cl ⁻ (ммоль/л)	98—107	Гиперхлоремия: нарушение выделительной функции почек (нефрозы, нефриты, нефросклерозы), дегидратация: диарея, рвота. Потеря жидкостей и солей при ожогах. Алкалозы , сопровождающиеся снижением pCO ₂	Гипохлоремия: обильное потоотделение. Диарея. ХПН. ОПН. Неконтролируемая диуретическая терапия. Диабетический ацидоз . Почечный диабет
Осмоляльность (ммоль/кг)	280—300	Гиперосмолярный синдром: почечная недостаточность. Сепсис. Обширные ожоги. Инфаркт миокарда. Острая и хроническая сердечная недостаточность. Сахарный диабет. Заболевания поджелудочной железы. Геморрагический, травматический шок. Экзогенная интоксикация. Наркоз. Кома	Гипоосмолярный синдром: снижение концентрации Na ⁺ в плазме

Мониторинг острых сердечных нарушений

Кардиомаркерами называют белковые соединения, концентрация которых в крови при нарушениях работы сердца резко возрастает. Исследование крови на кардиомаркеры назначают при подозрениях на острый коронарный синдром в дополнение к другим диагностическим методам. Также оно показано перед хирургическими операциями под наркозом для оценки сердечной деятельности [3]. К кардиомаркерам относят: миоглобин, тропонины I и T, N-концевой мозговой натрий-уретический пропептид (NT-проBNP), креатинфосфокиназу (КФК) и креатинфосфокиназу-MB (КФК-MB).

Креатинфосфокиназа

КФК — это фермент-димер, существующий в трех различных изоформах: скелетно-мышечная (М), мозговая (В) и сердечная изоформы (МВ). Наиболее богата КФК скелетная мускулатура, сердечная мышца, меньше ее в мозге, щитовидной железе, матке, легких. Повышение активности КФК в сыворотке крови наблюдается из-за выхода фермента из клеток при их повреждении. Выявление активности общей КФК и ее изоформ используют в диагностике и наблюдении за пациентами с инфарктом миокарда и различными миопатиями, такими как прогрессирующая мышечная дистрофия Дюшенна. Вслед за повреждением миокарда при остром инфаркте из поврежденных клеток миокарда происходит высвобождение КФК. На ранней стадии усиление активности КФК может быть выявлено уже через 4 часа после инфаркта миокарда, максимальной активности КФК достигает через 12—24 часа и затем уменьшается до нормальных показателей в течение 3—4 дней [4].

Сердечная изоформа креатинфосфокиназы (КФК-MB) присутствует в крови здорового человека в совсем незначительных количествах — не более 6% (0—24 МЕ/л) от общей активности КФК. Поэтому увеличение активности КФК-MB — высокоспецифичный и чувствительный индикатор повреждения миокарда при подозрении на острый инфаркт. КФК-MB — первый фермент, активность которого возрастает в сыворотке после инфаркта (уже в первые часы после приступа болей). Обычно пик КФК-MB достигается через 24 часа после приступа болей. Активность МВ-фракции при остром инфаркте миокарда колеблется от 6% до 25% [5].

Референсные значения: КФК: 24—180 МЕ/л; КФК-MB: 0—24 МЕ/л.

Данные по интерпретации показателей активности КФК и КФК-MB представлены в табл. 2.

Таблица 2. Интерпретация значений повышенной активности КФК-МВ у пациентов отделений реанимации и интенсивной терапии по данным научных публикаций

Активность КФК, КФК-МВ	Интерпретация
КФК: 24—180 МЕ/л, КФК-МВ: 0—24 МЕ/л	Норма
КФК: > 180 МЕ/л, КФК-МВ: > 24 МЕ/л	Острый инфаркт миокарда; миокардит; мышечные дистрофии; травма грудной клетки; травма с повреждением мышц; рабдомиолиз

Н-концевой мозговой натрийуретический пептид

Н-концевой мозговой натрийуретический пептид (NTpro-BNP) является маркером нарушения сердечной функции, и его уровень отражает тяжесть сердечной недостаточности. BNP — это натрийуретический пептид, обладающий гормональной активностью, который выделяется главным образом кардиомиоцитами стенки левого желудочка. При растяжении и напряжении стенки миокарда прогормон pro-BNP расщепляется посредством протеолиза на BNP и гормонально неактивный фрагмент — аминоконцевой мозговой натрийуретический пептид NTpro-BNP. NTpro-BNP хорошо зарекомендовал себя в качестве маркера исключения сердечной недостаточности, он является надежным независимым прогностическим показателем летального и других исходов сердечных заболеваний у людей с риском хронической ишемической болезни сердца и сердечной недостаточности. Тем не менее тест на NTpro-BNP является вспомогательным инструментом для стратификации риска у пациентов с острым коронарным синдромом и сердечной недостаточностью [6].

Референсные значения: 0—133 пг/мл.

Содержание NT-proBNP и интерпретация данных представлены в табл. 3.

Таблица 3. Интерпретация значений повышенного содержания NT-proBNP у пациентов отделений реанимации и интенсивной терапии по данным научных публикаций

Содержание NT-proBNP	Интерпретация
0—133 пг/мл	Норма
> 133 пг/мл	Артериальная гипертония, инфаркт миокарда, стенокардия (стабильная и нестабильная), миокардит, сердечная аритмия

Миоглобин

Миоглобин — это небольшой компактный гемсодержащий белок, который повсеместно встречается в клетках миокарда и скелетных мышц. Он связывает кислород и транспортирует его в митохондрии, где происходит реакция окислительного фосфорилирования. При повреждении миокарда происходит некроз миоцитов и макромолекулы миоглобина диффундируют из клеток в кровоток. Являясь небольшим по размеру цитозольным белком, миоглобин способен быстро высвобождаться из клеток и поэтому удобен в использовании в качестве маркера для ранней диагностики острого инфаркта миокарда и мониторинга реперфузии. Тест Roche CARDIAC Myoglobin имеет диагностическое окно от 2 до 12 часов. Однако из-за своей высокой концентрации во всех окислительных мышечных волокнах миоглобин не является специфичным сердечным маркером и при выявлении возможного острого инфаркта миокарда используется, прежде всего, для исключения подозрений на поражение сердца [7].

Референсные значения:

Женщины: 7—64 нг/мл.

Мужчины: 16—76 нг/мл.

Содержание миоглобина и интерпретация данных представлены в табл. 4.

Таблица 4. Интерпретация значений повышенного содержания миоглобина у пациентов отделений реанимации и интенсивной терапии по данным научных публикаций

Содержание миоглобина	Интерпретация
Женщины 7—64 нг/мл Мужчины 16—76 нг/мл	Норма
> 76 нг/мл	Инфаркт миокарда, почечная недостаточность, повреждение скелетных мышц

Тропонин Т

Тропонин Т (TnT) является компонентом сократительного аппарата поперечно-полосатых мышц. Хотя функция TnT одинакова во всех поперечно-полосатых мышцах, TnT, происходящий исключительно из миокарда (сердечный TnT), резко отличается от Tn скелетных мышц. Ввиду высокой тканевой специфичности сердечный TnT является кардиоспецифичным и высокочувствительным маркером для поврежденных миокарда. Уровень сердечного TnT повышается примерно через 3—4 ч после наступления острого инфаркта миокарда и может оставаться повышенным до двух недель. Данное исследование показано при

подозрении на повреждение клеток миокарда, например, при остром коронарном синдроме (для обнаружения или исключения острого или подострого инфаркта миокарда, определения тяжести инфаркта, оценки риска при нестабильной стенокардии путем определения малых миокардиальных повреждений), при воспалительных процессах миокарда (миокардитах) [8]. Тест Roche CARDIAC Troponin T имеет диагностическое окно от 2 до 12 часов. Тропонин Т и СК МВ являются основными показателями при диагностике острого инфаркта миокарда.

Референсные значения:

Женщины: 7—64 нг/мл.

Мужчины: 16—76 нг/мл.

Содержание тропонина Т и интерпретация данных представлены в табл. 5.

Таблица 5. Интерпретация значений повышенного содержания **Troponin T** у пациентов отделений реанимации и интенсивной терапии по данным научных публикаций

Содержание тропонина Т	Интерпретация
< 50 нг/л	Норма
≥ 50 нг/л	У 68% пациентов Troponin T ≥ 50 нг/л был диагностирован острый инфаркт миокарда. Высокая прогностическая вероятность смертности независимо от наличия или отсутствия острого инфаркта миокарда

Сравнительные характеристики тестов, исследуемых при подозрении на острый коронарный синдром, представлены в табл. 6 и 7.

Таблица 6. Чувствительность и специфичность тестов, проводимых при стратификации риска у пациентов с острым коронарным синдром и сердечной недостаточностью

Исследуемое вещество	Чувствительность, %	Специфичность, %	Исследуемое вещество	Чувствительность, %	Специфичность, %
Аспаратаминотрансфераза	89—97	48—88	ЛДГ общая	87	88
КФК общая	98—100	57—88	ЛДГ1	40—90	85
через 4 ч	20	89	Миоглобин	75—95	70
через 10 ч	59	83	Тропонин Т	> 98	80
КФК-МВ	94—100	98—100	через 4 ч	50	100
через 4 ч	16	87	через 10 ч	100	100
через 10 ч	53	87	через 7 сут	84	100
через 4 ч	49	94	Тропонин I	> 98	95
через 10 ч	76	79			

Таблица 7. Изменения концентрации кардиомаркеров в крови в разные временные промежутки после развития острого инфаркта миокарда

Исследуемое вещество	Начало увеличения активности, ч	Максимум увеличения активности, ч	Возвращение к норме, сут	Кратность увеличения
Аспаратами-нотрансфераза	5—6	24—48	4—7	2—20
КФК	2—4	24—36	3—6	3—30
КФК-МВ	2—4	12—18	2—3	До 8
ЛДГ	8—10	48—72	6—15	До 8
ЛДГ1	8—10	30—72	7—20	До 8
Миоглобин	0,5—2	6—12	0,5—1	До 20
Тропонин Т	3,5—10	12—18	7—14	До 300
Тропонин I	4—10	18—30	5—10	До 300

Определение маркеров сепсиса

Сепсис является частой причиной смерти в отделениях интенсивной терапии. За последние 15 лет значительно улучшились методы диагностики, что позволило начинать лечение сепсиса раньше. Приоритетом продолжают быть ранняя диагностика и наблюдение за больными с риском развития сепсиса. Данные проблемы привели к поиску лабораторных маркеров, которые могут быть связаны с наличием инфекции в организме, уровнем воспалительной реакции и сепсисом.

Биомаркер характеризует измеримый и воспроизводимый показатель клинического состояния пациента. Биомаркеры полезны для диагностики, прогнозирования, раннего распознавания заболеваний, стратификации риска, соответствующего лечения (тераностика) и обогащения клинических исследований для пациентов с сепсисом или с подозрением на сепсис. Для сепсиса идентифицирован ряд биомаркеров, из которых в экспресс-лаборатории реанимации особая роль отводится прокальцитонину и пресепсину, необходимых для диагностики неотложных состояний

Прокальцитонин

Прокальцитонин (ПКТ) представляет собой прогормон, предшественник гормона кальцитонина, который участвует в метаболизме кальция и поддерживает его постоянный уровень в крови. Полипептид ПКТ состоит из 116 аминокислот и синтезируется С-клетками щитовидной

железы. В норме его количество чрезвычайно мало и обнаруживается в крови в следовых количествах. При наличии бактериальной инфекции, при воздействии токсинов увеличивается экстратиреоидный синтез ПКТ нейроэндокринными клетками печени, почек, легких, мышечной ткани, адипоцитами, что приводит к значительному повышению его уровня. При системном воспалительном ответе, при воздействии провоспалительных молекул — эндотоксина, интерлейкинов (ИЛ-1 и ИЛ-6), фактора некроза опухоли альфа (ФНО α) — возрастает синтез ПКТ в макрофагах и моноцитарных клетках. Продукция данного биомаркера может нарастать в течение первых 2—4 часов, достигая максимума через 12 часов, период полувыведения составляет 22—26 часов. Следует отметить, что при вирусной инфекции синтез ПКТ отсутствует или подавлен. Благодаря особенностям своей кинетики ПКТ является более предпочтительным биомаркером для ранней диагностики заболевания и наблюдения за его прогрессированием. уровень ПКТ может повышаться без наличия инфекции при массовой гибели клеток. В частности, после тяжелой травмы и хирургического вмешательства уровень ПКТ быстро повышается, а затем, при отсутствии инфекции, снижается и приходит к норме через 3—5 дней. Также было отмечено, что повышение ПКТ при генерализации инфекции и развитии сепсиса часто происходит со значительной задержкой, что ведет к ложноотрицательным результатам [9, 10].

Методы определения ПКТ

1. Полуколичественный. Иммунохроматография (не требует анализатора, тест-полоски). Длительность теста — 30 мин.
2. Количественные:
 - а) иммуноферментная хемилюминисценция. Длительность выполнения теста в зависимости от анализатора: 21 мин — 2,5 ч;
 - б) иммунолюцинометрия. Длительность выполнения теста — 2 ч.

Данные по интерпретации полученных результатов представлены в табл. 8.

Таблица 8. Интерпретация уровней ПКТ у пациентов отделений реанимации и интенсивной терапии по данным научных публикаций

Уровень ПКТ (нг/мл)	Интерпретация
< 0,05	Сепсис исключен
< 0,5	Местная инфекция, сепсис маловероятен
0,50—2,00	Системная инфекция, возможен сепсис
> 2,0—10	Высокий риск сепсиса
> 10	Сепсис

Пресепсин

Пресепсин (ПСП) является высокоэффективным маркером сепсиса. Данному маркеру уделяется особое внимание в связи с его высокой чувствительностью, специфичностью и малым временем реакции для появления в крови. ПСП как биомаркер подходит не только для ранней диагностики сепсиса, но также для оценки его тяжести и прогноза.

Пресепсин — это циркулирующий белок, концентрация которого в крови быстро возрастает при развитии системных инфекций, сепсиса, тяжелого сепсиса и септического шока. Это белок (мол. масса 13 кДа), являющийся N-концевым фрагментом рецептора макрофагов CD14. Механизм повышения уровней ПСП принципиально отличается от механизма повышения уровней таких провоспалительных маркеров, как ФНО α , ИЛ-6, ИЛ-10, ПКТ, С-реактивный белок. При индукции системных воспалений повышение содержания ПСП происходит до повышения уровней указанных маркеров и быстрее, чем повышение уровней других маркеров сепсиса. Уровень ПСП четко отражает тяжесть сепсиса и соответствует показателям степени тяжести пациентов в критическом состоянии, определяемым согласно шкалам APACHE II, SOFA, MEDS. При мониторинге терапии сепсиса уровень ПСП быстро (в течение нескольких часов) снижается или повышается в отличие от уровней других маркеров, что отражает реальную динамику сепсиса, прогнозирует исходы и даже при снижении тяжести клинических симптомов сепсиса (ремиссии) прогнозирует его рецидивы.

Ключевую роль в образовании ПСП играет активация макрофагов/моноцитов, на поверхности которых расположен мембранный рецепторный белок mCD14 (m — membrane) — гликопротеин с молекулярной массой 55 кДа. В норме mCD14 экспрессируется на поверхности моноцитов/макрофагов, нейтрофилов, хондроцитов, В-клеток, дендритных и других зрелых миелоидных клеток. mCD14 — это рецептор, который «узнает» сигнал о наличии инфицирующих бактерий и «включает» систему неспецифического иммунитета и связанный с ней воспалительный процесс.

В настоящее время существует единственный метод определения пресепсина — хемилюминесцентный иммунологический метод [11, 12].

Референсные значения: до 337 пг/мл.

Время измерения: 15 минут для 6 образцов.

Данные по интерпретации полученных результатов представлены в табл. 9.

Таблица 9. Интерпретация уровней ПСП у пациентов отделений реанимации и интенсивной терапии по данным научных публикаций

Уровень ПСП (нг/мл)	Интерпретация
< 200	Сепсис исключен
200—299	Системная инфекция маловероятна
300—499	Системная инфекция возможна
500—999	Умеренный риск развития системной инфекции (тяжелого сепсиса). Повышенный риск неблагоприятного исхода
≥ 1000	Высокий риск развития системной инфекции (тяжелого сепсиса / септического шока). Высокий риск 30-дневной смертности, сравнимый с риском по шкале APACHE ≥ 25 баллов

Исследование концентрации свободного гемоглобина в плазме

В плазме здорового человека обнаруживаются незначительные количества свободного гемоглобина, так как он почти полностью метаболизируется в печени. При выполнении этого исследования основное внимание необходимо обращать на наличие гемолиза в пробирке после венопункции. Определение свободного гемоглобина — тест на внутрисосудистый и внесосудистый гемолиз.

Внутрисосудистый гемолиз встречается при следующих заболеваниях: при пароксизмальной ночной гемоглобинурии, пароксизмальной холодовой гемоглобинурии, ДВС-синдроме, механическом травматическом гемолизе при протезировании сосудов и клапанов сердца, тропической малярии, при интенсивной физической нагрузке, ожогах, маршевой гемоглобинурии. Концентрация свободного гемоглобина при этих состояниях резко повышена. Внесосудистый гемолиз встречается также при трансфузионных осложнениях, при этом повышение концентрации свободного гемоглобина менее выражено, при серповидноклеточной анемии и бета-талассемии оно незначительно.

Определение концентрации свободного гемоглобина не имеет практического значения в диагностике хронических гемолитических состояний.

С помощью специальных анализаторов выявляют низкую концентрацию свободного гемоглобина в пределах от 0—3,00 г/дл (0—30,0 г/л, 0—1,90 ммоль/л) и таким образом оценивают вероятность внутрисосудистого гемолиза. До настоящего времени в этих целях применяли сложные методы, которые основывались на неточных визуальных суждениях и занимали много времени, требуя построения калибровочных

кривых, — гемиглобинцианидный, фотометрический, метод определения с помощью люминесцентных комплексов тербия. Современный модифицированный гемиглобинцианидный метод определения низких концентраций гемоглобина позволяет получать быстрые точные результаты в течение 1 минуты, использовать образец объемом не более 20 мкл, не требует дополнительной калибровки при использовании кювет и реагентов одного целевого назначения, автоматически корректирует мутность, обусловленную наличием липидов и лейкоцитоза [13].

Данные по интерпретации концентрации свободного гемоглобина представлены в табл. 10.

Таблица 10. Интерпретация значения повышенной концентрации свободного гемоглобина по данным научных публикаций

Уровень свободного гемоглобина в плазме или сыворотке	Интерпретация
0—0,07 г/дл	Нормальные значения
> 0,07 г/дл	Гемолитические анемии. Гемолитическая болезнь новорожденных. Гемоглобинопатии (серповидноклеточная анемия и ее варианты, талассемия, гемоглобиноз С). Отравление гемолитическими ядами (чаще всего при укусах змей) с последующим развитием ДВС-синдрома. Гемолитические кризы в результате тяжелых посттрансфузионных реакций, при групповой или резус-несовместимости. Инфекционные заболевания (при малярии и как вторичный симптом при сепсисе). Массивные ожоги (термические или химические). Физиологическая гемоглобинемия (в результате воздействия на эритроидные клетки, расположенные в ткани легких или желудка при курении, гастрите, язвенной болезни)

Определение активности VIII фактора и ингибитора VIII фактора на фоне лечения эмицизумабом

Определение активности VIII фактора (FVIII) и ингибитора FVIII хромогенным методом выполняют у больных наследственной и приобретенной формой гемофилии А, получающих лекарственный препарат эмицизумаб.

Эмицизумаб представляет собой миметик FVIII, одобрен в России для профилактики кровотечений у больных гемофилией А с ингибиторами FVIII в 2018 г. и тяжелой формой гемофилии А без ингибиторов FVIII в 2019 г. Эмицизумаб, являясь миметиком FVIII, выполняет его функцию, однако не имеет с ним структурного сходства и не требует активации тромбином для начала работы [14]. Одностадийное клот-

тинговое исследование на основе активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ) является наиболее часто используемым тестом в рутинной лабораторной практике. Принцип метода заключается в определении АЧТВ в смеси субстратной дефицитной плазмы по FVIII (реагент) и предварительно разведенной исследуемой плазмы (плазма больного). В результате смешивания происходит укорочение АЧТВ дефицитной плазмы пропорционально активности FVIII плазмы больного, поскольку содержание всех других факторов свертывания реагента соответствует референсным значениям. Одноэтапный анализ определения активности FVIII и других факторов внутреннего пути имеет ряд недостатков, связанных с относительно плохой воспроизводимостью и вариабельностью между реагентами, высокой чувствительностью метода к воздействию антикоагулянтов и некоторых лекарственных препаратов (эмицизумаб), воздействию волчаночного антикоагулянта и других иммунных агентов, которые могут искажать истинные результаты факторной диагностики [15].

Результаты исследования АЧТВ и всех одностадийных анализов свертывания крови на основе АЧТВ (активность FVIII—XII, клоттинговый метод Неймегена—Бетезда) будут искажены при применении эмицизумаба и в течение 6 месяцев после его отмены.

Исключить подобные воздействия позволяет двухстадийный хромогенный метод определения активности FVIII. Принцип метода заключается в фотометрическом измерении амидолитической активности фактора при расщеплении хромогенного субстрата в кювете анализатора. На первой стадии плазму больного с неизвестной концентрацией FVIII инкубируют с реагентом, содержащим фосфолипиды, ионы Ca^{2+} , очищенные FIXa и FX. В результате образуется FXa в количестве, прямо пропорциональном активности FVIIIa. На второй стадии FXa гидролизует специфический для него хромогенный субстрат с высвобождением *p*-нитроанилина (pNA), окраску среды которым регистрирует спектрофотометр. Количество образовавшегося FXa, а следовательно, и интенсивность окрашивания среды в кювете анализатора пропорциональны активности FVIII в исследуемом образце. Недостатком хромогенного метода является его недостаточный клинический опыт применения, относительная высокая стоимость и низкая стабильность реагентов. Таким образом, лабораторный мониторинг активности FVIII и титра ингибитора при проведении терапии эмицизумабом проводится только хромогенными методами, поскольку препарат искажает результаты всех клоттинговых тестов на основе АЧТВ. Данный эффект сохраняется до 6 месяцев со дня введения последней дозы препарата [16].

Референтные интервалы — 50—160%.

Таблица 11. Показатели и их клиническое значение

Показатель	Нормальные значения	Увеличение активности	Уменьшение активности
Активность FVIII, определяемая хромогенным методом	50—160%	Слишком высокая доза эмицизумаба	Потребление эмицизумаба, необходимость увеличения дозы
Ингибитор FVIII, определяемый хромогенным методом	0	Тяжелая форма гемофилии А, отягощенная наличием ингибитора FVIII	—

Определение активности ADAMTS13 в плазме крови

ADAMTS13 (A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin type 1 motif, дезинтегриноподобная металлопротеиназа с мотивом тромбоспондина 1-го типа) представляет собой фермент протеазу, специфически расщепляющий высокомолекулярные мультимеры фактора Виллебранда. Функциональный или количественный дефицит этого фермента приводит к тромботической тромбоцитопенической пурпуре (ТТП).

ТТП — редкое, угрожающее жизни заболевание, проявляющееся тромбоцитопенией, микроангиопатической гемолитической анемией и нарушением функций органов и систем.

Диагноз ТТП устанавливают при выявлении в плазме крови активности ADAMTS13 < 10%. Причинами низкой активности ADAMTS13 могут быть нарушение секреции или функции этого фермента в результате мутации гена *ADAMTS13* при врожденной ТТП (синдром Апшоу—Шульмана) либо выработка антител, ингибирующих ADAMTS13, при иммуноопосредованной ТТП [17].

Различные этиологические факторы приводят к развитию ТТП, среди них беременность, инфекция, аутоиммунные и онкологические заболевания, травма, хирургические вмешательства, лекарственные препараты.

С 2019 г. на базе ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России организовано определение активности в плазме ADAMTS13 у больных с признаками тромботической микроангиопатии.

Диагноз ТТП устанавливали на основании выявления характерной клинической картины, тромбоцитопении, микроангиопатической гемолитической анемии [анемия, уменьшение концентрации гаптоглобина сыворотки до 0,25 г/л и ниже, повышение сывороточной активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ), обнаружение шистоцитов в мазке периферической крови, отрицательная прямая проба Кумбса] и уменьшения плазменной активности ADAMTS13 менее 10%.

Лабораторная диагностика ТТП основана на выявлении неиммунной микроангиопатической гемолитической анемии, неиммунной тромбоцитопении, активности в плазме ADAMTS13 < 10%, обнаружении или отсутствии ингибитора в плазме ADAMTS13, обнаружении или отсутствии мутаций гена *ADAMTS13*.

Анемия может быть различной степени выраженности.

Одним из патогномоничных признаков является обнаружение шистоцитов в крови. Их количество в норме при подсчете автоматическим способом — 0,03—0,58%, при визуальном подсчете — 0—0,27% от общего количества эритроцитов, у лиц с почечной недостаточностью — 0,6%, при преэклампсии — 0,45% и у лиц с протезированными клапанами сердца — 0,48%. Критерием ТТП признается обнаружение шистоцитов более 1%, по другим данным — более 2—4%. Некоторые эксперты считают, что для диагноза ТТП достаточно любое выявление шистоцитов. В то же время в дебюте ТТП шистоциты могут отсутствовать.

Неиммунный характер гемолиза подтверждается отрицательной прямой пробой Кумбса.

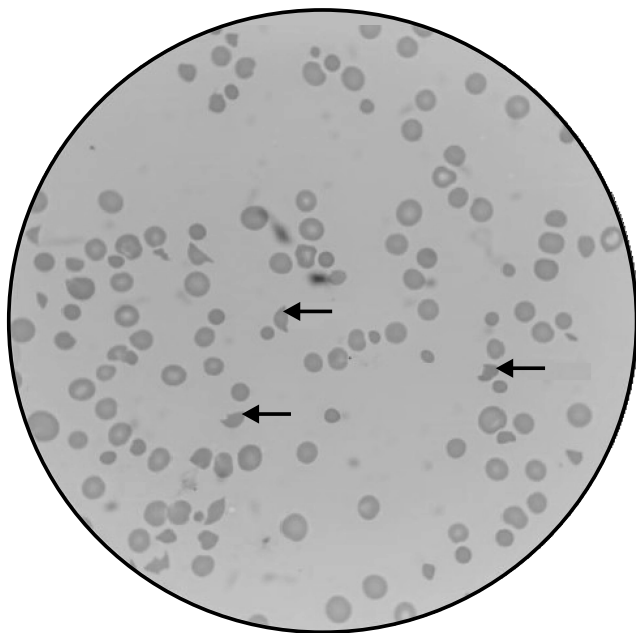


Рисунок 1. Шистоциты (фрагменты эритроцитов, показаны стрелкой) в мазке крови у больной.

Тромбоцитопения выявляется у всех пациентов с обострением ТТП. Для ТТП характерна выраженная тромбоцитопения — $10\text{--}30 \times 10^9/\text{л}$, которая развивается вследствие потребления тромбоцитов при образовании тромбов. Образующиеся тромбы содержат небольшое количество фибрина, поскольку при ТТП не происходит активации свертывания и отложения фибрина, поэтому клоттинговые тесты, концентрация фибриногена плазмы остаются в пределах нормы. Среди других биохимических показателей может быть гипербилирубинемия из-за гемолиза [18].

Таблица 12. Лабораторное обследование, рекомендуемое пациентам с подозрением на ТТП

Лабораторный тест	Значения при ТТП
Концентрация гемоглобина	Анемия
Ретикулоциты	Повышенное количество
Шистоциты	Обнаруживаются
Прямая проба Кумбса	Отрицательная
Концентрация лактатдегидрогеназы	Выше нормы в 1,5 раза
Концентрация гаптоглобина	Снижена либо не определяется
Тромбоциты крови	$< 150 \times 10^9/\text{л}$ или уменьшение более чем на 25% от исходных значений
Активность ADAMTS13	$< 10\%$
Ингибитор ADAMTS13	Обнаруживается при ингибиторной форме
Клоттинговые тесты, фибриноген	В пределах нормы
Мочевина, креатинин, электролиты, протеинурия	Изменены при поражении почек
Трансаминазы	В пределах нормы
Билирубин	Может быть повышен (гемолиз)
Тропонин	Повышен при поражении сердца
Тесты на беременность у женщин детородного возраста	Исключить беременность как фактор, провоцирующий ТТП

Диагностика ТТП

Для диагностики ТТП наибольшее значение имеет исследование активности и ингибитора ADAMTS13. Можно исследовать также антитела (IgG) к ADAMTS13 и антиген ADAMTS13. Определение антигена ADAMTS13 имеет большое научное значение, может быть использовано для прогноза, а также при его несоответствии активности можно заподозрить врожденную форму ТТП.

Методы определения активности ADAMTS13 претерпели ряд изменений и постепенно развивались и совершенствовались. Все начиналось с некоммерческих методов, созданных на базе той или иной лабо-

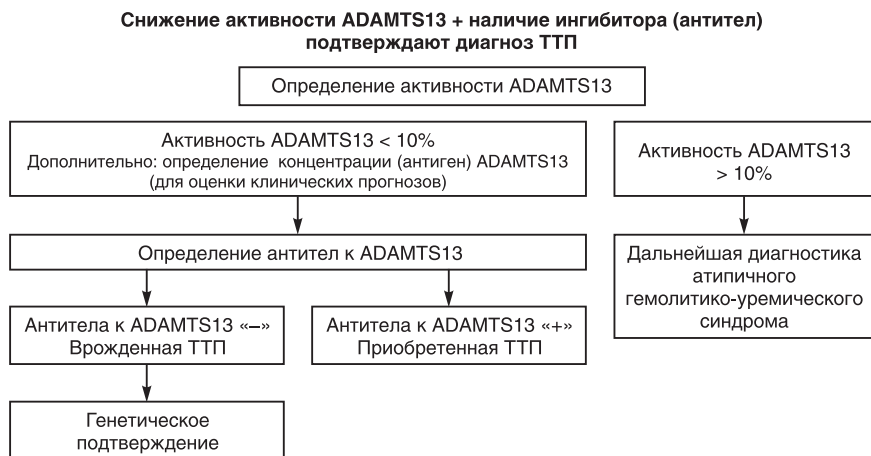


Рисунок 2. Диагностика ТТП.

