

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «РОССИЙСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ХИРУРГИИ
ИМЕНИ АКАДЕМИКА Б.В. ПЕТРОВСКОГО»

На правах рукописи

АСАУЛЕНКО

Захар Павлович

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МЕГАКАРИОЦИТАРНОГО
РОСТКА МИЕЛОИДНОЙ ТКАНИ В БИОПСИЯХ КОСТНОГО МОЗГА
ПРИ ПЕРВИЧНОМ МИЕЛОФИБРОЗЕ И ЭССЕНЦИАЛЬНОЙ
ТРОМБОЦИТЕМИИ С МУТАЦИЯМИ В ГЕНЕ *JAK2* ИЛИ *CALR*

3.3.2. Патологическая анатомия

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

Криволапов Юрий Александрович

доктор медицинских наук, профессор

Санкт-Петербург – 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. РН-НЕГАТИВНЫЕ МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНЫЕ НОВООБРАЗОВАНИЯ КАК АКТУАЛЬНАЯ ПРОБЛЕМА СОВРЕМЕННОЙ ГЕМАТОЛОГИИ И ПАТОЛОГИЧЕСКОЙ АНАТОМИИ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)	
1.1. Определение, история вопроса и классификация	12
1.2. Молекулярный патогенез Рн-негативных миелопролиферативных новообразований.....	14
1.3. Критерии Всемирной организации здравоохранения для диагностики эссенциальной тромбоцитемии: эпидемиология, клиническая картина, патоморфологические проявления и прогноз	23
1.4. Критерии Всемирной организации здравоохранения для диагностики первичного миелофиброза: эпидемиология, клиническая картина, патоморфологические проявления и прогноз	27
1.5. Драйверные мутации в гене <i>JAK2</i> и <i>CALR</i> и их связь с клинико- лабораторной и патоморфологической картиной при первичном миелофиброзе и эссенциальной тромбоцитемии.....	37
1.6. Гистологическое исследование костного мозга как критерий в диагностике первичного миелофиброза и эссенциальной тромбоцитемии	40
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	
2.1. Объект и материалы исследования.....	47
2.2. Методы исследования.....	48
2.3. Использование программного обеспечения <i>ilastik</i> для полуавтоматического выделения мегакариоцитов, экспрессирующих CD42b	62
2.4. Статистический анализ	65

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	66
3.1. Сравнительный анализ случаев первичного миелофиброза и эссенциальной тромбоцитемии	66
3.2. Сравнительный анализ случаев первичного миелофиброза и эссенциальной тромбоцитемии с мутацией в гене <i>JAK2</i> или <i>CALR</i> ...	86
3.3. Сравнительный анализ случаев первичного миелофиброза в префибротической и фибротической стадии с мутацией в гене <i>JAK2</i> или <i>CALR</i>	109
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ.....	125
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	148
ВЫВОДЫ	151
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	152
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ	153
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	155
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	157

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Первичный миелофиброз и эссенциальная тромбоцитемия относятся к группе Ph-негативных миелопролиферативных новообразований. Дифференциальная диагностика этих двух заболеваний представляет наибольшие трудности при патоморфологическом исследовании биопсий костного мозга с признаками гиперплазии миелоидной ткани без выраженных диспластических изменений.

Диагностика первичного миелофиброза и эссенциальной тромбоцитемии носит критериальный характер и зависит от результатов патоморфологического исследования, клинико-лабораторных данных и итогов молекулярно-генетического тестирования.

В XX столетии диагностика миелопролиферативных новообразований осуществлялась только на основании динамики клинических и лабораторных параметров. Ситуация изменилась после разработки классификации Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) опухолей кроветворной и лимфоидной тканей (2001 г.), где гистологический анализ трепанобиоптатов костного мозга был включен в перечень обязательных критериев для верификации первичного миелофиброза и эссенциальной тромбоцитемии [189]. За последние 20 лет в научной литературе опубликовано большое количество работ, подчеркивающих важность гистологического исследования костного мозга в дифференциальной диагностике этих болезней [29; 77; 92; 98; 110; 172; 173; 174]. 5-е издание Классификации ВОЗ опухолей гемопоэтической и лимфоидной тканей определяет гистологическое исследование трепанобиоптатов костного мозга как «большой» диагностический критерий, играющий ключевую роль в верификации диагноза. К патоморфологическим диагностическим признакам первичного миелофиброза и эссенциальной тромбоцитемии относят клеточность костного мозга, лейкоэритробластическое соотношение, наличие/отсутствие гиперплазии ростков

кроветворения, количественные, топографические и морфологические аномалии мегакариоцитарного ростка, наличие и выраженность ретикулинового, коллагенового фиброза. Отличительными особенностями этих двух болезней служат изменения мегакариоцитарного ростка. При гистологическом исследовании врач-патологоанатом должен оценить наличие, плотность и размер мегакариоцитарных кластеров: скопления тесно сомкнутых клеток при первичном миелофиброзе и расположенные более разреженно, не соприкасающиеся друг с другом мегакариоциты при эссенциальной тромбоцитемии, особенности строения ядер мегакариоцитов: гиполобулярные ядра при первичном миелофиброзе и гиперлобулярные ядра при эссенциальной тромбоцитемии, а также тропность мегакариоцитов к костным балкам и синусоидам, которая при первичном миелофиброзе выражена сильнее, чем при эссенциальной тромбоцитемии.

По данным литературы, у больных первичным миелофиброзом и эссенциальной тромбоцитемией в 50–60% случаев обнаруживают мутацию в гене *JAK2*. Янус-киназы (JAK) представляют собой семейство тирозинкиназ, ассоциированных с цитокиновыми рецепторами. *JAK2*, один из представителей этого семейства, активируется при связывании лиганда (например, эритропоэтина) с рецептором, что запускает фосфорилирование его внутриклеточных доменов и активацию сигнальных каскадов. При наличии мутации в гене *JAK2* возникают конформационные изменения кодируемого белка, приводящие к автономной (цитокин-независимой) передаче сигнала. Это нарушение провоцирует неконтролируемую пролиферацию клеток миелоидного ростка кроветворной ткани.

В 2013 году открыта соматическая мутация в 9 экзоне гена *CALR*, которую диагностируют у больных первичным миелофиброзом и эссенциальной тромбоцитемией в 20–35% случаев. Таким образом, случаи с подтвержденными мутациями в гене *JAK2* или *CALR* охватывают ~80% популяции больных первичным миелофиброзом или эссенциальной тромбоцитемией [13; 156; 157; 191].

Верификация первичного миелофиброза и эссенциальной тромбоцитемии в соответствии с критериями ВОЗ требует мультидисциплинарного подхода, при котором врач должен комплексно оценивать результаты гистологического исследования костного мозга, клинико-лабораторные показатели и молекулярно-генетические аномалии. Интеграция этих данных позволяет провести дифференциальную диагностику и подтвердить заболевание.

Несмотря на признание гистологического исследования костного мозга у больных Ph-негативными миелопролиферативными новообразованиями «большим» диагностическим критерием, трактовка изменений миелоидной ткани субъективна и плохо воспроизводима [32; 67; 149; 152; 153; 190]. Объективизация оценки патоморфологических изменений с использованием морфометрических методов исследования позволяет улучшить качество дифференциальной диагностики и выявить связь клинико-лабораторных данных и мутационного профиля с патоморфологическими изменениями в костном мозге у больных первичным миелофиброзом и эссенциальной тромбоцитемией.

Степень разработанности темы

В последние 20 лет достигнуты значительные успехи в вопросах морфологической диагностики первичного миелофиброза и эссенциальной тромбоцитемии. Разработанные «большие» и «малые» диагностические критерии облегчают постановку диагноза при слаженной работе мультидисциплинарной команды. Вместе с тем возможности гистологического исследования костного мозга врачом-патологоанатомом ограничены в связи с отсутствием четких сведений о диагностической значимости патоморфологических признаков, а также их чувствительности и специфичности. Результаты оценки патоморфологических изменений в костном мозге субъективны и плохо воспроизводимы. Сведения о связи гистологической картины заболевания с остальными диагностическими критериями недостаточны. Необходима комплексная и объективная оценка качественных и количественных изменений в

миелоидной ткани больных первичным миелофиброзом и эссенциальной тромбоцитемией с учетом клинической картины заболевания и мутационного статуса.

Цель исследования

Дать оценку количественным и качественным аномалиям строения костного мозга и их связи с клинико-лабораторной картиной первичного миелофиброза и эссенциальной тромбоцитемии с мутациями в гене *JAK2* или *CALR*.

Задачи исследования

1. Охарактеризовать и сопоставить клинические и лабораторные данные у больных первичным миелофиброзом и эссенциальной тромбоцитемией с мутацией в гене *JAK2* или *CALR*.
2. Оценить возможность патоморфологической дифференциальной диагностики первичного миелофиброза и эссенциальной тромбоцитемии на основе изменений эритроидного и гранулоцитарного ростка, степени ретикулинового и коллагенового фиброза и остеосклероза.
3. Провести морфометрический анализ гистотопографических и морфометрических характеристик мегакариоцитарного ростка в костном мозге у больных первичным миелофиброзом и эссенциальной тромбоцитемией с мутацией в гене *JAK2* или *CALR*.
4. Определить диагностическую значимость иммуногистохимического окрашивания мегакариоцитарного ростка для дифференциальной диагностики *JAK2*-позитивных или *CALR*-позитивных случаев первичного миелофиброза и эссенциальной тромбоцитемии.

Научная новизна исследования

В настоящем исследовании:

1. Выявлены клинико-лабораторные особенности первичного миелофиброза и эссенциальной тромбоцитемии с мутацией в гене *JAK2* или *CALR*.
2. Подтверждена целесообразность оценки типовых изменений костного мозга у больных первичным миелофиброзом и эссенциальной тромбоцитемией с мутацией в гене *JAK2* или *CALR*.
3. Получены данные о качественных и количественных аномалиях мегакариоцитарного ростка и их связи с нозологической формой, стадией заболевания и мутационным статусом.
4. На основе результатов иммуногистохимического исследования разработан дополнительный дифференциальный признак первичного миелофиброза и эссенциальной тромбоцитемии.

Теоретическая и практическая значимость работы

Обнаружены наиболее значимые гистотопографические и морфологические аномалии мегакариоцитарного ростка миелоидной ткани, позволяющие дифференцировать первичный миелофиброз и эссенциальную тромбоцитемию. Выявлена связь патоморфологических изменений в костном мозге с типом драйверной мутации. Доказана прогностическая значимость ретикулинового и коллагенового фиброза в группе больных первичным миелофиброзом. При иммуногистохимическом окрашивании мегакариоцитарного ростка установлены дифференциальные диагностические пороговые значения его показателей у больных первичным миелофиброзом и эссенциальной тромбоцитемией.

Методология и методы исследования

В работе использованы клинические, лабораторные, гистологические, гистохимические, иммуногистохимические, молекулярно-генетические и статистические методы исследования.

Положения, выносимые на защиту

1. У больных первичным миелофиброзом и эссенциальной тромбоцитемией мутации в гене *JAK2* ассоциированы с более выраженным лейкоцитозом, эритроцитозом, повышенной концентрацией гемоглобина и большим числом случаев заболевания со спленомегалией, мутации в гене *CALR* связаны с молодым возрастом и более высоким количеством тромбоцитов в общем анализе крови.

2. Оценка количества мегакариоцитов, их расположения, числа и размеров мегакариоцитарных кластеров, строения ядер мегакариоцитов в совокупности с типовыми изменениями костного мозга: клеточностью, лейко-эритробластическим соотношением, степенью выраженности ретикулинового и коллагенового фиброза, остеосклероза позволяют дифференцировать случаи первичного миелофиброза и эссенциальной тромбоцитемии с подтвержденными мутациями в гене *JAK2* или *CALR*.

3. При дифференциальной диагностике первичного миелофиброза и эссенциальной тромбоцитемии необходимо учитывать, что *CALR*-позитивные случаи ассоциированы с более выраженной гиперплазией мегакариоцитарного ростка в костном мозге в сравнении со случаями с подтвержденной мутацией в гене *JAK2*.

4. Иммуногистохимические методы окрашивания мегакариоцитарного ростка в биопсиях костного мозга больных первичным миелофиброзом и эссенциальной тромбоцитемией могут быть использованы для морфологической дифференциальной диагностики этих болезней.

Внедрение результатов исследования в практику

Результаты проведенного гистотопографического, морфометрического и иммуногистохимического исследования костного мозга больных первичным миелофиброзом и эссенциальной тромбоцитемией используются в диагностической работе патологоанатомического отделения клинической молекулярной морфологии ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России, патологоанатомического отделения СПБ ГБУЗ «Городская Больница № 40», патологоанатомического отделения ГБУЗ ЛОКБ, патологоанатомического отделения КГБУЗ ККПАБ, патологоанатомического отделения ООО «Лаборатория Гемотест».

Степень достоверности и апробация результатов

Степень достоверности обеспечена проведением морфометрических и молекулярно-генетических исследований у большой группы больных (122 пациента с первичным миелофиброзом и эссенциальной тромбоцитемией), использованием методов, адекватных поставленным целям и задачам исследования, качеством изготовления гистологических препаратов костного мозга и проведения лабораторных анализов, использованием объективных гистотопографических и морфометрических инструментов для оценки особенностей гистологического строения костного мозга, статистической обработкой полученных результатов.

Материалы диссертации представлены на 22nd Congress of European Hematology Association (Мадрид, 2017), 29th European Congress of Pathology (Амстердам, 2017), 30th European Congress of Pathology (Бильбао, 2018), VIII ежегодной научной конференции молодых ученых и специалистов (Санкт-Петербург, 2016), Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Генетика опухолей кроветворной системы» (Санкт-Петербург, 2017), Всероссийской научно-практической конференции с

международным участием «Актуальные вопросы гематологии и трансфузиологии», посвященной 85-летию Российского научно-исследовательского института гематологии и трансфузиологии (Санкт-Петербург, 2017), Региональной научно-практической конференции «Актуальные вопросы оказания гематологической помощи», посвященной памяти заслуженного деятеля науки РФ, заслуженного врача РФ, профессора К.М. Абдулкадырова (Санкт-Петербург, 2017), V Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Генетика опухолей кроветворной системы – от диагностики к терапии» (Санкт-Петербург, 2019), Конкурсе научных работ молодых патологоанатомов Российского общества патологоанатомов, представленных на соискание премии имени М.М. Руднева (Санкт-Петербург, 2020), II Московской международной гематологической школе (Москва, 2022), научно-практической конференции «Современные подходы в клинико-морфологической диагностике заболеваний человека» (Санкт-Петербург, 2023).