ратории и основанных на определении активности ADAMTS13 в плазме пациента по измерению оставшегося количества vWF или продуктов его расщепления после инкубации очищенного vWF или пулированной донорской плазмы, используемой в качестве источника vWF, с плазмой пациента. Эти исследования были сложными, выполнялись только в специализированных лабораториях в течение нескольких дней. Среди них электрофорез в агарозном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS) и вестерн-блоттинг, электрофорез белков в полиакриламидном геле в присутствии SDS (SDS-Page) и вестерн-блоттинг, коллагенсвязывающий метод, определение активности ADAMTS13 методом ристоцетининдуцированной агрегации [19].

В современных методах определения активности ADAMTS13 используются пептидный субстрат vWF, на который действует ADAMTS13, либо полипептид рекомбинантного домена A2 vWF, либо фрагмент, состоящий из 73 аминокислотных остатков от D1596 до R1668 vWF, обозначаемый как VWF73. Плазму пациента инкубируют с субстратом, на который действует ADAMTS13, и измеряют продукты расщепления. Тесты выполняют в течение нескольких часов, они обладают высокой чувствительностью и специфичностью.

Это позволило сократить время исследования до 4—5 ч [19].

В настоящее время используются методы флуоресцентного (ферстеровского) резонансного переноса энергии (Fluorescence Resonance Energy Transfer — FRET), твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА, англ. — ELISA), автоматизированный количественный метод определения активности ADAMTS13 на анализаторе HemosIL AcuStar,

а также полуколичественный тест определения активности ADAMTS13 Technoscreen®.

Принцип FRET заключается в том, что флуорогенный субстрат FRETs-VW73 подвергается расщеплению ADAMTS13 и происходит флуоресцентная эмиссия, которая может быть количественно оценена с помощью флуорометра.

В анализаторе HemosIL AcuStar реализован автоматизированный иммунохемилюминесцентный метод количественного определения активности ADAMTS13. В анализаторе используются готовые картриджи с флаконами, содержащими магнитные частицы, покрытые пептидом VW73, которые инкубируют с плазмой пациента. Продукты расщепления количественно определяются путем внесения меченых моноклональных антител к этим пептидам, интенсивность реакции хемилюминесценции прямо пропорциональна активности ADAMTS13. Время выполнения исследования составляет 33 мин [18].

Для скрининга разработан полуколичественный тест определения активности ADAMTS13 Technoscreen®. Это готовые наборы, в которые входят субстрат VWF73-GST (GST — glutathione S-transferase), содержащий фрагменты vWF, и тестовые лунки. Образцы плазмы предварительно инкубируются с субстратом в течение 20 мин при комнатной температуре, в это время ADAMTS13 расщепляет субстрат. Затем по капле предварительно инкубированной смеси добавляют в контрольную и тестовую лунки. В мембране тестовой лунки иммобилизованы антитела GST, которые связываются только с расщепленным VWF73. Связанный с антителами субстрат в тестовой и контрольной лунках детектируют с помощью стрептавидина-конъюгата, который придает им красную окраску. Интенсивность красной окраски в тестовой лунке пропорциональна активности ADAMTS13.

Время выполнения теста — менее 30 мин.

В случае получения положительного результата требуется подтверждение скринингового теста одним из известных количественных методов определения активности ADAMTS13.

На базе экспресс-лаборатории отделения реанимации и интенсивной терапии ФГБУ «НМИЦ гематологии» проводится исследование активности ADAMTS13, определение ингибитора ADAMTS13 с помощью теста смешивания, количественное определение антител к ADAMTS13, определение антигена иммуноферментным методом.

Итак, остановимся на этих методах более подробно.

Плазма для исследования активности ADAMTS13 поступает из различных регионов России. Образцом для исследования является цитратная плазма человека с низким содержанием тромбоцитов, свежая, полученная непосредственно из венозной крови или замороженная.

Для исследования кровь собирается в пробирки с 3,2% раствором цитрата натрия в соотношении 9:1, центрифугируется со скоростью 1200 G в течение 15 мин, отделяется плазма, которая хранится при температуре -20 или -70 °C до исследования [19].

Образцы на исследование должны быть взяты до начала трансфузий плазмы либо плазмообмена.

Образцы, содержащие ЭДТА, не могут быть использованы для тестирования данным методом, так как ЭДТА является сильным ингибитором активности ADAMTS13.

Определение активности металлопротеиназы ADAMTS13 в плазме крови методом ИФА

Для определения активности ADAMTS13 используется твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА, англ. — ELISA).

В лаборатории используются наборы Technoclone TECHNOZYM ADAMTS13. В набор входит 96-луночный планшет и необходимые реактивы. При проведении анализа используются высокоспецифичные **моноклональные анти-GST антитела**, адсорбированные на твердой фазе (лунках планшета). Это антитела к фрагменту мультимера фактора Виллебранда (рис. 4).

На первом этапе анализа в лунки вносится **субстрат GST-vWF73**, который связывается с моноклональными анти-GST антителами.

После часовой инкубации следует процедура отмывания лунок для удаления не связавшихся молекул. Следующим этапом вносятся **образцы и контроли, а также стандартные образцы**. Стандартные образцы необходимы для построения калибровочной кривой и расчета активности.

Далее следует инкубация, в результате которой ADAMTS13, содержащийся в образцах плазмы, разрезает (отщепляет) присутствующие в лунках мультимеры фактора Виллебранда с образованием фрагмента N10. После отмывки вносятся меченные ферментом анти-N10 антитела (конъюгат). Связанный с антителом фермент обнаруживают по изменению цвета раствора после добавления раствора 3,3',5,5'-тетраметилбензидина гидрохлорида (ТМБ), который служит субстратом для пероксидазы хрена, и стабилизированного буфера. ТМБ (хромоген) образует окрашенное соединение синего цвета, окисляясь под воздействием кислорода, высвобождаемого пероксидазой из перекиси водорода, при этом цвет раствора тем насыщенней, чем больше исследуемого аналита, связанного с пероксидазой хрена, находится в образце. Непрореагировавший субстрат будет бесцветным.

Реакцию останавливают стоп-раствором и затем измеряют оптическую плотность каждой лунки на приборе.

Окраска раствора в лунке и оптическая плотность прямо пропорциональна активности ADAMTS13.

После оценки калибровочной кривой и контрольных образцов можно переходить к оценке результатов анализа пациентов (рис. 3).

Измерение проводится на анализаторе **Multiscan FC (Thermo Fisher Scientific)** — это фотометр для широкого спектра различных исследований.

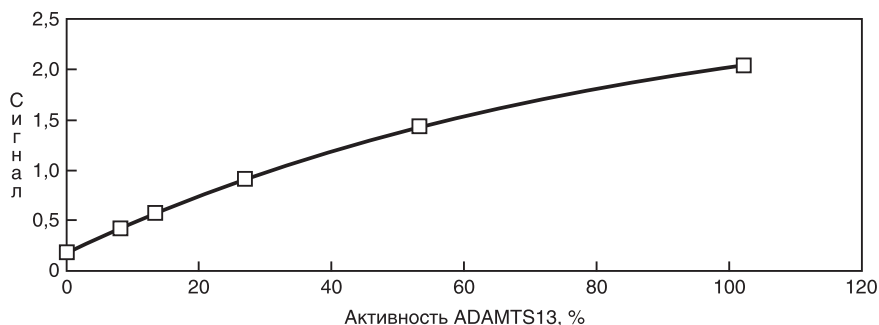


Рисунок 3. Пример калибровочной кривой.



Рисунок 4. Принцип метода определения активности ADAMTS13.

Определение ингибитора ADAMTS13 в плазме крови методом ИФА

Определение ингибитора дает возможность дифференциальной диагностики врожденной (полиморфизм генов) и приобретенной (антитела) ТТП в сочетании с определением активности и может быть использовано для контроля эффективности терапии при обменном переливании плазмы.

Есть два метода определения ингибитора:

1. Определение ингибитора по остаточной активности (тест смешивания).
2. Количественное определение антител (IgG) к ADAMTS13.

Антитела к ADAMTS13 относятся к классу IgG. Не все антитела обладают ингибиторной активностью, поэтому выявление ингибитора в тесте смешивания имеет большее значение для диагностики [20].

Определение ингибитора ADAMTS13 по остаточной активности

Ингибирующая активность анти-ADAMTS13 измеряется с помощью теста смешивания и определяется в единицах Бетесда.

Плазму пациента предварительно подогревают до 56 °С, чтобы инактивировать в ней эндогенную активность ADAMTS13.

Термоинактивированная плазма пациента и пулированная нормальная плазма смешивается в соотношении 1:1, 1:2, 1:4, 1:8 и инкубируется в течение 1,5 часа при 37 °С. Остаточная активность ADAMTS13 измеряется методом ИФА. Титр ингибитора анти-ADAMTS13 считается положительным, когда остаточная активность ADAMTS13 в термоинактивированной плазме пациента и смеси пулированной нормальной плазмы составляет менее 75% от таковой в контрольной смеси с пересчетом на разведение. Концентрация ингибитора, который нейтрализует 50% активности нормальной плазмы, принимается за 1 BU [18].

Количественное определение ингибитора ADAMTS13

Для количественного определения антител к ADAMTS13 используется набор для определения ингибитора ADAMTS13 Technoclone TECHNOZYM ADAMTS-13 INH.

Антитела к ADAMTS13 делятся на два класса: нейтрализующие антитела или ингибиторы и антитела, не обладающие ингибиторной активностью.

ИФА выявляет общее количество антител к ADAMTS13. Метод основан на связывании антител к ADAMTS13, имеющихся в плазме

пациента, с рекомбинантным ADAMTS13, нанесенным на стенки лунок планшета, при инкубации (рис. 5). Лунки планшета затем отмывают, и связанные антитела определяют с помощью пероксидазы хрена, конъюгированной с антителами к человеческим иммуноглобулинам (Ig)G. Диагностический порог антител к ADAMTS13 составляет более 15 ед/л [18].

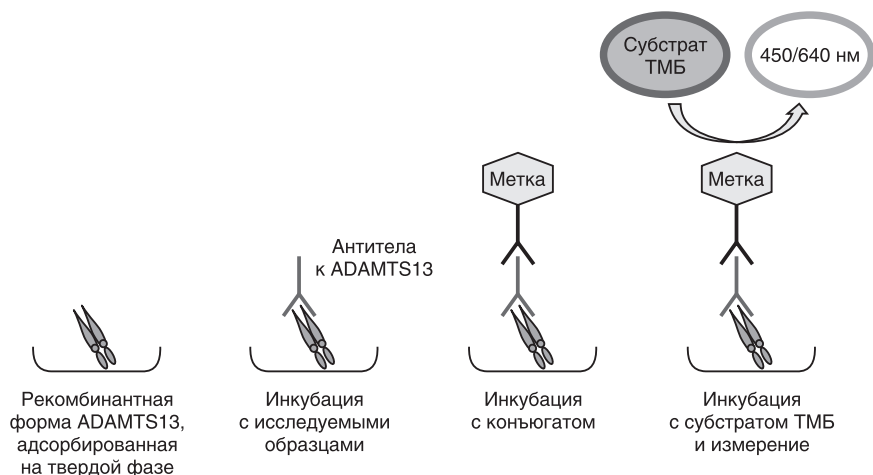


Рисунок 5. Принцип метода определения антител к ADAMTS13.

Для определения концентрации антигена ADAMTS13 методом ИФА используют набор для определения антигена ADAMTS13 Technoclone TECHNOZYM ADAMTS-13.

В набор входит 96-луночный планшет, на поверхности лунок предварительно адсорбированы антитела к ADAMTS13, которые связываются с антигеном ADAMTS13 плазмы (рис. 6).

Референсные значения антигена ADAMTS13 составляют 657—2368 нг/мл [18].

При сравнении результатов определения активности ADAMTS13 различными методами показано, что они коррелируют между собой. Результаты определения активности ADAMTS13 методом HemosIL AcuStar коррелируют с FRET ($r = 0,96$) и ИФА ($r = 0,96$), а коэффициент вариации между различными методами составляет менее 15%. Все методы выявляют выраженный дефицит ADAMTS13 ($< 10\%$), однако при пограничных значениях активности ADAMTS13 могут наблюдаться расхождения. Поэтому если при типичных клинических проявлениях активность ADAMTS13 превышает 10%, необходимо повторить исследование либо выполнить его другим методом [18].

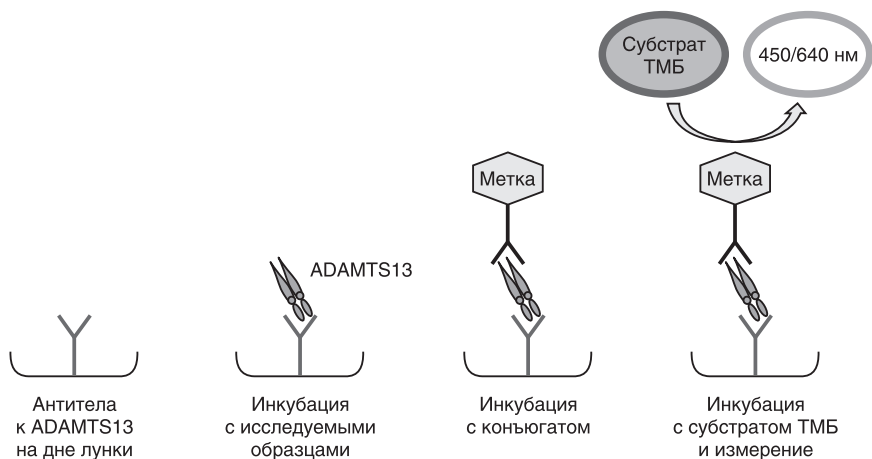


Рисунок 6. Принцип метода определения антигена ADAMTS13.

Таким образом, можно сформулировать следующие принципы диагностики ТТП:

- Предположительный диагноз ТТП устанавливают на основании клинической картины — анемия, тромбоцитопения, поражения различных органов и систем [18].
- Характерны выраженная тромбоцитопения без тяжелого нарушения функции почек, повышение сывороточной концентрации лактатдегидрогеназы, отрицательная прямая проба Кумбса, анемия, сниженное содержание гаптоглобина.
- Диагноз ТТП подтверждается при активности ADAMTS13 в плазме менее 10%. При активности ADAMTS13 10—20% и характерной клинической картине необходимо повторить исследование. Образцы плазмы на исследование должны быть взяты до начала трансфузий плазмы либо плазмообмена в пробирки с цитратом.
- При выявлении низкой активности ADAMTS13 необходимо исключить также ошибки преаналитического этапа (наличие ЭДТА в доставленном образце крови).
- При активности ADAMTS13 < 10% обследовать на наличие ингибитора ADAMTS13, его выявление определяет тактику дальнейшего лечения. Обнаружение антител к ADAMTS13, относящихся к IgG, не всегда свидетельствует о выявлении ингибитора, поскольку они могут не обладать ингибирующей активностью. Ингибирующее действие антител к ADAMTS13 подтверждается в тесте смешивания [18].

Необходимо обследовать всех впервые выявленных пациентов на наличие мутаций гена ADAMTS13. Наличие ингибитора не исключает мутации гена ADAMTS13.

Литература

1. Raffin TA. Indications for arterial blood gas analysis. *Ann Intern Med* 1986; 105(3):390—398. DOI: 10.7326/0003-4819-105-3-390.
2. Bickenbach J, Marx G. Point-of-Care-Monitoring: blood gas analysis. Review. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 2010; 45(11—12):722—730. DOI: 10.1055/s-0030-1268876.
3. Fan J, Ma J, Xia N et al. Clinical value of combined detection of CK-MB, MYO, cTnI and plasma NT-proBNP in diagnosis of acute myocardial infarction. *Clin Lab* 2017; 63(3):427—433. DOI: 10.7754/Clin.Lab.2016.160533.
4. Bervin T. A mimicry of an acute coronary syndrome. *BMJ Case Rep* 2009;2009: bcr01.2009.1424. DOI: 10.1136/bcr.01.2009.1424.
5. Gollop ND, Dhullipala A, Nagrath N, Myint PK. Is periprocedural CK-MB a better indicator of prognosis after emergency and elective percutaneous coronary intervention compared with post-procedural cardiac troponins? *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2013; 17(5):867—871. DOI: 10.1093/icvts/ivt303.
6. Kragelund C, Grønning B, Køber L et al. N-terminal pro-B-type natriuretic peptide and long-term mortality in stable coronary heart disease. *N Engl J Med* 2005; 352(7):666—675. DOI: 10.1056/NEJMoa042330.
7. Servonnet A, Dubost C, Martin G et al. Myoglobin: still a useful biomarker in 2017? *Ann Biol Clin* 2018; 76(2):137—141. DOI: 10.1684/abc.2018.1326.
8. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS et al. Third universal definition of myocardial infarction. *Eur Heart J* 2012; 33(20):2551—2567. DOI: 10.1093/eurheartj/ehs184.
9. Reinhart K, Karzai W, Meisner M. Procalcitonin as a marker of the systemic inflammatory response to infection. *Intensive Care Med* 2000; 26:1193—1200. DOI: 10.1007/s001340000624.
10. Wirz Y, Meier MA, Bouadma L et al. Effect of procalcitonin-guided antibiotic treatment on clinical outcomes in intensive care unit patients with infection and sepsis patients: a patient-level meta-analysis of randomized trials. *Crit Care* 2018; 22:191. DOI: 10.1186/s13054-018-2125-7.
11. Chenevier-Gobeaux C, Borderie D, Weiss N et al. Presepsin (sCD14-ST), an innate immune response marker in sepsis. *Clin Chim Acta* 2015; 450:97—103. DOI: 10.1016/j.cca.2015.06.026.
12. Звягин А. А., Демидова В. С., Смирнов Г. В. Биологические маркеры в диагностике и лечении сепсиса. *Раны и раневые инфекции* 2016; 3(2):19—23.
13. Morris LD, Pont A, Lewis SM. Use of a new HemoCue system for measuring haemoglobin at low concentrations. *Clin Lab Haematol* 2001; 23(2):91—96. DOI: 10.1046/j.1365-2257.2001.00363.x.
14. Blair HA. Emicizumab: a review in haemophilia A. *Drugs* 2019; 79(15): 1697—1707. DOI: 10.1007/s40265-019-01200-2. PMID:31542880.
15. Андреева Т. А., Жарков П. А., Зозуля Н. И. и др. Методические рекомендации по ведению больных гемофилией А, получающих эмицизумаб. *Гематология и трансфузиология* 2022; 67(2):267—280.
16. Суренков А. А., Орел Е. Б., Зозуля Н. И., Двирнык В. Н. Особенности клинико-лабораторной диагностики редкой коагулопатии — приобретенной

- гемофилии. Гематология и трансфузиология 2022; 67(4):535—550. |DOI: 10.35754/0234-5730-2022-67-4-535-550.
17. Галстян Г. М., Шмаков Р. Г., Клебанова Е. Е. и др. Тромботическая тромбоцитопеническая пурпура у беременных: родоразрешать нельзя прерывать. Где поставить запятую? Гематология и трансфузиология 2022; 67(1): 42—61.
 18. Галстян Г. М., Клебанова Е. Е. Диагностика тромботической тромбоцитопенической пурпуры. Терапевтический архив 2020; 92(12):207—217.
 19. Just S. Methodologies and clinical utility of ADAMTS-13 activity testing. Semin Thromb Hemost 2010; 36(1):82—90. DOI: 10.1055/s-0030-1248727.
 20. Vendramin C, Thomas M, Westwood JP, Scully M. Bethesda assay for detecting inhibitory anti-ADAMTS13 antibodies in immune-mediated thrombotic thrombocytopenic purpura. TH Open 2018; 2(3):e329—e333.

Д. С. Тихомиров, Е. Н. Игнатова, М. В. Демин, Т. А. Солдатова,
А. Ю. Крылова, А. А. Гуляева, Т. А. Туполева

Глава 19.

Лабораторная диагностика вирусных инфекций в гематологии и трансфузиологии

Введение

Лабораторная диагностика вирусных инфекций проводится с целью установления или подтверждения диагноза, проведения дифференциальной диагностики заболеваний, определения прогноза течения, обоснования тактики лечения, контроля эффективности проводимой терапии. Лабораторная диагностика вирусных инфекций базируется на применении специфических методов исследования, например иммунохимических и молекулярно-биологических. Новые технологии во всех областях науки и производства способствуют разработке новых или усовершенствованию уже применяемых тест-систем, как отечественного, так и зарубежного производства, и корректировке алгоритмов исследования.

Вирусные инфекции в гематологии и трансфузиологии

Пациенты с заболеваниями системы крови являются группой высокого риска в отношении большого числа инфекционных осложнений как бактериальной и грибковой, так и вирусной природы. Их можно условно разделить на экзогенные — возникающие при попадании

патогена в организм извне — и эндогенные инфекции — вызываемые собственной условно-патогенной флорой вследствие снижения иммунитета [1]. К экзогенным патогенам вирусной природы можно отнести возбудители респираторных, кишечных и социально значимых инфекций с парентеральным путем передачи [вирус гепатита В (ВГВ), вирус гепатита С (ВГС), вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) 1-го и 2-го типа]. К эндогенным возбудителям можно отнести микроорганизмы, способные сохраняться пожизненно в организме после первичного инфицирования. Среди них можно отметить герпесвирусы, папилломавирусы и некоторые ретровирусы. Актуальность того или иного вирусного патогена для гематологии и трансфузиологии определяется множеством факторов.

Острые респираторные (ОРВИ) и кишечные (ОКИ) вирусные инфекции занимают значительную часть в структуре инфекционных осложнений у пациентов с заболеваниями системы крови, поскольку у этих пациентов описаны случаи более тяжелого течения таких заболеваний, чем у иммунокомпетентных [2—8]. Однако, в отличие от гемотрансмиссивных инфекций, ОРВИ и ОКИ имеют сезонный эпидемиологический характер распространения и достаточно яркую клиническую картину. Также их характерной особенностью является элиминация из организма после клинического разрешения эпизода инфекции. Возбудители же вирусных инфекций с парентеральным путем передачи, напротив, постоянно циркулируют в популяции, крайне редко имеют яркие клинические проявления, а некоторые из них после первичного инфицирования навсегда остаются в организме.

Передача ВИЧ, вирусов гепатита В (ВГВ) и С (ВГС) может произойти в результате медицинских манипуляций: при переливании крови или ее компонентов, пересадке органов или тканей, через медицинские инструменты для парентеральных вмешательств и другие медицинские изделия, контаминированные ВГВ и ВГС, также при эндоскопических манипуляциях и других диагностических и лечебных процедурах, в ходе проведения которых существует риск нарушения целостности кожных покровов или слизистых оболочек [104]. Для ВГВ, согласно данным литературы, показана самая низкая заражающая доза, поэтому для него возможна передача в быту посредством совместного использования контаминированных вирусом различных предметов гигиены, в том числе бритвенных и маникюрных принадлежностей, зубных щеток, полотенец, ножниц. При этом передача вируса возможна при отсутствии на предметах видимой крови. Инфицирование ВГС контактно-бытовым путем происходит крайне редко. В ряде случаев гематологические заболевания ассоциированы с ВИЧ-инфекцией и иногда требуют дифференциальной диагностики [104].

Помимо парентерального пути передачи, ВГВ и ВИЧ обладают особыми характеристиками, согласно которым после первичного инфицирования не происходит полной элиминации вируса из организма [9, 10]. Ранее подобное утверждалось и для ВГС, однако данный постулат все больше ставится под сомнение. Таким образом, актуальность проблемы гемотрансмиссивных инфекций у пациентов с заболеваниями системы крови определяется и вероятностью реактивации вирусов, находящихся в организме в латентном состоянии [11–14].

Среди эндогенных вирусных инфекций наибольшую опасность для пациентов с заболеваниями системы крови представляют герпесвирусы, поскольку очень широко распространены в общей популяции, после первичного инфицирования навсегда остаются в организме и в случае снижения иммунитета способны реактивироваться и вызывать серьезные инфекционные осложнения.

Современные методы диагностики вирусных инфекций

Расширение возможностей в терапии гематологических заболеваний, в том числе с применением высокотехнологичной медицинской помощи, наряду с использованием большого арсенала антимикробных препаратов, иммуномодуляторов и таргетных препаратов диктует необходимость в расширении лабораторной диагностики вирусных инфекций. Это в свою очередь невозможно без использования новейших достижений в области лабораторных технологий. В этом разделе будут рассмотрены основные требования к клиническому материалу для вирусологических исследований и арсенал доступных методов для проведения этих исследований с кратким описанием сущности методики.

Материал для исследования

Качество лабораторных исследований и достоверность полученных результатов при диагностике вирусных инфекций во многом зависит от качества исследуемого образца, направленного в лабораторию. Важную роль играют такие факторы, как время с момента взятия образца до его доставки в лабораторию, основной диагноз у пациента, вид, качество и количество материала, направленного на исследование.

Очевидно, что для адекватной диагностики активной вирусной инфекции лучше всего подходит материал из локуса поражения, поскольку далеко не всегда поражение носит системный характер. Например, у пациента с подозрением на вирусный менингит исследование периферической крови, которая чаще всего используется в качестве

клинического материала, может дать отрицательный результат, в то время как исследование спинномозговой жидкости может выявить возбудитель. При инфекциях кожи или слизистых оболочек целесообразно исследовать образцы, полученные с этих поверхностей. Следует также помнить, что пробы, полученные в течение первых нескольких дней после начала инфекционного эпизода, обладают наибольшей диагностической ценностью. Однако вид биоматериала также зависит от возбудителя, на наличие которого планируется проведение исследования. Так, например, ВГВ тропен в основном к гепатоцитам, а в момент активной репликации в ходе цитолиза на фоне аутоиммунной агрессии против клеток, экспонирующих вирусные антигены и меченных противовирусными антителами anti-HBs, вирионы можно обнаружить в периферической крови. Таким образом, исследование, например, аспирата костного мозга на ДНК ВГВ малоинформативно, поскольку в нем практически нет клеток, способных поддерживать вирусную репликацию, и вирионы там могут оказаться в основном из-за пассивного транспорта крови через строму. В то же время ВГС обладает ограниченной тропностью к лимфоцитам, поэтому исследование на вирусную РНК можно провести и в клетках крови, и в аспирате костного мозга. Противовирусные иммуноглобулины классов IgM и IgG циркулируют преимущественно в крови, поэтому исследования на их присутствие наиболее информативно в сыворотке или плазме крови.

Субстратом для молекулярно-генетических методов исследования (например, полимеразной цепной реакции — ПЦР) служат нуклеиновые кислоты, выделенные из клинического материала, которые в дальнейшем могут быть заморожены при температуре от -20 до -70 °C и храниться длительное время.

В случае серологической диагностики следует учитывать, что иммуноглобулины, содержащиеся в сыворотке или плазме крови, относительно стабильны в зависимости от класса: IgM менее стабильны, чем IgG, поскольку более сложно организованы. Если тестирование образцов, доставленных в лабораторию, проводится в течение нескольких дней, сыворотку или плазму можно хранить при температуре $+4$ °C. Если исследование не может быть выполнено оперативно, допускается однократное замораживание образцов при температуре от -20 до -70 °C. Повторное замораживание и оттаивание не допускаются, поскольку приводят к разрушению анализата.

Ограничения диагностики вирусных инфекций

Как и в других областях микробиологии, обнаружение вируса (или какого-либо компонента вирионов) в клиническом образце само по себе

не всегда доказывает, что вирус является этиологическим агентом инфекционного осложнения. Эта проблема особенно характерна для полимеразной цепной реакции (ПЦР) и других чувствительных методов диагностики. Так, детекция участка нуклеиновой кислоты вируса позволяет констатировать присутствие вируса в образце, но не говорит ни о его вирулентности, ни о активности его репликации. Дифференцировать активную/персистирующую или латентную инфекцию можно, только имея дополнительные показатели, такие, например, как концентрация вирусной нуклеиновой кислоты в исследуемом образце или другие косвенные клинико-лабораторные данные.

Чтобы определить связь между выявленным вирусом и инфекционным осложнением у пациента, необходимо знать природу взаимодействия вируса с хозяином и симптомы, вызываемые вирусной инфекцией. Если для обнаруженного вируса характерна персистирующая или латентная инфекция, может потребоваться дополнительная диагностика, прежде чем он может быть признан причиной текущего инфекционного осложнения.

Описание методов диагностики вирусных инфекций

Вирусологический метод

Вирусологический метод, или метод клеточных культур, подразумевает изоляцию и наработку возбудителя в культуре клеток с последующей окраской с помощью специфических антител. До второй половины XX века оставался основным в диагностике вирусных инфекций. Однако, несмотря на высокую специфичность и информативность, метод является длительным, трудоемким, дорогостоящим и требует соответствующих условий работы с клеточными культурами, поэтому в современной практике вытесняется серологическими и особенно молекулярно-генетическими методами диагностики.

В настоящее время вирусологические исследования в диагностических вирусологических лабораториях проводятся преимущественно методом ShellVial. Этот метод был разработан для диагностики цитомегаловируса (ЦМВ), но впоследствии был адаптирован и под другие вирусы. Для практического здравоохранения метод полезен в качестве подтверждающего, но его крайне сложно использовать для практической диагностики. Также разработана модификация этого метода, которая получила название «быстрый культуральный метод». Модификация заключается в сокультивировании исследуемых образцов и клеток культуры ткани с последующим выявлением вирусных белков в зараженных клетках в реакции иммунофлуоресценции (РИФ) с помощью поли- и моноклональных антител [15, 16].

Микроскопия, цитология и гистология

Вирусные инфекции редко диагностируются с помощью электронной микроскопии, хотя преимущества метода включают скорость, отсутствие требований к жизнеспособности вируса и возможность визуализации множества различных видов вирусных частиц. К недостаткам относятся стоимость и сложность обслуживания электронной микроскопии, высокие требования к оператору, выполняющему исследование и проводящему интерпретацию полученных результатов, и ограниченная чувствительность, связанная с относительно высокой концентрацией вирусных частиц, которая требуется для визуализации [17].

Хотя вирусные частицы, за исключением поксвирусов и других гигантских вирусов, не могут быть непосредственно визуализированы с помощью световой микроскопии, косвенные признаки вирусной инфекции могут быть обнаружены. Наиболее характерными признаками вирусной инфекции являются различные клеточные включения, многоядерные клетки и синцитиальные клетки (слияние нескольких клеток в одно гигантское образование с несколькими ядрами). Вирусные включения могут быть обнаружены в ядре или цитоплазме инфицированных клеток. Вирус простого герпеса, ЦМВ, аденовирусы, полиомавирусы, вирус кори и др. способны вызывать характерные цитологические и гистологические изменения, которые могут быть обнаружены в образцах клинического материала из дыхательных путей. Гистологическое исследование окрашенной ткани может предоставить уникальную информацию о роли вирусной инфекции в возникновении воспаления и повреждения тканей. Оно может быть крайне актуальным при дифференциальной диагностике между бессимптомной вирусной репликацией, активной инфекцией, протекающей с повреждением органов и тканей или поражением ткани другой природы — например, вследствие реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) после трансплантации аллогенных стволовых гемопоэтических клеток.

Методы на основе анализа нуклеиновых кислот

Революция в диагностике вирусных инфекций была совершена благодаря развитию молекулярно-биологических методов, направленных на обнаружение и исследование нуклеиновых кислот. В зависимости от последовательности-мишени результаты исследования могут быть специфичными для одного конкретного вида вируса или для группы родственных вирусов.

Это особенно актуально в детекции вирусов, для которых антигенное разнообразие препятствовало успешной диагностике. Например, для энтеровирусов не был доступен быстрый немолекулярный метод

обнаружения до изобретения ПЦР-анализа [18]. Данная группа методов обладает рядом преимуществ. Так, одно из них — это стабильность ДНК как анализируемого вещества, так как диагностика может быть осуществлена даже в тех случаях, когда условия транспортировки приводят к потере жизнеспособности вируса.

Полимеразная цепная реакция

В ПЦР используются короткие олигонуклеотидные праймеры и термостабильная ДНК-полимераза, такая как *Taq*-полимераза, для амплификации сегмента ДНК-мишени, длина которого обычно составляет от 100 до 1000 пар нуклеотидов (п. н.). Классическая ПЦР включает повторяющиеся циклы, каждый из которых состоит из трех этапов, выполняющихся при различных температурах: денатурации, отжига праймеров и достройки комплементарной цепи (элонгации, удлинения). После амплификации проводят детекцию продуктов реакции (ампликонов). Это может осуществляться различными методами. До начала XXI века использовался гель-электрофорез. Однако в настоящее время детекция продуктов реакции проводится одним из нескольких методов гибридизации зондов (например, молекулярные маяки или Саузерн-блоттинг). ПЦР обладает очень высокой аналитической чувствительностью и из-за своей простоты и относительно невысокой стоимости в настоящее время остается наиболее широко используемым методом.

Большая часть ПЦР-исследований в диагностических вирусологических лабораториях проводится с использованием ПЦР в реальном времени, при которой продукты реакции обнаруживаются по мере их синтеза [19]. Имеется довольно широкий спектр доступного оборудования для проведения данных исследований. По сравнению с классической, ПЦР в реальном времени обладает рядом важных преимуществ. Во-первых, не требуется отдельного метода обнаружения продуктов реакции (например, электрофорез в агарозном геле), что значительно сокращает время анализа и снижает риск загрязнения лабораторной среды ампликонами. Это в свою очередь ускоряет исследование и устраняет необходимость в дополнительном лабораторном помещении. Во-вторых, использование нескольких флуоресцентных красителей с различными длинами волн излучения позволяет проводить мультиплексные реакции с одновременным детектированием более чем одного продукта. Очень важно, что количественная оценка мишеней для ПЦР также возможна, поскольку генерируемая флуоресценция пропорциональна количеству продукта ПЦР. Для обнаружения продуктов в режиме реального времени обычно используется один из трех методов, хотя совсем недавно были внедрены и другие

методы обнаружения. В простейшей системе используется ДНК-связывающий краситель SYBR Green, который испускает флуоресценцию, когда он связывается с двуцепочечной ДНК (дцДНК), соответственно интенсивность флуоресценции пропорциональна количеству продукта ПЦР. Однако SYBR Green неспецифически связывается с любой дцДНК, поэтому может регистрироваться сигнал от нежелательных продуктов амплификации, таких как димеры праймеров.

Анализ кривой плавления может помочь различить флуоресценцию от искомого и от нежелательного продукта амплификации. Данный анализ проводят после завершения реакции амплификации путем регистрации флуоресценции по мере постепенного повышения температуры реакционной смеси. При достижении точки плавления продукта реакции дцДНК выделяется SYBR Green и флуоресценция уменьшается. На температуру плавления влияют как длина, так и последовательность продукта ПЦР, и таким образом она точно определяется для конкретного продукта ПЦР. Нежелательные продукты амплификации обычно имеют иные температуры плавления, что позволяет легко отличить их от предполагаемого продукта ПЦР.

Другие системы детекции основаны на использовании олигонуклеотидных зондов, меченных флуоресцентными красителями, которые взаимодействуют друг с другом в соответствии с принципами резонансной передачи энергии флуоресценции. Для ПЦР с использованием гибридизированных зондов требуется два олигонуклеотидных зонда, которые гомологичны соседним участкам одной из цепей ДНК. Зонды подбирают таким образом, чтобы 5'-конец одного зонда находился в пределах нескольких нуклеотидов от 3'-конца другого зонда. Каждый из этих смежных концов помечен флуоресцентным красителем. Краситель на 3'-конце называется донорным красителем, а краситель на 5'-конце называется акцепторным красителем. Когда красители находятся в непосредственной близости (на расстоянии нескольких нуклеотидов), возбуждение донорного красителя приводит к испусканию света акцепторным красителем. Когда оба зонда связываются со своими последовательностями-мишенями, два красителя находятся в пределах близости, необходимой для возбуждения акцепторного красителя, и возникает флуоресценция. Интенсивность флуоресценции пропорциональна количеству продукта ПЦР.

Другой системой, основанной на взаимодействии флуоресцентных красителей, является так называемая система Taqman. В этом случае используется зонд, комплементарный сегменту искомого ПЦР-продукта, расположенному между парой ПЦР-праймеров. Этот зонд помечен двумя флуоресцентными красителями, один из которых называется репортерным и связан с 5'-концом зонда, а другой называется

гасителем и связан с 3'-концом. Когда они находятся в непосредственной близости, гаситель предотвращает флуоресценцию репортера. Во время элонгации 5'-экзонуклеазная активность Taq-полимеразы расщепляет нуклеотиды с 5'-конца связанного зонда, высвобождая репортерный краситель от гасителя, что позволяет ему излучать свет. Как и в анализе с использованием гибридизационного зонда, интенсивность флуоресценции пропорциональна количеству продукта ПЦР. Это наиболее популярные виды меток для ПЦР в реальном времени, но есть и другие: молекулярные маяки, «скорпион» и др.

ПЦР с обратной транскрипцией

В качестве субстрата Taq-полимераза использует только молекулы ДНК. Геном же большей половины вирусных агентов представлен молекулой РНК. Тем не менее метод ПЦР применим и для диагностики таких вирусных агентов. В этом случае требуется включение стадии обратной транскрипции перед ПЦР (отПЦР). Реакцию обратной транскрипции можно провести с использованием специального фермента, такого как ревертаза вируса мышинного лейкоза Молони или ревертаза вируса миелобластома птиц. В качестве альтернативы в настоящее время доступны термостабильные многофункциональные ферменты, такие как рекомбинантная ДНК-полимераза бактерии *Thermus thermophilus*, которые могут проводить как обратную транскрипцию, так и ДНК-полимеразные реакции.

В дополнение к обнаружению вирионной РНК, отПЦР также может быть применена для обнаружения вирусной матричной РНК (мРНК), что может быть особенно полезно при диагностике инфекции, вызываемой вирусами, которые имеют латентную фазу в своем жизненном цикле. Для этих вирусов обнаружение вирусной ДНК не говорит о наличии продуктивной инфекции, тогда как обнаружение мРНК, экспрессируемой только при продуктивной инфекции, будет свидетельствовать об активной вирусной инфекции.

Альтернативные методы амплификации нуклеиновых кислот

Кроме описанных методов амплификации участков ДНК, существуют и другие. Например, метод разветвленной ДНК (рДНК) [20]. Реакция проводится на твердой фазе, покрытой зондами, комплементарными анализируемой нуклеиновой кислоте. Следующая серия комплементарных ДНК-зондов связывает анализируемую нуклеиновую кислоту с синтетическими молекулами разветвленной ДНК, каждая из которых несет повторяющиеся нуклеотидные последовательности для связывания с мечеными зондами, что приводит к усилению сигнала. Хемилюминесцентная подложка позволяет обнаруживать мишень, а измерение интенсивности излучаемого света позволяет точно определить ко-

личество вводимой мишени. Поскольку сама мишень не амплифицируется, эта реакция менее восприимчива к контаминации, чем ПЦР.

Контаминация при ПЦР

Общей проблемой, связанной с высокочувствительными реакциями амплификации нуклеиновых кислот, является возникновение ложноположительных результатов вследствие загрязнения реакции экзогенными нуклеиновыми кислотами. Источником загрязнения могут быть ампликоны — продукты предыдущих реакций, вирусные нуклеиновые кислоты, присутствующие в другом образце, особенно если он содержит высокий уровень предполагаемой мишени.

Предотвращение контаминации требует скрупулезного внимания к процедурным деталям в лаборатории. Для предотвращения остаточного загрязнения после ПЦР широко используется ряд специфических профилактических методов, включая использование наконечников для пипеток с аэрозольным фильтром, ультрафиолетовое облучение компонентов реакции (не включая Taq-полимеразу и праймеры для ПЦР, которые могут быть инаktivированы ультрафиолетовым облучением), использование небольших рабочих аликвот, частую чистку оборудования и лабораторных поверхностей и применение средств, разрушающих ампликоны.

Важной мерой предосторожности является физическое разделение лаборатории на секции, где подготавливается образец, проводится реакция ПЦР, осуществляется детекция продуктов амплификации. После проведения ПЦР реакционную пробирку открывают только в той части лаборатории, которая предназначена для определения продукта, либо не открывают вовсе, если детекция проводится в ней же. ПЦР в реальном времени менее подвержена контаминации, поскольку для обнаружения продукта не требуются дальнейшие манипуляции с амплифицированным продуктом. Дополнительной проблемой является контаминация одного образца другим, которая может произойти при работе с образцами в лаборатории. В связи с этим необходимо использовать отрицательный контроль, чтобы определить этот тип контаминации.

Секвенирование

Секвенирование продуктов ПЦР-амплификации может быть проведено для нескольких целей, включая точную идентификацию вируса, генотипирование и определение наличия мутаций, связанных с устойчивостью к противовирусным препаратам или повышенной вирулентностью патогена. Анализы генотипической устойчивости чаще всего проводятся для ВИЧ, ЦМВ, ВГВ и вируса гриппа А.

В случае ВГВ нуклеотидное секвенирование гена нуклеокапсида и связанного с ним промотора также используется для выявления мутаций, которые были связаны с тяжелым течением заболевания и прогрессированием в хроническую инфекцию [21]. Секвенирование нового поколения (NGS), вероятно, найдет важное применение в диагностической вирусологии, в том числе для тестирования чувствительности к противовирусным препаратам, для идентификации вирусов, растущих в культуре клеток, которые невозможно идентифицировать обычными средствами [22], а также для обнаружения известных и новых вирусов [23].

Методы на основе микрочипов

Крайне перспективным направлением развития лабораторной диагностики являются технологии, базирующиеся на микрочипах. Последние состоят из сотен или тысяч олигонуклеотидных зондов, связанных с твердой фазой (положение и состав олигонуклеотидов при этом заранее известен). Амплифицированная нуклеиновая кислота связывается со специфическими зондами, что позволяет очень быстро определить нуклеотидную последовательность или обнаружить варианты последовательности, присутствующие в образце. Технология микрочипов потенциально позволяет одновременно обнаруживать множество возбудителей инфекционных заболеваний как вирусной, так и невирусной природы. Основным применением технологии микрочипов в диагностической вирусологии на сегодняшний день является одновременное обнаружение нескольких респираторных вирусов.

Серологические исследования

Измерение уровня противовирусных антител было одним из первых методов, использованных для специфической диагностики вирусных инфекций, и остается важным инструментом в диагностической вирусологической лаборатории. Роль серологии может заключаться в диагностике острой инфекции или в определении гуморального ответа на вирусную инвазию. Серологический профиль выработки противовирусных антител во многих случаях позволяет определить фазу инфекции. Антитела IgM часто обнаруживаются в течение короткого периода времени до появления вирусоспецифических антител IgG. Концентрация IgM имеет тенденцию к снижению примерно в течение 1—2 месяцев, хотя при некоторых вирусных инфекциях низкие уровни могут сохраняться в течение 1 года и более. Антитела IgG гораздо более долговечны и могут сохраняться в крови в течение всей жизни человека. Такие антитела называют анамнестическими. Альтернативный серологический подход к диагностике инфекции основан на концеп-

ции, согласно которой аффинность антител возрастает по мере созревания иммунного ответа [24]. Таким образом, антитела, вырабатываемые вскоре после заражения, обладают низким сродством к возбудителю, а антитела, вырабатываемые на поздних этапах заражения, обладают высокой аффинностью. Обнаружение низкоаффинных антител использовалось для диагностики инфекции краснухи [25] и ВИЧ [26].

Взаимосвязь между началом клинических проявлений инфекции и наличием вирусоспецифических антител зависит от инкубационного периода инфекции. При инфекциях с коротким инкубационным периодом (например, при ОРВИ) антитела отсутствуют при появлении симптомов. Однако у вирусов с инкубационным периодом 1 месяц или дольше вирусоспецифические антитела IgG и IgM обычно присутствуют при появлении симптомов. Серологический профиль при повторном заражении и реактивации эндогенного вируса более сложен, чем при диагностике первичной инфекции. В обоих этих случаях инфекция возникает у человека с уже существующими антителами IgG. При повторном заражении может возникнуть антительный ответ, который приводит к повышению уровня вирусоспецифических антител IgG при продолжающемся отсутствии вирусоспецифических антител IgM. Реактивация латентной инфекции, например в случае некоторых герпесвирусных инфекций, может привести к появлению вирусоспецифических антител IgM, а также IgG.

Интерпретация серологических данных уникальна для вирусов, которые обычно вызывают хроническую инфекцию (например, ВИЧ), и родственных ретровирусов — вирусов Т-клеточной лимфомы/лейкоза (HTLV) 1-го и 2-го типов. Обнаружение антител любого изотипа к этим вирусам (при отсутствии искусственной иммунизации) практически всегда указывает на текущую инфекцию. В случае ВГС подтвержденное наличие антител к вирусу соответствует активной инфекции примерно у 85% людей. Однако после успешной противовирусной терапии ВГС может наблюдаться элиминация вируса из организма, при этом наличие антител может сохраняться еще несколько лет.

Наиболее широко используемым серологическим методом детекции является иммуоферментный анализ (ИФА). Для этого метода вирусный антиген, полученный из лизата инфицированных вирусом клеток, очищенного вирусного препарата или рекомбинантного вирусного белка, прикрепляется к твердой поверхности (например, к поверхности лунок иммунологического планшета). Далее вносится исследуемый образец, проводится инкубация. Следующим шагом добавляется второе антитело, обладающее специфичностью к иммуноглобулинам человека, которое обычно представляет собой мышинное моноклональное или поликлональное антитело не человеческого вида, конъюгиро-

ванное с пероксидазой хрена. Это противовидовое антитело связывается с любым присутствующим человеческим антителом. Его присутствие обнаруживают на основе колориметрического, радиометрического или флуоресцентного сигнала. Важным преимуществом ИФА является его относительная простота, возможность модификации и автоматизации метода.

Однако использование ИФА, как и любого другого метода диагностики, имеет свои ограничения, особенно при проведении вирусной диагностики у пациентов с заболеваниями системы крови. Так, важно помнить, что у пациентов данной категории часто наблюдается гуморальный иммунодефицит (дисгаммаглобулинемия). При этом синтез иммуноглобулинов может быть снижен вследствие нарушения функции или снижения количества В-лимфоцитов по многим причинам: из-за гематологического заболевания, вследствие применения таргетной терапии (например, ритуксимаба), в раннем периоде после трансплантации гемопоэтических клеток. В этом случае ИФА-диагностика может давать ложноотрицательные результаты. Реципиентам аллогенных стволовых гемопоэтических клеток в раннем посттрансплантационном периоде проведение серологических исследований не показано. С другой стороны, пациенты с заболеваниями системы крови часто являются реципиентами множественных трансфузий компонентов донорской крови или потребителями препаратов из нее. В этом случае результат тоже может быть некорректным.

Вестерн-блоттинг

Одним из вариаций серологических реакций является вестерн-блоттинг. Он позволяет идентифицировать антитела к отдельным специфическим вирусным белкам. При вестерн-блоттинге вирусные антигены, присутствующие в инфицированных клетках, денатурируют, разделяют с помощью гель-электрофореза, переносят на мембрану и дают им вступить в реакцию с исследуемым образцом. Связывание противовирусных антител обнаруживается с помощью меченых детекторных антител. Вестерн-блоттинг является довольно сложным, но высокоспецифичным методом благодаря способности идентифицировать связывание с отдельными вирусными белками. Таким образом, его основным применением в диагностических лабораториях является подтверждение результатов скрининговых анализов, которые являются менее специфичными. Например, вестерн-блот широко используется для подтверждения положительного результата на ВИЧ.

Рекомбинантный иммуносвязывающий анализ отличается от вестерн-блоттинга тем, что специфические вирусные антигены продуцируются в системах экспрессии *in vitro* и искусственно прикрепляются

к мембранам в заранее определенной конфигурации, часто в виде точек или полос. Затем мембраны инкубируют с сывороткой и обнаруживают связанные антитела, как при вестерн-блоттинге. Поскольку антигены, используемые в иммуносвязывающем анализе, не денатурируются, как при обычном вестерн-блоттинге, эти анализы могут иметь преимущества при обнаружении антител к конформационным эпитопам. Для подтверждения положительных результатов на ВГС используется рекомбинантный иммуносвязывающий анализ.

Исследования, связанные с противовирусными препаратами

В последние годы были лицензированы противовирусные препараты для лечения различных вирусных инфекций: гриппа А и В, ВИЧ-инфекции, гепатитов В и С, а также инфекций, вызываемых вирусами простого герпеса, ветряной оспы / опоясывающего лишая, ЦМВ, респираторным синцитиальным вирусом и пр. Все более широкое применение этих препаратов сопровождается появлением устойчивости у вирусов к противовирусным препаратам. В связи с этим для оптимального лечения пациента может потребоваться тестирование на резистентность.

Тестирование на восприимчивость к противовирусным препаратам делится на фенотипические и генотипические методы. Фенотипические методы анализируют влияние противовирусных препаратов на репликацию вируса, которое может быть измерено по инфекционности, продукции вирусного антигена или нуклеиновой кислоты или влиянию на активность вирусного фермента, такого как нейраминидаза гриппа.

Фенотипические анализы (наблюдение за культурой клеток, зараженной вирусом, при нанесении различных концентраций противовирусного препарата) важны, поскольку они непосредственно измеряют влияние противовирусных препаратов на репликацию вируса. Кроме того, они более универсальны, чем генотипические анализы, поскольку их можно использовать, когда генетическая основа резистентности неизвестна. Фенотипические анализы также полезны при анализе вирусов, у которых наличие множественных мутаций затрудняет прогнозирование фенотипа на основе генотипических данных (ВИЧ). Наконец, для определения значимости мутаций, обнаруженных в изолятах с лекарственной устойчивостью, необходимо использовать фенотипические анализы.

Однако с практической точки зрения фенотипические анализы, как правило, являются трудоемкими, медленными и плохо стандартизированными. Кроме того, существует теоретическое опасение, что рост вируса в культуре клеток может привести к отбору нерепрезентатив-

ных вирусных вариантов, особенно потому, что устойчивость к противовирусным препаратам в некоторых случаях может быть связана со снижением приспособленности вируса. По этим причинам фенотипические анализы не проводятся в большинстве диагностических вирусологических лабораторий.

Генотипические анализы проверяют генетическую основу устойчивых фенотипов. Используются различные методы, включая обнаружение полиморфизмов длины рестрикционных фрагментов, ПЦР-анализы, которые обнаруживают мутации благодаря дифференциальному связыванию праймера или зонда, и секвенирование. Генотипические анализы информативны только тогда, когда известна генетическая основа резистентности, и наиболее полезны, когда оцениваемая резистентность обусловлена ограниченным числом генетических изменений. Подобные анализы наиболее широко используются для ЦМВ, ВИЧ, ВГВ и вируса гриппа А.

Перспективы развития методов лабораторной диагностики вирусных инфекций

Диагностическая вирусология переживает критический момент в своей истории. Выявление респираторных вирусов; диагностика и мониторинг вирусных инфекций, особенно вызванных ЦМВ, вирусами Эпштейна—Барр и ВК у пациентов с ослабленным иммунитетом; тестирование вирусной нагрузки и чувствительности к противовирусным препаратам — все это становится рутинной диагностической практикой.

Скорость разработки стандартизированных валидированных коммерческих молекулярных тестов высока, накопление знаний о вирусном процессе значительно расширяет возможности медицинской вирусологии.

В будущем анализы для выявления присутствия вирусов, возможно, потребуются комбинировать с анализами для оценки биомаркеров, которые предоставляют информацию о том, как организм реагирует на присутствие вируса. Возможно, потребуются оценка генетических маркеров, чтобы помочь определить, как конкретный пациент может отреагировать на вирусную инфекцию и ее лечение.

Нормативная документация, регламентирующая лабораторную диагностику вирусных инфекций

Лабораторная диагностика вирусных инфекций, как любой вид медицинской помощи, регламентируется множеством нормативно-правовых актов. Ниже приведен список документов, регламентирующих ла-

бораторную диагностику вирусных инфекций, актуальных на момент выхода данной книги.

- Федеральный закон от 21.11.2011 № 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации».
- Федеральный закон от 30.03.1999 № 52-ФЗ (ред. от 04.11.2022, с изм. от 30.05.2023) «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения».
- Федеральный закон от 20.07.2012 № 125-ФЗ (ред. от 28.06.2022) «О донорстве крови и ее компонентов».
- Приказ МЗ РФ от 20.10.2020 № 1128н «О порядке предоставления информации о реакциях и об осложнениях, возникших у реципиентов в связи с трансфузией (переливанием) донорской крови и (или) ее компонентов, в уполномоченный федеральный орган исполнительной власти, осуществляющий функции по организации деятельности службы крови». Зарегистрирован в Минюсте России 06.11.2020, № 60773.
- Приказ МЗ РФ от 20.10.2020 № 1129н «Об утверждении правил проведения обязательного медицинского освидетельствования на выявление вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-инфекции)». Зарегистрирован в Минюсте России 11.11.2020, № 60847.
- Приказ МЗ РФ от 26.10.2020 № 1148н «Об утверждении требований к организации системы безопасности деятельности субъектов обращения донорской крови и (или) ее компонентов при заготовке, хранении, транспортировке и клиническом использовании донорской крови и (или) ее компонентов». Зарегистрирован в Минюсте России 24.11.2020, № 61083.
- Приказ Министерства экономического развития Российской Федерации от 14.02.2020 № 66 «Об утверждении Формы федерального статистического наблюдения с указаниями по ее заполнению для организации Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Федерального статистического наблюдения за санитарно-эпидемиологической ситуацией по ВИЧ-инфекции в Российской Федерации».
- Приказ Министерства труда и соцзащиты РФ от 11.12.2020 № 885н «Об утверждении перечня отдельных профессий, производств, предприятий, учреждений и организаций, работники которых проходят обязательное медицинское освидетельствование для выявления ВИЧ-инфекции при проведении обязательных предварительных при поступлении на работу и периодических медицинских осмотров».
- Приказ Минздрава России от 28.10.2020 № 1166н «Об утверждении порядка прохождения донорами медицинского обследования и перечня медицинских противопоказаний (временных и постоянных)

для сдачи крови и (или) ее компонентов и сроков отвода, которому подлежит лицо при наличии временных медицинских показаний, от донорства крови и (или) ее компонентов».

- Приказ Минздрава России от 29.07.2022 № 519н «Об утверждении Порядка проведения медицинского обследования донора, давшего письменное информированное добровольное согласие на изъятие своих органов и (или) тканей для трансплантации». Зарегистрирован в Минюсте России 30.08.2022, № 69838.
- Приказ Минздрава России от 27.10.2020 № 1157н «Об утверждении унифицированных форм медицинской документации, в том числе в форме электронных документов, связанных с донорством крови и (или) ее компонентов и клиническим использованием донорской крови и (или) ее компонентов, и порядков их заполнения».
- ОСТ 91500.13.0001-2003 «Правила проведения внутрилабораторного контроля качества количественных методов клинических лабораторных исследований с использованием контрольных материалов».
- Постановление Главного государственного санитарного врача РФ от 28.01.2021 № 4 (ред. от 25.05.2022) Об утверждении санитарных правил и норм СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней» (вместе с СанПиН 3.3686-21 «Санитарные правила и нормы...»).
- Письмо Роспотребнадзора от 28.04.2023 № 02/6959-2023-30 «О стандартных операционных процедурах».
- Постановление Правительства РФ от 22.06.2019 № 797 «Об утверждении Правил заготовки, хранения, транспортировки и клинического использования донорской крови и ее компонентов и о признании утратившими силу некоторых актов Правительства Российской Федерации».
- Методические рекомендации № 21 «Профилактика профессионального заражения ВИЧ-инфекцией медицинских работников скорой и неотложной медицинской помощи» (утв. руководителем Департамента здравоохранения г. Москвы 14.04.2004) (вместе с «Перечнем медикаментов и предметов общемедицинского назначения мини-укладки для оказания первой медицинской помощи»).
- Письмо Минздрава России от 05.04.2023 № 21-5/И/1-5672 «О направлении Методических рекомендаций для населения и медицинских работников по вопросам профилактики заражения и распространения хронического вирусного гепатита С» (вместе с «Методическими рекомендациями для населения по профилактике вирусного гепатита С», «Методическими рекомендациями для медицинских работников по профилактике вирусного гепатита С»). Зарегистрировано в Минюсте России 15.02.2021 № 62500.

- САНПИН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».
- Стандарт GLP — система норм, правил и указаний, направленных на обеспечение согласованности и достоверности результатов лабораторных исследований.

Лабораторная диагностика вирусных инфекций у доноров

Лабораторная диагностика вирусных инфекций у доноров крови и ее компонентов

Заготовка компонентов крови для реципиентов, находящихся в состоянии иммунодепрессии, в частности для пациентов гематологических стационаров, должна осуществляться с повышенными требованиями, предъявляемыми к вирусной безопасности компонентов крови.

Для реализации заражения при переливании компонентов донорской крови необходимо сочетание ряда факторов, таких как наличие возбудителя инфекции в крови донора в момент донации, невозможность выявить его имеющимися в настоящий момент в арсенале лаборатории способами и сохранение его жизнеспособности в условиях процессинга и производства компонентов и препаратов крови. Существенной частью комплекса мер по обеспечению вирусной безопасности переливания крови является ее лабораторный аспект, то есть качество и адекватность исследования образцов крови доноров на содержание вирусных патогенов.

Медицинское обследование донора проводится при наличии информированного добровольного согласия донора на медицинское обследование и донацию крови и (или) ее компонентов с соблюдением требований, установленных статьей 20 Федерального закона от 21.11.2011 № 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» и в соответствии Приказом Минздрава России от 28.10.2020 № 1166н.

Медицинская сестра во время донации осуществляет отбор образцов крови доноров для выявления маркеров ВИЧ, ВГВ, ВГС и возбудителя сифилиса непосредственно из системы контейнера без наруше-

ния целостности или из специального контейнера-спутника для проб, имеющегося в составе этой системы, в вакуумные одноразовые пробирки, соответствующие применяемым методикам лабораторных исследований. Сифилис не является вирусной инфекцией, поэтому его лабораторная диагностика у доноров крови и ее компонентов в данном разделе рассматриваться не будет.

Не допускается открытие пробирок с образцами крови до момента доставки их на исследование в лабораторию. Медицинский лабораторный техник (или лаборант) осуществляет транспортировку пробирок с образцами крови в лабораторию в специальных контейнерах при температуре от +2 до +24 °С при условии недопущения прямого воздействия света. Пробирки с образцами крови подвергаются центрифугированию, режим которого определяется инструкциями к медицинским изделиям (наборам реагентов). Образцы крови донора до проведения лабораторных исследований хранятся в условиях, отвечающих требованиям, установленным в эксплуатационной документации производителя (изготовителя) медицинского изделия, предназначенного для лабораторных исследований (набора реагентов).

В целях выявления маркеров ВИЧ, ВГВ и ВГС применяются иммунологические (ИФА или иммунохемилюминесцентный анализ — ИХЛА) и молекулярно-биологические методы (ПЦР), реализованные в наборах реагентов, зарегистрированных в соответствии с постановлением Правительства Российской Федерации от 27.12.2012 № 1416 «Об утверждении Правил государственной регистрации медицинских изделий».

Все образцы донорской крови подлежат обязательному иммунологическому исследованию на наличие:

- антител к ВИЧ-1 и ВИЧ-2 и антигена p24 ВИЧ-1;
- поверхностного антигена ВГВ (HBsAg);
- антител к ВГС (анти-ВГС).

Для реципиентов компонентов донорской крови, находящихся в состоянии иммунодефицита, в частности для пациентов гематологических стационаров, рекомендовано также исследование донорской крови на наличие антител к ядерному антигену ВГВ (анти-HBc).

Результат исследования образца донорской крови считается «отрицательным» и подлежит молекулярному исследованию в случае получения отрицательных результатов во всех иммунологических тестах.

В случае получения положительного или неопределенного результата иммунологического исследования образца донорской крови врач клинической лабораторной диагностики организует проведение повторного иммунологического исследования с сохранением условий первой постановки, включая реагенты. Донорская кровь и ее компо-

ненты, полученные во время данной донации, не подлежат клиническому использованию до момента получения отрицательных результатов повторных лабораторных исследований.

Результат исследования образца донорской крови считается «отрицательным» в случае получения положительного или сомнительного результата в первой постановке и дважды отрицательного результата при повторных исследованиях.

В случае получения повторного положительного или неопределенного результата иммунологического исследования образца донорской крови компоненты крови, заготовленные от данной донации, идентифицируются, незамедлительно изымаются и признаются непригодными. Врач клинической лабораторной диагностики оформляет в лабораторной информационной системе медицинской организации (далее — ЛИС) донору временный отвод с формулировкой «задержан лабораторией». Все компоненты крови данного донора, находящиеся на хранении, не подлежат клиническому использованию до момента получения отрицательных результатов подтверждающих лабораторных исследований.