По теме диссертации опубликованы 22 печатных работы, из них 2 в журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России. Получены 2 патента на изобретение.

Структура и объем работы

Диссертационная работа изложена на 177 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов работы, обсуждения, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы, списка сокращений и списка литературы, который включает 8 отечественных и 184 зарубежных источников. Диссертационная работа содержит 64 рисунка и 39 таблиц.

ГЛАВА 1. РН-НЕГАТИВНЫЕ МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНЫЕ НОВООБРАЗОВАНИЯ КАК АКТУАЛЬНАЯ ПРОБЛЕМА СОВРЕМЕННОЙ ГЕМАТОЛОГИИ И ПАТОЛОГИЧЕСКОЙ АНАТОМИИ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1. Определение, история вопроса и классификация

Миелопролиферативные новообразования – групповое наименование опухолей, для которых характерно увеличение абсолютного количества зрелых клеток в крови, нарушение пролиферации одного или нескольких ростков миелоидной ткани без выраженных диспластических изменений. Для заболеваний этой группы характерно возникновение экстрамедуллярных очагов гемопоэза и повышенный риск тромбообразования. При прогрессировании патологии на фоне длительного течения возможно развитие фиброза костного мозга или бластной трансформации.

Первая классификация миелопролиферативных новообразований была разработана W. Dameshek в 1951 году. Основываясь на сходстве патогенеза и клинических проявлений, он выделил такие болезни как хронический гранулоцитарный лейкоз, истинная полицитемия, идиопатическая («агногенная») миелоидная метаплазия селезенки (и печени), тромбоцитемия, мегакариоцитарный лейкоз и эритролейкоз (синдром ди Гульельмо) [50]. Эта классификация неоднократно подвергалась пересмотру по мере накопления новых знаний о природе этих заболеваний. Один из первых шагов в понимании этиологии Рн-негативных миелопролиферативных новообразований был сделан P. Fialkow, который изучал полиморфизмы в X-сцепленном локусе глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы с целью подтвердить клональную природу истинной полицитемии, эссенциальной тромбоцитемии и первичного миелофиброза [72; 101; 144]. Приведенные в работах P. Fialkow и соавт. доказательства клонального происхождения миелопролиферативных новообразований, сведения о вовлечении в патогенез всех типов миелоидных клеток дали первые указания на то, что эта

группа заболеваний представляет собой опухоли, возникающие на уровне стволовой клетки. Следующая смена парадигмы патогенеза Ph-негативных миелопролиферативных новообразований произошла в 2005 году и была связана с открытием мутации *JAK2V617F* в 14 экзоне четырьмя независимыми лабораториями [10; 13; 16; 48]. В дальнейшем у пациентов с первичным миелофиброзом и эссенциальной тромбоцитемией были обнаружены драйверные мутации в гене тромбопоэтинового рецептора (*MPL*), мутации в гене кальретикулина (*CALR*). Помимо мутации *JAK2V617F* в 14 экзоне у больных истинной полицитемией была описана мутация гена *JAK2* в 12 экзоне [102; 123; 135; 156].

Актуальная классификация миелопролиферативных новообразований опубликована в 5-м издании Классификации ВОЗ опухолей гемопоэтической и лимфоидной тканей в 2022 году [166]:

1. Хронический миелоидный лейкоз;
2. Хронический нейтрофильный лейкоз;
3. Хронический эозинофильный лейкоз;
4. Истинная полицитемия;
5. Первичный миелофиброз;
6. Эссенциальная тромбоцитемия;
7. Ювенильный миеломоноцитарный лейкоз;
8. Миелопролиферативное новообразование, без дополнительных уточнений.

Миелопролиферативные новообразования принято разделять на две патогенетически отличающиеся подгруппы: болезни с наличием филадельфийской хромосомы и ее отсутствием. Первая подгруппа представлена хроническим миелоидным лейкозом, обязательными диагностическими критериями которого служат лейкоцитоз в периферической крови, а также обнаружение реципрокной транслокации между длинным плечом хромосомы 9 и длинным плечом хромосомы 22, *t(9;22)(q34; q11.2)*, в результате чего образуется так называемая филадельфийская (Ph) хромосома. Эта транслокация характеризуется тем, что

часть онкогена *ABL1* (Abelson), который в норме располагается на длинном плече 9 хромосомы, переносится на длинное плечо хромосомы 22 в место разрыва гена *BCR*. В итоге образуется патологический химерный ген *BCR::ABL1*, кодирующий белок с выраженной аномальной тирозинкиназной активностью, что приводит к неконтролируемому избыточному непрерывному и в дальнейшем неэффективному гематопоэзу [122]. Подгруппа Ph-негативных миелопролиферативных заболеваний включает в себя первичный миелофиброз, эссенциальную тромбоцитемию и истинную полицитемию.

Дифференциальная диагностика заболеваний в группе Ph-негативных миелопролиферативных новообразований очень важна. Диагноз определяет терапевтическую тактику, прогноз заболевания, характер течения (вялотекущее или агрессивное), вероятность и характер осложнений (трансформация в миелофиброз, острый миелоидный лейкоз) [1; 6].

Сходство клинической картины и лабораторных данных при Ph-негативных миелопролиферативных новообразованиях обусловило необходимость введения результатов гистологического исследования костного мозга в «большие» критерии диагностики эссенциальной тромбоцитемии, первичного миелофиброза и истинной полицитемии. Трепанобиопсия костного мозга стала важной частью диагностики онкогематологических заболеваний с 60-х годов прошлого века [116]. Гистологическое исследование позволяет установить морфологический диагноз в соответствии с 5-м изданием Классификации ВОЗ опухолей гемопоэтической и лимфоидной тканей [165]. Гистологическое исследование предполагает обязательную оценку ретикулинового фиброза по Европейской системе методом серебрения [167].

1.2. Молекулярный патогенез Ph-негативных миелопролиферативных новообразований

Эмпирически подтвержденной, единой и общепринятой концепции патогенеза миелопролиферативных новообразований в настоящее время нет.

Ведущая гипотеза возникновения – озлокачествление гемопоэтической клетки-предшественника у пациентов с генетической предрасположенностью в результате воздействия факторов внешней среды [113; 156; 157; 188]. Итогом влияния триггерных факторов становятся генетические перестройки, которые вовлекают гены, регулирующие клеточный цикл. В результате этих мутаций клетки приобретают опухолевый фенотип (повышенная пролиферативная способность, нарушение апоптоза, меньшая зависимость от регуляторных сигналов тканевого микроокружения).

До 2005 года молекулярный патогенез *BCR::ABL1*-негативных миелопролиферативных новообразований был неизвестен. В 2005 году крупным прорывом стало обнаружение соматической мутации G-T на нуклеотиде 1849 в 14 экзоне гена *JAK2*, приводящей к замене валина на фенилаланин в кодоне 617 (*JAK2V617F*) [10; 13; 16; 18]. Замена валина на фенилаланин в 617 положении приводит к конформационным перестройкам псевдокиназного домена (JH2) и нарушает его ингибирующие функции. Таким образом, транскрипт *JAK2V617F* способен активировать JAK-STAT сигнальный путь при отсутствии лигандов. *JAK2* представляет собой член семейства JAK, характеризующегося наличием двух киназных доменов: каталитически активной С-концевой части и каталитически неактивной (или очень слабой) псевдокиназы, которая предотвращает самоактивацию киназного домена [186]. На N-конце JAK обладают четырехточечным доменом, похожим на моэзин, эзрин, радиксин (FERM)-подобный домен и SH2-подобный домен. От домена FERM зависит нековалентное присоединение молекул JAK к цитокиновым рецепторам. Киназы семейства JAK можно рассматривать как каталитическую часть семейства рецепторов гемопоэтических цитокинов, поскольку они связаны с рецепторами на внутриклеточном уровне. Кроме того, соединение JAK с рецепторами важно для их правильной транспортировки на клеточную поверхность. Гомодимерные рецепторы, такие как рецептор эритропоэтина, рецептор тромбопоэтина и рецептор гранулоцитарного колониестимулирующего фактора, используют JAK2, тогда как гетеромерные рецепторы используют JAK1 и JAK2/тирозинкиназу 2, JAK3.

Связывание цитокинов вызывает изменения в конформации рецепторов, которые активируют тирозин-киназы JAK, связанные с рецептором, путем трансфосфорилирования. Активированные JAK фосфорилируют рецепторы, которые впоследствии используются в качестве участка стыковки для других сигнальных молекул, в частности STAT. В каноническом пути STAT фосфорилируются тирозин-киназами JAK, которые вызывают их гомодимеризацию или гетеродимеризацию и последующую транспортировку в ядро, где они регулируют транскрипцию своих генов-мишеней. Псевдокиназный домен JAK2 играет две роли: первая – ингибиовать киназный домен, а вторая – способствовать цитокин-зависимой активации [186].

Фенотип заболевания зависит от ряда факторов: гомозиготное или гетерозиготное носительство *JAK2V617F*, аллельная нагрузка (VAF), сопутствующие мутации и внешние воздействия (дефицит железа). Патогенетическое значение мутации *JAK2* в 12 экзоне связано с активацией эритропоэтин-зависимых сигнальных путей, приводящей к развитию эритроцитоза [102]. Мутация в гене *JAK2V617F* встречается примерно у 70% больных миелопролиферативными новообразованиями: 95% случаев истинной полицитемии и от 50 до 60% случаев эссенциальной тромбоцитемии и первичного миелофиброза. Мутация в гене *JAK2V617F* часто может переходить из гетерозиготного состояния в гомозиготное, что связано с митотическими рекомбинациями, приводящими к копий-нейтральной потере гетерозиготности в специфических локусах короткого плеча 9 хромосомы [10; 106].

Мутация в гене *JAK2* обнаружена в полипotentных стволовых клетках – общих клетках-предшественниках миелопоэза, также она может быть выявлена в В- и NK-клетках, реже эту мутацию находят в Т-лимфоцитах. Экспериментально на мышиных моделях было продемонстрировано, что даже одной клетки, несущей мутацию *JAK2V617F*, может быть достаточно для развития миелопролиферативного новообразования, манифестирующим проявлением которого обычно служит тромбоцитоз или эритроцитоз [131]. Мутация в гене *JAK2* характеризуется очень высокой вариабельностью частоты аллели (VAF): около

25% при эссенциальной тромбоцитемии, больше 50% при истинной полицитемии и близка к 100% при постполицитемическом миелофиброзе. При первичном миелофиброзе VAF вариабелен, но обычно высокий [103]. Описаны случаи мутации *JAK2V617F* у больных с хроническим миеломоноцитарным лейкозом, острым миелоидным лейкозом, миелодиспластическими новообразованиями, а также миелодиспластическими/миелопролиферативными новообразованиями [48]. В здоровой популяции мутация в гене *JAK2* встречается крайне редко (менее 1%), но очень распространена при клональном гемопоэзе с неопределенным потенциалом [11; 47; 48; 117].

Частота обнаружения мутации в гене *JAK2V617F* при истинной полицитемии составляет 95% (в 5% случаев мутация в гене *JAK2* локализована в 12 экзоне), при эссенциальной тромбоцитемии и первичном миелофиброзе – 50–60% [102]. В литературе описаны наследственные синдромы, ассоциированные с тромбоцитозом, для которых характерны герминальные мутации в гене *JAK2* [11; 81; 80].

Несмотря на то, что у больных миелопролиферативными новообразованиями мутация *JAK2V617F* считается специфичным молекулярно-генетическим маркером, она не обязательно оказывается инициирующим фактором клонального процесса [17; 45; 46; 88; 96]. Очередность приобретения соматических мутаций стволовой клеткой и/или клеткой-предшественником миелопоэза может влиять на особенности течения миелопролиферативного новообразования (ответ на терапию, клональная эволюция болезни, патогенетические взаимоотношения мутировавшей клетки и тканевого микроокружения). В группе больных эссенциальной тромбоцитемией и истинной полицитемией с двумя подтвержденными конкурирующими мутациями *JAK2* и *TET2* продемонстрировано, что инициирующая мутация *JAK* повышает вероятность развития истинной полицитемии, в то время как у пациентов с первоначальной мутацией *TET2* чаще развивается эссенциальная тромбоцитемия [59].

Активирующие мутации в гене рецептора тромбопоэтина *MPL* могут быть герминальными – в редких случаях семейного тромбоцитоза (*MPL-S505N*), либо

соматическими и наблюдаться у 3–8% пациентов с первичным миелофиброзом и эссенциальной тромбоцитемией [74; 124; 143]. Активация MPL под действием тромбопоэтина вызывает активацию JAK2 и TYK2, которые конститутивно связаны с рецептором, но для передачи сигнала и индукции пролиферации необходима только активация JAK2. Механизм цитокин-независимой активации сигнального пути связан с изменениями структуры димеров Mpl и присоединенных белков Jak2 [138]. Остаток триптофана (W) в положении 515 в норме ингибирует димеризацию Mpl, что предотвращает самоактивацию рецептора [183]. Замена W515 на другую аминокислоту, например лейцин, лизин, аргинин, приводит к потере ингибиторной функции, что сопровождается активацией Mpl. Мутации в гене рецептора тромбопоэтина *MPL* обычно гетерозиготны, но они могут быть и гомозиготными при прогрессировании заболевания [15]. Все мутации W515, кроме W515C и W515P, приводят к активации MPL в отсутствие тромбопоэтина и активируют JAK2. Мутацию в 515 кодоне гена *MPL* (W515L/K) обнаруживают приблизительно в 3% случаев эссенциальной тромбоцитемии и 5% случаев первичного миелофиброза, описаны случаи этой мутации у пациентов с миелодиспластическими/ миелопролиферативными новообразованиями с мутацией гена *SF3B1* и тромбоцитозом [129]. Мутация в 505 кодоне гена *MPL* (S505N) может быть герминальной и встречаться в случаях семейного тромбоцитоза [74]. Описаны и приобретенные соматические мутации *MPLS505N*, которые можно обнаружить менее чем у 1% больных эссенциальной тромбоцитемией [71; 123]. Наличие герминальных и соматических мутаций в 505 кодоне гена *MPL* (S505N) подчеркивает сходство механизмов увеличения количества тромбоцитов крови при семейном тромбоцитозе и эссенциальной тромбоцитемии.

Мутации в гене кальретикулина выявляют у большинства *JAK2*-негативных больных эссенциальной тромбоцитемией или первичным миелофиброзом (20–35% всех случаев) [120]. Мутации в гене *JAK2* и *CALR* взаимоисключают друг друга, хотя описаны малочисленные случаи обнаружения у пациента обеих мутаций [46]. Кальретикулин (CALR) представляет собой шаперонный белок

эндоплазматического ретикулума, который в случае мутации способен взаимодействовать с рецептором тромбопоэтина, приводя к тромбопоэтин-независимой активации. Функция кальретикулина заключается в контроле качества N-гликозилированных белков и хранении кальция. В первых публикациях о мутации в гене *CALR* было показано, что *CALRdel52* способен активировать STAT5 и этот эффект становится менее выраженным при ингибировании JAK2 [157]. В недавних работах было продемонстрировано, что мутация в гене *CALR* способна активировать MPL и затем JAK2 [36; 40; 125; 150; 180]. Где именно в клетке происходит активация MPL при мутации в гене *CALR* – неизвестно. Данные литературы свидетельствуют, что при мутации в гене *CALR* мутированные белки ведут себя как аномальные шапероны и перемещаются к поверхности клетки вместе с MPL [19]. В этом случае активация MPL может происходить в любом месте от эндоплазматического ретикулума до клеточной поверхности. Аномальные белки *CALR* способны индуцировать продукцию цитокинов моноцитами, а также активировать рецепторы к гранулоцитарному колониестимулирующему фактору [40; 126].

Значение этих событий в патогенезе миелопролиферативных новообразований изучено недостаточно. Описано большое количество мутаций гена кальретикулин, большинство из них классифицируют как тип 1 (делеции 52-bp в 9 экзоне, p.L367fs*46) или тип 2 (инсерции 5-bp в 9 экзоне, p.K385fs*47). Дальнейшая активация рецептора тромбопоэтина и JAK2-STAT сигнального пути зависит от наличия положительно заряженной С-концевой части, возникающей в результате сдвига рамки считывания в 9 экзоне. Это условие важно, так как оно обуславливает стабильное взаимодействие лектин-связывающего домена *CALR* с тромбопоэтиновым рецептором [90]. Специфический сдвиг рамки считывания приводит к образованию новой С-концевой части, лишенной KDEL мотива, важного для хранения белка в эндоплазматическом ретикулуме. Мутированный белок *CALR* содержит новую аминокислотную последовательность, несущую положительный заряд.

Существуют большие различия в частоте мутаций 1-го и 2-го типа при эссенциальной тромбоцитемии и первичном миелофиброзе: при эссенциальной тромбоцитемии мутации 1-го и 2-го типа встречаются в 55% и 35% случаев соответственно, тогда как при первичном миелофиброзе преобладают мутации 1 типа – 75% против 15% [53]. Мутации в гене *CALR* обычно гетерозиготны, хотя в литературе описано несколько случаев гомозиготных мутаций, особенно для мутаций второго типа [156; 157]. В отличие от мутаций в гене *JAK2V617F*, для мутаций в гене *CALR* характерна высокая аллельная нагрузка (VAF) – в среднем 40% [103]. В редких случаях эссенциальной тромбоцитемии VAF может быть ниже, но почти всегда более 15%.

Примерно у 10% больных эссенциальной тромбоцитемией и первичным миелофиброзом отсутствуют мутации в генах *JAK2*, *CALR*, *MPL*. «Трижды негативные» случаи необходимо тщательно обследовать для исключения реактивных причин тромбоцитоза и миелопролиферации. У пациентов с эссенциальной тромбоцитемией отсутствие драйверных мутаций ассоциировано с более молодым возрастом, у больных первичным миелофиброзом, напротив, служит фактором риска неблагоприятного прогноза [35].

Классический механизм активации JAK-киназ связан с цитокиновой стимуляцией, которая инициируется при связывании лигандов с рецепторами цитокинов I типа. К таким рецепторам относятся: *MPL* (рецептор тромбопоэтина), рецепторы эритропоэтина, а также рецепторы гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (G-CSF).

В патогенезе Ph-негативных миелопролиферативных новообразований ключевую роль играет цитокин-независимая активация сигнального пути JAK-STAT, регулирующего базовые клеточные функции: пролиферацию и рост клеток, их активацию и дифференцировку, адгезивные взаимодействия, а также процессы апоптоза.

Процесс внутриклеточной передачи сигнала от рецептора цитокинов происходит при обязательном участии нерецепторных тирозинкиназ семейства JAK (Janus-киназы) и цитоплазматических транскрипционных факторов семейства

STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription) [51]. Известно четыре киназы JAK – JAK1, JAK2, JAK3 и TYK2. Название JAK (Janus-киназы) связано с их структурой. JAK имеют молекулярную массу 120–140 кДа и состоят из 7 доменов (JAK-homology, JH). Два домена в карбокситерминальной части молекулы представлены киназным доменом (JH1) и псевдокиназным доменом (JH2). Они обладают высокой степенью гомологии. Псевдокиназный домен выполняет функцию негативного регулятора активности киназного домена, киназная его активность редуцирована. Наличие двух доменов почти одинакового строения, но с разными функциями обусловило название семейства – Janus (двуликое божество в древнеримской мифологии). Гены JAK1 картированы на хромосоме 1p31.3, JAK2 – на 9p24, JAK3 и Tyk2 – в соседних участках 19p13.1 и 19p13.2, соответственно. Janus-киназы JAK1, JAK2, JAK3 и Tyk2 ассоциированы с разными рецепторами и неодинаково распределяются в клетках различных типов. Tyk2 связан с рецепторами интерферонов, интерлейкинов семейств IL6, IL10, IL12. JAK1 ассоциирован с рецепторами интерферонов, семейством интерлейкинов IL2, IL4, IL6 и IL10. JAK2 связан с одноцепочечными рецепторами эритропоэтина, тромбопоэтина и рецепторами семейств GM-CSF, IL6 и др. Перечисленные Janus-киназы распространены в различных клетках. В отличие от них JAK3 содержится почти исключительно в клетках лимфоидного ростка кроветворения. JAK3 ассоциирован с рецепторами лимфотропных цитокинов семейства IL2/IL4 [3]. После взаимодействия лиганда с рецептором и последующей димеризации рецепторного комплекса запускается активация Janus-киназ. Это инициирует фосфорилирование внутриклеточных доменов рецептора, в результате чего в его цитоплазматической части формируются фосфо-тиrosиновые остатки. Данные остатки служат сайтами связывания для STAT-белков, которые затем подвергаются фосфорилированию под действием JAK. Фосфорилированные STAT-молекулы образуют активные димеры, способные к транслокации в ядро, где они связываются с определенными участками хромосом и регулируют экспрессию генов-мишеней [100].

Таким образом, мутации в гене *JAK2V617F*, мутации в гене *JAK2* в 12 экзоне, мутации в гене тромбопоэтинового рецептора и мутации в гене кальретикулина представляют собой основные генетические поломки, лежащие в основе цитокин-независимой активации сигнального пути JAK-STAT при миелопролиферативных новообразованиях [99].

Помимо диагностически значимых клональных маркеров более чем у половины больных миелопролиферативными новообразованиями обнаруживают редкие мутации генов *TET2* (10–15% больных), *ASXL1* (5–10%) и *DNMT3A* (5–10%). Реже встречаются мутации генов, участвующих в сплайсинге (*SRSF2*, *SF3B1*, *U2AF1*, *ZRSR2*), и генов, участвующих в эпигенетической регуляции и сигнальных путях, а также регулирующих структуру хроматина (*EZH2*, *IDH1*, *IDH2*, *CBL*, *STAG2*, *TP53*). Перечисленные дополнительные мутации более характерны для фибротической стадии первичного миелофиброза и бластного криза первичного миелофиброза, чем для префибротической стадии первичного миелофиброза, эссенциальной тромбоцитемии и истинной полицитемии. Мутации генов *EZH2*, *IDH1*, *IDH2*, *SRSF2* и *ASXL1* при первичном миелофиброзе служат маркерами неблагоприятного прогноза. Мутация в гене *TP53* ассоциирована с лейкемической трансформацией, поэтому группа пациентов с этой мутацией должна выделяться в отдельную категорию [83; 121; 154; 185].

Анализ частоты встречаемости мутаций генов *ASXL1* и *EZH2* продемонстрировал, что у больных первичным миелофиброзом с префибротической стадией эти мутации встречаются реже – 18,0% и 3,6% случаев, соответственно, в сравнении со случаями первичного миелофиброза с фибротической стадией – 33,7% и 12,0% случаев (р-значение < 0,0001) [147]. У больных с первичным миелофиброзом с фибротической стадией в 13,6% случаев наблюдали две и более мутации генов высокого молекулярного риска против 5,4% случаев при первичном миелофиброзе с префибротической стадией (р-значение < 0,0001) [170].

Цитогенетические аномалии обнаруживают в 30% случаев миелопролиферативных новообразований. Описаны редкие случаи сочетания

мутации гена *BCR::ABL* и мутации гена *JAK2*, приводящие к развитию у пациента двух различных миелоидных опухолей [132]. Наличие *del(13)(q12-22)* или *der(6)t(1;6)(q21-23; p21.3)* хоть и не является диагностическим маркером, но в значительной степени ассоциировано с первичным миелофиброзом [91].

1.3. Критерии Всемирной организации здравоохранения для диагностики эссенциальной тромбоцитемии: эпидемиология, клиническая картина, патоморфологические проявления и прогноз

Эссенциальная тромбоцитемия (код по ICD-O 9962/3) – это миелопролиферативное новообразование, характеризующееся тромбоцитозом, повышенным риском тромбоза и/или кровотечений, а также увеличением количества крупных, зрелых мегакариоцитов в костном мозге.

В прошлом это заболевание обозначали как первичную тромбоцитемию, идиопатическую тромбоцитемию, хронический мегакариоцитарный лейкоз, геморрагическую тромбоцитемию, мегакариоцитарный миелоз. Первое упоминание об эссенциальной тромбоцитемии датируется 1934 годом, когда два австрийских врача-патологоанатома E. Epstein и A. Goedel опубликовали статью «Hamorrhagische thrombozythämie bei vascularer schrumpfamilz (Hemorrhagic thrombocythemia with a vascular, sclerotic spleen)» [63]. В 1951 году W. Dameshek, предложивший понятие «миелопролиферативное заболевание», выделил мегакариоцитарный лейкоз в качестве отдельной нозологической формы [50].

По данным программы SEER (Surveillance, Epidemiology, and End Results), в США заболеваемость эссенциальной тромбоцитемией составляет 1,55 (95% ДИ 1,52–1,57) на 100 000 населения в год [41].

Эссенциальная тромбоцитемия представляет собой заболевание с индолентным течением и обычно диагностируется в хронической фазе. Клиническая картина может быть весьма разнообразной, начиная от бессимптомного тромбоцитоза, который случайно выявляют при обследовании, и заканчивая такими симптомами как головные боли, эритромегалия,

тромботические или геморрагические осложнения. Длительно сохраняющийся тромбоцитоз, при исключении его вторичного генеза (травмы, инфекции, реактивные состояния, дефицит железа и др.) служит важным диагностическим признаком. Эссенциальная тромбоцитемия может приводить к повышению риска венозных тромбозов (глубокие вены нижних конечностей, легочная эмболия и др.) и артериальных тромбозов (инфаркт миокарда, острые нарушения мозгового кровообращения и др.). Кровотечения, возникающие при эссенциальной тромбоцитемии, могут быть ассоциированы с приобретенным синдромом фон Виллебранда (дисбаланс между тромбоцитозом и количеством факторов свертывания, не зависящих от числа тромбоцитов) и проявляться желудочно-кишечными кровотечениями, кровотечениями из слизистых оболочек. Несмотря на то, что клиническая симптоматика при эссенциальной тромбоцитемии выражена намного слабее, чем при первичном миелофиброзе, у 50–60% больных эссенциальной тромбоцитемией отмечаются такие проявления как усталость, головные боли, ухудшение внимания, эритромегалия. Кожный зуд и ночная потливость требуют исключения истинной полицитемии, при наличии у пациента спленомегалии необходимо дифференцировать эссенциальную тромбоцитемию и первичный миелофиброз. Признаками, позволяющими пациентам с тромбоцитозом ($> 450 \times 10^9/\text{л}$) верифицировать эссенциальную тромбоцитемию, служат драйверные мутации (*JAK2*, *V617F*, *CALR* или *MPL*) и результаты гистологического исследования костного мозга, исключающие реактивные изменения, префибротическую стадию первичного миелофиброза и другие миелоидные новообразования, включая хронический миелоидный лейкоз, миелодиспластическое новообразование с *del5(q)*, рефрактерную анемию с кольцевыми сидеробластами и тромбоцитозом. Отсутствие диагностически значимых драйверных мутаций требует проведения тщательного обследования пациента с целью исключить другие первичные и вторичные причины тромбоцитоза [21; 161]. Диагностические критерии эссенциальной тромбоцитемии приведены в Таблице 1.

Таблица 1 – Диагностические критерии эссенциальной тромбоцитемии

Диагностические критерии	Описание
Большие критерии	<p>1. Количество тромбоцитов $\geq 450 \times 10^9/\text{л}$.</p> <p>2. В биоптате костного мозга преимущественно пролиферация мегакариоцитов с увеличением количества крупных зрелых мегакариоцитов с гиперлобулярными ядрами. Отсутствует значительное увеличение или «сдвиг влево» элементов гранулоцитопоэза или эритропоэза.</p> <p>Крайне редко: незначительное увеличение степени выраженности ретикулинового фиброза (MF-1).</p> <p>3. Отсутствуют критериальные признаки истинной полицитемии, первичного миелофиброза, <i>BCR::ABL1</i>-позитивного хронического миелоидного лейкоза и других миелоидных новообразований.</p> <p>4. Наличие мутации <i>JAK2</i>, <i>CALR</i> или <i>MPL</i>.</p>
Малый критерий	Наличие клонального маркера или отсутствие доказательств для реактивного тромбоцитоза.
Примечание – Для установления диагноза необходимо наличие всех 4 критериев или первых трех больших критериев и малого критерия.	