В случае получения положительного или неопределенного повторного результата исследования на наличие маркеров ВИЧ врач клинической лабораторной диагностики организует направление образца донорской крови в региональный центр профилактики и борьбы со СПИДом для подтверждающего исследования.

В случае получения положительного или неопределенного повторного результата исследования образца донорской крови на наличие HBsAg и/или анти-ВГС образец донорской крови при необходимости может быть исследован в подтверждающих тестах — ИФА/ИХЛА с нейтрализацией и иммуноблоттинг/ИФА-спектр (соответственно). Анти-НВс положительные образцы для уточнения специфичности положительной реакции могут быть дополнительно исследованы на наличие анти-НВс IgM, анти-НВс и антител к е-антигену вируса гепатита В (анти-НВе).

В случае получения положительного результата при повторном исследовании и/или в подтверждающих тестах (в том числе из центра профилактики и борьбы со СПИДом) все единицы донорской крови и (или) ее компонентов, заготовленные от этого донора, идентифицируются, незамедлительно изымаются и признаются непригодными; проводится заседание рабочей группы по вопросам отстранения от донорства крови и ее компонентов, донору оформляется постоянный отвод, решение отражается в медицинской карте донора (форма № 406/у).

В случае получения неопределенного результата при повторном исследовании и/или отрицательного результата дополнительного тести-

рования и/или в подтверждающих тестах (в том числе из центра профилактики и борьбы со СПИДом) донору оформляется временный отвод сроком на 120 календарных дней с последующим повторным исследованием на основании решения рабочей группы по вопросам отстранения от донорства крови и ее компонентов. Исследование повторяют спустя 120 и более календарных дней:

В случае получения положительного или неопределенного результата исследования все компоненты донорской крови и (или) ее компонентов, заготовленные от этого донора, идентифицируются, незамедлительно изымаются и признаются непригодными; проводится заседание рабочей группы по вопросам отстранения от донорства крови и ее компонентов, донору оформляется постоянный отвод, решение отражается в медицинской карте донора (форма № 406/у).

В случае получения отрицательного результата последующего иммунологического исследования компоненты крови, находящиеся на хранении, считаются пригодными для клинического применения, временный медицинский отвод снимается, а донор допускается до последующих донаций.

Молекулярно-биологическое исследование проводят с целью выявления РНК ВИЧ, ВГС и ДНК ВГВ либо в формате индивидуального тестирования параллельно с иммунологическими исследованиями, либо в формате минипулов для образцов с отрицательными результатами иммунологических исследований.

В случае получения положительного результата молекулярно-биологического исследования в формате индивидуального тестирования проводят повторное исследование с сохранением условий первой постановки, включая реагенты. Донорская кровь и ее компоненты, полученные во время данной донации, не подлежат клиническому использованию до момента получения отрицательных результатов повторных лабораторных исследований.

В случае получения последовательно двух отрицательных результатов повторного молекулярно-биологического исследования исследуемый образец крови донора считается «отрицательным».

В случае получения повторного положительного результата молекулярно-биологического исследования все единицы донорской крови и (или) ее компонентов, заготовленные от этого донора, идентифицируются, незамедлительно изымаются и признаются непригодными; проводится заседание рабочей группы по вопросам отстранения от донорства крови и ее компонентов, донору оформляется постоянный отвод, решение отражается в медицинской карте донора (форма № 406/у). Врач клинической лабораторной диагностики организует направление пробы с повторным положительным результатом молекулярно-биоло-

гического исследования на наличие РНК ВИЧ в центр профилактики и борьбы со СПИДом для подтверждающего исследования.

В случае получения положительного результата при молекулярно-биологическом исследовании в формате минипулов результат считается «промежуточным». Донорская кровь и ее компоненты, полученные во время данной донации, образцы которой вошли в положительный минипул, не подлежат клиническому использованию до момента получения отрицательных результатов повторных лабораторных исследований.

Проводят индивидуальное исследование всех образцов, входящих в минипул. Выявленный «положительный» образец при индивидуальном исследовании считается «положительным», все единицы донорской крови и (или) ее компонентов, заготовленные от этого донора, незамедлительно изымаются и признаются непригодными; проводится заседание рабочей группы по вопросам отстранения от донорства крови и ее компонентов, донору оформляется постоянный отвод, решение отражается в медицинской карте донора (форма № 406/у). Все остальные образцы, входившие в положительный минипул, считаются «отрицательными».

Проводят повторное исследование в случае отрицательного результата всех образцов при индивидуальном молекулярно-биологическом исследовании образцов крови, ранее входивших в минипул. В случае повторного отрицательного результата индивидуального молекулярно-биологического исследования образцы крови доноров считаются «отрицательными».

Компоненты крови, образцы которых признаны «отрицательными» по всем исследуемым инфекционным маркерам, считаются пригодными для клинического применения.

В случае выявления нарушений при отборе образцов крови доноров и выполнении лабораторных исследований, указанных в настоящем Порядке, нарушении идентификации образцов крови доноров все единицы донорской крови и (или) ее компонентов, заготовленные от установленной донации, изымаются и признаются непригодными.

Лабораторная диагностика вирусных инфекций у доноров костного мозга и стволовых гемопоэтических клеток

Лабораторная диагностика вирусных инфекций у доноров костного мозга и гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) может проводиться на этапах подбора донора и непосредственно перед заготовкой ГСК и регламентирована п. 7.3 Приказа Минздрава России от 29.07.2022 № 519н «Об утверждении Порядка проведения медицинского обследо-

вания донора, давшего письменное информированное добровольное согласие на изъятие своих органов и (или) тканей для трансплантации».

Образцы крови донора до проведения лабораторных исследований хранятся в условиях, отвечающих требованиям, установленным в эксплуатационной документации производителя (изготовителя) медицинского изделия, предназначенного для лабораторных исследований (набора реагентов). Пробирки с образцами подвергаются центрифугированию, режим которого определяется инструкциями к медицинским изделиям (наборам реагентов).

В целях выявления маркеров ВИЧ, ВГВ и ВГС применяются иммунологические (ИФА, ИХЛА) и молекулярно-биологические методы, реализованные в наборах реагентов, зарегистрированных в соответствии с постановлением Правительства Российской Федерации от 27.12.2012 № 1416 «Об утверждении Правил государственной регистрации медицинских изделий».

Все образцы крови доноров костного мозга и ГСК подлежат обязательному исследованию на наличие:

- антител к ВИЧ-1 и ВИЧ-2 и антигена р24 ВИЧ-1;
- HBsAg;
- анти-ВГС;
- РНК ВИЧ;
- ДНК ВГВ;
- РНК ВГС.

В ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России доноров костного мозга и ГСК дополнительно обследуют на наличие следующих маркеров ВГВ:

- анти-НВс;
- анти-НВs;
- анти-НВе.

Результат исследования образца крови донора ГСК считается «отрицательным» в случае получения отрицательных результатов по всем вирусным маркерам (кроме анти-НВs).

В случае получения положительного или неопределенного результата исследования образца крови (кроме анти-НВs) врач клинической лабораторной диагностики организует проведение повторного исследования с сохранением условий первой постановки, включая реагенты.

Результат исследования образца крови донора костного мозга и ГСК считается «отрицательным» в случае получения положительного или сомнительного результата в первой постановке и дважды отрицательного результата при повторных исследованиях.

В случае получения положительного или неопределенного повторного результата исследования на наличие маркеров ВИЧ врач клини-

ческой лабораторной диагностики организует направление образца донорской крови в центр профилактики и борьбы со СПИДом для подтверждающего исследования.

В случае получения положительного или неопределенного повторного результата исследования образца донорской крови на наличие HBsAg и/или анти-ВГС образец донорской крови при необходимости может быть исследован в подтверждающих тестах — ИФА/ИХЛА с нейтрализацией и иммуноблот/ИФА-спектр (соответственно). Анти-НВс положительные образцы могут быть дополнительно исследованы на наличие анти-НВс IgM. Наличие в образце крови донора анти-НВс и/или анти-НВе свидетельствует о инфицировании донора данным вирусом.

В случае получения повторного положительного или неопределенного результата исследования образца крови врач клинической лабораторной диагностики информирует лечащего врача пациента, которому предполагалась трансплантация костного мозга или ГСК от данного донора, о полученных результатах вирусологического обследования. Лечащий врач решает вопрос о пригодности для использования костного мозга или ГСК от данного донора.

Лабораторная диагностика вирусных инфекций у пациентов с заболеваниями системы крови

Как было сказано выше, инфекции, возникающие у пациентов с заболеваниями системы крови, можно условно разделить на экзогенные и эндогенные. Далее эти кластеры будут рассмотрены отдельно.

Лабораторная диагностика экзогенных вирусных инфекций

Пациенты с заболеваниями системы крови являются группой высокого риска вероятного инфицирования гемотрансмиссивными вирусами, такими как ВГВ, ВГС, ВИЧ-1 и ВИЧ-2. Инфицирование перечисленными вирусами возможно при медицинских манипуляциях: переливании крови или ее компонентов, пересадке органов или тканей, процедуре гемодиализа, через медицинские инструменты для парентеральных вмешательств и другие медицинские изделия, контаминированные ВГВ и ВГС, также при эндоскопических манипуляциях и других диагностических и лечебных процедурах, в ходе проведения которых существует риск нарушения целостности кожных покровов или слизистых оболочек. Возможна передача ВГВ в быту посредством совместного использования контаминированных вирусом различных предметов гигиены, в том числе бритвенных и мани-

кюрных принадлежностей, зубных щеток, полотенец, ножниц, при этом передача вируса возможна при отсутствии на предметах видимой крови. Инфицирование ВГС в данных случаях происходит крайне редко. В ряде случаев гематологические заболевания требуют дифференциального диагноза с ВИЧ-инфекцией.

Актуальность проблемы гемотрансмиссивных инфекций у пациентов с заболеваниями системы крови определяется вероятностью реактивации вирусов, находящихся в организме в латентном состоянии [11—14, 36]. Рекомендовано проведение профилактики гепатита В у HBsAg-отрицательных пациентов, которые являются реципиентами костного мозга от анти-HBc позитивных доноров: либо вакцинация, либо введение специфического иммуноглобулина, прием ламивудина или применение обоих препаратов. Но эти меры могут быть эффективны в предотвращении *de novo* инфекции и недостаточны при наличии латентного гепатита В у реципиента [27, 34]. Профилактика реактивации ВГС у пациентов с заболеваниями системы крови на этапах программной терапии затруднительна в связи с нарушениями иммунитета [28, 35].

Вероятность обнаружения у гематологических больных сочетанного инфицирования ВГС и ВГВ в 3 раза выше, чем вероятность их изолированного обнаружения.

Специфическая лабораторная диагностика вирусных инфекций с парентеральным путем передачи

К специфическим лабораторным маркерам ВГВ относятся: ДНК ВГВ, антигены ВГВ (HBsAg, HBeAg) и антитела к вирусным антигенам (анти-HBs, анти-HBc IgM и IgG, анти-HBe).

ДНК ВГВ — маркер активной репликации вируса. Определение ДНК вируса позволяет сократить период серонегативного «окна», в течение которого не обнаруживаются маркеры ВГВ у инфицированного пациента, до 15 дней [27].

HBsAg — маркер скрининга, является подтверждением диагноза гепатита В. Период серонегативного «окна» для этого маркера составляет в среднем 49—59 дней с колебаниями от 30 до 80 дней. Иногда необходимо проведение тестирования образцов крови больных гепатитом В на более широкий спектр маркеров ВГВ, поскольку HBsAg может не обнаруживаться, например:

- в ранней фазе гепатита В при наличии симптомов острой фазы;
- в ранней фазе выздоровления;
- у пациентов с хроническим гепатитом В с низким титром HBsAg;
- при латентной форме гепатита В;
- у носителей мутантного штамма ВГВ [29].

HBeAg — антиген инфекционности и высокой вирулентности ВГВ, его длительная циркуляция в организме больного гепатитом В свидетельствует о возможности хронизации процесса [27]. Кроме того, HBeAg — маркер активной репликации ВГВ, так как его высокие титры соответствуют высокой ДНК-полимеразной активности [30]. В образцах крови в острой фазе болезни HBeAg выявляется вместе с HBsAg, а при реактивации хронических форм гепатита В — вместе с другими маркерами ВГВ.

Анти-HBs — антитела, обладающие протективными свойствами. Период серонегативного «окна» может колебаться от 2 до 6 месяцев, иногда до 1 года. Сохраняются они долго, со временем их уровень понижается. Определение титра анти-HBs имеет значение при оценке иммунного ответа организма в исходе болезни и после проведения вакцинации.

Анти-HBc IgM и IgG — антитела к HBcAg, который обладает высокой иммуногенностью и обнаруживается только в ядрах гепатоцитов при морфологическом исследовании биоптатов печени. Данный антиген в крови не выявляется. Анти-HBc IgM — это так называемые ранние антитела, которые обнаруживаются в начале острой фазы болезни, а также при реактивации латентного процесса. Анти-HBc IgG — маркер перенесенной или хронической вирусной инфекции, чаще всего латентной. Лабораторная диагностика этого маркера в образцах крови имеет важное значение, так как его выявление у доноров крови и ее компонентов является основанием для отвода донора от кроводачи [30, 31], а выявление данного маркера у пациентов с заболеваниями крови является сигналом для пристального наблюдения (мониторинга) за состоянием пациента при проведении лечения основного заболевания с целью заблаговременного вмешательства при реактивации ВГВ [28].

Анти-HBe — антитела к HBeAg, характеризуют прекращение активной репликации вируса. Появление этих антител в крови больного указывает на уменьшение вирусной нагрузки и наступление иммунной фазы сероконверсии. Выявление иммунологических маркеров анти-HBc IgG и анти-HBe указывает на перенесенный гепатит В.

К специфическим лабораторным маркерам ВГС относятся: РНК ВГС, ядерный антиген ВГС (HCVcAg) и анти-ВГС (суммарные).

РНК ВГС — маркер активной репликации вируса. Это первый маркер острого вирусного гепатита С, так как генетический материал вируса в плазме крови обнаруживается приблизительно к 10-му дню после заражения [32].

HCVcAg — ранний серологический маркер. Является маркером репликации РНК ВГС, но анализ на HCVcAg менее чувствителен (ниж-

ний предел обнаружения соответствует 500—3000 МЕ/мл РНК ВГС, в зависимости от генотипа ВГС) [32]. Чаще всего используется при невозможности выполнения анализа на наличие РНК ВГС методом ПЦР.

Анти-ВГС (суммарные) — маркер скрининга, антитела класса IgM и IgG к комплексу структурных и неструктурных белков ВГС. Период серонегативного «окна» этого маркера составляет в среднем 4—10 недель. Антитела не обладают протективными свойствами, сохраняются на долгие годы и после спонтанного излечения, и после проведенного успешного лечения. Поэтому их обнаружение может быть следствием возможной вирусной инфекции (острой, хронической, в том числе латентной) или перенесенного ранее заболевания. В случае выявления анти-ВГС (общих) проводят подтверждение наличия антител класса IgM и IgG к индивидуальным белкам вируса (core, NS3, NS4, NS5) в образцах крови и дополнительно с целью оценки активности процесса проводят анализ на РНК ВГС качественно или на HCVcAg [32]. Возможно получение отрицательного результата, который необходимо проверить проведением анализа на РНК ВГС качественно (или HCVcAg) в следующих случаях:

- в период серонегативного «окна», если есть симптомы инфекционного процесса;
- у пациентов с иммуносупрессией;
- у пациентов на гемодиализе;
- у пациентов после плазмообмена.

К специфическим лабораторным маркерам ВИЧ относятся: РНК/ДНК ВИЧ, антиген ВИЧ (p24) и антитела к вирусным белкам ВИЧ-1 и ВИЧ-2 (анти-ВИЧ).

РНК ВИЧ — маркер активной репликации вируса. Это первый маркер острого вирусного процесса, так как РНК вируса в плазме крови может быть обнаружена уже к 7-му дню после заражения [33]. Определение провирусной ДНК ВИЧ или вирусной РНК ВИЧ в инкубационный период необходимо для максимально быстрого назначения антиретровирусной терапии, в процессе лечения — для оценки эффективности проводимой терапии.

P24 — структурный ядерный белок ВИЧ-1. Антиген может быть обнаружен на 15-й день после заражения на ранних стадиях ВИЧ, пока концентрация антител не достигнет определяемого уровня.

Анти-ВИЧ — суммарный спектр антител IgM, IgG к ВИЧ-1 и ВИЧ-2. Первые антитела могут быть обнаружены на 30-й день после заражения, поздние — к 3-му месяцу [33]. Лабораторное обследование на ВИЧ-инфекцию выполняют при обязательном согласии пациента. Лабораторное тестирование включает 2 этапа — скрининг и подтвер-

ждение результата, полученного на первом этапе. На первом этапе исследуют антиген и суммарный спектр антител к вирусу. В случае получения отрицательного результата проведение второго этапа не требуется, выдается полученный ответ. В случае получения положительного результата тестирование последовательно повторяют два раза. При получении двух отрицательных результатов повторного тестирования образец признается отрицательным. Дважды положительный (включая первичное тестирование) образец крови отправляют в референс-лабораторию для дальнейшего исследования (2-й этап). Тогда заключение о наличии или отсутствии в исследуемом образце маркеров ВИЧ делают исходя из полученных результатов второго этапа в референсной лаборатории [33]. Пациент с положительным результатом референс-исследования, а также при выявлении антигена p24 направляется для установления диагноза ВИЧ-инфекции в центр профилактики и борьбы со СПИДом или иную уполномоченную специализированную медицинскую организацию. Результаты исследования по телефону, электронной почте, путем СМС-информирования не сообщаются. Результат выдается при личном обращении обследуемого или его законного представителя.

Таким образом, маркерами острой фазы инфекционного процесса вышеперечисленных инфекций являются: ДНК ВГВ, HBsAg, HBeAg, анти-HBc IgM, РНК ВГС, HCVcAg, РНК/ДНК ВИЧ, p25/24. При обнаружении HBsAg следует контролировать наличие HBeAg, при обнаружении анти-HBc — анти-HBc IgM.

Первичное вирусологическое обследование на специфические маркеры парентеральных вирусных инфекций

Существует стандарт обследования на маркеры вирусных инфекций при госпитализации, проведении диспансеризации или профосмотрах, перед выполнением плановой операции, во время ведения беременности, при оформлении медицинской книжки. Стандарт включает в себя следующие показатели: HBsAg, анти-ВГС, антитела/антиген ВИЧ и серологические реакции на сифилис. Сифилис не является заболеванием вирусной природы, но в силу схожести ряда его клинических проявлений с заболеваниями системы крови (например, лимфаденопатия) и методов диагностики с заболеваниями вирусной этиологии выявление его маркеров включено в протокол обследования пациентов. С учетом перечисленных выше особенностей ведения пациентов гематологической клиники стандартное исследование расширено и сформирован следующий протокол.

Протокол исследования образцов крови первичных пациентов с заболеваниями системы крови на инфекционные маркеры (ВИЧ, ВГВ, ВГС и возбудителя сифилиса), принятый в ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России

Обследование первичных пациентов на регламентированные инфекционные маркеры [28]:

1. ВИЧ-1 и ВИЧ-2: определение антител к ВИЧ-1 и ВИЧ-2 и антигена р24 ВИЧ-1.
2. ВГВ: определение HBsAg.
3. ВГС: определение анти-ВГС (суммарных).
4. ВГС: определение РНК ВГС методом ПЦР, качественное исследование.
5. Сифилис: антитела к *Treponema pallidum* комплексом серологических реакций.

Обследование первичных пациентов на расширенный спектр инфекционных маркеров:

1. ВГВ: определение анти-НВс.
2. ВГВ: определение анти-НВs.
3. ВГВ: определение ДНК ВГВ методом ПЦР, качественное исследование.

Дополнительное обследование по показаниям:

1. В случае обнаружения HBsAg — дополнительное исследование HBeAg.
2. В случае обнаружения анти-НВс — дополнительное исследование анти-НВс IgM.
3. При наличии только анти-НВs (с учетом анамнестических данных больного о проведении вакцинации или ее отсутствии) — исследование на анти-НВе для подтверждения инфицированности ВГВ.
4. В случае обнаружения ДНК ВГВ — проведение количественного анализа.
5. В случае обнаружения РНК ВГС — проведение количественного анализа.

Мониторинг специфических маркеров парентеральных вирусных инфекций

Обнаружение любого из перечисленных специфических маркеров ВГВ, ВГС, ВИЧ, даже однократное, у онкогематологических больных должно быть сигналом медицинскому персоналу к тщательному наблюдению за симптомами у таких пациентов и расширенному мониторингу их вирусологического статуса.

Для пациентов отделений гемодиализа, гематологии и трансплантации (если пребывание в стационаре свыше 1 месяца) и реципиентов

крови и ее компонентов, органов и тканей — обследование на наличие HBsAg, анти-ВГС, ДНК ВГВ, РНК ВГС 1 раз в месяц.

Если при первичном обследовании у больных с угнетенным иммунитетом отсутствовали антитела к белкам ВГВ (анти-HBc, анти-HBs) — мониторинг этих маркеров 1 раз в 3 месяца.

Остальные контингенты пациентов вне зависимости от результатов тестирования при поступлении обследуются на инфекционные маркеры ВГВ и ВГС по клиническим и эпидемиологическим показаниям.

Трансфузиологическое расследование при появлении маркеров гемотрансмиссивных инфекций после переливания компонентов донорской крови

Современная терапия заболеваний системы крови включает не только интенсивное химиотерапевтическое и таргетное воздействие, но и своевременную качественную трансфузионную поддержку [37]. Также переливание компонентов донорской крови, в частности препаратов плазмы, показано лицам, страдающим заболеваниями других профилей, среди которых роженицы с развернутым синдромом диссеминированного внутрисосудистого свертывания [37], пациенты ожоговых отделений [38], больные с массивной кровопотерей [39]. За последнее десятилетие просветительская работа среди населения, переход на безвозмездное донорство и современные лабораторные средства тестирования донорской крови, включающие высокочувствительные тест-системы, привели к стремительному снижению количества посттрансфузионных инфекционных осложнений [40—43]. Но, несмотря на значительные достижения в повышении безопасности донорской крови, с ее использованием до сих пор традиционно ассоциируются нозокомиальные инфекции с парентеральным путем передачи, возбудителями которых являются ВИЧ, ВГВ и ВГС. До сих пор фиксируются случаи передачи ВГС во время хирургических вмешательств, связанные с нарушениями противоэпидемического режима [44]. Описаны случаи нозокомиальных вспышек вирусных гепатитов В и С в медицинских организациях, причиной которых являются инъекционные процедуры, использование многодозовых флаконов и недостаточное соблюдение персоналом стандартных мер предосторожности, в том числе мытья рук [45, 46]. При наличии в крови HBeAg наблюдается высокая концентрация ДНК ВГВ в слюне, что подтверждает гипотезу, согласно которой слюна является возможным источником для горизонтальной передачи ВГВ [45]. Расследование обстоятельств, при которых произошли вспышки внутрибольничного распространения инфекции, показало, что наиболее частыми причинами их возникновения являются нарушения противоэпидемического режима. В некоторых исследова-

ниях отмечено, что после трансплантации сердца реципиенты подвергаются риску заражения во время процедуры трансвенозной эндомиокардиальной биопсии [47]. Передача ВГВ и ВГС также возможна в стоматологических учреждениях, однако вероятность этого события ниже, чем в ранее описанных случаях [48]. В одном из когортных исследований многофакторный анализ показал, что причиной заражения ВГВ среди пациентов был контроль уровня глюкозы в крови на дому с использованием многоразовых ланцетов медицинской сестрой. Случаи передачи подтверждены определением генотипа ВГВ, нехарактерного для региона, в котором были зафиксированы вспышки [49]. Согласно данным Центра по контролю и профилактике заболеваний США (Center for Disease Control and Prevention, CDC, ЦКЗ США), 9 из 18 зафиксированных вспышек гепатита С произошли в амбулаторных условиях: 7 — у пациентов, получающих процедуры вено-венозной гемодиализации, а 2 — связаны с действиями инфицированных медицинских работников, которые были уличены в употреблении наркотических средств [50]. Таким образом, передача возбудителя может происходить не только вследствие переливания компонентов крови от инфицированных доноров, но и как результат других медицинских манипуляций, таких как трансплантация органов и тканей, инвазивные медицинские процедуры, и как результат несоблюдения требований противоэпидемического режима.

Первый отчет о доказанной передаче ВГС при трансплантации органов от доноров с повышенным риском инфицирования (потребителей инъекционных наркотиков), отрицательных по результатам ПЦР-скрининга на наличие РНК ВГС в сыворотке крови, был опубликован в 2015 году [51]. При дальнейшем расследовании РНК ВГС была обнаружена в селезенке и других лимфоидных тканях донора. Примечательно, что передача возбудителя в результате трансплантации от инфицированного донора произошла далеко не во всех случаях [51]. В исследовании 2011 года только 3 из 5 реципиентов оказались инфицированы от донора, у которого впоследствии была обнаружена низкая концентрация ДНК ВГВ [52]. В наблюдении за 12 реципиентами в течение 7 месяцев после трансплантации от 1 донора, оказавшегося ВГС-позитивным, отмечено заражение ВГС только у 9 человек. Эти данные свидетельствуют о том, что на вероятность передачи инфекции влияет множество факторов, важную роль среди которых, очевидно, играют состояние иммунной системы реципиента, доза вируса, попавшая в его организм, и фаза инфекции у донора [51].

Множество исследований посвящено определению источника заражения парентеральными вирусными гепатитами с помощью молекулярного анализа вирусных штаммов. Для проведения эпидемиологи-

ческого расследования используют молекулярные методы, служащие удобными инструментами для получения объективных данных о эпидемиологической связи (или ее отсутствии) при расследовании ятрогенных случаев заражения — филогенетический анализ и секвенирование [44, 45, 49, 51, 53]. Однако методология проведения расследования передачи инфекции при оказании медицинской помощи в Российской Федерации описана только для ВИЧ-инфекции. Нормативно-правовые акты, четко регламентирующие проведение подобных исследований при выявлении маркеров ВГВ или ВГС у реципиентов компонентов донорской крови, практически отсутствуют.

За прошедшие два десятилетия сложилась тенденция, согласно которой наблюдается статистически достоверное снижение частоты встречаемости HBsAg и анти-ВГС у пациентов с заболеваниями системы крови с 5,0% до 2,4% и с 19,8% до 11,3% соответственно [54]. Тем не менее случаи появления маркеров гемотрансмиссивных инфекций у пациентов, получающих лечение, включающее множественные трансфузии компонентов крови, не редкость. В ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России было проведено исследование, в котором в течение 14 месяцев проводился регулярный мониторинг на маркеры ВИЧ, ВГВ и ВГС у пациентов, получавших медицинскую помощь в условиях стационара и ранее не инфицированных этими вирусами (с момента госпитализации результаты тестирования были отрицательными). Показано, что вирусным гепатитом В за время наблюдения заболели 4 (5,5%) человека, вирусным гепатитом С — 2 (2,7%) пациента и сочетание гепатитов В и С обнаружено у 1 (1,3%) больного [55]. Случаев появления маркеров ВИЧ зафиксировано не было. В результате изучения случаев появления маркеров, к сожалению, в двух эпизодах не удалось исключить трансфузионный путь передачи инфекции.

Посттрансфузионные вирусные гепатиты — нечастое событие в последнее время. Тем не менее необходимость локализации источника инфекции несомненна. В ходе выполнения этой задачи очевидным является использование современных информационных систем как при заготовке компонентов донорской крови, так и при ее клиническом применении. Эти процессы могут протекать внутри одной медицинской организации, например в трансплантационном центре, который сам обеспечивает собственные потребности в компонентах донорской крови, и тогда они будут курироваться одной службой (подразделением, отделом). В этом случае методология проведения расследования, которая будет описана далее, относительно проста и позволяет достаточно успешно проводить подобные расследования. В случае, когда заготовку и клиническое использование компонентов донорской крови осуществляют разные медицинские организации, подобное рассле-

дование может быть затруднено без должного взаимодействия между организациями, включающего интенсивный обмен информационными (данные о выявлении лабораторных маркеров, трансфузиях донорской крови, информация о донорах) и материальными потоками (образцы клинического материала, компоненты донорской крови, документация). Таким образом, целью создания настоящего раздела стала разработка типового алгоритма и принципов проведения трансфузиологического расследования при появлении маркеров инфекций с парентеральным путем передачи у пациента после переливания компонентов донорской крови.

Когда возможно успешное проведение трансфузиологического расследования?

В данном разделе рассматриваются аспекты, связанные непосредственно с использованием донорской крови. Расследование факторов, связанных с другими действиями при оказании медицинской помощи, способными привести к инфицированию, в рамках данного алгоритма не рассматриваются. Среди таких действий можно выделить: проведение манипуляций с нарушением целостности кожных покровов и слизистых оболочек (операции, множественные инъекции и т. п.), трансплантацию органов и тканей, не являющихся донорской кровью и ее компонентами (например, аллогенные ГСК, солидные органы, сперма и пр.), контактирование с инфицированными лицами.

Данный тип расследования проводится на уровне отделения, где пациент получает медицинскую помощь, включая трансфузии донорской крови, отдела/лаборатории/группы диагностического подразделения, занимающегося лабораторной диагностикой инфекционных маркеров, и подразделения, занимающегося заготовкой донорской крови и выдачей ее для клинического использования. Предлагаемый алгоритм может быть реализован и в случае, когда донорская кровь поступает из другой медицинской организации, однако только в случае интенсивного взаимодействия с последней.

Современные достижения лабораторной диагностики позволяют определять множество маркеров вирусных инфекций с парентеральным путем передачи. Многие из них, при обнаружении в крови пациента, свидетельствуют о факте инфицирования, однако не все. Согласно современному консенсусу, после перенесенного вирусного гепатита В и в случае бессимптомного течения, ВГВ навсегда остается в организме. Это происходит благодаря способности вирусной ДНК сохраняться в гепатоцитах в виде кольцевой ковалентно-замкнутой формы, стабилизированной вирусными пептидами. До последнего времени считалось, что ВГС также окончательно не элиминирует из

организма. Такой вывод делался на основании пожизненной персистенции противовирусных антител после перенесенной инфекции. С появлением противовирусных препаратов прямого действия опубликовано множество работ, свидетельствующих о возможной элиминации ВГС [56, 57]. Однако нет единого мнения исследователей по данному вопросу, поскольку однозначных доказательств эрадикации вируса после достижения устойчивого вирусологического ответа на терапию препаратами прямого действия на данный момент не представлено.