При проведении патоморфологического исследования костного мозга у больных эссенциальной тромбоцитемией обнаруживают нормоклеточный костный мозг, в редких случаях клеточность костного мозга может быть как ниже, так и выше возрастной нормы.

Наиболее заметные аномалии в костном мозге при эссенциальной тромбоцитемии связаны с мегакариоцитарным ростком: количество мегакариоцитов заметно увеличено, бросается в глаза большое количество крупных и гигантских форм с обширной зрелой цитоплазмой и лопастными гиперсегментированными ядрами (ядра «типа оленевых рогов»). Мегакариоциты распределены в миелоидной ткани случайным образом: как поодиночке, так и в

виде неплотных, рыхлых скоплений. При эссенциальной тромбоцитемии для мегакариоцитов не характерна локализация вблизи эндоста или у стенок кровеносных синусов [64; 65; 172; 173; 187].

Для визуализации мегакариоцитов используют антитела к CD42b и CD61. Количество CD34-позитивных клеток-предшественников обычно не увеличено.

Ретикулиновый фиброз, обнаруживаемый в миелоидной ткани при импрегнации солями серебра по Гордону–Свиту или по Гомори, у больных эссенциальной тромбоцитемией обычно отсутствует. Редко можно визуализировать неравномерно выраженное слабое увеличение степени выраженности фиброза. Выраженный ретикулиновый фиброз ($MF > 1$) делает диагноз эссенциальная тромбоцитемия сомнительным и требует исключения первичного миелофиброза [77; 160; 167; 168].

На протяжении длительного времени патоморфологическая картина в костном мозге у больных эссенциальной тромбоцитемией остается неизменной. В редких случаях с течением времени степень выраженности ретикулинового фиброза может увеличиваться, приводя к развитию посттромбоцитемического миелофиброза [28; 108; 167].

Прогрессия эссенциальной тромбоцитемии до фазы акселерации и бластного криза происходит достаточно редко и подтверждается при наличии в крови и/или костном мозге 10–19% и $\geq 20\%$ бластов, соответственно [14]. По данным литературы, развитие бластного криза или миелодиспластического новообразования отмечается менее чем в 5% случаев и, наиболее вероятно, ассоциировано с предшествующей цитотоксической терапией [42; 75; 84; 162].

Медиана общей выживаемости у больных эссенциальной тромбоцитемией составляет 10–15 лет. Учитывая, что заболевание обычно диагностируется у лиц 65–70 лет, продолжительность жизни у пациентов с эссенциальной тромбоцитемией в среднем мало отличается от таковой в популяции [112; 114; 160].

Для эссенциальной тромбоцитемии разработана прогностическая модель, позволяющая разделить больных на группы низкого, промежуточного и высокого

риска, – Международная прогностическая шкала (IPSET), приведенная в Таблице 2 [12].

Таблица 2 – Подсчет риска по Международной прогностической шкале (IPSET) у больных эссенциальной тромбоцитемией

Признак	Количество баллов по системе стратификации риска
Возраст \geq 60 лет	2 балла
Лейкоцитоз более $11 \times 10^9/\text{л}$	1
Эпизоды тромбозов в анамнезе	1
Примечание – 0 баллов – низкий риск; 1–2 балла – промежуточный; 3–4 балла – высокий риск.	

1.4. Критерии Всемирной организации здравоохранения для диагностики первичного миелофиброза: эпидемиология, клиническая картина, патоморфологические проявления и прогноз

Первичный миелофиброз (код по ICD-O 9961/3) – миелопролиферативное новообразование клональной природы, для которого в префибротической или, как ее еще называют, клеточной стадии характерна пролиферация в костном мозге атипичных мегакариоцитов и гранулоцитов. Фибротическая стадия связана с поликлональным увеличением количества фибробластов, что приводит к развитию фиброза костного мозга (ретикулинового и/или коллагенового), остеосклероза и сопровождается возникновением очагов экстрамедуллярного кроветворения [163; 164].

Ранее для обозначения этого заболевания применяли следующие синонимы: агногенная миелоидная метаплазия, хронический идиопатический миелофиброз, остеомиелофиброз, сублейкемический миелоз, в зарубежной литературе встречается название «синдром Хеука–Ассмана» [148].

Впервые два случая первичного миелофиброза были описаны в 1879 году немецким хирургом G. Heuck [85]. В его работе приведено описание двух молодых пациентов со спленомегалией, фиброзом костного мозга и фокусами экстрамедуллярного гемопоэза. В протоколе аутопсийного исследования G. Heuck отметил наличие остеосклероза. В 1904 году немецким патологоанатомом M. Askanazy был документирован случай с фиброзом костного мозга и очагами экстрамедуллярного гемопоэза в печени [22]. В 1907 году H. Assmann впервые использовал термин «остеосклеротическая анемия» и в дальнейшем длительное время подобную клиническую картину заболевания называли «синдром Heuck–Assmann» [23]. В 1951 году W. Dameshek впервые выделил первичный миелофиброз в качестве самостоятельной нозологической единицы [50].

Согласно эпидемиологическим данным, первичный миелофиброз диагностируется с частотой 0,44–1,5 случая на 100 000 человек в год [41; 62; 89]. Анализ десятилетней динамики заболеваемости в Санкт-Петербурге продемонстрировал, что ежегодная первичная заболеваемость колеблется от 0,72 до 1,56 случая и составила в среднем 1,06 случая на 100 000 населения в год [142]. Достоверной информации о частоте встречаемости префибротической стадии первичного миелофиброза нет, но данные референс-центров позволяют предположить, что на ее долю приходится 30–50% всех случаев первичного миелофиброза. Чаще всего первичный миелофиброз возникает на шестом–седьмом десятилетии жизни (~10% всех случаев в продвинутой стадии возникают у пациентов младше 40 лет), соотношение мужчин и женщин примерно одинаковое. У детей заболевание встречается редко [164].

Первичный миелофиброз представляет собой более агрессивное, чем эссенциальная тромбоцитемия, заболевание, влияющее на качество жизни пациентов. Случай эссенциальной тромбоцитемии и истинной полицитемии, первичного миелофиброза в префибротической стадии могут сопровождаться развитием фиброза костного мозга, приводя к развитию посттромбоцитемического и постполицитемического миелофиброза, фибротической стадии первичного миелофиброза. Принимая во внимание концепцию клональной эволюции при

хроническом миелоидном лейкозе, первичный миелофиброз можно расценивать как манифестирующее миелопролиферативное новообразование, ранее не диагностированное и находящееся в продвинутой стадии. Клональная эволюция позволяет обосновать большее количество мутаций и цитогенетических аномалий, а также повышенный риск лейкемической трансформации у пациентов с первичным миелофиброзом [42; 147; 162].

До трети случаев первичного миелофиброза протекают бессимптомно и выявляются случайно. Это заболевание может быть заподозрено по данным клинического анализа крови – анемии и тромбоцитопении, а также при наличии у пациента массивной спленомегалии [147].

При первичном миелофиброзе фокусы экстрамедуллярного гемопоэза чаще всего возникают в селезенке, возможно поражение печени, что приводит к увеличению этого органа в размерах (гепатомегалии). Спленомегалия чаще выявляется у больных в фибротической стадии болезни. Описаны случаи экстрамедуллярного гемопоэза в лимфатических узлах, центральной нервной системе, коже, перикарде, брюшине, плевре, яичниках, надпочечниках, желудочно-кишечном тракте и легких. Для миелопролиферативных новообразований характерно появление эпизодов тромбозов и кровоизлияний, но наиболее всего распространены эти события при первичном миелофиброзе в префибротической и фибротической стадиях [182]. Частым клиническим проявлением, особенно в стадии миелофиброза, служит анемия, нередко в сочетании с тромбоцитопенией [43]. Лейкемическая трансформация происходит у 20–25% пациентов и характеризуется присутствием 20% бластов в крови или костном мозге [130]. По данным P. Guglielmelli и соавт., префибротическая стадия первичного миелофиброза ассоциирована с более молодым возрастом, менее выраженной анемией, лейкопенией и тромбоцитопенией. Большая доля пациентов с клеточной стадией относится к группе низкого риска по международной шкале оценки прогноза (IPSS) – 74,8% при префибротической и 51,9% при фибротической стадии [147]. Диагностические критерии первичного миелофиброза в префибротической и фибротической стадии приведены в Таблицах 3, 4.

Таблица 3 – Диагностические критерии первичного миелофиброза в префибротической стадии (ВОЗ, 2022)

Диагностические критерии	Описание
Большие критерии	<p>1. Гиперплазия и атипия мегакариоцитов с отсутствием ретикулинового фиброза > 1-й степени, сопровождающаяся повышенной клеточностью костного мозга относительно возрастной нормы, гранулоцитарной пролиферацией и (часто) сужением эритроидного ростка.</p> <p>2. Отсутствуют критериальные признаки истинной полицитемии, первичного миелофиброза, <i>BCR::ABL1</i>-позитивного ХМЛ или миелодиспластического синдрома, или других миелоидных новообразований.</p> <p>3. Наличие мутации <i>JAK2</i>, <i>CALR</i> или <i>MPL</i> или выявление других маркеров клональности или отсутствие минимального реактивного ретикулинового фиброза.</p>
Малые критерии	<p>1. Анемия, не связанная с сопутствующей патологией.</p> <p>2. Лейкоцитоз $\geq 11 \times 10^9/\text{л}$.</p> <p>3. Сplenомегалия, подтвержденная пальпаторно или инструментально.</p> <p>4. Увеличение активности ЛДГ выше верхней границы референтного диапазона.</p> <p>5. Лейкоэритробластоз.</p>
Примечание – Диагноз первичного миелофиброза в префибротической стадии устанавливается при наличии всех трех «больших» и как минимум одного «малого» критерия.	

Таблица 4 – Диагностические критерии первичного миелофиброза в фибротической стадии (ВОЗ, 2022)

Диагностические критерии	Описание
Большие критерии	<p>1. Гиперплазия и атипия мегакариоцитов и ретикулиновый/коллагеновый фиброз 2-й или 3-й степени.</p> <p>2. Отсутствуют критериальные признаки истинной полицитемии, первичного миелофиброза, <i>BCR::ABL1</i>-позитивного ХМЛ или миелодиспластического синдрома, или других миелоидных новообразований.</p> <p>3. Наличие мутации <i>JAK2</i>, <i>CALR</i> или <i>MPL</i>, или при отсутствии этих мутаций выявление других маркеров клональности, или исключение реактивного миелофиброза.</p>
Малые критерии	<p>1. Анемия, не связанная с сопутствующей патологией.</p> <p>2. Лейкоцитоз $\geq 11 \times 10^9/\text{л}$.</p> <p>3. Сplenомегалия, подтвержденная пальпаторно или инструментально.</p> <p>4. Увеличение активности ЛДГ выше верхней границы референтного диапазона.</p> <p>5. Лейкоэритробластоз.</p>
<p>Примечание – Диагноз первичного миелофиброза в фибротической стадии устанавливается при наличии всех трех «больших» и как минимум одного «малого» критерия.</p>	

Патоморфологические изменения в миелоидной ткани при первичном миелофиброзе зависят от стадии заболевания. Так как прогрессия этого заболевания сопровождается увеличением степени выраженности ретикулинового и коллагенового фиброза, остеосклероза, были разработаны стандартизованные оценочные шкалы [108; 167; 175].

По данным литературы, 30–50% впервые выявленных случаев первичного миелофиброза относятся к префибротической/клеточной стадии (степень ретикулинового фиброза миелоидной ткани не превышает 1) [24; 34; 147; 176; 178].

У пациентов с префибротической стадией в мазке периферической крови может наблюдаться тромбоцитоз, лейкоцитоз или лейкоэритробластоз [92]. При гистологическом исследовании обнаруживают гиперклеточный костный мозг с преобладанием миелоидной ткани за счет гранулоцитарного и мегакариоцитарного ростков, хорошо визуализируются синусы [134]. Гранулоцитарный росток представлен зрелыми и созревающими формами (метамиелоциты, палочкоядерные гранулоциты), может наблюдаться слабо выраженный «сдвиг влево». Количество бластов не увеличено. При иммуногистохимическом окрашивании с антителами к CD34 можно визуализировать минимальное увеличение количества CD34-позитивных клеток-предшественников [26]. Эритроидные островки могут быть плохо сформированы, диспластические изменения эритроидных предшественников обнаруживают редко [176; 178].

Наиболее выраженные патоморфологические изменения, позволяющие дифференцировать клеточную стадию первичного миелофиброза от других миелопролиферативных новообразований, происходят в мегакариоцитарном ростке. Количество мегакариоцитов увеличено, они формируют крупные патологические скопления в виде клеток, соприкасающихся контурами друг с другом. В костном мозге обнаруживают гистотопографические аномалии мегакариоцитарного ростка – отдельные мегакариоциты и их группы могут располагаться вблизи от кровеносных синусов и перитрабекулярно, что нехарактерно для них в норме. Мегакариоциты заметно различаются по размеру – чаще встречают клетки очень крупных размеров, но могут появляться и микроформы. Ядра мегакариоцитов обычно с выпуклыми контурами, встречаются и гиперхромные, и гипохромные ядра. Аномалии конденсации хроматина очень разнообразны – визуализируют гиполобулярные крупные гипохромные ядра (баллонообразные), крупные гиполобулярные гиперхромные ядра со слаженными контурами (облаковидные), мелкие гиперхромные «голоядерные» формы [29; 109; 176; 179].