Спектр маркеров, выявление которых в крови пациента означает факт инфицирования возбудителем, приведен в табл. 1.

Таблица 1. Вирусные маркеры, свидетельствующие о факте инфицирования

Типы маркеров	ВГВ	ВГС	ВИЧ
Серологические	HBsAg, суммарные анти-HBc, анти-HBc- IgM, анти-HBe, HBeAg	Суммарные анти-ВГС, спектр антител к отдельным белкам ВГС	Антитела к структурным и неструктурным белкам, антиген p24
Молекулярные	ДНК ВГВ	РНК ВГС	РНК ВИЧ

Сочетание тех или иных вирусных маркеров позволяет предположить стадию инфекции у пациента.

Этапы проведения трансфузиологического расследования появления маркеров гемотрансмиссивных инфекций после переливания донорской крови

Для унификации проведения расследование целесообразно разделить на несколько этапов. Ниже приведем эти этапы и их краткое описание.

- *Инициализация расследования.* На данном этапе проводится проверка необходимости проведения расследования. Пациент, получающий трансфузионную терапию, мог быть инфицирован еще до начала оказания медицинской помощи в конкретной медицинской организации.
- *Определение даты (периода) вероятного инфицирования.* Если расследование все-таки начато, то для его успешного проведения необходимо определить временной период, когда реципиент мог быть инфицирован в результате трансфузий компонентов донорской крови.
- *Проведение мероприятий по локализации вероятного источника инфекции среди доноров.* После определения периода вероятного инфицирования становится очевидной необходимость проведения мероприятий по локализации источника инфекции. Эти мероприятия

включают в себя анализ трансфузий, которые получал пациент, поиск доноров, от которых были заготовлены перелитые компоненты. Далее проводится анализ конкретных доноров, которые могли стать источником инфекции.

- *Завершение расследования.* На этом этапе происходит принятие окончательного решения о наличии/отсутствии трансфузионного пути передачи инфекции и финальное документирование процедуры. Далее рассмотрим этапы более подробно.

Инициализация эпидемиологического расследования

Современная терапия опухолевых заболеваний системы крови и депрессий кроветворения невозможна без массивной гемотрансфузионной поддержки. Характерными особенностями лечения этих заболеваний являются многоэтапность (различная терапия на разных стадиях заболевания), большая длительность и зачастую необходимость в проведении трансплантации ГСК (ТГСК) (аутологичных или аллогенных). Так, среднее время лечения и наблюдения, включая трансплантацию, может составлять несколько лет. Это означает, что пациент госпитализируется в стационар множество раз на различных этапах лечения.

Принимая во внимание столь длительный срок, можно предположить, что инфицирование возбудителем с парентеральным путем передачи может произойти как в результате оказания медицинской помощи, в том числе проведения трансфузий компонентов донорской крови, так и вне стационара, в котором пациент проходит лечение (например, при лечении зубов или при незащищенных половых контактах) [58–62]. Нанесение же татуировок даже на обширную поверхность тела за последнее десятилетие все реже относится к факторам риска инфицирования гемотрансмиссивными инфекциями, особенно в странах с невысокой общепопуляционной инфицированностью [63]. Таким образом, проверка на наличие маркеров из табл. 1 должна осуществляться в каждую госпитализацию. Расследование целесообразно инициировать, если маркер из табл. 1 впервые обнаружен у пациента спустя 11 и более дней после госпитализации. Этот временной период обусловлен характерной особенностью инфекций с парентеральным путем передачи — наличием негативного «окна». Негативное «окно» — это период времени от момента инфицирования до наработки достаточного количества вирусных маркеров (мишеней), которые могут быть обнаружены доступными лабораторными методами. Продолжительность этого периода может различаться для разных маркеров и возбудителей. Аналитическая чувствительность используемых тест-систем тоже влияет на величину этого «окна». Так, для ВИЧ-инфекции

период негативного «окна» при комбинированном определении вирусного антигена р24 и противовирусных антител составляет в среднем 22 (19—24) дня при использовании тест-систем 3-го поколения и 18 (16—24) дней при использовании тест-систем 4-го поколения [63]. При определении РНК ВИЧ методом ПЦР период негативного «окна» может составлять от нескольких часов до нескольких дней. Для вирусного гепатита С максимальный период негативного «окна» при тестировании на противовирусные антитела достигает 180 дней. Но вирусная РНК может быть обнаружена в крови уже через 11 дней [64].

Так, если у пациента, который наблюдается в медицинской организации, оказывающей ему помощь по профилю «Гематология» или «Трансфузиология», выявляется вирусный маркер, надлежит провести проверку, первичное ли это выявление. Если маркеры вируса и ранее выявлялись у пациента, то инициация расследования не осуществляется. Если же первичное выявление маркеров инфекции с парентеральным путем передачи у пациента, получающего трансфузионную терапию, доказано, то инициируется расследование. Причем, если выявлены маркеры вирусных гепатитов, расследование проводится силами медицинской организации. При скрининге же на маркеры ВИЧ в случае получения положительного результата в диагностических тестах, одновременно выявляющих антитела к ВИЧ-1 и ВИЧ-2 и антиген р24, согласно санитарно-эпидемическим требованиям п. 622 СанПин 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней», анализ проводится последовательно еще 2 раза (с тем же образцом крови и в той же тест-системе). Если получены два положительных результата из трех постановок, образец считается первично-положительным и направляется в референсную лабораторию (например, в региональный центр СПИД), для подтверждающего тестирования. Если случай первичного выявления ВИЧ-инфекции подтверждается, расследование проводится силами надзорного органа (Роспотребнадзор).

Рассмотрим два примера, когда инициализация трансфузиологического расследования показана и когда в расследовании нет необходимости.

Пример № 1

Пациент П. 37 лет с диагнозом: «Острый миелоидный лейкоз, ремиссия заболевания», госпитализирован в день А для проведения консолидирующего курса полихимиотерапии по соответствующему протоколу. В зависимости от состояния пациента, ему проводится гекомпонентная терапия. При рутинном скрининге в день Х в биохимическом анализе крови выявлена билирубинемия 85 мкмоль/л, повышение активности аминотрансфераз — АЛТ 93 ед/л, АСТ 65 ед/л.

Среди прочих обследований лечащий врач назначает вирусологическое исследование крови пациента. Результаты вирусологического исследования представлены в табл. 2.

Таблица 2. Результаты вирусологического исследования на маркеры гемотрансмиссивных инфекций, проведенного в день X

№	Вирусный маркер	Результат	Референсное значение
1	ВИЧ, определение антигена/анти-тел комбинированным тестом	Отрицательный	Отрицательный
2	HBsAg	Положительный	Отрицательный
3	ДНК ВГВ	Положительный	Отрицательный
4	Анти-HBc	Отрицательный	Отрицательный
5	Анти-ВГС	Отрицательный	Отрицательный
6	РНК ВГС	Отрицательный	Отрицательный

У пациента обнаружены маркеры вирусного гепатита В (ДНК ВГВ и HBsAg). Далее лечащий врач должен убедиться, что при госпитализации было проведено исследование на наличие маркеров, свидетельствующих о наличии инфицирования. Согласно данным истории болезни, при госпитализации такое исследование было проведено. Результаты исследования представлены в табл. 3.

Таблица 3. Результаты госпитального скрининга пациента П. при госпитализации в день А

№	Вирусный маркер	Результат	Референсное значение
1	ВИЧ, определение антигена/анти-тел комбинированным тестом	Отрицательный	Отрицательный
2	HBsAg	Отрицательный	Отрицательный
3	ДНК ВГВ	Отрицательный	Отрицательный
4	Анти-ВГС	Отрицательный	Отрицательный
5	РНК ВГС	Отрицательный	Отрицательный
6	Серологическая диагностика сифилиса	Отрицательный	Отрицательный

Принимая во внимание все данные, можно констатировать у пациента появление (первичное выявление) маркеров инфекции с парентеральным путем передачи на фоне проведения гемотрансфузионной терапии. Следовательно, при появлении маркеров гемотрансмиссивных инфекций после переливания компонентов донорской крови *показано инициирование* эпидемиологического расследования.

Пример № 2

Пациент С. 62 лет с диагнозом: «Гемофилия А, коксартроз коленного сустава, постоянная гемостатическая терапия, терапия криопреципитатом, подготовка к тотальному эндопротезированию». При госпитализации и подготовке к плановой операции у пациента в скрининговом исследовании выявлены анти-ВГС. При изучении истории болезни: пациент наблюдается в центре 12 лет. Настоящий визит для планового оперативного вмешательства. Антитела к вирусу гепатита С у пациента выявлялись задолго до настоящего визита. *Данных за инициализацию трансфузиологического расследования нет.*

Определение даты (периода) вероятного инфицирования

Как было описано выше, у инфекций с парентеральным путем передачи помимо инкубационного периода существует негативное «окно». Таким образом, для того, чтобы начать поиск источника инфекции среди доноров компонентов крови, стоит определить период, когда пациент мог быть инфицирован. Для максимального охвата при определении этого периода рекомендуется из даты первичного выявления маркера инфекции вычесть 90 дней (либо 180 дней, если у пациента выявлены анти-ВГС, поскольку у данной инфекции наблюдается максимальный инкубационный период и длительность сероконверсии).

Период вероятного инфицирования = Дата первичного выявления —
— 90 дней (или 180, если определяются только анти-ВГС).

В представленной формуле фигурирует дата первичного выявления маркера инфекции. Эта дата может быть скорректирована, поскольку частота обследования на маркеры гемотрансмиссивных инфекций довольно низка. Однако такая возможность есть в тех лабораториях, в которых проводятся исследования на маркеры не только гемотрансмиссивных инфекций, но и других инфекций и в которых ведется архивирование образцов крови, поступающих на исследование. Очевидно, что проводить частые исследования на все доступные маркеры нецелесообразно. Так, путем исследования архивных образцов крови, которые были доставлены в лабораторию ранее, но не исследовались на маркеры гемотрансмиссивных инфекций, можно скорректировать дату первичного выявления. Схематично это отображено на рис. 1.

Если дату первичного выявления удалось скорректировать, то 90 дней вычитаются именно из скорректированной даты.

Приведем пример корректировки даты первичного выявления инфекции.

Пример № 1 (продолжение)

Пациенту П. показано проведение трансфузиологического расследования, поскольку в день X у него впервые выявлены маркеры гемо-

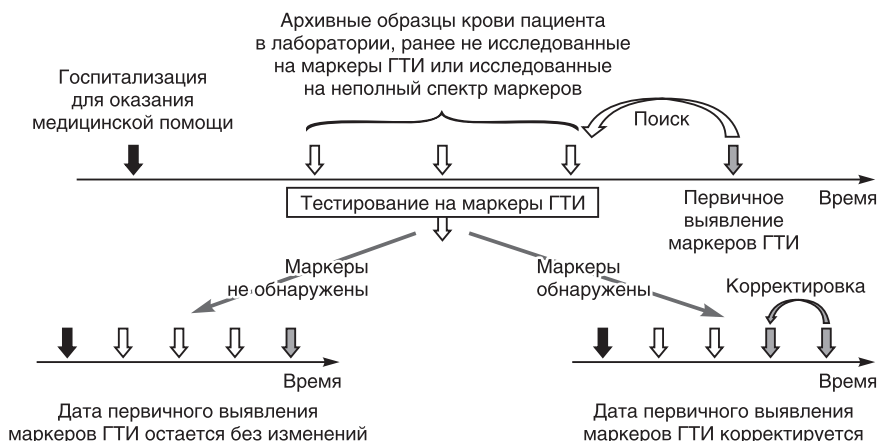


Рисунок 1. Схема возможной корректировки даты первичного выявления маркеров гемотрансмиссивных инфекций путем исследования архивных образцов крови (в случае их наличия). ГТИ — гемотрансмиссивная инфекция. Стрелками обозначены дни, в которые в лабораторию поступали образцы крови на исследования. Серые стрелки обозначают положительные результаты определения маркеров гемотрансмиссивных инфекций, полые — отрицательные.

трансмиссивной инфекции (ДНК ВГВ, HBsAg). Датой первичного выявления маркеров считается день X. Однако подразделение, которое занимается лабораторной диагностикой, может попытаться скорректировать эту дату путем поиска архивных образцов крови пациента П., ранее не исследованных на маркеры ВГВ. Поиск архивных образцов показал, что между днем А и X у пациента были проведены исследования крови на маркеры герпесвирусов за три недели до дня X. Эти образцы подлежат тестированию на маркеры ВГВ. Результаты их тестирования приведены в табл. 4.

Таблица 4. Результаты тестирования архивного образца крови пациента П. на маркеры ВГВ

№	Вирусный маркер	Результат	Референсное значение
1	HBsAg	Отрицательный	Отрицательный
2	ДНК ВГВ	Положительный	Отрицательный
3	Анти-HBc	Отрицательный	Отрицательный

Из таблицы видно, что ДНК ВГВ могла быть выявлена на три недели раньше, чем день X. В это же время видно, что HBsAg в этот день либо полностью отсутствует, либо его концентрация ниже аналитической чувствительности используемой тест-системы. Такая комбина-

ция маркеров соответствует первичной инфекции, вызванной ВГВ. Таким образом, при определении периода вероятного инфицирования следует использовать дату архивного образца. В этом случае период вероятного инфицирования сдвигается на более ранний срок, что повышает вероятность локализации источника инфекции среди доноров, от которых были заготовлены компоненты донорской крови, перелитые пациенту.

Проведение мероприятий по локализации вероятного источника инфекции среди доноров

После определения времени вероятного инфицирования реципиента донорской крови начинается сбор трансфузиологического анамнеза пациента за указанный период (от вычисленной даты до даты первичного выявления маркера инфекции, скорректированной, если удалось это сделать). На этом этапе расследования осуществляется поиск всех трансфузий, проведенных с вычисленной даты до даты первичного выявления маркера инфекции (скорректированной, если это удалось сделать). Попутно составляется список доноров, от которых эти компоненты были заготовлены.

Возможные варианты результатов такого поиска:

- За период вероятного инфицирования гемокомпонентная терапия пациенту не проводилась. В этом случае **трансфузионный путь передачи считается исключенным**, расследование можно завершить и перейти к документированию процедуры.
- В период вероятного инфицирования пациент получал трансфузии компонентов донорской крови. В этом случае каждая трансфузия рассматривается как потенциально рискованная, а каждый донор, от которого заготовлены перелитые компоненты, считается потенциальным источником инфекции и рассматривается отдельно.

Список доноров — потенциальных источников инфекции передается в организацию (подразделение), откуда были выданы компоненты донорской крови, перелитые пациенту, где и проходит дальнейший анализ собранных данных.

Согласно приказу Минздрава России от 28.10.2020 № 1166н, медицинское освидетельствование доноров крови и ее компонентов включает тестирование донорской крови на молекулярные маркеры гемотрансмиссивных инфекций (РНК ВИЧ, ДНК ВГВ и РНВ ВГС) высокочувствительными тест-системами. Также нормативная документация регламентирует временные интервалы между донациями, которые составляют 14 дней. Ранее было сказано, что средний период негативного «окна» при тестировании на молекулярные маркеры вирусов составляет порядка 18—24 дней. Таким образом, если при донации

донор находился в негативном «окне», то в случае осуществления следующей донации, спустя месяц и более, у донора с высокой вероятностью будут выявлены молекулярные маркеры гемотрансмиссивных инфекций и донор будет отведен от донорства. С другой стороны, если у донора, после заготовки компонента, который был перелит пациенту в период вероятного инфицирования, есть последующие успешные донации, при которых результаты скрининга на маркеры гемотрансмиссивных инфекций отрицательны, то это дает возможность утверждать, что данный донор не является источником инфекции, и он может быть исключен из расследования. Подобная проверка позволяет существенно сократить число доноров — возможных источников инфекции, участвующих в расследовании.

Если при подобной проверке все доноры из списка оказались с последующими успешными донациями, то **трансфузионный путь передачи считается исключенным**, расследование можно завершить и перейти к документированию процедуры. Если же в списке оказываются доноры, у которых нет последующих успешных донаций и/или которые были отведены от донорства в связи с выявлением маркеров той же инфекции, что была выявлена у пациента, то **источник инфекции считается локализованным**, начинается финальное документирование процедуры.

Если в ходе проверки выясняется, что у донора не было последующих донаций, то проводится попытка установления с донором контакта и приглашения его на контрольное обследование. Если с донором установлен контакт и он согласился пройти обследование, то осуществляется тестирование нового образца его крови. Если в результате этого обследования у донора обнаружены маркеры инфекции, которая выявлена у пациента, то **источник инфекции считается локализованным**, начинается финальное документирование процедуры. Если же с донором не удастся установить контакт или донор отказывается от прохождения контрольного обследования, то **констатируется невозможность завершения расследования**.

Завершение расследования

Расследование может закончиться по трем различным сценариям:

- Расследование завершено, трансфузионный путь передачи инфекции исключен.
- Расследование завершено, трансфузионный путь передачи инфекции подтвержден, источник инфекции локализован.
- Расследование не может быть завершено, трансфузионный путь передачи инфекции не может быть исключен.

По окончании расследования целесообразно составить карту или акт, содержащий записи о всех этапах проведения расследования.

Диагностика респираторных вирусных инфекций

Общие сведения

Возбудители ОРВИ и гриппа включают в себя обширную группу вирусов, поражающих дыхательный тракт человека. В зависимости от инфекционного агента и степени тяжести состояния пациента клиническая картина заболевания может варьировать от катаральных явлений и общей интоксикации до развития острого респираторного дистресс-синдрома, отека легких, геморрагического синдрома и/или пневмонии [3, 10, 102]. Для пациентов гематологического профиля, преимущественно находящихся в состоянии иммуносупрессии, возбудители ОРВИ и гриппа являются одними из возможных этиологических агентов поражения дыхательной системы. Из-за большей восприимчивости к вирусам пациентов с иммунодефицитом [4, 67] течение инфекции может характеризоваться более длительной персистенцией вируса [3] в организме и повышенным риском развития осложнений [4]. Например, возможно распространение инфекционного процесса из верхних дыхательных путей в нижние с клиническими и рентгенологическими признаками пневмонии, дыхательной недостаточности и потенциальным летальным исходом [4].

Среди факторов риска развития вирусных пневмоний у гематологических больных можно отметить следующие [3]:

- Возраст старше 65 лет.
- Лимфопения менее $0,2 \times 10^9/\text{л}$.
- Трансплантация аллогенных ГСК (алло-ТГСК) от неродственного/несовместимого донора.
- Срок менее 1 месяца после алло-ТГСК.
- Тяжелое иммунодефицитное состояние.

Лабораторная диагностика ОРВИ

Лабораторное исследование, направленное на идентификацию возбудителей ОРВИ и гриппа, назначают по клиническим показаниям. Тотальный скрининг на ОРВИ и грипп у пациентов с заболеваниями системы крови в настоящее время не показан. Лабораторное тестирование показано для пациентов с клиническими симптомами респираторной инфекции [68, 69]. Оптимальным методом лабораторной диагностики возбудителей инфекций дыхательного тракта у пациентов с заболеваниями системы крови являются методы амплификации нуклеиновых кислот. Например, ПЦР в различных модификациях позволяет выявлять специфические фрагменты нуклеиновых кислот и обладает рядом преимуществ. В частности, мультиплексная ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме Real-Time позволяет существенно сэкономить время за счет

одновременного исследования широкого спектра возбудителей ОРВИ и гриппа. Этот метод позволяет получить результат тестирования на большое количество патогенов уже через несколько часов после взятия биоматериала.

Основными патогенами вирусной природы, способными вызывать инфекции дыхательных путей, в том числе и у пациентов с заболеваниями системы крови, являются следующие РНК-содержащие вирусы: респираторно-синцитиальный вирус (*human respiratory syncytial virus* — hRSv, иногда называется ортопневмовирусом), метапневмовирус человека (*human metapneumovirus* — hMpv), вирусы парагриппа 1, 2, 3 и 4-го типов (*human parainfluenza virus-1-4* — hPiv), коронавирусы видов OC43, E229, NL63, HKUI (*human coronavirus* — hCov) и с 2020 г. — SARS-CoV-2, риновирусы (*human rhinovirus* — hRv), вирусы гриппа А (*Influenza virus A*) и гриппа В (*influenza virus B*), ДНК-содержащие аденовирусы групп В, С и Е (*human adenovirus* — hAdv) и бокавирус (*human bocavirus* — hBov).

Респираторные нарушения, вызываемые этими вирусами, варьируют от саморазрешающихся инфекций верхних дыхательных путей до тяжелых пневмоний [3, 4].

Данные о частоте встречаемости возбудителей ОРВИ и гриппа у гематологических больных разнятся в литературе. Необходимо учитывать сезонность заболеваемости в течение года. Чаще других вирусов у пациентов с заболеваниями системы крови в качестве возбудителя респираторных инфекций выявляются риновирусы [68, 69].

Следующими по частоте выявления являются вирусы гриппа, парагриппа и коронавирусы, реже встречаются метапневмовирусы [67—72]. Данные, доказывающие этиологическую роль аденовирусов и бокавируса в поражении дыхательных путей у данной категории пациентов, малочисленны.

Исследуемым материалом из верхних дыхательных отделов являются мазки со слизистой оболочки носоглотки и задней стенки ротоглотки при наличии катарального синдрома и локальных воспалений слизистых оболочек носо- и ротоглотки.

Исследуемым материалом из нижних дыхательных отделов могут выступать жидкость бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ), мокрота или плевральная жидкость. Исследование назначают при наличии изменений в легких на компьютерной томографии, симптомов острой дыхательной недостаточности, для дифференцирования возбудителя пневмонии.

Материал необходимо отправить на исследование возбудителей в срок до 7 дней и максимум до 2 недель от начала инфекции (при условии сохранения признаков поражения верхних дыхательных путей) [73, 74].

Инструментальные исследования

При инфекции респираторного тракта показано выполнение следующих инструментальных исследований:

- Рекомендовано выполнение пульсоксиметрии с измерением SpO_2 пациентам с ОРВИ для ранней диагностики респираторных нарушений [73—78, 104, 105].
- Рекомендовано выполнение компьютерной томографии или рентгенографии органов грудной клетки пациентам с явлениями бронхита (для исключения очаговой пневмонии) и наличии физикальных признаков поражения легочной ткани (верификация пневмонии) [73—78].
- Рекомендовано выполнение бронхоскопии со взятием жидкости БАЛ для лабораторного исследования при подозрении на поражение нижних отделов дыхательных путей.

Диагностика кишечных вирусных инфекций у пациентов с заболеваниями системы крови

Общие сведения

Возбудители острых кишечных инфекций (ОКИ) представляют собой группу патогенов, поражающих желудочно-кишечный тракт (ЖКТ) человека. Инфекции, вызываемые вирусами ОКИ, обладают высокой контагиозностью (заражающая доза составляет 18—1000 вирусных частиц) [79], реализуют алиментарный путь передачи через загрязненную воду или пищевые продукты [80]. Чаще всего вирусные ОКИ протекают в виде гастроэнтерита: многократных эпизодов рвоты, осмотической диареи, болевого абдоминального и интоксикационного синдромов. [81]. Вследствие потери жидкости в организме развивается дегидратация, способная привести к гиповолемическому шоку, коме и даже летальному исходу [80, 82].

У пациентов с заболеваниями системы крови, часто находящихся в состоянии иммуносупрессии, причиной энтеропатии могут выступать различные факторы, среди которых: инфекционные, поражение слизистых на фоне полихимиотерапии, РТПХ. Среди вирусов, способных вызвать ОКИ у пациентов данной категории, описаны ротавирусы, норовирусы, астровирусы, реже аденовирусы [5—8]. Чаще высокому риску заражения вирусной инфекцией ЖКТ подвержены дети с иммунодефицитом [82—85]. У них наблюдается более тяжелое и продолжительное течение [80, 86—88]. Однако общий вклад «классических» вирусных патогенов в структуру некротической энтеропатии у пациентов с гемобластозами невелик. У пациентов данной категории при поражении ЖКТ требуется проведение дифференциальной диагностики с бактериальными инфекциями (чаще всего клостридиальным коли-

том или инфекцией, вызванной *Escherichia coli* с продукцией бета-лактамаз расширенного спектра), вирусными инфекциями, не вызывающими энтеропатию у иммунокомпетентных лиц (герпесвирусами), а у реципиентов аллогенных ГСК — с острой РТПХ, протекающей с поражением кишечника.

Лабораторная диагностика вирусов ОКИ

Лабораторное исследование биоматериала у пациентов с клиническими симптомами тяжелой инфекции ЖКТ на наличие репликации вирусов, вызывающих ОКИ, проводится параллельно с определением возбудителей гастроэнтерита бактериальной или грибковой природы [80] и диагностикой РТПХ, протекающей с поражением кишечника [5—8].

Для лабораторной диагностики вирусных возбудителей ОКИ у пациентов с заболеваниями системы крови наиболее эффективными являются методы амплификации нуклеиновых кислот. Как было сказано ранее, к таким методам относится ПЦР в различных модификациях, которая позволяет выявлять специфические фрагменты нуклеиновых кислот (в данном случае вирусного возбудителя) и обладает рядом преимуществ. В частности, мультиплексная ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме Real-Time является методом с высокой аналитической чувствительностью, позволяющим существенно экономить время за счет одновременного определения нескольких вирусных возбудителей ОКИ. Этот метод позволяет получить результат тестирования уже через несколько часов после взятия биоматериала.

Основными и наиболее опасными патогенами вирусной природы, способными вызывать инфекции желудочно-кишечного тракта, в том числе и у пациентов с заболеваниями системы крови, как было описано ранее, являются следующие РНК-содержащие вирусы: ротавирусы группы А (*rotavirus A*), норовирусы 1-й и 2-й геногруппы (*norovirus GI* и *GII*), астровирусы (*astrovirus*) и ДНК-содержащие аденовирусы группы F (*adenovirus F*) [91].

Из перечисленных патогенов наиболее частыми возбудителями гастроэнтерита являются ротавирусы и норовирусы [80, 90]. Однако среди взрослого населения, и в том числе у пациентов гематологического профиля, чаще встречаются случаи норовирусной инфекции [80, 81, 90]. Аденовирусные и астровирусные инфекции как возбудители ОКИ встречаются реже [80]. Также нельзя забывать, что частой причиной поражения ЖКТ у пациентов с заболеваниями системы крови являются представители герпесвирусов.

Исследуемым материалом при подозрении на вирусное поражение ЖКТ могут служить рвотные и каловые массы, промывные воды же-

лудка и кишечника, реже кровь. В случае возникновения вспышки ОКИ для исследования допустимы концентраты образцов потенциально контаминированной воды. Материал необходимо доставить на исследование возбудителей ОКИ в течение 2 часов после сбора. Для более длительного хранения допускается замораживание при -20°C на срок до 7 дней [81].

Инструментальные исследования

При кишечной инфекции показано выполнение следующих инструментальных исследований:

- Рекомендовано выполнение УЗИ брюшной полости для установления вовлечения в патологический процесс паренхиматозных органов [81].
- Рекомендовано выполнение компьютерной томографии или рентгенографии органов брюшной полости и забрюшинного пространства пациентам с мезаденитом и выраженным болевым абдоминальным синдромом [81].
- Рекомендовано проведение эзофагогастродуоденоскопии для оценки состояния слизистых оболочек верхних отделов ЖКТ.

Лабораторная диагностика эндогенных инфекций

Герпесвирусные инфекции

Герпесвирусные инфекции — группа гетерогенных заболеваний, вызванных вирусами семейства *Herpesviridae*. Источником инфекционного агента является человек с различными формами заболевания. Пик первичного инфицирования представителями данного вирусного семейства приходится на первые три года жизни, при этом инфицирование может протекать бессимптомно либо протекать в виде инфекционного мононуклеоза. С первичным инфицированием вирусом герпеса человека б часто связана розеола. Однако описаны случаи и более позднего первичного инфицирования. Как правило, в этом случае наблюдаются яркие клинические проявления инфекции, такие как лихорадка, лимфаденопатия, боль в горле, ринит, ломота в костях и пр. Механизмы и пути передачи инфекций крайне разнообразны: воздушно-капельный, контактно-бытовой, прямой контактный, половой, вертикальный, парентеральный. Основным отличием герпесвирусов от большинства других вирусных семейств является их способность к становлению латентной инфекции, в ходе которой экспрессируются только белки латентных вирусных генов и не происходит активного синтеза новых вирусных частиц. Благодаря этой способности вирус не элиминирует из организма после первичного инфицирования, остава-

ясь пожизненно в нем. Таким образом, инфицированность некоторыми представителями этого вирусного семейства составляет от 50% до 98% в зависимости от региона [92].

В связи с этой особенностью герпесвирусов различают первичную вирусную инфекцию или реактивацию эндогенного вируса. Также следует различать такие понятия, как вирусная инфекция и вирусная болезнь. Герпесвирусная инфекция — состояние, сопровождающееся вирусной репликацией и характеризующееся лабораторной изоляцией вируса и/или детекцией вирусных белков (антигена) и/или ДНК в любой биологической жидкости или ткани организма независимо от наличия клинических проявлений. Герпесвирусная болезнь — это инфекция, протекающая с поражением органов-мишеней и имеющая лабораторное (молекулярно-генетическое, культуральное, гистологическое и/или иммуногистохимическое) подтверждение поражения цитомегаловирусом определенного органа. Органом-мишенью может выступить любой орган или система органов реципиента.

Краткая характеристика семейства *Herpesviridae*

Герпесвирусы человека — это крупные (от 120 — 300 нм) ДНК-содержащие вирусы, тропные к различным клеткам и тканям организма. Особенностью этих вирусов является способность к пожизненной персистенции в организме. При персистенции вирус находится в латентном состоянии и может реактивироваться при определенных условиях [93, 94]. Широкая распространенность вирусов, способность к длительной персистенции с вероятностью реактивации, уход вируса от иммунного ответа и разнообразие клинических проявлений обуславливают трудности в диагностике герпесвирусных инфекций. В связи с перечисленными особенностями вирусов данного семейства детекция вируса в образцах материалов пациентов не всегда свидетельствует о его роли в качестве этиологического агента наблюдаемой клинической картины инфекционного осложнения

Согласно таксономии, утвержденной Международным комитетом по таксономии вирусов, семейство *Herpesviridae* включает три подсемейства: *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae*, *Gammaherpesvirinae* [95]. Различают 9 герпесвирусов, вызывающих заболевания у человека, данные представлены в табл. 5.

Представители этого семейства способны реплицироваться в широком спектре клеток, в связи с чем происходит вирусная инвазия в различные органы и системы, вызывая тем самым многообразие клинических проявлений. Все это диктует необходимость комплексного подхода к лабораторной диагностике инфекций, вызываемых герпесвирусами, особенно у иммунокомпрометированных пациентов.

Таблица 5. Классификация и заболевания, ассоциированные с герпес-вирусами человека

Подсемейство	Род	Вид	Клинические синдромы и заболевания, ассоциированные с вирусом
<i>Alphaherpesvirinae</i>	<i>Simplexvirus</i>	<i>Human alphaherpesvirus 1, 2</i> (вирус простого герпеса 1-го и 2-го типов, вирус герпеса человека 1 и 2)	Гингивостоматит и фаринготонзиллит, экзема, дерматит, эзофагит, пневмония, гепатит, менингит, энцефалит, инфекции мочевых путей и половых органов, герпетическое поражение глаз, врожденная инфекция
	<i>Varicellovirus</i>	<i>Human alphaherpesvirus 3</i> (вирус герпеса человека 3, варицелла-зостер вирус)	Ветряная оспа, опоясывающий лишай, менингит, энцефалит, поражение глаз, диссеминированный опоясывающий лишай, врожденная инфекция
<i>Betaherpesvirinae</i>	<i>Cytomegalovirus</i>	<i>Human betaherpesvirus 5</i> (вирус герпеса человека 5, цитомегаловирус)	Мононуклеоз, пневмония, гепатит, ретинит, колит, врожденная инфекция
	<i>Roseolovirus</i>	<i>Human betaherpesvirus 6A</i> (вирус герпеса человека 6A)	Внезапная экзантема, мононуклеоз, фебрильные судороги у детей, энцефалит, менингит, пневмония, гепатит, миелосупрессия, DRESS-синдром, бесплодие, поражение глаз
		<i>Human betaherpesvirus 6B</i> (вирус герпеса человека 6B)	
		<i>Human betaherpesvirus 7</i> (вирус герпеса человека 7)	Внезапная экзантема, лихорадка, фебрильные судороги у детей, гепатит
<i>Gammaherpesvirinae</i>	<i>Lymphocryptovirus</i>	<i>Human gammaherpesvirus 4</i> (вирус герпеса человека 4, вирус Эпштейна—Барр)	Инфекционный мононуклеоз, гепатит, энцефалит, лимфома Ходжкина, лимфома Беркитта, назофарингеальная карцинома, карцинома желудка
	<i>Rhadinovirus</i>	<i>Human gammaherpesvirus 8</i> (вирус герпеса человека 8, герпесвирус, ассоциированный с саркомой Капоши)	Саркома Капоши, болезнь Кастлемана (мультицентрический вариант)

Лабораторная диагностика

Для диагностики инфекций, ассоциированных с герпесвирусами, целесообразно использовать комплекс методов, направленных на разные мишени. Наиболее оптимальным является сочетание иммунологического метода для определения противовирусных антител, например ИФА или ИХЛА, и молекулярно-генетического метода для определения вирусной ДНК (ПЦР). При этом для определения антител используется периферическая кровь (сыворотка/плазма), а для ПЦР техниче-

ски может быть использован любой клинический материал, из которого могут быть эффективно выделены нуклеиновые кислоты [96, 97]. Также следует помнить, что использование данного метода имеет ограничения при различных состояниях и на фоне специфической терапии. Так, у реципиентов стволовых гемопоэтических клеток, у пациентов, получающих препараты, вызывающие клеточную деплецию, или пациентов с заболеванием, поражающем В-клетки, исследование на антитела может быть неэффективно.

Поскольку локусы поражения могут быть крайне разнообразными, особенно у пациентов с заболеваниями системы крови, то и выбор материала для исследования должен быть продиктован характером инфекционного осложнения. Так, при мукозитах и гингивитах в качестве материала для исследования может быть использована слюна либо соскоб ротовой полости, при мочевого инфекции — моча, при некротической энтеропатии — кал, при пневмонии и/или дыхательной недостаточности в случае проведения бронхоскопии — бронхоальвеолярная лаважная жидкость, и т. д.

Поскольку инфицированность герпесвирусами составляет, по разным данным, от 50% до 99% в зависимости от вируса и региона, то в случае развития у пациента с заболеванием системы крови герпесвирусной инфекции или герпесвирусной болезни, как правило, предполагается, что это ассоциировано с реактивацией эндогенного вируса, поскольку это событие более вероятно, чем реинфекция новым вирусным штаммом.

Ограничения лабораторной диагностики герпесвирусных инфекций у пациентов с заболеваниями системы крови и возможные трудности в интерпретации результатов вирусологических исследований

При определении маркеров герпесвирусной инфекции важно помнить, что любой диагностический метод имеет ряд ограничений. Так, наличие у пациента гаммапатии (гипер- и гипогаммаглобулинемии), как на фоне течения основного заболевания, так и на фоне проводимой терапии, может давать некорректные результаты определения противовирусных антител. Так, диагностику могут затруднять такие факторы, как: развернутое течение плазмоклеточных дискразий и парпротеинемического гемобластоza, активная секреция парапротеина, применение таргетных препаратов, подавляющих пролиферацию В-лимфоцитов (ритуксимаб). Некорректные результаты могут быть связаны и с применением внутривенного иммуноглобулина или массивных трансфузий плазмосодержащих компонентов донорской крови.

Молекулярные исследования имеют свои ограничения и могут давать сложно интерпретируемые результаты. Например, вирусы герпеса человека 1 и 2 реплицируются преимущественно в эпителиальных клетках, а депонируются в нервных ганглиях, что делает исследование периферической крови на наличие вирусной ДНК малоинформативным [97]. Геном этого вируса может попадать в кровоток, как правило, при генерализованной герпетической инфекции или сепсисе вирусного генеза, но, как правило, в этом случае его концентрация в крови будет меньше, чем в очаге поражения [98].

Сложность интерпретации результатов вирусологического исследования усугубляется отсутствием пороговых значений концентраций, которые бы разграничивали активную и латентную инфекцию. Поскольку одной из главных особенностей герпесвирусов является их способность к становлению латентной инфекции, то результаты количественного определения концентрации вирусной ДНК должны быть тщательно оценены лечащим врачом и сопоставлены с другими клинико-лабораторными данными.

Механизмы становления латентного типа инфекции у конкретных представителей герпесвирусов достаточно сильно отличаются между собой. Так, для вируса Эпштейна—Барр (ВЭБ) характерна латентная инфекция в моноклеарных клетках, при которой вирусная ДНК присутствует в клетке в виде кольцевой ковалентно замкнутой эписомы, стабилизированной вирусными белками [99]. При этом вирусная ДНК реплицируется совместно с клеточной, в результате чего при делении каждая дочерняя клетка получает и вирусную эписому. Таким образом, при получении положительного результата определения ДНК ВЭБ в клеточной фракции периферической крови, но низкой вирусной нагрузки — на пределе чувствительности используемой тест-системы — можно предположить, что диагностирован не активно реплицирующийся вирус, а латентная форма инфекции.

Кратность проведения вирусологического исследования у пациентов с заболеваниями системы крови диктуется различными факторами: нозологической формой и статусом заболевания, стадией лечения, состоянием пациента. Так, рекомендованная кратность мониторинга герпесвирусов у реципиентов аллогенных стволовых гемопоэтических клеток в раннем посттрансплантационном периоде (до 100 дней после трансплантации) составляет не реже одного раза в месяц при отсутствии клинических проявлений инфекции. Далее мониторинг может проводиться для контроля ответа на противовирусное лечение.

Однако в ходе естественного мутационного процесса на фоне длительного применения препаратов прямого противовирусного действия (как правило, ганцикловира или валганцикловира), особенно при ис-

пользовании препаратов в субоптимальных дозах [106], могут возникнуть вирусные штаммы, устойчивые к их действию. В основе молекулярных механизмов выработки устойчивости лежит возникновение мутационных изменений в генах, кодирующих вирусную фосфотрансферазу (UL97 для ЦМВ) и ДНК-полимеразу (UL54 для ЦМВ) [107]. В случае длительной противовирусной терапии может произойти отбор штамма с несколькими мутациями, обеспечивающими резистентность. Мутации, понижающие сродство того или иного фермента к препаратам, обладают разными показателями фактора устойчивости. Примерно 95% ганцикловир-устойчивых штаммов ЦМВ содержат 1 или более мутаций в гене UL97. Обычно они локализованы в специфических кодонах — 460, 520 и 590—607; в 70% случаев — в кодонах 450, 594 и 595 [108].

Показано, что частота возникновения резистентности вируса к ганцикловиру у реципиентов трансплантата стволовых клеток довольно высока и оценивается как ~3,8% [109]. Описаны случаи, когда появление мутантного штамма сопровождалось повышением вирусной нагрузки и приводило к летальному исходу. С учетом изложенного своевременное выявление мутационных изменений, потенциально способных вызвать устойчивость вируса к ганцикловиру при трансплантации стволовых гемопоэтических клеток, а также органов и тканей, может иметь существенное значение при принятии терапевтического решения.

Особенности диагностики инфекции, вызванной ВГЧ-6

Вирус герпеса человека 6 (ВГЧ-6) персистирует в организме преимущественно посредством интеграции своего генома в теломерные участки хромосом клеток хозяина [100, 101]. При этом этот процесс не является сайтоспецифичным и может произойти в теломерном участке любой хромосомы инфицированной клетки. Описаны случаи такой интеграции в половые клетки, что делает возможной передачу такой формы вируса потомству [102]. При слиянии гамет, содержащих интегрированный вирус, образуется организм, где каждая ядродержащая клетка несет копию генома вируса. Эта форма носит название наследуемый хромосомно-интегрированный ВГЧ-6 (нхи-ВГЧ-6) и встречается, по разным данным, менее чем в 1 случае на 1000 населения. Еще одной особенностью в этом случае является то, что происходит полногеномное встраивание. Таким образом, при проведении вирусологической диагностики на наличие ДНК ВГЧ-6 практически в любом биоматериале, который содержит ядродержащие клетки, результат всегда будет положительный, причем вирусная нагрузка всегда будет в области высоких значений. Для доказательства наличия нхи-ВГЧ-6 необходимо проведение ПЦР-исследования клинического материала,

в котором не происходит вирусная репликация (например, образцов ногтевых пластин и/или волосяных фолликул). Положительный результат исследования такого материала указывает на наличие нхи-ВГЧ-6.

Литература

1. Медицинская вирусология: учебное пособие / под ред. И. И. Генералова. Витебск: ВГМУ, 2017. 307 с.
2. Новикова И. А. Клиническая лабораторная диагностика: учебное пособие. Минск: Вышэйшая школа, 2020. 207 с.
3. Gerna G, Piralla A, Rovida F et al. Correlation of rhinovirus load in the respiratory tract and clinical symptoms in hospitalized immunocompetent and immunocompromised patients. *J Med Virol* 2009; 81(8):1498—1507.
4. Kaiser L, Aubert JD, Pache JC et al. Chronic rhinoviral infection in lung transplant recipients. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 174(12):1392—1399.
5. Naccache S N, Peggs KS, Mattes FM et al. Diagnosis of neuroinvasive astrovirus infection in an immunocompromised adult with encephalitis by unbiased next-generation sequencing. *Clin Infect Dis* 2015; 60(6):919—923. DOI: 10.1093/cid/ciu912.
6. Coppo P, Scieux C, Ferchal F et al. Astrovirus enteritis in a chronic lymphocytic leukemia patient treated with fludarabine monophosphate. *Ann Hematol* 2000; 79:43—45.
7. Daniel-Wayman S, Fahle G, Palmore T et al. Norovirus, astrovirus, and sapovirus among immunocompromised patients at a tertiary care research hospital. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2018; 92(2):143—146. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2018.05.01.
8. Roddie C, Paul JPV, Benjamin R et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation and norovirus gastroenteritis: a previously unrecognized cause of morbidity *Clin Infect Dis* 2009; 49(7):1061—1068. DOI: 10.1086/605557.
9. Groff SP. Retroviridae. In: Knipe D, Howley P, Griffin DE et al. (editors). *Fields virology*. 6th edition. Philadelphia: Wolters Kluwer Health; 2013. Vol. 2, chap. 47. P. 1424—1473.
10. Туполева Т. А. Латентная форма инфекции, вызванная вирусом гепатита В. *Гематология и трансфузиология* 2018; 63(2):166—173. DOI: 10.25837/HAT.2018.68..2..007.
11. Lin A, Thadareddy A, Goldstein M J et al. Immune suppression leading to hepatitis C virus re-emergence after sustained virological response. *J Med Virol* 2008; 80(10):1720—1722.
12. Ritchie D, Piekarz RL, Blombery P et al. Reactivation of DNA viruses in association with histone deacetylase inhibitor therapy: a case series report. *Haematologica* 2009; 94(11):1618—1622.
13. Pei SN, Chen CH, Lee CM et al. Reactivation of hepatitis B virus following rituximab-based regimens: a serious complication in both HBsAg-positive and HBsAg-negative patients. *Ann Hematol* 2010; 89(3):255—262.

14. Yeo W, Chan TC, Leung NW et al. Hepatitis B virus reactivation in lymphoma patients with prior resolved hepatitis B undergoing anticancer therapy with or without rituximab. *J Clin Oncol* 2009; 27(4):605—611. DOI: 10.1200/JCO.2008.18.0182.
15. Послова Л. Ю., Ковалишена О. В., Сергеева А. В. и др. Эпидемиология внутриутробных инфекций. Нижний Новгород: Ремедиум Приволжье, 2019. 118 с.
16. Нисевич Л. Л., Бахмут Е. В., Аширова А. А. и др. Лабораторная диагностика врожденных вирусных инфекций. *Детские инфекции* 2006; 5(2):12—18.
17. Miller SE. Virus Identification by electron microscopy. *Microsc Today* 2000; 8(5):28—29.
18. Rotbart HA. Enzymatic RNA amplification of the enterovirus. *J Clin Microbiol* 1990; 28(3):438—442. DOI:10.1017/S1551929500065226.
19. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res* 1996; 6(10):986—994.
20. Кюрегян К. К., Геворкян М. Г. Метод разветвленных цепей ДНК (bDNA) для обнаружения ДНК вируса гепатита В и РНК вируса гепатита С. *Мир вирусных гепатитов* 2005; 9:2—4.
21. Ou JH, Laub O, Rutter WJ. Hepatitis B virus gene function: The precore region targets the core antigen to cellular membranes and causes the secretion of the e antigen. *Proc Natl Acad Sci* 1986; 83(6):1578—1582. DOI:10.1073/pnas.83.6.1578.
22. Svraka S, Rosario K, Duizer E et al. Metagenomic sequencing for virus identification in a public-health setting. *J Gen Virol* 2010; 91(11):2846—2856. DOI:10.1099/vir.0.024612-0.
23. Cheval J, Sauvage V, Frangeul L et al. Evaluation of high-throughput sequencing for identifying known and unknown viruses in biological samples. *J Clin Microbiol* 2011; 49(9):3268—3275. DOI:10.1128/jcm.00850-11.
24. Eisen HN, Siskind GW. Variations in affinities of antibodies during the immune response. *Biochemistry* 1964; 3(7):996—1008. DOI:10.1021/bi00895a027.
25. Rousseau S, Hedman K. Rubella infection and reinfection distinguished by avidity of IgG. *J Clin Microbiol* 1988. 331(8594):1108—1109. DOI:10.1016/S0140-6736(88)91926-5.
26. Suligoi B, Galli C, Massi M et al. Precision and accuracy of a procedure for detecting recent human immunodeficiency virus infections by calculating the antibody avidity index by an automated immunoassay-based method. *J Clin Microbiol* 2002; 40(11):4015—4020. DOI:10.1128/jcm.40.11.4015-4020.2002.
27. Острый гепатит В (ГВ) у взрослых. Клинические рекомендации, 2020. URL: cr.minzdrav.gov.ru/schema/672_1?ysclid=loud0rae3u600063764.
28. Туполева Т. А., Гармаева Т. Ц., Куликов С. М. Протокол мониторинга вирусологического статуса больных заболеваниями системы крови с целью реализации стратегии повышения вирусной безопасности трансфузий. // Алгоритмы диагностики и протоколы лечения заболеваний системы крови / под ред. В. Г. Савченко. М.: Практика, 2018. Т. 1. С. 143—158.
29. Wang J, Liu Y, Liao H et al. The sK122R mutation of hepatitis B virus (HBV) is associated with occult HBV infection: analysis of a large cohort of Chinese patients. *J Clin Virol* 2020; 130:104564. DOI:10.1016/j.jcv.2020.104564.

30. Туполева Т. А., Игнатова Е. Н., Гуляева А. А. и др. Скрининг донорской крови на антитела к ядерному антигену вируса гепатита В как инструмент повышения безопасности трансфузий для больных заболеваниями системы крови. Клиническая лабораторная диагностика 2016; 61(5):311—316. DOI: 10.1016/j.cld.2019.04.002.
31. Тихомиров Д. С., Туполева Т. А., Гуляева А. А. и др. Система мер, обеспечивающая безопасность трансфузий компонентов крови. Гематология и трансфузиология 2020; 65(3):321—334.
32. Хронический вирусный гепатит С. Клинические рекомендации, 2021. URL: cr.minzdrav.gov.ru/schema/516_2?ysclid=loud5oashi157109752.
33. Покровский В. В., Юрин О. Г., Кравченко А. В. и др. Рекомендации по лечению ВИЧ-инфекции и связанных с ней заболеваний, химиопрофилактике заражения ВИЧ. Эпидемиология и инфекционные болезни 2019; 4, прил. 87 с.
34. Likhitsup A, Lok AS. Understanding the natural history of hepatitis B virus infection and the new definitions of cure and the endpoints of clinical trials. Clin Liver Dis 2019; 23(3):401—416.
35. Tada T, Toyoda H, Yasuda S et al. Natural history of liver-related disease in patients with chronic hepatitis C virus infection: An analysis using a Markov chain model. J Med Virol 2019; 91(10):1837—1844. DOI: 10.1002/jmv.25533
36. Fenwick C, Joo V, Jacquier P et al. T-cell exhaustion in HIV infection. Immunol Rev 2019; 292(1):149—163. DOI:10.1111/imr.12823
37. Артымук Н. В., Астахов А. А., Белокрыницкая Т. Е. и др. Интенсивная терапия синдрома диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови (ДВС-синдром, коагулопатия) в акушерстве. Анестезиология и реаниматология 2019; 2:5—26. DOI: 10.17116/anaesthesiology20190215.
38. Коуров А. С., Зиновьев Е. В., Шперлинг Н. В. и др. Применение тромбоцитарной аутологичной плазмы в местном лечении ожогов и ран различной этиологии. Неотложная хирургия им. И. И. Джанелидзе 2021; S1: 37—38.
39. Пшениснгов К. В., Александрович Ю. С. Массивная кровопотеря в педиатрической практике. Гематология и трансфузиология 2020; 65(1):70—86. DOI: 10.35754/0234-5730-2020-65-1-70-86.
40. Туполева Т. А., Богословская Е. В., Грумбкова Л. О. и др. Использование ПЦР для детекции ВГВ и ВГС на станции переливания крови. Материалы VI всероссийской научно-практической конференции «Генодиагностика инфекционных болезней — 2007». М., 2007. Т. 1. С. 230—238.
41. Burns K, Heslin J, Crowley B et al. Nosocomial outbreak of hepatitis B virus infection involving two hospitals in the Republic of Ireland. J Hosp Infect 2011; 78:279—283. DOI: 10.1016/j.jhin.2011.02.016.
42. Dumpis U, Kovalova Z, Jansons J et al. An outbreak of HBV and HCV infection in a paediatric oncology ward: Epidemiological investigations and prevention of further spread. J Med Virol 2003; 69:331—338. DOI:10.1002/jmv.10293.
43. Голосова Т. В., Сомова А. В., Туполева Т. А., Филатов Ф. П. Тестирование доноров и эволюция посттрансфузионного гепатита. Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии 1999; 1:32—36.

44. Apostolou A, Bartholomew M, Greeley R et al. Transmission of hepatitis C virus associated with surgical procedures — New Jersey 2010 and Wisconsin 2011. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2015; 64(7):165—170.
45. Büchner A, Du Plessis N, Reynders D et al. Nosocomial outbreak of hepatitis B virus infection in a pediatric hematology and oncology unit in South Africa: Epidemiological investigation and measures to prevent further transmission. *Pediatr Blood Cancer* 2015; 62(11):1914—1919. DOI 10.1002/pbc.25605.
46. Germain J, Carbonne A, Thiers V et al. Patient-to-patient transmission of hepatitis C virus through the use of multidose vials during general anesthesia. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2005; 26(09):789—792. DOI:10.1086/502618.
47. Lanini S, Puro V, Lauria FN et al. Patient to patient transmission of hepatitis B virus: a systematic review of reports on outbreaks between 1992 and 2007. *BMC Med* 2009; 7:15. DOI: 10.1186/1741-7015-7-15.
48. Cleveland J, Gray S, Harte J et al. Transmission of blood-borne pathogens in US dental health care settings: 2016 Update. *J Am Dent Assoc* 2016; 147(9):729—738. DOI:10.1016/j.adaj.2016.03.020.
49. Diercke M, Monazahian M, Petermann H et al. Hepatitis B outbreak in a nursing home associated with reusable lancet devices for blood glucose monitoring, Northern Germany 2010. *J Med Virol* 2015; 87(4):583—588. DOI 10.1002/jmv.24104.
50. Jasuja S, Thompson N, Peters P et al. Investigation of hepatitis B virus and human immunodeficiency virus transmission among severely mentally ill residents at a long term care facility. *PLoS ONE* 2012; 7:e43252. DOI:10.1371/journal.pone.0043252.
51. Suryaprasad A, Basavaraju S, Hocevar S et al. Transmission of hepatitis C virus from organ donors despite nucleic acid test screening. *Am J Transplant* 2015; 15(7):1827—1835. DOI: 10.1111/ajt.13283.
52. Centers for Disease Control and Prevention. Notes from the field: transplant-transmitted hepatitis B virus — United States, 2010. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2011; 60:1087.
53. Campo D, Xia G, Dimitrova Z et al. Accurate genetic detection of hepatitis C virus transmissions in outbreak settings. *J Infect Dis* 2016; 213(6):957—965. DOI: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiv542>.
54. Туполева Т. А., Игнатова Е. Н., Тихомиров Д. С. и др. Динамика инфицированности вирусами гепатитов В и С больных заболеваниями системы крови. *Гематология и трансфузиология* 2016; 61(1):75.
55. Туполева Т. А., Сомова А. В., Грумбова Л. О. и др. Вирусы гепатитов В и С у больных гематологической клиники. *Новое в трансфузиологии* 2006; 43:42—50.
56. Жданов К. В., Козлов К. В., Сукачев В. С. и др. Элиминация HCV-инфекции: история с продолжением. *Журнал инфектологии* 2018; 10(4): 6—13.
57. Semmler G, Binter T, Kozbial K et al. Noninvasive risk stratification after HCV eradication in patients with advanced chronic liver disease. *Hepatology* 2021; 73(4):1275—1289. DOI:10.1002/hep.31462.

58. Veronesi L, Bonanini M, Dall'Aglio P et al. Health hazard evaluation in private dental practices: a survey in a province of northern Italy. *Acta Biomed* 2004; 75(1):50—55.
59. Zhou LF, Zhu HH, Lin J et al. Surveillance of viral contamination of invasive medical instruments in dentistry. *J Zhejiang Univ Sci B* 2006; 7(9):745—748.
60. Rai RR, Mathur A, Mathur D et al. Prevalence of occult hepatitis B & C in HIV patients infected through sexual transmission. *Trop Gastroenterol* 2007; 28(1):19—23.
61. Hebo HJ, Gemed DH, Abdusemed KA. Hepatitis B and C viral infection: prevalence, knowledge, attitude, practice, and occupational exposure among healthcare workers of Jimma University Medical Center, southwest Ethiopia. *Sci World J* 2019; 2019:9482607. DOI:10.1155/2019/9482607.
62. Prinsze FJ, van de Laar T, Slot E et al. No increased risk of transfusion-transmissible infections after tattooing, body piercing, or acupuncture among blood donors in the Netherlands. *Transfusion* 2019; 59(8):2575—2583. DOI: 10.1111/trf.15421.
63. Taylor D, Durigon M, Davis H et al. Probability of a false-negative HIV antibody test result during the window period: a tool for pre-and post-test counselling. *Int J STD AIDS* 2015; 26(4):215—224. DOI: 10.1177/0956462414542987.
64. Ray SC, Bailey JB, Thomas DL. Hepatitis C virus. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE et al. (editors). *Fields virology*. 6th edition. Philadelphia: Wolters Kluwer Health; 2013. Vol. 1. P. 795—824.
65. Острые респираторные вирусные инфекции (ОРВИ) у взрослых. Клинические рекомендации, 2021. URL: cr.minzdrav.gov.ru/recomend/724_1?ysclid=loufjg8kq29698710.
66. Marinelli T, Wee LYA, Rowe E et al. Respiratory viruses cause late morbidity in recipients of hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2020; 26(4):782—788. DOI: 10.1016/j.bbmt.2019.12.724.
67. Gabutti G, De Motoli F, Sandri F et al. Viral respiratory infections in hematological patients. *Infect Dis Ther* 2020; 9:495—510. DOI: 10.1007/s40121-020-00313-6.
68. Martino R, Ward KN, Boeckh M et al. Fourth European Conference on Infections in Leukaemia (ECIL-4): guidelines for diagnosis and treatment of human respiratory syncytial virus, parainfluenza virus, metapneumovirus, rhinovirus, and coronavirus. *Clin Infect Dis* 2013; 56(2):258—266.
69. Jacobs SE, Lamson D M, Soave R et al. Clinical and molecular epidemiology of human rhinovirus infections in patients with hematologic malignancy. *J Clin Virol* 2015; 71:51—58. DOI: 10.1016/j.jcv.2015.07.309.
70. Milano F, Campbell AP, Guthrie KA et al. Human rhinovirus and coronavirus detection among allogeneic hematopoietic stem cell transplantation recipients. *Blood* 2010; 115(10):2088—2094. DOI: 10.1182/blood-2009-09-244152.
71. Piñana JL, Martino R, García-García I et al.; Infectious Complications Subcommittee of the Spanish Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cell Therapy Group (GETH). Risk factors and outcome of COVID-19 in patients with hematological malignancies. *Exp Hematol Oncol* 2020; 9:1—16. DOI:10.1186/s40164-020-00177-z. DOI: 10.1093/ofid/ofz247

72. Magira EE, Chemaly RF, Jiang Y et al. Outcomes in invasive pulmonary aspergillosis infections complicated by respiratory viral infections in patients with hematologic malignancies: a case-control study. *Open Forum Infect Dis* 2019; 6(7): ofz247.
73. Яцышина С. Б., Творогова М. Г., Шипулин Г. А., Малеев В. В. Лабораторная диагностика гриппа и других ОРВИ методом полимеразной цепной реакции. *Лабораторная служба* 2017; 6(3):238—267.
74. Чучалин А. Г., Синопальников А. И., Козлов Р. С. и др. Клинические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике тяжелой внебольничной пневмонии у взрослых. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия* 2015; 17(2):84—126.
75. Временные методические рекомендации «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)». URL: static-0.minzdrav.gov.ru/system/attachments/attach/000/061/254/original/%D0%92%D0%9C%D0%A0_COVID-19_V17.pdf?1671088207.
76. Инфекционные болезни. Национальное руководство / под ред. Н. Д. Юшука, Ю. Я. Венгерова. 2-е изд., перераб. и доп. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2019. 1004 с.
77. Popescu CM, Ursache AL, Feketea G et al. Are community acquired respiratory viral infections an underestimated burden in hematology patients? *Microorganisms* 2019; 7(11):521. DOI:10.3390/microorganisms7110521.
78. Hijano DR, Maron G, Hayden RT. Respiratory viral infections in patients with cancer or undergoing hematopoietic cell transplant. *Front Microbiol* 2018; 9:3097. DOI:10.3389/fmicb.2018.03097.
79. Teunis PF, Moe CL, Liu P et al. Norwalk virus: How infectious is it? *J Med Virol* 2008; 80:1468—1476.
80. Bányai K, Estes MK, Martella V, Parashar UD. Viral gastroenteritis. *Lancet* 2018; 392(10142):175—186. DOI: 10.1016/S0140-6736(18)31128-0.
81. Ротавирусный гастроэнтерит у детей. Клинические рекомендации. URL: cr.minzdrav.gov.ru/schema/755_1?ysclid=lougiuyuec752807948.
82. Page NA, Mans J, Nadan S. Viral gastroenteritis. In: Eslick GD (editor). *Gastrointestinal diseases and their associated infections*. 1st edition. Elsevier, 2019. P. 135—149.
83. Flerlage T, Hayden R, Cross SJ et al. Rotavirus infection in pediatric allogeneic hematopoietic cell transplant recipients. *Pediatr Infect Dis J* 2018; 37(2):176—181. DOI: 10.1097/INF.0000000000001740.
84. Srinivasan A, Klepper C, Sunkara A et al. Impact of adenoviral stool load on adenoviremia in pediatric hematopoietic stem cell transplant recipients. *Pediatr Infect Dis J* 2015; 34(6):562—565. DOI: 10.1097/INF.0000000000000678.
85. Беспярых Ю. А., Господарик А. В., Журавель Е. А. и др. Трансплантация фекальной микробиоты при астровирусной инфекции у реципиента аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток: клинический случай. *Клиническая практика* 2023; 14(1):115—122.
86. Blacklow NR, Greenberg HB. Viral gastroenteritis. *N Engl J Med* 1991; 325:252—264.