Мегакариоцитарная атипия или «дисплазия» – важный патоморфологический признак первичного миелофиброза. Согласно J.E. Goasguen

и соавт., термин «мегакариоцитарная дисплазия» отражает изменения мегакариоцитарного ростка при миелодиспластических новообразованиях. Выделяют цитологические и ядерные проявления дисплазии. Цитологическими проявлениями дисмегакариоцитопоэза следует считать появление и увеличение доли мегакариоцитов малого размера – т. н. микроформ. В случае обнаружения в миелоидной ткани мегакариоцитов разных размеров с гиполобулярными ядрами и/или с множеством отделенных друг от друга ядер говорят о ядерной дисплазии [82]. В 5-м издании Классификации ВОЗ опухолей гемопоэтической и лимфоидной тканей в диагностических критериях первичного миелофиброза и эссенциальной тромбоцитемии употреблено понятие «мегакариоцитарная атипия», при этом патоморфологические проявления атипии (вариабельность форм и размеров мегакариоцитов, гиполобулярные ядра при первичном миелофиброзе, гиперпloidные и гипердольчатые ядра при эссенциальной тромбоцитемии) могут быть тождественны мегакариоцитарной дисплазии. Это сходство позволяет утверждать, что терминологические различия между атипией и дисплазией несколько условны, так как оба термина отражают связь между клonalной эволюцией и патоморфологическими изменениями в мегакариоцитарном ростке при миелопролиферативных и миелодиспластических новообразованиях. Использование антител к CD42b или CD61 позволяет более четко визуализировать количественные, пространственные и цитологические изменения мегакариоцитарного ростка. В работе M. Schino и соавт. в 2021 году было предложено понятие «мегакариоцитарная активация», объединяющее следующие признаки: эмпериполез, мегакариоцитарные скопления из 3 и более клеток и перимегакариоцитарный фиброз. У больных миелопролиферативными новообразованиями наличие этих трех гистологических признаков служит специфичным предиктором прогрессии миелофиброза [30].

Фибротическая стадия первичного миелофиброза характеризуется лейкоэритробластозом, анизопойкилоцитозом эритроцитов в периферической крови, могут обнаруживаться эритроциты аномальной формы – дакриоциты. Фиброз 2–3 степени, а также остеосклероз, выявляемые при патоморфологическом

исследовании биопсий костного мозга, – необходимые патоморфологические признаки для верификации фибротической стадии [25; 108; 155; 164]. Вследствие прогрессии миелофиброза миелоидная ткань вытесняется ретикулиновыми и коллагеновыми волокнами, что приводит к снижению клеточности костного мозга относительно возрастной нормы. Поэтому при гистологическом исследовании у пациентов с фибротической стадией, как правило, находят нормоклеточный или гипоклеточный костный мозг.

Атипичная мегакариоцитарная пролиферация – ключевой диагностический признак. Количество мегакариоцитов увеличено, они формируют плотные скопления, обнаруживаемые у поверхности костных балок, рядом и внутри синусов. Дефекты созревания приводят к появлению клеток с измененным ядерно-цитоплазматическим соотношением, аномалиями конденсации хроматина – мегакариоциты с баллонообразными и облаковидными ядрами, «голоядерные» формы мегакариоцитов [73; 133; 176].

Количественная и гистотопографическая оценка мегакариоцитарного ростка может быть облегчена при использовании антител к CD42b и CD61. Характерной особенностью фибротической стадии первичного миелофиброза служит увеличение количества костномозговых кровеносных синусов, которые могут быть расширены и содержать в просвете островки кроветворения [31; 69; 107].

Степень выраженности остеосклероза варьирует и может проявляться как в виде почкообразных выпячиваний у поверхности костных балок, так и в виде широких разрастаний, соединяющих костные trabекулы друг с другом и вытесняющих миелоидную ткань [176].

Лейкоэритробластическое соотношение обычно изменено за счет сужения эритроидного ростка. Выраженные диспластические изменения гранулоцитарного и эритроидного ростка не характерны. На долю незрелых клеток приходится до 10% клеточного состава миелоидной ткани, для их идентификация и подсчета могут быть использованы антитела к CD34 и/или CD117 [26].

Появление в периферической крови и костном мозге 10–19% бластов свидетельствует о прогрессии заболевания в fazu акселерации, 20% и более –

признак развития бластного криза первичного миелофиброза. К другим признакам прогрессии заболевания в fazu акселерации относят моноцитоз и диспластические изменения миелоидной ткани.

О важности выделения у больных первичным миелофиброзом клеточной и фибротической стадии свидетельствуют показатели общей выживаемости; так, медиана общей выживаемости в случаях клеточной стадии составляет 14,7 года (95% ДИ 7,7–21,8), а в случаях фибротической стадии она существенно ниже – 7,2 года (95% ДИ 5,7–8,7), р-значение < 0,0001. Для сравнения, медиана общей выживаемости у больных эссенциальной тромбоцитемией составляет 30,2 года (95% ДИ 23,7–31,2). Выполненный R. Guglielmelli и соавт. анализ общей выживаемости продемонстрировал, что отношение рисков у больных первичным миелофиброзом в префибротической стадии составило 2,7 (95% ДИ 1,9–3,7; р-значение < 0,0001), у больных первичным миелофиброзом в стадии миелофиброза – 5,9 (95% ДИ 4,5–7,8; р-значение < 0,0001) при сравнении с эссенциальной тромбоцитемией. О важности стадийного подхода при диагностике помимо показателей общей выживаемости свидетельствуют данные о кумулятивной частоте возникновения острых лейкозов у больных первичным миелофиброзом в клеточной стадии и первичным миелофиброзом в фибротической стадии – 7% и 11% в течение 5 лет, 12% и 23% в течение 10 лет (р-значение < 0,0001) в сравнении с больными эссенциальной тромбоцитемией – 0% и 1% в течение 5 и 10 лет, соответственно [147].

Выделение среди больных первичным миелофиброзом групп низкого и высокого риска важно, так как это влияет на тактику выбора терапии. Для оценки групп риска разработано большое количество прогностических шкал: IPSS, DIPSS, DIPSS Plus, MIPSS 70, MIPSS 70 2.0, MYSEC PM. Особенность Международной шкалы оценки прогноза (IPSS) заключается в том, что она применима только на момент постановки диагноза, в то время как другие шкалы применимы в любой момент оценки [136]. Динамическая международная прогностическая шкала (DIPSS), вероятно, наиболее универсальный инструмент для оценки прогноза у больных первичным миелофиброзом. Однако при наличии сведений о кариотипе

пациента предпочтительнее использовать DIPSS Plus [55; 9]. Международная шкала оценки прогноза (IPSS) и Динамическая международная прогностическая шкала (DIPSS) у больных первичным миелофиброзом приведены в Таблицах 5, 6.

Таблица 5 – Подсчет риска по Международной шкале оценки прогноза (IPSS) у больных первичным миелофиброзом

Признак	Количество баллов по системе стратификации риска
Концентрация гемоглобина менее 100 г/л	1
Возраст старше 65 лет	1
Лейкоцитоз более $25 \times 10^9/\text{л}$	1
Бласты в периферической крови 1% или более	1
Симптомы опухолевой интоксикации	1
Примечание – 0 баллов – низкий риск; 1 балл – промежуточный-1; 2 балла – промежуточный-2; 3 балла или более – высокий риск.	

Таблица 6 – Подсчет риска по Динамической международной прогностической шкале (DIPSS) у больных первичным миелофиброзом

Признак	Количество баллов по системе стратификации риска
Концентрация гемоглобина менее 100 г/л	2
Возраст старше 65 лет	1
Лейкоцитоз более $25 \times 10^9/\text{л}$	1
Бласты в периферической крови 1% или более	1
Симптомы опухолевой интоксикации	1
Тромбоцитопения менее $100 \times 10^9/\text{л}$	1
Примечание – 0 баллов – низкий риск; 1–2 балла – промежуточный-1; 3–4 балла – промежуточный-2; 5–6 баллов или более – высокий риск.	

1.5. Драйверные мутации в гене *JAK2* и *CALR* и их связь с клинико-лабораторной и патоморфологической картиной при первичном миелофиброзе и эссенциальной тромбоцитемии

Мутацию в гене *CALR* обычно обнаруживают у больных эссенциальной тромбоцитемией более молодого возраста, среди пациентов преобладают мужчины [150]. По данным литературы, для больных эссенциальной тромбоцитемией с мутацией в гене *CALR* характерно большее количество тромбоцитов в крови, а анемия и лейкоцитоз встречаются реже, чем у *JAK2*-позитивных пациентов [103; 105; 157]. Показатели общей выживаемости у больных эссенциальной тромбоцитемией с мутациями в гене *JAK2* или *CALR* сходны [38; 56; 103; 115; 184]. В многочисленных работах представлены убедительные данные, что для *CALR*-позитивных случаев характерна более высокая выживаемость без тромбоза; риск артериального и венозного тромбоза у этой группы пациентов в два раза ниже, чем у больных с мутацией в гене *JAK2* [38; 56; 66; 115; 184]. Риск развития фиброза костного мозга у больных эссенциальной тромбоцитемией с мутацией в гене *JAK2* или *CALR* одинаков [94; 115; 155]. Но в ряде исследований указывают на связь мутации в гене *CALR* с повышенным риском развития фиброза [20; 156].

При первичном миелофиброзе мутация в гене *CALR* служит независимым фактором прогноза: так, при *CALR*-позитивных формах медиана общей выживаемости составляет ~ 17 лет, в то время как у больных с мутацией в гене *JAK2* медиана общей выживаемости ~ 9 лет [103]. По данным мета-анализа, у больных первичным миелофиброзом мутация в гене *CALR* prognostически более благоприятна, чем мутация в гене *JAK2* (отношение рисков 2,58, 95% ДИ 2,08–3,20). При сравнении с *JAK2*-позитивными случаями мутация в гене *CALR* при первичном миелофиброзе ассоциирована с более низким риском развития спленомегалии (отношение шансов 0,47, 95% ДИ 0,29–0,78) и тромбоза (отношение шансов 0,52, 95% ДИ 0,29–0,92). При этом не обнаружено статистически значимых различий риска развития бластного криза у больных первичным миелофиброзом с мутациями в гене *JAK2* или *CALR* (отношение рисков 0,90, 95% ДИ 0,55–1,47).

[150]. Данные о связи мутационного статуса при первичном миелофиброзе с распределением пациентов по группам риска DIPSS противоречивы. В ряде публикаций получены сведения, что мутация в гене *JAK2* связана с более высокими рисками по DIPSS, чем мутация в гене *CALR* [127; 184]. В других статьях утверждается об отсутствии статистически значимых различий классификации по группам риска DIPSS у пациентов с *JAK2/CALR*-позитивными случаями первичного миелофиброза [37; 54; 192].

В мета-анализе, опубликованном H.R. Kourie и соавт., а также совместном исследовании Клиники Мейо (Рочестер, США) и Флорентийского университета (Флоренция, Италия) было продемонстрировано, что у больных первичным миелофиброзом мутация в гене *CALR* 1-го типа ассоциирована с лучшими показателями общей выживаемости в сравнении с мутацией в гене *CALR* 2-го типа [57; 95]. У пациентов с *CALR*-позитивной эссенциальной тромбоцитемией статистически значимые различия между типом мутации и показателями общей выживаемости обнаружены не были [38].

Полуколичественная оценка клеточности костного мозга, гранулоцитарного, эритроидного и мегакариоцитарного ростков, а также морфометрический анализ мегакариоцитов у пациентов с миелопролиферативными новообразованиями, выполненные в работе N. Vytrva и соавт., позволили обнаружить связь патоморфологических характеристик миелоидной ткани с наличием или отсутствием драйверной мутации в гене *JAK2*. У больных эссенциальной тромбоцитемией с мутацией в гене *JAK2* чаще обнаруживали гиперплазию гранулоцитарного ростка (р-значение = 0,005), в то время как в *JAK2*-негативных случаях среднее количество мегакариоцитов в 1 мм^2 площади среза миелоидной ткани было выше (р-значение = 0,02), мегакариоциты характеризовались более извитыми контурами ядер – признак более выраженного полиморфизма (р-значение = 0,04). В группе первичного миелофиброза мутация в гене *JAK2* была ассоциирована с большим размером мегакариоцитов (р-значение = 0,04), более гладкими контурами клеток (р-значение = 0,001), меньшей долей мегакариоцитов,

формирующих скопления (р-значение = 0,049) и расположенных перитрабекулярно (р-значение = 0,05) [118].

В исследовании A. Pich и соавт. было показано, что у больных эссенциальной тромбоцитемией мутация в гене *JAK2* ассоциирована с более высокой клеточностью миелоидной ткани, а также большим количеством дисморфных мегакариоцитов – клеток аномальных размеров (гигантские/карликовые), неправильной формы, с гипо-/гипер-лобулярными гиперхромными ядрами, неравномерно-окрашенной цитоплазмой с вакуолизацией. У пациентов с *CALR*-позитивной эссенциальной тромбоцитемией клеточность костного мозга ниже, но количество кластеров мегакариоцитов увеличено. Для мутации в гене *MPL* характерна наименьшая клеточность костного мозга и наиболее выраженная тенденция к формированию мегакариоцитарных скоплений [105].

Гистологическое исследование биопсий костного мозга у 105 больных эссенциальной тромбоцитемией с мутациями в гене *JAK2* или *CALR* продемонстрировало наличие цитологических и пространственных различий. Так, у пациентов с мутацией в гене *CALR* чаще обнаруживали ядерные аномалии в мегакариоцитах (р-значение = 0,09), кроме того, у *CALR*-позитивных больных в миелоидной ткани чаще визуализировали плотные кластеры мегакариоцитов (р-значение = 0,02) [190].

Эти данные, а также различия в некоторых клинических показателях, таких как концентрация гемоглобина, количество тромбоцитов или частота тромботических осложнений, обосновывают выделение *CALR*-позитивных случаев эссенциальной тромбоцитемии в отдельную группу [94, 103]. Наряду с легким клиническим течением и более высокими показателями общей выживаемости, эссенциальная тромбоцитемия с мутацией в гене *CALR* характеризуется более низким риском лейкемической трансформации, о чем косвенно свидетельствуют патоморфологические находки – меньшая клеточность костного мозга и менее выраженная гиперплазия гранулоцитарного ростка в сравнении с *JAK2*-позитивными случаями [128; 155; 157].

Сравнительный анализ биопсий костного мозга у больных эссенциальной тромбоцитемией с мутациями в генах *JAK2*, *CALR* и *MPL* продемонстрировал, что *JAK2*-позитивные случаи чаще служили причиной разногласий между двумя экспертами, а также были отнесены к миелопролиферативным новообразованиям, неклассифицируемым [190]. Эти данные совпадают с результатами более ранних публикаций, посвященных оценке патоморфологических изменений в биопсиях костного мозга у пациентов с истинной полицитемией, включенных в протоколы PVSG. По данным R. Peterson, J.T. Ellis и соавт., при микроскопическом исследовании была отмечена широкая вариабельность клеточности костного мозга (в среднем 82%, диапазон 37–100%), количества мегакариоцитов в 1 мм² площади среза (в среднем 62, диапазон 12–145) и степени выраженности ретикулинового фиброза (64% случаев без признаков фиброза, 25% случаев – небольшое увеличение степени выраженности фиброза, 11% случаев – умеренное и выраженное увеличение степени выраженности фиброза) [60; 61; 159].