87. Bosch A, Pintó RM, Guix S. Human astroviruses. *Clin Microbiol Rev* 2014; 27:1048—1074.
88. Oka T, Wang Q, Katayama K, Saif LJ. Comprehensive review of human sapoviruses. *Clin Microbiol Rev* 2015; 28:32—53.
89. Lopman BA, Bresee JS. Viral gastroenteritis. In: Long SS (editor). *Principles and practice of pediatric infectious diseases*. 4th edition. Elsevier, 2012. P. 377—381.
90. GBD 2016 Diarrhoeal Disease Collaborators. Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of diarrhoea in 195 countries: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Infect. Dis* 2018; 18:1211—1228. DOI: 10.1016/S1473-3099(18)30362-1.
91. Knoll BM, Lindesmith LC, Yount BL et al. Resolution of diarrhea in an immunocompromised patient with chronic norovirus gastroenteritis correlates with constitution of specific antibody blockade titer. *Infection*. 2016; 44:551—554.
92. Марданлы С. Г., Арсеньева В. А., Марданлы С. С., Ротанов С. В. Распространенность вирусов герпеса человека среди контингентов различного возраста. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии* 2019; 2:50—55.
93. Ярославцева Н. Г., Тихомиров Д. С., Романова Т. Ю. и др. Лабораторная диагностика активной и латентной инфекции, вызванной вирусом герпеса человека 6-го типа, у пациентов с заболеваниями системы крови. *Вопросы вирусологии* 2018; 63(2):84—90.
94. Pellet PE, Roizman B. Herpesviridae. In: Knipe D, Howley P, Griffin DE et al. (editors). *Fields virology*. 6th edition. Philadelphia: Wolters Kluwer Health; 2013. Vol. 2. P. 1802—1822
95. Kuhn JH. Virus Taxonomy. In: Bamford DH, Zuckerman M (editors). *Encyclopedia of virology*. 4th edition. Academic Press, 2021. P. 28—37.
96. Доброхотова Ю. Э., Боровкова Е. И. Герпесвирусная инфекция: эпидемиология, диагностика, терапия. *Гинекология* 2017; 19(5):20—25.
97. Филатова Е. Н., Уткин О. В. Современные подходы к моделированию герпесвирусной инфекции. *Журнал МедиАль* 2014; 2(12):172—197.
98. Исаков Д. В., Исаков В. А. Новые аспекты патогенеза простого герпеса. *Вестник гематологии* 2016; 12(4):13—18.
99. Логачева Л. С., Кулыга В. Н. Клинические проявления и варианты течения инфекции, вызванной вирусом Эпштейна—Барр. *Медицина экстремальных ситуаций* 2013; 2(44):22—27.
100. Никольский М. А., Голубцова В. С. Хромосомно-интегрированный вирус герпеса человека 6 типа. *Инфекция и иммунитет* 2015; 5(1):7—14.
101. Викулов Г. Х., Домонова Э. А., Мелехина Е. В. и др. Наследуемая хромосомная интеграция Human betaherpesvirus 6В у женщины с сочетанной герпесвирусной инфекцией, протекающей на фоне вторичной иммунной недостаточности. *Инфекционные болезни* 2020; 18(4):182—188.
102. Pugni L, Pietrasanta C, Ronchi A et al. Inherited chromosomally integrated human herpesvirus 6: an unexpected finding in a septic neonate. *Pediatr Infect Dis J* 2021; 40(1):74—75.

103. САНПИН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».
104. СанПиН 3.1.12.3117-13 «Профилактика гриппа и других острых респираторных вирусных инфекций».
105. Письмо Минздрава России от 22.12.2021 № 30-4/И/2-21694 О направлении актуализированных временных методических рекомендаций «Порядок проведения вакцинации против новой коронавирусной инфекции (COVID-19)».
106. Chou S. Cytomegalovirus UL97 mutations in the era of ganciclovir and maribavir. *Rev Med Virol* 2008; 18(4):233—246. DOI: 10.1002/rmv.574.
107. Göhring K, Wolf D, Bethge W et al. Dynamics of coexisting HCMV-UL97 and UL54 drug-resistance associated mutations in patients after haematopoietic cell transplantation. *J Clin Virol* 2013; 57(1):43—49. DOI: 10.1016/j.jcv.2013.01.00.
108. Biron KK. Antiviral drugs for cytomegalovirus diseases. *Antiviral Res* 2006; 71(2—3):154—163. DOI: 10.1016/j.antiviral.2006.05.002.
109. Eckle T, Jahn G, Hamprecht K. The influence of mixed HCMV UL97 wildtype and mutant strains on ganciclovir susceptibility in a cell associated plaque reduction assay. *J Clin Virol* 2004; 30(1):50—56. DOI: 10.1016/j.jcv.2003.08.010.

И. В. Гальцева, Ю. О. Давыдова, Н. М. Капранов,
К. А. Никифорова, Е. Н. Паровичникова

Глава 20.

Методика подсчета CD34-положительных гемопозитических стволовых клеток в периферической крови и трансплантате

Введение

Для гематологических злокачественных новообразований трансплантация аллогенных гемопозитических стволовых клеток (алло-ТГСК) является потенциально излечивающим вариантом лечения в качестве консолидации после химиотерапии. Выполнение алло-ТГСК является эффективной тактикой терапии больных лимфомой клеток мантии, в том числе с мутациями в гене *TP53* [1], другими неходжкинскими лимфомами (НХЛ), хроническим лимфолейкозом (ХЛЛ) [2], острыми лейкозами [3].

Первая аллогенная трансплантация от донора реципиенту была проведена американским врачом-трансплантологом Эдвардом Донналлом Томасом в 1957 г. Шести пациентам с гемобластомами после кондиционирования, включающего облучение или интенсивную химиотерапию, внутривенно вводили костный мозг от здоровых доноров, после чего у пациентов происходило восстановление показателей периферической крови (количества нейтрофилов, тромбоцитов, уровня гемоглобина), а циркулирующие эритроциты были представлены клетками донорского типа [4]. Таким образом, наблюдалось приживание трансплантата — костного мозга донора. В многочисленных экспериментах с лабораторными животными показано, что в костном мозге присутствуют клетки, которые после трансфузии в кровеносное русло реципиента способны

заселять костномозговые ниши и инициировать пролиферацию и дифференцировку клеток всех ростков кроветворения. Эти клетки называются гемопоэтическими стволовыми клетками (ГСК) [5].

ГСК способны мигрировать из костного мозга в периферическую кровь и обратно. Впервые предположение о наличии в периферической крови клеток с «мультипотентным характером» было высказано в 1950-х годах [6]. В экспериментах на крысах показано, что при летальном тотальном облучении тела ГСК от экранированных областей способны через кровеносное русло заселить костный мозг облученных областей [7]. В другом исследовании было показано, что крысы могут пережить смертельную дозу радиации, если соединить их кровеносную систему с кровеносной системой необлученного сиблинга [8]. Павианы, подвергшиеся тотальному облучению всего тела, при комбинации с поддерживающей терапией умерли в течение 8 дней от глубокой гипоплазии костного мозга, в то время как павианы, имевшие перекрестную циркуляцию крови с необлученными партнерами, умерли в течение 14 дней с признаками реакции «трансплантат против хозяина» [9]. В результате этих экспериментов уже в начале 1960-х годов была сформулирована гипотеза, предполагающая использование ГСК периферической крови в качестве трансплантата [10].

Однако ГСК присутствуют в крови в очень малом количестве (в пределах 0,01—0,1%) [11]. Поэтому было предложено проводить процедуру лейкафереза для концентрирования лейкоцитов. В 1971 г. были обнаружены колониеобразующие единицы в продукте лейкафереза (лейкоконцентрате), количество которых превышало число колоний, выросших при культивировании образцов периферической крови без процедуры лейкафереза [12].

Воздействие ряда веществ, например гранулоцитарного колоние-стимулирующего фактора (Г-КСФ), приводит к значительному увеличению количества циркулирующих в периферической крови ГСК. Резкое увеличение количества ГСК в периферической крови под воздействием ростовых факторов называют мобилизацией. В случае мобилизации ГСК сначала происходит усиление пролиферации ранних предшественников в нишах костного мозга, а затем усиление их миграции в кровоток [13].

Таким образом, в клинической практике в качестве источников аллогенных ГСК применяется два типа трансплантатов: костный мозг и мобилизованные ГСК периферической крови. Эти трансплантаты отличаются не только содержанием ГСК, но и клеточным составом в целом [14], что обуславливает разные сроки приживления трансплантата и восстановления кроветворения реципиента, а также частоту и спектр побочных эффектов аллогенной трансплантации.

Определение количества гемопоэтических стволовых клеток

Способность трансплантата к приживлению зависит от количества ГСК, которое он содержит. Одним из наиболее ранних методов оценки качества трансплантата и косвенного определения содержащихся ГСК был метод, основанный на подсчете количества колониеобразующих единиц, в частности более поздних линейно-коммитированных гемопоэтических предшественников — колониеобразующих единиц гранулоцитарно-макрофагальных (КОЕ-ГМ). Недостаток этого метода заключался в отсутствии стандартизации. Вариации в условиях культивирования делали результаты, полученные из разных лабораторий, трудносопоставимыми. Главным ограничением этого метода также было время до получения результата, которое составляло 10–14 дней [11].

Уникальный и абсолютно специфичный маркер ГСК до настоящего времени не обнаружен. Традиционно индикатором ГСК считают наличие поверхностной экспрессии кластера дифференцировки 34 (cluster of differentiation 34, CD34). CD34 — это сиаломуциноподобная молекула адгезии. Следует иметь в виду, что CD34 — это не строго специфичный маркер ГСК и обнаруживается помимо ГСК и на более коммитированных гемопоэтических предшественниках, а также на клетках эндотелия сосудов. Также CD34 может быть использован в качестве маркера для идентификации других тканеспецифичных стволовых клеток, включая мышечные сателлитные клетки и эпидермальные предшественники [15].

Хорошо изучена функция CD34 на эндотелиальных клетках, где он содействует адгезии лимфоцитов к специализированному эндотелию сосудов в лимфоидных тканях. При этом функции, которые выполняет CD34 на ГСК, остаются не до конца изученными. Считается, что молекула адгезии CD34 участвует в повышении пролиферации и/или блокировании дифференцировки клеток. Так, у CD34-нокаутированных мышей снижено количество гемопоэтических предшественников, которые к тому же обладают дефектом пролиферации. Однако у таких мышей не наблюдается снижения абсолютного содержания зрелых клеток крови [15]. Возможно, это связано с существованием CD34-отрицательных ГСК [16, 17].

Количество CD34-позитивных (CD34⁺) ГСК, определяемое методом проточной цитометрии, является наиболее оптимальным индикатором способности трансплантата к восстановлению гемопоэза у реципиента [18].

И определение КОЕ-ГМ, и подсчет количества CD34⁺ ГСК методом проточной цитометрии требуют профессионального навыка, поэтому

некоторые трансплантационные центры в прошлом рекомендовали ограничиваться подсчетом мононуклеарных клеток (МНК). Считалось, что достаточным является сбор МНК в количестве $4\text{--}6 \times 10^8$ на 1 кг массы пациента (/кг). Однако было показано, что количество МНК плохо коррелирует с восстановлением клеток периферической крови [19]. В исследовании Fernandez и соавт. ни количество КОЕ-ГМ, ни количество МНК не было связано со временем до восстановления нейтрофилов и тромбоцитов [20].

Bender и соавт. показали, что быстрое приживание трансплантата достигается, когда трансплантат содержит 20×10^4 /кг КОЕ-ГМ или 2×10^6 /кг CD34⁺ ГСК [18]. В исследовании Bensinger и соавт. у пациентов, которым было перелито $2,5\text{--}5 \times 10^6$ /кг CD34⁺ ГСК и более 5×10^6 /кг CD34⁺ ГСК, различий во времени до момента восстановления нейтрофилов не было, но тромбоциты восстанавливались быстрее [21]. Tricot и соавт. исследовали 225 пациентов с множественной миеломой, которым после химиотерапии выполняли трансплантацию аутологичных гемопоэтических стволовых клеток (ауто-ТГСК). Было обнаружено, что для пациентов, получавших цитотоксическую химиотерапию ≤ 24 месяцев, для быстрого восстановления количества тромбоцитов ($\geq 50 \times 10^9$ /л к 21-му дню) достаточным было введение 2×10^6 /кг CD34⁺ ГСК, в то время как пациентам, находившимся на терапии ≥ 24 месяцев, необходимо было введение $> 5 \times 10^6$ /кг CD34⁺ ГСК [22]. Remberger и соавт., изучив эффект дозы CD34⁺ клеток на исход ТГСК, заключили, что при введении $6\text{--}7 \times 10^6$ /кг CD34⁺ улучшается общая выживаемость и уменьшается смертность, связанная с трансплантацией. При введении $< 5 \times 10^6$ /кг CD34⁺ чаще развивались рецидив и хроническая реакция «трансплантат против хозяина» (хРТПХ) [23]. В то же время при сверхвысоких дозах ($\geq 11 \times 10^6$ /кг) CD34⁺ ГСК происходило снижение выживаемости и увеличивалась частота рецидивов [24].

Таким образом, рядом исследований было показано, что скорость восстановления параметров периферической крови после трансплантации зависит от содержания CD34⁺ ГСК в трансплантате. На текущий момент признано, что в большинстве случаев для адекватного восстановления кроветворения достаточным является введение $2\text{--}5 \times 10^6$ /кг CD34⁺ ГСК [21, 20, 25].

Но не только определение количества CD34⁺ ГСК непосредственно в трансплантате является важным. Необходимо определять количество ГСК и в периферической крови непосредственно перед началом первой процедуры лейкафереза, чтобы можно было прогнозировать количество CD34⁺ ГСК в лейкоконцентрате и эффективность этой дорогостоящей процедуры.

Процесс заготовки ГСК периферической крови включает следующие этапы:

1. Введение мобилизующих препаратов, таких как Г-КСФ. В течение этого этапа в крови увеличивается количество лейкоцитов и количество ГСК.
2. Подсчет ГСК в периферической крови на 4—5-й дни мобилизации. Наиболее оптимальный вариант — сбор необходимого количества стволовых клеток ($\geq 2 \times 10^6/\text{кг}$ CD34⁺ ГСК) за одну процедуру лейкофереза. Но часто для сбора необходимого числа CD34⁺ ГСК может потребоваться несколько процедур лейкофереза. Если сбор ГСК начат слишком рано, то может потребоваться большее количество процедур лейкофереза, что увеличивает финансовые и временные затраты. Факторами, повышающими эффективность мобилизации CD34⁺ клеток, являются мужской пол, более высокий индекс массы тела, большая доза Г-КСФ, более высокий уровень лейкоцитов до мобилизации и использование в качестве мобилизующего препарата ленограстима, а не филграстима [26]. При обнаружении более 20 CD34⁺ ГСК в 1 мкл периферической крови целесообразно начинать процедуру лейкофереза. В этом случае высока того, что удастся вероятность заготовить более $2 \times 10^6/\text{кг}$ CD34⁺ ГСК за 1—2 процедуры [27, 28]. Если количество CD34⁺ ГСК в периферической крови менее 20/мкл, то рекомендуется лейкоферез не проводить, продолжить мобилизацию и повторить подсчет CD34⁺ ГСК в периферической крови на следующий день.
3. Проведение процедуры лейкофереза, процессинг лейкоконцентрата.
4. Подсчет количества заготовленных CD34⁺ ГСК в лейкоконцентрате. Если за одну процедуру не удалось собрать $2 \times 10^6/\text{кг}$ CD34⁺ ГСК, то мобилизацию продолжают и повторяют процедуру лейкофереза на следующий день. В этом случае определять количество CD34⁺ ГСК в крови перед сбором необязательно.

В 1996 г. сообществом ISHAGE (International Society for Hematotherapy and Graft Engineering) был разработан протокол определения количества CD34⁺ ГСК в биологических образцах методом проточной цитофлуориметрии. В данном протоколе описаны пробоподготовка, подбор реактивов и стратегия гейтирования [11, 29]. Ниже мы приводим адаптированную версию этого протокола, применяемую в ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ.

Для осуществления исследования необходимо наличие двух моноклональных антител: против антигена CD34 и против антигена CD45. CD45 — это панлейкоцитарный антиген, который **не** обнаруживается на эритроцитах, ретикулоцитах, эритрокариоцитах, тромбоцитах, эндотелиальных клетках. CD45 экспрессируется на всех лейкоцитах, при

этом плотность экспрессии — наибольшая на лимфоцитах, средняя — на моноцитах и базофилах и более слабая — на нейтрофилах и ГСК. Так как CD34⁺ ГСК — это редко встречающиеся клетки, то рекомендуется использовать антитела против CD34, меченные «ярким» флуорохромом, например фикоэритрином. Кроме того, необходимо использовать антитела против CD34 класса III (клоны 8G12, НРСА-2 или 581). Рекомендуются антитела против CD45, меченные более слабым флуорохромом, например флуоресцеина изотиоцианатом, а среди клонов отдается предпочтение 2D1 или J33. Помимо моноклональных антител необходимо использовать также 7-аминоактиномицин D (7-AAD) — краситель, применяющийся для оценки жизнеспособности клеток, при этом окрашивающиеся 7-AAD клетки являются нежизнеспособными [29].

Наиболее оптимальным является применение лизиса эритроцитов после инкубации с моноклональными антителами без последующей отмывки, что позволяет минимизировать потери клеток при пробоподготовке.

1. К анализируемому образцу периферической крови, костного мозга или лейкоконцентрата добавляются моноклональные антитела и 7-AAD, проводится инкубация 15—20 минут в темноте при комнатной температуре.
2. Затем добавляется лизирующий раствор на основе хлорида аммония без фиксатора. Время лизиса выдерживается в соответствии с инструкцией производителя.
3. Сразу после лизиса эритроцитов образец анализируют на проточном цитофлуориметре в течение 1 часа. Хранить образцы до сбора рекомендуется в воде со льдом в темноте.

Существует два подхода к определению абсолютного количества CD34⁺ ГСК в образце.

1. Двухплатформенный метод, который включает определение доли CD34⁺ ГСК относительно всех лейкоцитов (CD45-положительных событий) с помощью проточного цитофлуориметра и подсчет абсолютного количества лейкоцитов с помощью гематологического анализатора. После этого производится расчет абсолютного содержания CD34⁺ ГСК в 1 мкл.
2. Одноплатформенный метод, в котором используются специальные пробирки с фиксированным количеством лиофилизированных флуоресцентных гранул.

Последовательность гейтирования (согласно протоколу ISHAGE) проиллюстрирована на рис. 1. На рисунке не представлены предварительные этапы гейтирования, общие для всех цитометрических исследований, а именно: выделение всех событий на графике линейных

шкал бокового и прямого светорассеяния друг против друга (единичных событий и всех клеток) и гейтирование жизнеспособных клеток, не связавших 7-AAD. Далее из всех проанализированных событий выбираются CD45-положительные клетки (CD45⁺) на точечной диаграмме бокового светорассеяния (SSC — side scatter) против CD45 с помощью гейта «лейкоциты» (рис. 1, А). При выборе данных клеток следует иметь в виду, что CD34⁺ ГСК имеют слабую экспрессию CD45, поэтому гейт рекомендуется ставить так, чтобы не отсечь искомые клетки. Затем на диаграмме SSC против CD34 отбираются все CD34⁺ клетки. Экспрессия CD34 уменьшается по мере созревания клетки: наиболее высокая экспрессия характерна для истинно стволовых и полипотентных стволовых клеток, более слабая — для унипотентных частично коммитированных клеток-предшественниц. Для подсчета необходимо выбрать все CD34⁺ клетки независимо от степени экспрессии (рис. 1, Б). На следующем этапе проводится «обратное» гейтирование: выделенные CD34⁺ клетки отображаются вновь на диаграмме SSC против CD45 (рис. 1, В). Здесь необходимо исключить события с высокой экспрессией CD45 — это лимфоциты и моноциты,

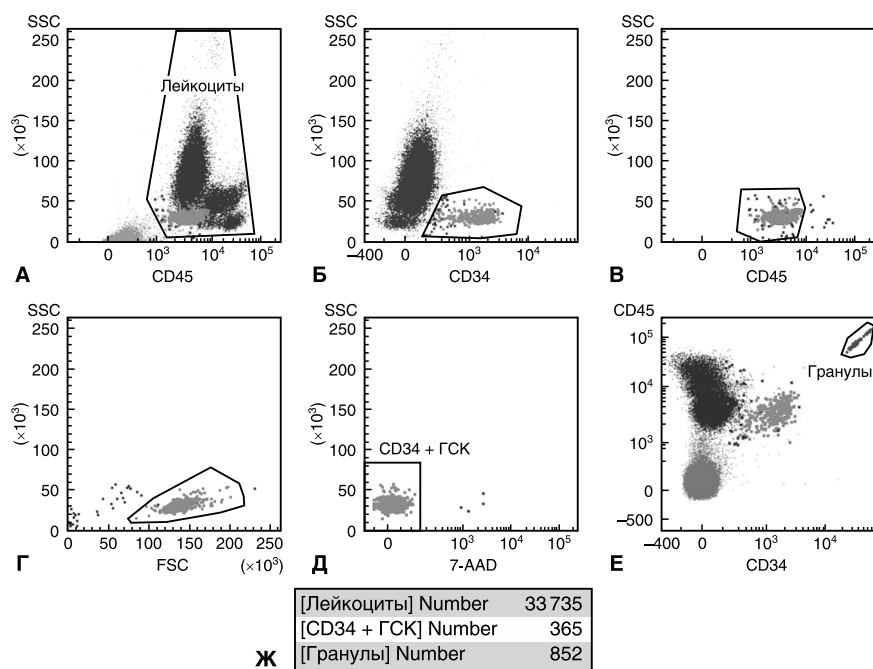


Рисунок 1. Стратегия гейтирования, применяемая для определения количества CD34⁺ ГСК. А—Д: двухплатформенный метод. А—Е: одноплатформенный метод. Объяснение в тексте.

которые неспецифически окрасились моноклональным антителом к CD34. Далее на диаграмме прямого светорассеяния (FSC — forward scatter) против SSC отсекаются события с низкими параметрами FSC и/или SSC, которые являются обломками клеток, так называемым дебрисом (рис. 1, Г). На этом же этапе нужно отсекал события со слишком высокими значениями FSC и/или SSC, так как ГСК имеют размеры, близкие к размерам лимфоцитов. Дополнительно можно проверить выделенные CD34⁺ клетки, показав их на графике SSC против 7-AAD — все они не должны окрашиваться (рис. 1, Д). Если используется одноплатформенный метод, то в дополнение ко всем выше обозначенным этапам необходимо также выделить лиофилизированные флуоресцентные гранулы на диаграмме CD34 против CD45 (рис. 1, Е). Для достаточной точности анализа рекомендуется проанализировать по крайней мере 100 CD34⁺ ГСК и/или 75 000 CD45⁺ клеток [11].

Далее рассмотрим расчет абсолютного содержания CD34⁺ ГСК в биологическом образце двумя методами.

1. *Двухплатформенный метод.* Как было указано ранее, для определения CD34⁺ ГСК двухплатформенным методом необходимо знать абсолютное число лейкоцитов в образце (АЧЛ) и долю CD34⁺ ГСК среди лейкоцитов (%CD34⁺ ГСК). На рис. 1, Ж показано, что при анализе образца было проанализировано 33 735 лейкоцитов, среди которых присутствует 365 CD34⁺ ГСК, тогда их доля составит: $365 \div 33\,735 \times 100\% = 1,08\%$. АЧЛ в образце составило $9,8 \times 10^9/\text{л}$. Для расчета абсолютного количества CD34⁺ ГСК удобна следующая формула:

Абсолютное количество CD34⁺ ГСК (мкл) = %CD34⁺ ГСК $\times$ 10 $\times$ АЧЛ,

где АЧЛ сокращено до числа, стоящего до $\times 10^9/\text{л}$. Тогда в данном примере получаем, что абсолютное количество CD34⁺ ГСК в образце составляет: $9,8 \times 1,08 \times 10 = 105,8/\text{мкл}$.

2. *Одноплатформенный метод.* Пересчет абсолютного количества CD34⁺ ГСК производится по формуле:

$$\begin{aligned} &\text{Абсолютное количество CD34}^+ \text{ ГСК} = \\ &= \frac{\text{Число CD34}^+ \text{ ГСК в гейте} \times \text{Число гранул в пробирке}}{\text{Число гранул в гейте} \times \text{Объем образца}}. \end{aligned}$$

В данном примере число CD34⁺ ГСК в гейте составило 365, число гранул в гейте — 1852 (рис. 1, Ж), а число гранул в пробирке — 53 550 (указывается производителем). В анализ было взято 100 мкл образца. Тогда абсолютное количество CD34⁺ ГСК составляет: $(365 \times 53\,550 \div 1852) \div 100 \text{ мкл} = 105,5/\text{мкл}$.

После получения лейкоконцентрата определяют количество CD34⁺ ГСК, которое он содержит. Для этого необходимо получить следующие величины: долю CD34⁺ ГСК среди всех CD45⁺ клеток, общее количество ядросодержащих клеток, объем лейкоконцентрата (ЛК) и массу тела больного. Для подсчета общего содержания ядросодержащих клеток в лейкоконцентрате в асептических условиях берут пробу лейкоконцентрата в микропробирку и разбавляют 0,9% раствором хлорида натрия в отношении 1:9 и определяют АЧЛ ($\times 10^9/\text{л}$) с помощью гематологического анализатора. Далее находят массу заготовленного ЛК. Взвешивают контейнер с ГСК на медицинских весах и, считая, что его плотность равна 1000 г/см^3 , переводят найденную массу в объем (мл) по формуле $1 \text{ г} = 1 \text{ мл}$.

$$\begin{aligned} &\text{Количество ядросодержащих клеток в ЛК } (\times 10^6) = \\ &= \frac{\text{АЧЛ } (\times 10^9/\text{л}) \times \text{Объем ЛК (мл)} \times 10}{1000}. \end{aligned}$$

Далее можно подсчитать количество заготовленных в лейкоконцентрате CD34⁺ ($\times 10^6$ клеток) ГСК на 1 кг массы тела больного (реципиента):

$$\begin{aligned} &\text{Количество CD34}^+ \text{ клеток/кг} = \\ &= \frac{\% \text{CD34}^+ \times \text{Количество ядросодержащих клеток в ЛК}}{100 \times \text{Масса пациента (реципиента)}}. \end{aligned}$$

Есть также упрощенная формула для расчета:

$$\text{Количество CD34}^+ \text{ клеток/кг} = \frac{\text{АЧЛ} \times \% \text{CD34}^+ \times \text{Масса ЛК}}{10 \times \text{Масса пациента (реципиента)}},$$

где АЧЛ сокращено до числа, стоящего до $\times 10^9/\text{л}$, и определено в разведенном в 10 раз лейкоконцентрате, а масса ЛК берется без размерности.

Влияние криоконсервации трансплантата на содержание CD34⁺ ГСК

Криоконсервация является единственным возможным способом обеспечить длительное, до 14,5 года [30], хранение ГСК. Однако все процедуры заморозки, разморозки и оттаивания трансплантата неизбежно будут приводить к гибели клеток.

Desoutter и соавт. с помощью 7-AAD и нецитотоксического флуоресцентно меченного ингибитора каспаз (FLICA), ковалентно связывающегося только с активными ферментами каспаз, оценили апоптоз

в 46 образцах аутологичных стволовых клеток, полученных из периферической крови. Во всех пробах трансплантатов после разморозки выявили увеличение опосредованного каспазами апоптоза CD34⁺ клеток в среднем до 23% ($23,5 \pm 2,1$), в то время как в свежих образцах FLICA⁺ клетки составляли не более 2% ($1,9 \pm 0,4$). Авторы не обнаружили связи между длительностью посттрансплантационной аплазии и долей клеток в апоптозе в реинфузированных трансплантатах [31]. В то же время Wu и соавт., измерявшие долю клеток в апоптозе при помощи сочетания аннексина-V и 7-AAD, обнаружили, что у больных, в трансплантате которых было больше лейкоцитов в состоянии апоптоза, медленнее восстанавливалось количество нейтрофилов [32].

На уровень апоптоза после разморозки также может оказывать влияние дегрануляция гранулоцитов. В ряде работ была обнаружена значительная отрицательная корреляция между процентным содержанием гранулоцитов в продукте афереза до замораживания и жизнеспособностью ядросодержащих клеток после оттаивания [30], что, вероятно, обусловлено высвобождением эластазы, миелопероксидазы, катепсинов и дефенсинов.

Литература

1. Королева Д. А., Щецова О. О., Дроков М. Ю. и др. Собственный опыт трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток крови у больных с TP53-мутированными формами ЛКМ. Гематология и трансфузиология 2022; 67(S2):224.
2. Королева Д. А., Дроков М. Ю., Щецова О. О. и др. Результаты выполнения трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК) у больных агрессивными В- и Т-клеточными лимфомами. Гематология и трансфузиология 2022; 67(S2):224—225.
3. Forman SJ, Blume KG, Thomas E. Bone marrow transplantation. Wiley-Blackwell, 1994.
4. Thomas ED, Lochte HL Jr, Lu WC, Ferrebee JW. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. N Engl J Med 1957; 257(11):491—496.
5. Boisset JC, Robin C. On the origin of hematopoietic stem cells: Progress and controversy. Stem Cell Research 2012; 8(1):1—13.
6. Bond VP, Cronkite EP, Flidner TM, Schork P. Deoxyribonucleic acid synthesizing cells in peripheral blood of normal human beings. Science 1958; 128(3317): 202—203.
7. Swift MN, Taketa ST, Bond VP. Efficacy of hematopoietic protective procedure in rats x-irradiated with intestine shielded. Radiat Res 1956; 4(3):186—192.
8. Brecher G, Cronkite EP. Post-radiation parabiosis and survival in rats. Proc Soc Exp Biol Med 1951; 77(2):292—294.

9. Storb R, Graham TC, Epstein RB et al. Demonstration of hemopoietic stem cells in the peripheral blood of baboons by cross circulation. *Blood* 1977; 50(3): 537—542.
10. Goodman J, Hodgson G. Evidence for stem cells in the peripheral blood of mice. *Blood* 1962; 19(6):702—714.
11. Sutherland DR, Anderson L, Keeney M et al. The ISHAGE guidelines for CD34+ cell determination by flow cytometry. *J Hematother* 1996; 5(3): 213—226.
12. McCredie KB, Hersh EM, Freireich EJ. Cells capable of colony formation in the peripheral blood of man. *Science* 1971; 171(3968):293—294.
13. Körbling M, Freireich EJ. Twenty-five years of peripheral blood stem cell transplantation. *Blood* 2011; 117(24):6411—6416.
14. Афанасьев Б. В., Зубаровская Л. С., Моисеев И. С. Аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток у детей: настоящее, проблемы, перспективы. *Российский журнал детской гематологии и онкологии* 2015; 2(2):28—42.
15. Nielsen JS, McNaghy KM. Novel functions of the CD34 family. *J Cell Sci* 2008; 121(24):3682—3692.
16. Nakauchi H. Hematopoietic stem cells: Are they CD34-positive or CD34-negative? *Nat Med* 1998; 4(9):1009—1010.
17. Engelhardt M, Lübbert M, Guo Y. CD34+ or CD34-: Which is the more primitive? *Leukemia* 2002; 16(9):1603—1608.
18. Bender JG, To LB, Williams S, Schwartzberg LS. Defining a therapeutic dose of peripheral blood stem cells. *J Hematother* 1992; 1(4):329—341.
19. Demirer T, Dean Buckner C, Bensinger WI. Optimization of peripheral blood stem cell mobilization. *Stem Cells* 1996; 14(1):106—116.
20. Fernandez HF, Noto TA, Morrell L et al. Early engraftment of mobilized autologous peripheral-blood progenitor cells collected by large-volume leukapheresis. *Blood* 1994; 84(Suppl 1):A94.
21. Bensinger W, Appelbaum F, Rowley S et al. Factors that influence collection and engraftment of autologous peripheral-blood stem cells. *J Clin Oncol* 1995; 13(10):2547—2555.
22. Tricot G, Jagannath S, Vesole D et al. Peripheral blood stem cell transplants for multiple myeloma: identification of favorable variables for rapid engraftment in 225 patients. *Blood* 1995; 85(2):588—596.
23. Remberger M, Grønvald B, Ali M et al. The CD34+ cell dose matters in hematopoietic stem cell transplantation with peripheral blood stem cells from sibling donors. *Clin Hematol Int* 2020; 2(2):74—81.
24. Remberger M, Törlén J, Ringdén O et al. Effect of total nucleated and CD34+ cell dose on outcome after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2015; 21(5):889—893.
25. Bender JG, To LB, Williams S, Schwartzberg LS. Defining a therapeutic dose of peripheral blood stem cells. *J Hematother* 1992; 1(4):329—341.
26. Anguita-Compagnon AT, Dibarrart MT, Palma J et al. Mobilization and collection of peripheral blood stem cells: guidelines for blood volume to process, based

- on CD34-positive blood cell count in adults and children. *Transplant Proc* 2010; 42(1):339—344.
27. Гальцева И. В., Давыдова Ю. О., Гапонова Т. В. и др. Абсолютное количество гемопоэтических стволовых клеток CD34+ в периферической крови перед процедурой лейкофереза как параметр, прогнозирующий эффективность сбора стволовых клеток. *Терапевтический архив* 2017; 89(7):18—24.
 28. Mohty M, Hübel K, Kröger N et al. Autologous haematopoietic stem cell mobilisation in multiple myeloma and lymphoma patients: A position statement from the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2014; 49(7):865—872.
 29. Barnett D, Janossy G, Lubenko A et al. Guideline for the flow cytometric enumeration of CD34+ haematopoietic stem cells. Prepared by the CD34+ haematopoietic stem cell working party. General Haematology Task Force of the British Committee for Standards in Haematology. *Clin Lab Haematol* 1999; 21(5): 301—308.
 30. Winter JM, Jacobson P, Bullough B et al. Long-term effects of cryopreservation on clinically prepared hematopoietic progenitor cell products. *Cytotherapy* 2014; 16(7):965—975.
 31. Desoutter J, Ossart C, Lacassagne MN et al. Cryopreservation and thawing of hematopoietic stem cell CD34-induced apoptosis through caspase pathway activation: Key role of granulocytes. *Cytotherapy* 2019; 21(6):612—618.
 32. Wu L, Al-Hejazi A, Filion L et al. Increased apoptosis in cryopreserved autologous hematopoietic progenitor cells collected by apheresis and delayed neutrophil recovery after transplantation: a nested case-control study. *Cytotherapy* 2012; 14(2):205—214.

И. В. Гальцева, Ю. О. Давыдова, Н. М. Капранов,
К. А. Никифорова

Глава 21.

Методика подсчета CD3-положительных клеток в трансплантате

Выполнение трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК) для многих пациентов является шансом на выздоровление, однако алло-ТГСК может приводить к тяжелым иммунологическим осложнениям, таким как реакция «трансплантат против хозяина» (РТПХ) или отторжение трансплантата. Частота развития острой РТПХ (оРТПХ), по различным литературным данным, достигает 60% [1–4], хронической РТПХ — 30–40% [5]. Вероятность отторжения трансплантата достигает 5–7% и в значительной степени зависит от HLA-совместимости донора и реципиента [6]. Высокая смертность после алло-ТГСК также связана с вирусными инфекциями после трансплантации. Кроме того, после алло-ТГСК может развиваться рецидив основного гематологического заболевания (в 30–45% случаев) [7, 8], и для решения этой проблемы могут быть применены лимфоциты донора.

На практике инфузия лимфоцитов донора впервые была осуществлена в 1990 г. Kolb и коллегами для лечения молекулярного рецидива хронического миелолейкоза после алло-ТГСК [9]. Успех этой исследовательской группы положил начало практике инфузии лимфоцитов донора для лечения посттрансплантационных рецидивов гематологических заболеваний. В многочисленных клинических исследованиях,

выполненных за последние 25 лет, было показано, что введение лимфоцитов донора позволяет достигнуть полной ремиссии у значительного количества больных с рецидивом основного заболевания: хронического миелолейкоза (ХМЛ) [10, 11], острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) [12], острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ) [11], лимфом [13]. Кроме того, инфузию донорских лимфоцитов можно проводить в профилактических целях: в исследовании Wang и соавт. на большой выборке пациентов ($n = 932$) было показано, что при применении интенсифицированного миелоаблативного режима кондиционирования и профилактической инфузии лимфоцитов донора достигаются наибольшие общая и безрецидивная выживаемости [14].

Основную роль в реализации противоопухолевого ответа среди всех лимфоцитов отводят популяции Т-клеток. Долгое время оставался открытым вопрос об оптимальном количестве Т-клеток, вводимых пациентам: нужно соблюсти баланс между количеством, достаточным для элиминации опухолевых клеток, но не приводящим к развитию РТПХ. Так как специфическим маркером Т-клеток служит антиген CD3, то были разработаны методики по подсчету CD3-положительных клеток с помощью проточной цитометрии. В работе Bar и соавт. [15] больных с рецидивами гематологических заболеваний — ХМЛ, хронического лимфолейкоза (ХЛЛ), множественной миеломы, ОМЛ, ОЛЛ, миелодиспластического синдрома (МДС) и других — разделили на 3 группы. Больным из группы А CD3⁺ клетки вводили в количестве $< 1 \times 10^7$ на 1 кг массы реципиента (/кг), из группы Б — $1-10 \times 10^7$ /кг, из группы В — $> 10 \times 10^7$ /кг. Риск развития РТПХ в течение 12 месяцев после инфузии лимфоцитов составил 21%, 45% и 55% для групп А, Б и В соответственно. Доза CD3⁺ клеток, превышавшая 10×10^7 /кг, была связана с увеличением риска развития РТПХ после переливания донорских лимфоцитов ($p = 0,03$). Введение средних доз CD3⁺ лимфоцитов ($1-10 \times 10^7$ /кг) снижало вероятность развития рецидива по сравнению с инфузией малых доз Т-клеток ($< 1 \times 10^7$ /кг). С целью профилактики рецидива в работе Wang и соавт. количество использованных в ходе инфузии CD3⁺ лимфоцитов составляло 1×10^8 /кг [16].

При гаплоидентичных и родственных частично совместимых трансплантациях доза CD3⁺ лимфоцитов составляет 10^4-10^5 /кг. При совместимых аллогенных неродственных трансплантациях — 10^5-10^6 /кг.

Определение количества CD3⁺ лимфоцитов донора в лейкоконцентрате, получаемом в результате лейкофереза, используемого для трансфузии пациентам, является необходимой процедурой, так как от количества Т-лимфоцитов в трансплантате зависит результат проводимой

терапии. Подсчет CD3⁺ лимфоцитов осуществляется двухплатформенным методом: с помощью проточного цитофлуориметра определяют долю CD3⁺ клеток от всех лейкоцитов (CD45-положительных клеток), содержащихся в лейкоконцентрате, а количество лейкоцитов определяется с помощью автоматического гематологического анализатора. Итоговая формула, применяемая для расчета количества CD3⁺ клеток на килограмм массы тела пациента, представлена ниже:

Количество CD3⁺ лимфоцитов/кг =

$$= \frac{\text{Доля CD3}^+ \text{ лимфоцитов (\%)} \times \text{Количество ядросодержащих клеток в ЛК} (\times 10^9)}{100\% \times \text{Масса тела пациента (кг)}},$$

где ЛК — лейкоконцентрат.

Количество ядросодержащих клеток определяется так же, как описано в гл. «Методика подсчета CD34-положительных гемопоэтических стволовых клеток в периферической крови и трансплантате».

Процедура пробоподготовки для проведения цитометрического анализа количества CD3⁺ клеток включает в себя следующие этапы:

1. Добавление к анализируемому образцу моноклональных антител¹ и 7-аминоактиномицина D (7-AAD)², с последующей инкубацией в течение 15—20 минут в темноте.
2. Добавление лизирующего раствора на основе хлорида аммония без фиксатора. Инкубация на протяжении 10 минут³ в темноте при комнатной температуре.
3. После лизиса эритроцитов необходимо провести сбор и запись данных на проточном цитофлуориметре. Подготовленный таким путем образец стабилен в течение 1 часа. Хранить образцы до сбора рекомендуется в воде со льдом в темноте.

Последовательность гейтирования при проведении цитометрического анализа представлена на рис. 1.

Последовательность гейтирования:

1. Исключить из анализа дебрис и нелизированные эритроциты на диаграмме линейных шкал бокового (SSC) и прямого (FSC) светорассеяния.
2. Выбрать все жизнеспособные клетки (гейт «Живые клетки»), которые не окрашиваются 7-AAD.
3. Из всех жизнеспособных клеток выбрать CD45-«положительные события» на диаграмме SSC vs CD45 (гейт «Лейкоциты»).

¹ Рекомендуется использовать моноклональные антитела анти-CD3 (клон SK7) и анти-CD45 (клоны 2D1 или J33).

² 7-AAD — это краситель, применяющийся для оценки жизнеспособности клеток. Клетки, окрашивающиеся 7-AAD, являются нежизнеспособными.

³ Согласно рекомендациям производителя раствора.

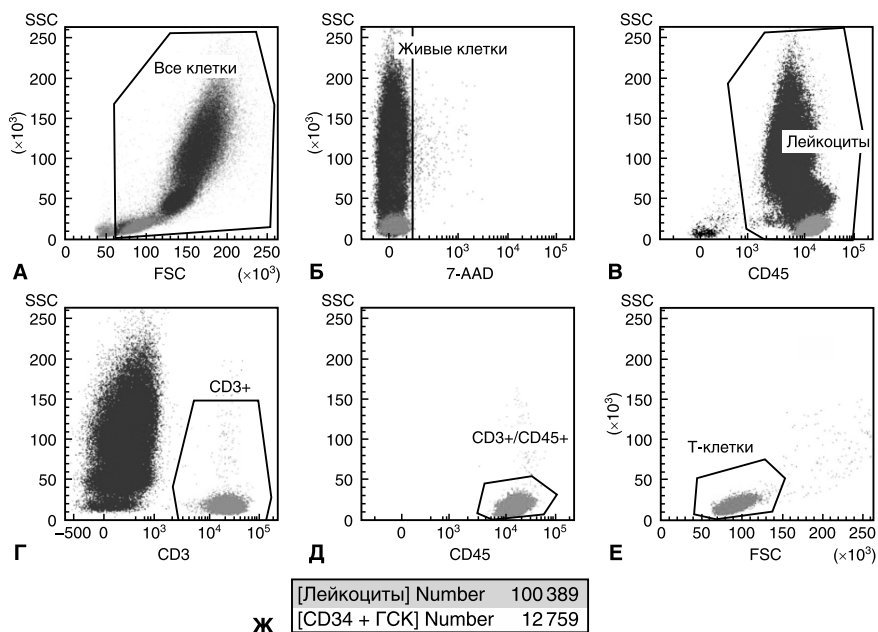


Рисунок 1. Стратегия гейтирования, применяемая для определения количества $CD3^+$ ГСК. Объяснение в тексте.

- Из всех $CD45^+$ клеток выбрать $CD3^+$ (гейт $CD3^+$) на диаграмме SSC vs CD3.
- Провести обратное гейтирование выбранных клеток на диаграмму SSC vs CD45 и выбрать клетки с высокой экспрессией CD45 (гейт $CD3^+/CD45^+$).
- Провести обратное гейтирование выбранных клеток на диаграмму SSC vs FSC и выбрать клетки с низкими параметрами бокового и прямого светорассеяния, соответствующие лимфоцитам (гейт «Т-клетки»).

Доля $CD3^+$ клеток равна отношению количества клеток в гейте «Т-клетки» к количеству клеток в гейте «Лейкоциты». Точно рассчитанная доля $CD3^+$ лимфоцитов в продукте афереза позволяет определить абсолютное количество заготовленных $CD3^+$ клеток на килограмм массы тела реципиента и определить необходимый для трансплантации объем трансплантата.

Литература

1. Pavletic SZ, Fowler DH. Are we making progress in GVHD prophylaxis and treatment? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2012; 2012(1): 251—264.
2. Jagasia M, Arora M, Flowers ME et al. Risk factors for acute GVHD and survival after hematopoietic cell transplantation. *Blood* 2012; 119(1):296—307.
3. Veltri L, Regier M, Cumpston A et al. Incidence and pattern of graft-versus-host disease in patients undergoing allogeneic transplantation after nonmyeloablative conditioning with total lymphoid irradiation and antithymocyte globulin. *Bone Marrow Res* 2013; 2013:414959.
4. Al-Kadhimi Z, Gul Z, Chen W et al. High incidence of severe acute graft-versus-host disease with tacrolimus and mycophenolate mofetil in a large cohort of related and unrelated allogeneic transplantation patients. *Biol Blood Marrow Transplant* 2014; 20(7):979—985.
5. Arai S, Arora M, Wang T et al. Increasing incidence of chronic graft-versus-host disease in allogeneic transplantation: a report from the Center for International Blood and Marrow Transplant Research. *Biol Blood Marrow Transplant* 2015; 21(2):266—274.
6. Mattsson J, Ringdén O, Storb R. Graft failure after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2008; 14(Suppl 1):165—170.
7. Barrett AJ, Battiwalla M. Relapse after allogeneic stem cell transplantation. *Expert Rev Hematol* 2010; 3(4):429—441.
8. Ossenkoppele GJ, Janssen JJ, van de Loosdrecht AA. Risk factors for relapse after allogeneic transplantation in acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2016; 101(1):20—25.
9. Kolb HJ, Mittermüller J, Clemm C et al. Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients. *Blood* 1990; 76(12):2462—2465.
10. Dazzi F, Szydlo RM, Cross NC et al. Durability of responses following donor lymphocyte infusions for patients who relapse after allogeneic stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia. *Blood* 2000; 96(8): 2712—2716.
11. Shiobara S, Nakao S, Ueda M et al. Donor leukocyte infusion for Japanese patients with relapsed leukemia after allogeneic bone marrow transplantation: lower incidence of acute graft-versus-host disease and improved outcome. *Bone Marrow Transplant* 2000; 26(7):769—774.
12. Schmid C, Labopin M, Nagler A et al. Donor lymphocyte infusion in the treatment of first hematological relapse after allogeneic stem-cell transplantation in adults with acute myeloid leukemia: a retrospective risk factors analysis and comparison with other strategies by the EBMT Acute Leukemia Working Party. *J Clin Oncol* 2007; 25(31):4938—4945.
13. Morris E, Thomson K, Craddock C et al. Outcomes after alemtuzumab-containing reduced-intensity allogeneic transplantation regimen for relapsed and refractory non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 2004; 104(13):3865—3871.

14. Wang Y, Liu QF, Wu DP et al. Impact of prophylactic/preemptive donor lymphocyte infusion and intensified conditioning for relapsed/refractory leukemia: a real-world study. *Sci China Life Sci* 2020; 63(10):1552—1564.
15. Bar M, Sandmaier BM, Inamoto Y et al. Donor lymphocyte infusion for relapsed hematological malignancies after allogeneic hematopoietic cell transplantation: prognostic relevance of the initial CD3+ T cell dose. *Biol Blood Marrow Transplant* 2013; 19(6):949—957.

Инструментальная диагностика в гематологии

Глава 22.

Алгоритм лучевого обследования пациентов с парапротеинемическими гемобластозами

Одним из критериев установления диагноза «симптоматическая множественная миелома» (ММ) является выявление остеолитических изменений в скелете. По данным литературы, очаги деструкции в костях определяются у 80—90% пациентов [1—4].

Учитывая современные возможности в лечении ММ, необходима точная диагностика поражения костей и костного мозга, т. к. зачастую именно на основании этих данных принимается решение о начале лечения, а выявление минимальной остаточной болезни (МОБ) важно для определения глубины противоопухолевого ответа, прогноза и планирования дальнейшего лечения [5].

Лучевая диагностика в настоящее время представлена широким спектром доступных вариантов выявления поражения костей и костного мозга, начиная от самого простого — классической рентгенографии и заканчивая высокотехнологичными методами визуализации, такими как компьютерная томография (КТ) всего тела, в том числе в режиме низкой дозы облучения, позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ) с КТ (ПЭТ-КТ), магнитно-резонансная томография (МРТ). С учетом международных рекомендаций и собственного опыта в использовании различных методов медицинской визуализации нами был разработан алгоритм лучевого обследования пациентов с ММ.

После клинико-лабораторной верификации парапротеинемического гемобластоза всем пациентам в дебюте заболевания в качестве скринингового метода показано проведение компьютерной томографии костей скелета в режиме низкой дозы облучения (низкодозовой КТ скелета), позволяющей оценить наличие и распространенность остеолитических изменений, костных и экстрамедуллярных плазмоцитом.

В зависимости от выявленных на низкодозовой КТ скелета изменений определено несколько подходов к использованию тех или иных методов лучевой диагностики.

1. При обнаружении двух и более очагов деструкции диагноз считается подтвержденным и использование других методов визуализации не требуется. Однако при выявлении патологических переломов тел и дугоотростчатого аппарата позвонков или инвазии мягкотканного компонента костной плазмоцитомы в просвет спинномозгового канала для решения вопроса о необходимости декомпрессии и/или стабилизирующей операции целесообразно проведение МРТ-исследования пораженной области, позволяющего более достоверно оценить вовлеченность в патологический процесс спинного мозга, оболочек, нервных корешков и степень стеноза спинномозгового канала.

В процессе лечения потребуются контроль размеров и структуры костных и экстрамедуллярных плазмоцитом. Для этих целей применяется КТ или МРТ зоны интереса по стандартным протоколам сканирования. С учетом КТ-критериев положительного ответа на лечение ММ [6] первое контрольное КТ-исследование следует проводить не раньше, чем завершён 4-й курс химиотерапии (рис. 1).

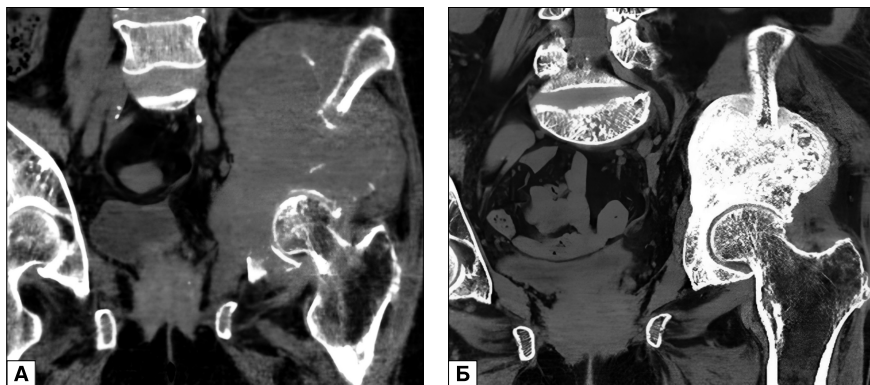


Рисунок 1. Фрагмент КТ костей таза в коронарной проекции. Массивная костная плазмоцитома в левой подвздошной кости. А — до лечения. Б — после 4-го курса полихимиотерапии; наблюдается уменьшение размеров и массивное обызвествление плазмоцитомы.

В случаях возникновения во время лечения патологических переломов трубчатых костей рекомендуется использование полипозиционной классической рентгенографии. При переломах других костей (позвоночник, таз, ребра) целесообразно использовать КТ.

По окончании лечения при достижении полной ремиссии с целью детекции МОБ следует оценить возможность выполнения ПЭТ-КТ. Международная рабочая группа по изучению ММ рекомендует проводить оценку МОБ методом ПЭТ-КТ с исследовательской/научной целью. Схематично алгоритм представлен на рис. 2.

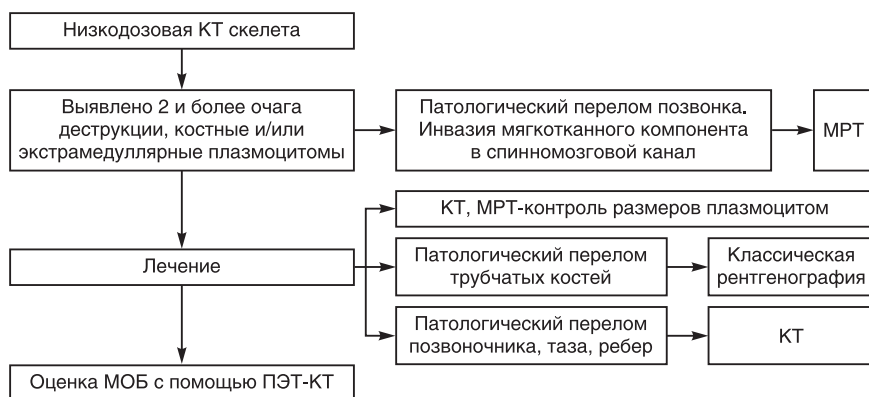


Рисунок 2. Лучевая диагностика парапротеинемического гемобластоза при нескольких очагах деструкции.

2. При обнаружении единичного очага поражения костной ткани (костной плазмоцитомы, подтвержденной гистологическим исследованием) для уточнения наличия инфильтрации костного мозга показано выполнение МРТ-исследования в режиме сканирования всего тела, а при недоступности этого исследования — МРТ всех отделов позвоночника и таза [5]. Если такой вид исследования недоступен или имеются противопоказания к его выполнению (клаустрофобия, имплантированный искусственный водитель ритма сердца, имплантированный слуховой аппарат и т. д.), можно заменить его на ПЭТ-КТ.

При исключении инфильтрации костного мозга устанавливают диагноз солитарной плазмоцитомы, которая требует облучения очага поражения. Оценка ответа на лечение осуществляется методом МРТ в режиме сканирования всего тела или ПЭТ-КТ.

В случае выявления инфильтрации костного мозга подтверждается диагноз ММ, который требует системного лечения. Схематично алгоритм представлен на рис. 3.

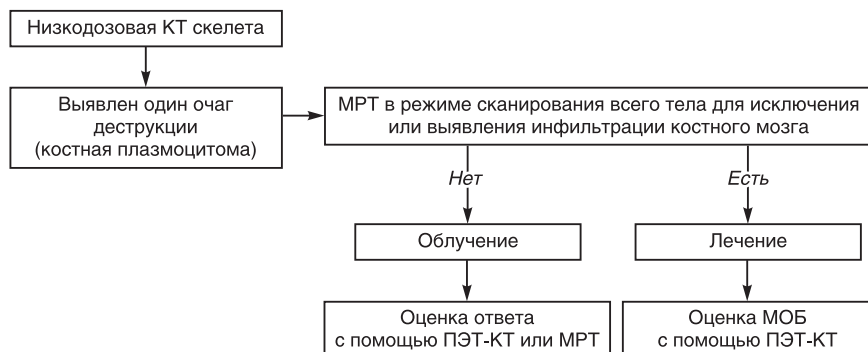


Рисунок 3. Лучевая диагностика парапротеинемического гемобластоза при одном очаге деструкции.

3. Если при выполнении низкодозовой КТ скелета не было выявлено ни одного очага деструкции костной ткани, для уточнения наличия инфильтрации костного мозга показано проведение МРТ-исследования в режиме сканирования всего тела, а при недоступности этого исследования — МРТ всех отделов позвоночника и таза [5]. Если указанный вид исследования недоступен или имеются противопоказания к его выполнению (клаустрофобия, имплантированный искусственный водитель ритма сердца, имплантированный слуховой аппарат и т. д.), можно заменить его на ПЭТ-КТ.

При исключении инфильтрации костного мозга показано наблюдение за пациентом с ежегодным выполнением контрольного МРТ в режиме всего тела, в ряде случаев ПЭТ-КТ.

При выявлении инфильтрации костного мозга требуется проведение системного лечения. Оценка ответа осуществляется лабораторными методами (иммунохимическое исследование крови и мочи, подсчет миелограммы). Схематично алгоритм представлен на рис. 4.

В случае клинико-лабораторной констатации рецидива парапротеинемического гемобластоза показана повторная низкодозовая КТ скелета. Целью данного исследования является поиск новых очагов деструкции костной ткани, новых костных и экстрамедуллярных плазмочитом, оценка размеров ранее существовавших плазмочитом (увеличение более чем на 50%) [7]. Для достоверного выявления новых структурных изменений необходимо сопоставление с аналогичным дебютным исследованием.

Если при повторном исследовании выявлены новые плазмочитомы, необходим КТ- или МРТ-контроль их размеров в процессе лечения, но не ранее, чем закончен 4-й курс химиотерапии.

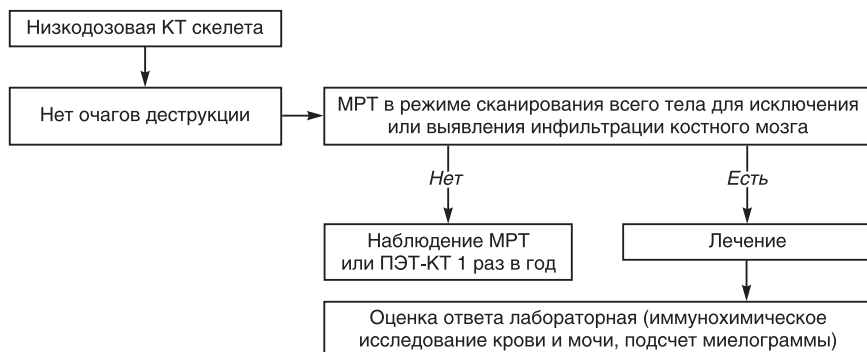


Рисунок 4. Лучевая и лабораторная диагностика парапротеинемического гемобластоза в отсутствие очагов деструкции.

Оценка ответа на лечение осуществляется лабораторными методами (иммунохимическое исследование крови и мочи, подсчет миелограммы). Схематично алгоритм представлен на рис. 5.

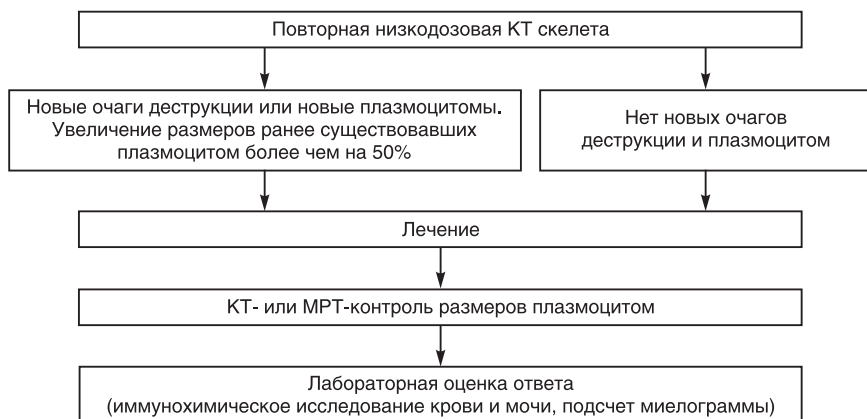


Рисунок 5. Лучевая и лабораторная констатация рецидива парапротеинемического гемобластоза.

Литература

1. Dimopoulos M, Terpos E, Comenzo RL et al. International myeloma working group consensus statement and guidelines regarding the current role of imaging techniques in the diagnosis and monitoring of multiple myeloma. *Leukemia* 2009; 23:1545—1556. DOI: 10.1038/leu.2009.89.

2. Terpos E, Kleber M, Engelhardt M et al. European Myeloma Network guidelines for the management of multiple myeloma-related complications. *Haematologica* 2015; 100(10):1254—1266.
3. Terpos E. Multiple myeloma: criteria for diagnosis and response to therapy. In: Gouliamos AD, Andreou JA, Kosmidis PA (editors). *Imaging in clinical oncology*. 2nd edition. Cham (CH): Springer, 2018. P. 651—658. DOI: 10.1007/978-3-319-68873-2_95.
4. Brigle K, Pierre A, Finley-Oliver E et al. Myelosuppression, bone disease, and acute renal failure: evidence-based recommendations for oncologic emergencies. *Clin J Oncol Nurs* 2017; 21(5 Suppl):60—76. DOI: 10.1188/17.CJON.S5.60-76.
5. Hillengass J, Usmani S, Rajkumar SV et al. International myeloma working group consensus recommendations on imaging in monoclonal plasma cell disorders. *Lancet Oncol* 2019; 20(6):e302—e312. DOI: 10.1016/S1470-2045(19)30309-2.
6. Костина И. Э., Гитис М. К., Менделеева Л. П и др. Рентгеновская компьютерная томография в диагностике и мониторинге поражения костей при множественной миеломе с использованием низкодозового и стандартного протоколов сканирования. *Гематология и трансфузиология* 2018; 63(2): 113—123.
7. Kumar S, Paiva B, Anderson KC et al. International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual disease assessment in multiple myeloma. *Lancet Oncol* 2016; 17(8):e328—e346. DOI: 10.1016/S1470-2045(16)30206-6.

**Диагностика заболеваний системы крови.
Практическое руководство**

Научные редакторы д. м. н. Е. Н. Паровичникова,
д. м. н. И. В. Гальцева
Редакторы к. м. н. В. А. Ананич, к. б. н. Н. В. Первухова
Технический редактор В. Ю. Кознов
Оформление обложки Л. Е. Канивченко
Подготовка иллюстраций Ю. Г. Косовская
Корректор В. А. Алексеев

Издательский дом «Практика»
119048, Москва, а/я 421. Тел. (495) 921-22-04
Электронная почта: practica@practica.ru. Сайт: www.practica.ru
Подписано в печать 26.02.2024. Формат 60 × 90/16
Дополнительный тираж 500 экз. Заказ №

Отпечатано в ООО «Фотоэксперт»
Москва, Волгоградский пр-т, 42, корп. 5
Тел.: (495) 601-96-96