Таким образом, миелопролиферативные новообразования с мутацией в гене *JAK2* характеризуются разнородной гистологической картиной, в то время как *CALR*-позитивные случаи эссенциальной тромбоцитемии ассоциированы с цитологической атипией мегакариоцитов и большим количеством мегакариоцитарных кластеров. Патоморфологическую дифференциальную диагностику между эссенциальной тромбоцитемией и первичным миелофиброзом в префибротической стадии необходимо проводить с учетом информации о мутационном статусе пациента, так как фенотип заболевания может зависеть от типа драйверной мутации.

1.6. Гистологическое исследование костного мозга как критерий в диагностике первичного миелофиброза и эссенциальной тромбоцитемии

Гистологическое исследование биопсий костного мозга относится к большим диагностическим критериям миелопролиферативных новообразований [165]. Чувствительность данного метода исследования в диагностике этой группы

болезней варьирует от 32,5 до 75%, специфичность – 92–98% в зависимости от заболевания (тест имеет достаточную диагностическую точность, если его чувствительность и специфичность превышают 80%) [190]. Несмотря на возросшую роль гистологического исследования биопсий костного мозга в постановке диагноза, данные о воспроизводимости этого критерия диагностики противоречивы.

По данным J. Thiele и соавт., повторное гистологическое исследование 295 биопсий костного мозга больных эссенциальной тромбоцитемией и первичным миелофиброзом в префибротической стадии без сопутствующей клинико-лабораторной информации характеризовалось высокой степенью согласованности (κ арра = 0,62, p -значение < 0,001, 95% ДИ 0,550–0,702), мнение двух независимых групп врачей-патологоанатомов о диагнозе совпало в 78% случаев. При этом совпадение клинического и патоморфологического диагнозов отмечали в 215 из 295 случаев (73%) [65].

Анализ биопсий костного мозга 211 пациентов с миелопролиферативными новообразованиями, выполненный A. Alvarez-Larran и соавт., продемонстрировал, что гистологическое исследование без сопроводительной клинико-лабораторной информации о пациенте характеризуется высокой степенью согласованности (κ арра = 0,67) и служит высокоспецифичным (92%, ДИ 87–95) и достаточно чувствительным (79%, ДИ 59–92) тестом у пациентов с префибротической и фибротической стадией первичного миелофиброза. У больных эссенциальной тромбоцитемией микроскопическое исследование костного мозга также обладает высокой специфичностью (98,5%, ДИ 92–100), но гораздо менее чувствительно (54%, ДИ 45–62) [49; 190].

Низкая чувствительность и высокая специфичность гистологического исследования костного мозга у больных эссенциальной тромбоцитемией указывают на тот факт, что патоморфологические изменения миелоидной ткани у значительной части пациентов могут быть недостаточны для дифференцировки в группе миелопролиферативных новообразований при наличии характерной клинической картины.

О субоптимальной воспроизведимости диагнозов в группе миелопролиферативных новообразований свидетельствует публикация U. Gianelli и соавт. При микроскопическом исследовании 103 отобранных биопсий костного мозга больных эссенциальной тромбоцитемией, первичным миелофиброзом и истинной полицитемией мнение 3 из 4 участников исследования совпало в 72% случаев (в 59% случаев эссенциальной тромбоцитемии, 89% случаев первичного миелофиброза и 60% случаев истинной полицитемии) [153].

Средняя степень согласованности ($\kappa = 0,41$) была получена при гистологическом исследовании 102 биопсий костного мозга 6 врачами-патологоанатомами, имеющими опыт в гематопатологии. По данным T. Buhr и соавт., совпадение диагностического мнения всех участников исследования на основании патоморфологических изменений было получено лишь в 10% случаев. Предоставление врачам-патологоанатомам информации о клинической и лабораторной картине заболевания позволило добиться полного консенсуса в 17% случаев. Диагностическое мнение 5 врачей-патологоанатомов из 6 совпадало в 35% случаев при отсутствии данных о пациенте и в 32% случаев при их предоставлении участникам исследования. При этом 66,7% межисследовательский консенсус (совпадение 4 диагностических мнений из 6) был достигнут в 61% случаев при отсутствии данных о пациенте и в 64% случаев при их наличии [67].

Согласно результатам B.S. Wilkins и соавт., наиболее воспроизведимыми патоморфологическими изменениями в костном мозге у больных эссенциальной тромбоцитемией служат клеточность костного мозга (сила ассоциации 8,3; 95% ДИ 5,5–12,6) и число мегакариоцитарных кластеров (сила ассоциации 9,1; 95% ДИ 6,0–13,9). Достаточно стандартизировано оценивают степень выраженности ретикулинового фиброза (сила ассоциации 5,1; ДИ 4,0–6,4). Особенности строения кластеров мегакариоцитов (рыхлые или плотные) воспроизведимы существенно хуже – сила ассоциации 2,7; 95% ДИ 2,2–3,3. Оценка дольчатости ядер мегакариоцитов также субъективна и плохо воспроизводима («рога оленя» – 2,5; 95% ДИ 1,9–3,3, облаковидные ядра – 2,2; 95% ДИ 1,7–2,8, пикнотизированные формы – 3,2; 95% ДИ 2,4–4,2) [32].

Похожие результаты были получены в работе A. Alvarez-Larrán и соавт. В результате анализа 211 гистологических препаратов длиной не менее 15 мм с минимумом 10 микроскопически определяемыми костномозговыми ячейками было обнаружено, что остеосклероз и гиперплазия гранулоцитарного роста обладают самой высокой степенью межисследовательского согласия (превосходное согласие), оценка сосудистой пролиферации и клеточности костного мозга показали среднее согласие. Плохое согласие было выявлено при оценке лейкоэритробластического соотношения, пространственных (периостальное расположение, характеристика кластеров) и цитологических (размеры клеток, аномалии ядер) характеристик мегакариоцитарного ростка [190].

Данные B.S. Wilkins и соавт. и A. Alvarez-Larrán и соавт. о низкой воспроизводимости характеристик ядерной атипии мегакариоцитов контрастируют с результатами, полученными S.M. Koopmans и соавт., согласно которым межисследовательское согласие при оценке особенностей строения ядер мегакариоцитов достаточно велико; так, мнение 3 из 4 экспертов о наличии в мегакариоцитах ядер типа «рогов оленя» совпало в 95% случаев (ДИ 88,6–100,6), облаковидных ядер – в 86% случаев (ДИ 76,0–95,5). Несколько хуже воспроизводимость характеристики кластеризации мегакариоцитов – межисследовательский консенсус о наличии плотных кластеров был получен в 88% случаев (ДИ 78,0–97,0), рыхлых кластеров – 71% случаев (ДИ 57,8–85,1). Как и в публикации A. Alvarez-Larrán и соавт., оценка лейкоэритробластического соотношения оказалась субъективной и плохо воспроизводимой – межисследовательское согласие было достигнуто лишь в 71% случаев (ДИ 59,6–83,3). Совпадение мнений 3 из 4 экспертов о нозологической форме в группе миелопролиферативных новообразований было получено лишь в 70% случаев (57,6–81,3) [152].

Интегральная оценка патоморфологических характеристик с целью дифференциальной диагностики в группе миелопролиферативных новообразований вызывает трудности даже у опытных специалистов, специализирующихся на гематопатологии, – совпадение патоморфологического

диагноза у 3 экспертов, принимавших участие в исследовании, в 53% случаев, сила ассоциации 2,1; 95% ДИ 1,8–2,4 [32].

В 5-м издании Классификации ВОЗ опухолей гемопоэтической и лимфоидной тканей перечислены патоморфологические признаки, позволяющие дифференцировать первичный миелофиброз и эссенциальную тромбоцитемию. Но отсутствие ранжирования этих признаков по значимости приводит к тому, что разные специалисты могут не только по-разному интерпретировать отдельные патоморфологические изменения, но и придавать их комбинациям различный вес.

С целью объективизировать оценку патоморфологических изменений в биопсиях костного мозга у больных эссенциальной тромбоцитемией и первичным миелофиброзом M. Brousseau и соавт. на основе анализа 127 биопсий костного мозга была предложена балльная система оценки, состоящая из 9 параметров (Таблица 7) [146].

Таблица 7 – Балльная система оценки патоморфологических изменений в костном мозге при эссенциальной тромбоцитемии и префибротической стадии первичного миелофиброза

	Эссенциальная тромбоцитемия		Первичный миелофиброз, префибротическая стадия	
	Характеристика	Балл	Характеристика	Балл
Клеточность костного мозга	Норма	0	Увеличено	1
Количество клеток гранулоцитарного ростка	Норма	0	Увеличено	1
Количество клеток эритроидного ростка	Норма/увеличено	0/1	Снижено	2

Продолжение таблицы 7

	Эссенциальная тромбоцитемия		Первичный миелофиброз, префибротическая стадия	
	Характеристика	Балл	Характеристика	Балл
Перитрабекулярные мегакариоциты	Отсутствуют	0	Присутствуют	1
Кластеры мегакариоцитов	Рыхлые	0	Плотные	1
Гиполобулярные ядра	Отсутствуют	0	Присутствуют	1
Гиперхромные диспластически измененные ядра	Отсутствуют	0	Присутствуют	1
Голоядерные формы	Отсутствуют	0	Присутствуют	1
Ядерно-цитоплазматический индекс у мегакариоцитов	Нормальный	0	Повышенный	1

Для разграничения эссенциальной тромбоцитемии и первичного миелофиброза в префибротической стадии следует использовать два пороговых значения: ≤ 3 , специфичное для эссенциальной тромбоцитемии, и ≥ 6 , характерное для префибротической стадии первичного миелофиброза. В выборке из 127 биопсий костного мозга, которые включали 102 случая эссенциальной тромбоцитемии, 18 случаев первичного миелофиброза в префибротической стадии и 7 случаев первичного миелофиброза в фибротической стадии, в 84 случаях эссенциальной тромбоцитемии балл был ≤ 3 , в 15 случаях первичного миелофиброза в клеточной стадии и 7 случаях первичного миелофиброза в фибротической стадии балл был ≥ 6 . В «серой зоне» оказался 21 случай (эссенциальная тромбоцитемия = 18, первичный миелофиброз = 3), что составляет 16,5% от всей выборки. Таким образом, балльная система оценки эссенциальной тромбоцитемии и префибротической стадии первичного миелофиброза помогает врачу-патологоанатому классифицировать 83,5% случаев. Наличие «серой зоны»

свидетельствует, что предложенные в ВОЗ патоморфологические критерии диагностики, основанные на состоянии миелоидной ткани, нуждаются в уточнении и не могут расцениваться в качестве «золотого стандарта». Необходим комплексный анализ характеристик ростков миелопоэза с учетом степени выраженности ретикулинового фиброза, клинико-лабораторных показателей, молекулярно-генетических данных и клинической картины заболевания.

Плохая воспроизводимость гистологических критериев ВОЗ в группе миелопролиферативных новообразований позволяет считать патоморфологическое исследование биопсии костного мозга тестом с низкой чувствительностью. Патоморфологическая дифференциальная диагностика эссенциальной тромбоцитемии и первичного миелофиброза в префибротической стадии требует тщательной качественной и количественной оценки большого количества гистологических характеристик в совокупности. Отсутствие четкой стандартизации гистологического исследования костного мозга у больных миелопролиферативными новообразованиями, субъективизм интерпретации частоты встречаемости и степени выраженности изменений того или иного признака приводят к необходимости поиска объективных патоморфологических признаков, не зависящих от индивидуальных особенностей исследователя.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Объект и материалы исследования

Проведено поперечное (одномоментное) исследование. В исследование включены больные первичным миелофиброзом и эссенциальной тромбоцитемией с подтвержденной мутацией в гене *JAK2* или *CALR*. В патологоанатомическом отделении клинической молекулярной морфологии ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России (зав. отд. заслуженный врач РФ, д. м. н., профессор Ю.А. Криволапов) в 2012–2017 годах в соответствии с критериями Классификации опухолей кроветворной и лимфоидной тканей ВОЗ отобраны биопсии костного мозга 63 больных первичным миелофиброзом и 59 больных эссенциальной тромбоцитемией [166].

Критерии включения в исследование:

1. возраст старше 18 лет на момент включения в исследование;
2. диагноз первичный миелофиброз или эссенциальная тромбоцитемия, установленный в соответствии с диагностическими критериями ВОЗ;
3. подтвержденная мутация в гене *JAK2* или *CALR*.

Согласно критериям включения, больные были разделены на следующие группы:

1. больные первичным миелофиброзом с мутацией в гене *JAK2* (N = 49);
2. больные первичным миелофиброзом с мутацией гене *CALR* (N = 14);
3. больные эссенциальной тромбоцитемией с мутацией в гене *JAK2* (N = 30);
4. больные эссенциальной тромбоцитемией с мутацией в гене *CALR* (N = 29).

Молекулярно-генетические исследования были выполнены в лаборатории молекулярной генетики ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России (зав. отд. д. б. н. И.С. Мартынкевич).

2.2. Методы исследования

Исследование групп больных включало:

1. Анализ медицинской документации для сбора анамнестических данных, данных физикального, инструментального обследования с измерением размеров печени и селезенки, показателей клинического анализа крови, оценки у больных первичным миелофиброзом групп риска по системам IPSS, DIPSS.
2. Молекулярно-генетические исследования для определения мутаций в гене *JAK2* или *CALR*.
3. Гистологическое исследование биопсий костного мозга, окрашенных гематоксилином и эозином, азуром II и эозином. Оценка степени выраженности ретикулинового, коллагенового фиброза в гистологических препаратах костного мозга, импрегнированных солями серебра по Гордону–Свиту, окрашенных трихромовым методом по Массону. Оценка степени выраженности остеосклероза.
4. Анализ гистотопографических характеристик мегакариоцитарного ростка и морфометрических характеристик мегакариоцитов в гистологических препаратах костного мозга, окрашенных гематоксилином и эозином, азуром II и эозином.
5. Мануальная и полуавтоматизированная с использованием программного обеспечения оценка количества мегакариоцитов и их размеров (площадь, периметр клетки) в биопсиях костного мозга, окрашенных в реакции с антителами к CD42b.

Анализ медицинской документации

В исследование включены больные первичным миелофиброзом и эссенциальной тромбоцитемией, которые находились в диагностических целях в отделениях гематологии и химиотерапии клиники им. Э.Э. Эйхвальда ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России, ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России, СПб ГБУЗ «Городская больница № 15», СПб ГБУЗ «Городская клиническая больница № 31» до начала специфической терапии. Оценку клинической картины заболевания у пациентов выполняли с учетом жалоб, сбора

анамнеза, данных физикального исследования, клинического анализа крови и данных ультразвукового исследования и/или компьютерной томографии органов брюшной полости [2]. При сборе анамнестических данных пациентов особое внимание обращали на наличие или отсутствие увеличенных в размерах печени и селезенки, органомегалии и симптомов опухолевой интоксикации – признаков, включенных в системы стратификации IPSS и DIPSS у больных первичным миелофиброзом [136; 9]. У больных эссенциальной тромбоцитемией выделяли наличие тромботических осложнений в анамнезе – признака, включенного в систему стратификации IPSET [12]. Для оценки концентрации гемоглобина, количества тромбоцитов, лейкоцитов и эритроцитов в единице объема периферической крови отбирали клинический анализ крови, взятый в максимально близкие к дате забора биопсии костного мозга сроки. У больных первичным миелофиброзом для стратификации пациентов на группы риска по системам IPSS, DIPSS в периферической крови определяли процент бластных клеток.

Молекулярно-генетические методы исследования

Для определения мутаций в генах *JAK2* или *CALR* геномная дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) была выделена из периферической крови следующим методом:

1. Гемолиз эритроцитов с помощью 20-минутной инкубации с NH_4Cl (4 мл/мл крови) при $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$;
2. Отбор 10–20 мкл лейкоцитов после осаждения;
3. Лизис лейкоцитов в 400 мкл лизирующего буфера в течение 10 мин при $+65\text{ }^{\circ}\text{C}$;
4. Добавление 600 мкл хлороформа к лизату лейкоцитов;
5. Центрифугирование лизата с хлороформом;
6. Перенос фазы, содержащей ДНК, в преципитирующий буфер;
7. Растворение осадка с ДНК в 1,2 М NaCl ;
8. Высаливание ДНК в 96% $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$;

9. Отмывка ДНК в 70% C_2H_5OH ;
10. Высушивание ДНК и растворение в 100 мкл воды.

Наличие мутации V617F в гене *JAK2* было анализировано следующим методом:

1. Амплификация содержащего мутацию участка гена *JAK2*.

Праймеры: F 5'-TGGTTTAAATTATGGACTA-3';
R 5'-TCACAAGATATAACTGAATAG-3'.

Состав смеси для полимеразной цепной реакции (ПЦР): 0,6 мкл 25 mM $MgCl_2$, 20–100 нг геномной ДНК (3мкл), по 10 пмоль каждого праймера, 6,0 мкл 2,5-кратной реакционной смеси и ампулированная вода до объема 15 мкл.

Программа для ПЦР: 5 мин – 95 °C, (30 сек – 95 °C, 30 сек – 41 °C, 30 сек – 72 °C) × 35 циклов, 5 мин – 72 °C.

2. Обработка амплифликата рестриктазой *Eam1105I* (Fermentas, США), согласно инструкции производителя, в количестве 2 мкл амплифликата на 15 мкл реакционного объема.

3. Разделение и окрашивание продуктов гидролиза. Разделение проводилось в 6% полиакриламидном геле. Окрашивание проводилось бромистым этидием.

4. Визуализация продукта амплификации при помощи УФ-излучения. Наличие мутации указывалось отсутствием гидролиза части продукта, т. к. мутация приводила к отсутствию сайта рестрикции.

Наличие инсерций/делеций 9 экзона гена *CALR* было анализировано следующим методом:

1. Амплификация содержащего мутации участка гена *CALR*.

Праймеры: F5'-TGCAGGCAGCAGAGAAACAA-3',
R5'-CTCTACAGCTCGTCCTGGC-3'.

Состав смеси для ПЦР: 1,2 мкл 25 mM $MgCl_2$, 20–100 нг геномной ДНК (3мкл), по 10 пмоль каждого праймера, 12,0 мкл 2,5-кратной реакционной смеси и ампулированная вода до объема 30 мкл.

Программа для ПЦР: 10 мин – 95 °C, (30 сек – 95 °C, 30 сек – 63 °C, 30 сек – 72 °C) × 35 циклов, 5 мин – 72 °C.

2. Смешивание амплификаата с 3 мкл ddH₂O и 1 мкл двойной краски (ксиленцианол, бромфеноловый синий, глицерин).

3. Разделение продуктов амплификации. Разделение проводилось в 6% полиакриламидном геле. Окрашивание проводилось бромистым этидием.

4. Визуализация продукта амплификации при помощи УФ-излучения. Предварительно наличие мутации указывалось наличием гетеродуплексов фрагментов дикого типа и/или добавочных полос.

5. Секвенирование по Сенгеру в автоматической капиллярной системе MegaBACE 1000 DNA Analysis System с использованием набора реагентов DYEnamic ET dye terminator cycle sequencing kit.

Подготовка: очистка от продуктов амплификации, не связавшихся с dNTP, при помощи буфера (0,15 M NH₄COOH, 95% C₂H₅OH).

Состав смеси: 20 нанограмм продукта, по 10 пмоль каждого праймера, 8 мкл Terminator Mix (5 mM ddNTP и 1000 mM dNTP), дейонизированная вода до объема 20 мкл.

Программа: 1 мин – 96 °C, (10 сек – 96 °C, 5 сек – 60 °C, 4 мин – 65 °C) × 27 циклов.

Обработка продуктов: очистка от продуктов амплификации, не связавшихся с dNTP, при помощи буфера (0,15 M NH₄COOH, 95% C₂H₅OH), добавление 12 мкл формамида.

Анализ: автоматический в анализаторе, с использованием программ VECTOR NTI и Sequence Scanner 2.0.

Гистологические методы исследования

Для гистологического исследования использовали биопсии костного мозга, окрашенные гематоксилином и эозином или азуром II и эозином (по А.А. Максимову в модификации Ю.А. Криволапова) по следующей методике:

Срезы костного мозга на 30 минут помещали в термостат при температуре 56 °С, затем двумя сменами ксилола с неостывших срезов удаляли парафин. После депарафинизации гистологические образцы гидратировали тремя сменами абсолютного этанола, затем помещали под проточную воду. Промытые проточной водой препараты окрашивали гематоксилином Майера в течение 3–5 минут, после чего просветляли окраску в солянокислом спирте до почти полного обесцвечивания ядерного хроматина. Далее препараты снова промывали в проточной воде 5–7 минут и помещали в рабочий раствор азура II и эозина в емкости Коплина или емкости Хелендахела на 16–18 часов при комнатной температуре. На следующем этапе срезы, предварительно помещенные в дистиллированную воду, по одному доставали и погружали в слабый раствор уксусной кислоты для дифференцировки окраски (дифференцирующий раствор требует для приготовления 100 мл воды и 1–2 капли ледяной уксусной кислоты). После завершения процесса дифференцировки окраски срезы помещали в водопроводную воду. Далее с каждого предметного стекла абсолютизированным изопрапонолом смывали воду и к избытку изопрапонола поверх среза добавляли несколько капель 1% раствора эозина в 70% этаноле. После перемешивания раствора эозина и изопрапонола и приобретания срезом синевато-сиреневого окрашивания смывали получившуюся смесь красителя и спирта абсолютизированным изопрапонолом. На заключительном этапе срез промывали ксилолом и заключали под покровным стеклом по стандартной методике [4].

При гистологическом исследовании костного мозга больных первичным миелофиброзом анализировали клеточность костного мозга и его клеточный состав.

Для подсчета клеточности костного мозга оценивали соотношение жировых клеток и миелоидной ткани. Долю миелоидной ткани выражали в процентах. Так как с возрастом у здоровых людей соотношение жировых клеток и кроветворного костного мозга меняется, для рассчета нормальной клеточности костного мозга использовали обобщенные данные литературы, представленные в Таблице 8.

Таблица 8 – Нормальная доля миелоидной ткани в трепанобиоптатах костного мозга (из [33; 137; 140; 181])

Возраст	Доля миелоидной ткани (%)
Новорожденные	80–100
1–3 мес.	80–100
Дети	60–80
20–30 лет	60–70
40–60 лет	40–50
≥ 70 лет	30–40

Соответствующий возрасту пациента показатель клеточности костного мозга называли нормоклеточным. Уменьшение доли миелоидной ткани в костном мозге больного ниже порогового значения описывали как гипоклеточный костный мозг, увеличение выше порогового значения – гиперклеточный костный мозг.

В норме значения лейкоэритробластического соотношения варьируют от 1,5:1 до 4:1 [97; 134; 167; 179]. Нормальные значения этого показателя свидетельствует о том, что в миелоидной ткани гранулоцитов и моноцитов больше, чем нормобластов, в 1,5–4 раза. Увеличение или уменьшение относительного количества клеток гранулоцитарного и моноцитарного ростка или клеток эритроидного ростка обозначали термином «расширение» или «сужение», соответственно.

Оценка степени выраженности ретикулинового фиброза была выполнена в гистологических препаратах, импрегнированных солями серебра по Гордону–Свиту согласно следующей методике:

Срезы костного мозга в течение 10 минут хранили в термостате при температуре 56 °С. После извлечения из термостата выполняли депарафинизацию срезов двумя сменами ксилола, тремя сменами 95% раствора этилового спирта и погружали срезы деионизированную воду. На следующем этапе применяли раствор перманганата калия и активирующий кислотный буфер, после чего препарат промывали в деионизированной воде. После промывки на срезы наносили

раствор ферроаммония сульфата, затем препарат снова промывали в дистиллированной воде, вслед за этим проводили импрегнацию срезов раствором аммиаката окиси серебра. На импрегнированные препараты наносили нейтральный раствор формалина, затем промывали в дистиллированной воде. После промывки проводили тонирование срезов раствором хлорида золота, вслед за этим промывали в дистиллированной воде. На заключительном этапе окрашивания срезы фиксировали раствором гипосульфита натрия. Дальнейшая дегидратация, просветление и заключение срезов под покровное стекло были выполнены по стандартной методике.

Для оценки степени выраженности ретикулинового фиброза использовали импрегнацию солями серебра по Гордону–Свиту или по Гомори. Оценку степени выраженности коллагенового фиброза выполняли в гистологических препаратах, окрашенных трихромовым методом по Массону по стандартной методике. Полуколичественные шкалы оценки степени выраженности ретикулинового и коллагенового фиброза, остеосклероза приведены в Таблицах 9, 10. В гистологических препаратах костного мозга с неравномерно выраженным ретикулиновым и/или коллагеновым фиброзом ставили более высокую оценку степени выраженности фиброза, если участки с большей степенью фиброза составляли более 30% площади межбалочных пространств.

Таблица 9 – Гистологические критерии степени выраженности ретикулинового фиброза костного мозга

Степень	Описание
MF-0	Отдельные непересекающиеся ретикулиновые волокна
MF-1	Рыхлая сеть ретикулиновых волокон с многочисленными пересечениями
MF-2	Плотная диффузная сеть ретикулиновых волокон с многочисленными пересечениями, единичные пучки волокон, соответствующие очажкам коллагенового фиброза
MF-3	Плотная диффузная сеть ретикулиновых волокон с многочисленными пересечениями, многочисленные грубые пучки коллагена и/или распространенный остеосклероз

Таблица 10 – Гистологические критерии степени выраженности коллагенового фиброза костного мозга

Степень	Описание
Coll-0	Коллагеновые волокна окружают кровеносные сосуды
Coll-1	Единичные линейные коллагеновые волокна располагаются изолированно около костных балок или в просвете костномозговых ячеек и не соединяются в сеть
Coll-2	Пучки коллагеновых волокон располагаются перитрабекулярно или в просвете костномозговых ячеек, местами соединяются в сеть либо распространенный перитрабекулярный коллагеновый фиброз
Coll-3	Диффузная (окончательно сформированная) сеть коллагеновых волокон более чем в 30% костномозговых пространств

Оценку степени выраженности остеосклероза проводили в гистологических препаратах костного мозга, окрашенных гематоксилином и эозином, азуром II. В соответствии с рекомендациями Европейского консенсуса 2005 года и результатами работы экспертной группы врачей-патологоанатомов,

специализирующихся на гематопатологии, использовали 4-балльную систему оценки, представленную в Таблице 11 [167].

Таблица 11 – Гистологические критерии степени выраженности остеосклероза

Степень	Описание
Os-0	Строение костных балок не изменено и соответствует возрастной норме
Os-1	Изолированные костные «наросты», «крючки» и спикулы. Фокусы формирования костной ткани на поверхности костных балок
Os-2	Диффузное перитрабекулярное формирование костной ткани с участками утолщения костных балок. Различимы фокусы соединения новообразованных костных балок
Os-3	Обширные сливающиеся пласти новообразованной костной ткани, вытесняющие и замещающие миелоидную ткань

Гистотопографическая и морфометрическая оценка мегакариоцитарного ростка

Гистологические препараты костного мозга, окрашенные гематоксилином и эозином или азуром II и эозином с помощью сканирующего микроскопа Pannoramic 250 Flash III (3DHISTECH, Венгрия), переводили в цифровой формат. В программе Pannoramic Viewer каждый исследуемый срез вручную выделяли по контуру для оценки его площади ($S_{\text{среза}}$) в мкм^2 , затем мануально обводили границы костных балок с целью определить координаты их границ и суммарную площадь ($\sum S_{\text{балок}}$) в мкм^2 . Площадь миелоидной ткани ($S_{\text{миелоидной ткани}}$) вычисляли по формуле (1):

$$(S_{\text{среза}} - \sum S_{\text{балок}}) \times k / 100, \quad (1)$$

где k – средняя клеточность костного мозга в гистологическом препарате.

В программе Pannoramic Viewer в исследуемых срезах каждый мегакариоцит выделяли точечной аннотацией, после чего координаты всех мегакариоцитов каждого среза экспортировали в MS Excel и конвертировали в txt-формат.

Обработка координат с целью анализа особенностей расположения мегакариоцитов в костном мозге была выполнена с использованием языка программирования Python.

В биопсиях костного мозга оценивали следующие характеристики: среднее количество мегакариоцитов в кластере, среднее количество мегакариоцитов и мегакариоцитарных кластеров в 1 мм^2 миелоидной ткани, среднее расстояние между мегакариоцитами и костными балками, доля мегакариоцитов, лежащих у костных балок в пределах 50 мкм (расстояние между мегакариоцитом и костной балкой ≤ 50 мкм расценивали как перитрабекулярное). Пороговое значение 50 мкм было выбрано с учетом данных литературы. Выполненный N. Vytrva и соавт., морфометрический анализ 112 биопсий костного мозга больных миелопролиферативными новообразованиями продемонстрировал, что средние значения (стандартное отклонение) наибольшего диаметра цитоплазмы мегакариоцита при *JAK2*-позитивной эссенциальной тромбоцитемии составляют 32,8 (32,8) мкм, при первичном миелофиброзе с мутацией в гене *JAK2* – 30,0 (5,4) мкм [118].

Для анализа количества кластеров и количества мегакариоцитов в одном кластере использовали алгоритм кластеризации DBSCAN [52]. Были заданы следующие параметры алгоритма: минимальное количество соседних мегакариоцитов, необходимых для образования кластера, – 3, максимальное расстояние между ними – 100 мкм, расстояние между мегакариоцитами – евклидово. Получено свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2024682149 Российская Федерация. Программное обеспечение для гистотопографического анализа мегакариоцитарного ростка миелоидной ткани в биопсатах костного мозга : № 2024680664 : заявл. 05.09.2024 : опубл. 18.09.2024 / З.П. Асауленко, Ю.А. Криволапов, Д.В. Гирдюк, В.К. Верендеев. – 1 л.

Принцип работы алгоритма кластеризации DBSCAN заключается в классификации точечных объектов, расположенных близко друг к другу, как группы и игнорировании областей с малой плотностью расположения точечных объектов – т. н. «шум». В методике DBSCAN используются понятия [52]:

ε – окрестность объекта x ;

V – множество всех наблюдений;

$$U(x, \varepsilon) = \{y \in V : p(x, y) \leq \varepsilon\}.$$

Корневой объект степени M (для заданного ε) – объект, окрестность которого содержит не менее M других объектов. При заданном значении M объект у плотно-достижим из объекта x , если $y \in U(x, \varepsilon)$ и объект x является корневым.

Объект y плотно-достижим из объекта x , если существуют такие объекты x_1, \dots, x_n , где $x_1 = x$, $x_n = y$, что при всех $i = 1, \dots, n - 1$ объект x_{i+1} непосредственно плотно-достижим из x_i .

«Шум» – объекты, не достижимые ни из одного другого объекта.

Число кластеров K алгоритм DBSCAN определяет в процессе работы.

Принцип работы алгоритма DBSCAN.

1. Задаются значения параметров ε и M .
2. Если все объекты $x \in V$ уже просмотрены, завершить выполнение алгоритма. В противном случае выбирается любой из них и отмечается как просмотренный.
3. Если x – корневой объект, создается новый кластер ($K := K + 1$), переход к пункту 4; в противном случае точка x помечается как «шум», переход к шагу 1.
4. В созданный кластер включаются все объекты, которые являются плотно-достижимыми из (корневого) объекта x , переход к шагу 2.

Ограничением алгоритма кластеризации DBSCAN считается возможность проводить оценку пространственного расположения на плоскости исключительно точечных объектов. В проведенном исследовании точечные объекты представляли собой экспортованные координаты мегакариоцитов, которые были определены при исследовании отсканированных гистологических препаратов костного мозга, окрашенных гематоксилином и эозином или азуром II и эозином (Рисунок 1).



Рисунок 1 – Визуализация результата работы алгоритма кластеризации DBSCAN: мегакариоциты, формирующие скопления, окрашены цветом, мегакариоциты черного цвета – «шум»

Среднее количество мегакариоцитов в 1 мм^2 миелоидной ткани вычисляли по формуле (2):

$$(N \text{ мегакариоцитов}) / (S \text{ миелоидной ткани}). \quad (2)$$

Среднее количество мегакариоцитарных кластеров в 1 мм^2 миелоидной ткани вычисляли по формуле (3):

$$(N \text{ кластеров мегакариоцитов}) / (S \text{ миелоидной ткани}). \quad (3)$$

Для оценки тропности мегакариоцитов к костным балкам с использованием языка программирования Python автоматически определяли среднее значение расстояний между координатами каждого мегакариоцита и границами ближайших костных балок, отдельно проводили подсчет количества мегакариоцитов, лежащих у костных балок в пределах 50 мкм (Рисунок 2). Получено свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2024682253 Российской Федерации. Программное обеспечение для вычисления тропности мегакариоцитов к костным балкам в трепанобиоптатах костного мозга : № 2024681272 : заявл. 10.09.2024 : опубл. 19.09.2024 / З.П. Асауленко, Ю.А. Криволапов, Д.В. Гирдюк, В.К. Верендеев. – 1 л.

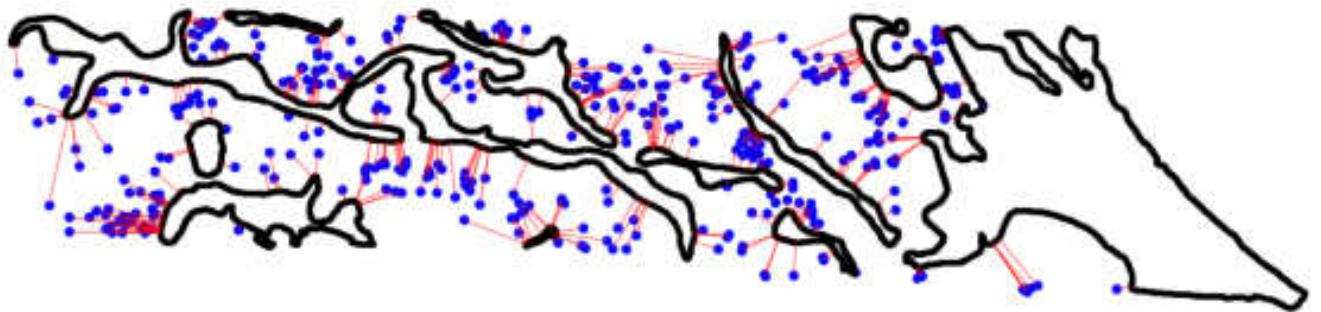


Рисунок 2 – Визуализация методики оценки тропности мегакариоцитов к костным балкам: мегакариоциты отмечены синим цветом, контуры костных балок черным цветом, красные линии – кратчайшее расстояние между мегакариоцитом и костной балкой

Сравнение морфометрических параметров мегакариоцитов в трепанобиоптатах костного мозга больных первичным миелофиброзом и эссенциальной тромбоцитемией с мутацией в гене *JAK2* или *CALR* осуществляли с использованием программы Pannoramic Viewer. В каждом отсканированном биоптате костного мозга в зависимости от его размера случайным образом выбирали до 100 мегакариоцитов. В каждом мегакариоците вручную обводили ядра и контуры цитоплазмы, полученные значения периметров и площадей ядер и клеток экспортировали в MS Excel для морфометрического анализа (Рисунок 3). Оценивали следующие параметры мегакариоцитов: периметр ядра мегакариоцита ($P_{я}$), площадь ядра мегакариоцита ($S_{я}$), периметр мегакариоцита ($P_{мег}$), площадь мегакариоцита ($S_{мег}$), ядерно-цитоплазматическое соотношение, которое определяли по формуле (4):

$$\frac{S_{я}}{S_{мег}} \quad (4)$$

и коэффициент кривизны ядра ($F_{я}$), который определяли по формуле (5):

$$(4\pi \times S_{я}) / \lceil P_{я} \rceil^2. \quad (5)$$

Значение коэффициента кривизны ядра, равное 1, соответствует ядру круглой формы, чем ближе значение коэффициента кривизны ядра к 0, тем более извитые и удлиненные контуры имеет ядро.

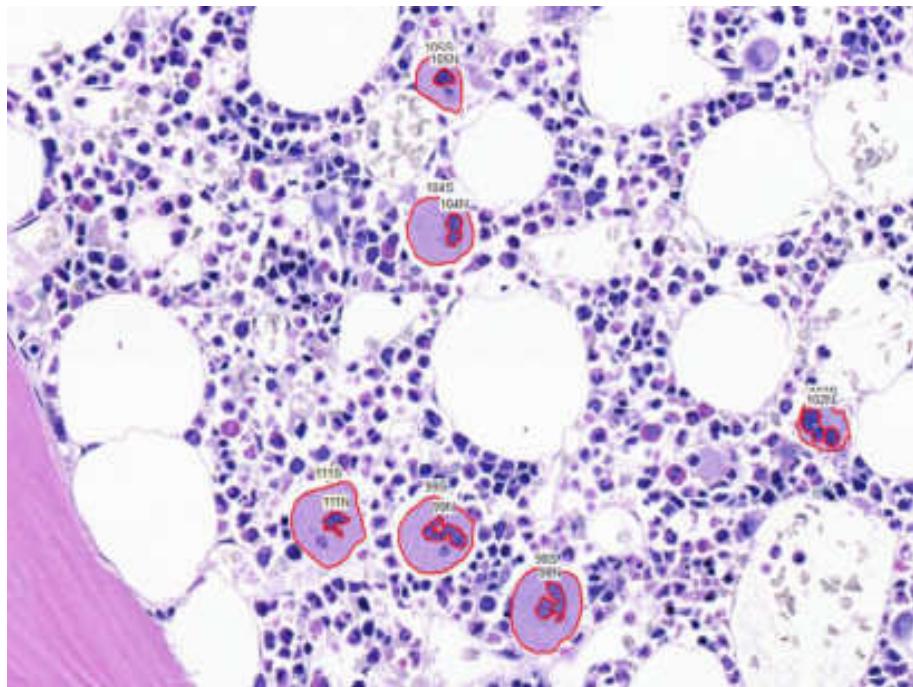


Рисунок 3 – Анализ морфометрических характеристик мегакариоцитов

Морфометрический анализ CD42b-позитивных мегакариоцитов в миелоидной ткани

У 53 больных первичным миелофиброзом (40 случаев с мутацией в гене *JAK2*, 13 случаев с мутацией в гене *CALR*) и 55 больных эссенциальной тромбоцитемией (30 случаев с мутацией в гене *JAK2*, 25 случаев с мутацией в гене *CALR*) выполнено иммуногистохимическое исследование с антителами к CD42b (клон EP409), производитель Cell Marque. Для постановки иммуногистохимической реакции использовали разведение 1:400. При микроскопическом исследовании препаратов костного мозга, окрашенных в реакции с антителами к CD42b, визуализировали цитоплазматическое и мембранное окрашивание мегакариоцитов, внутренним позитивным контролем считали тромбоциты, экспрессирующие CD42b.

Иммуногистохимическое исследование было выполнено по следующей методике: серийные срезы толщиной 3 мкм депарафинировали и регидратировали

по стандартной методике. Для «демаскировки» антигенов срезы подвергали высокотемпературной обработке в буфере с pH 9,0 в течение 30 минут в PT Module (Thermo scientific). Иммуногистохимическое окрашивание проводили по стандартному протоколу, включающему инкубацию с 3% перекисью водорода, инкубацию с первичными кроличьими моноклональными антителами CD42b (разведение 1:400, клон EP409) при 37 °C в течение 30 минут. В качестве системы визуализации использовалась полимерная система HiDef Detection HRP Polymer Detector (Cell Marque). Заключительную проводку проводили поэтапно в этаноле и ксилоле. Заключение срезов под покровные стекла выполняли с использованием среды Витрогель с помощью аппарата Leica CV5030.

Гистологические препараты костного мозга, окрашенные в реакции с антителами к CD42b, сканировали с помощью цифрового сканирующего микроскопа Pannoramic 250 Flash III (3DHISTECH, Венгрия). В отсканированных гистологических препаратах в программе SlideViewer выделяли 10 полей зрения площадью 0,1 мм^2 каждое с визуально наибольшей плотностью расположения мегакариоцитов. В отобранных полях зрения вручную обводили все CD42b-позитивные мегакариоциты. Параметрами сравнения в исследованных группах служили средние периметр и площадь мегакариоцитов, а также среднее количество мегакариоцитов в одном поле зрения. Для описания связи характеристик мегакариоцитов и заболевания (первичный миелофиброз или эссенциальная тромбоцитемия) использовали многофакторный дисперсионный анализ и логистический регрессионный анализ.

2.3. Использование программного обеспечения *ilastik* для полуавтоматического выделения мегакариоцитов, экспрессирующих CD42b

Ilastik представляет собой программное обеспечение с открытым исходным кодом, разработанное для классификации и сегментации изображений [93]. Объектом исследования были отсканированные биопсии костного мозга больных первичным миелофиброзом и эссенциальной тромбоцитемией, окрашенные в

реакции с антителами к CD42b. Из 1080 полей зрения, размеченных в 108 оцифрованных гистологических препаратах, случайным образом были отобраны 100 полей зрения площадью 0,1 мм^2 каждое. Выбранные поля зрения с помощью программы SlideMaster экспортировали как растровые графические изображения TIFF (Tagged Image File Format) с их дальнейшей конвертацией в JPEG (Joint Photographic Experts Group) формат. С целью анализа изображений в программе ilastik использовали алгоритм «Классификация пикселей и объектов». Методику обучения классификатора можно разбить на следующие этапы.

1. Определение параметров изображения для анализа: цвет, интенсивность цвета, текстура;
2. Обучение классификатора на тестовых изображениях: представляет собой ручное аннотирование объектов по классам для их дальнейшей автоматической идентификации программным алгоритмом;
3. Ручная калибровка пороговых уровней чувствительности и специфичности алгоритма, определение минимально и максимально допустимых размеров идентифицируемых объектов;
4. Автоматическая группировка объектов на заданные классы;
5. Выбор характеристик объектов, которые необходимо оценить: периметр и площадь объекта, максимальный диаметр, коэффициент кривизны, интенсивность цвета и др.;
6. Экспорт выбранных показателей в табличном виде в Microsoft Excel;
7. Сохранение алгоритма для работы со следующими изображениями.

Для решения поставленных в этой работе задач объекты аннотировали на два класса: 1 – мегакариоциты, 2 – фон. Обучение классификатора проводили на 10 изображениях площадью 0,1 мм^2 каждое. Оценку точности и полноты алгоритма выполняли на остальных 90 микрофотографиях. На Рисунке 4 продемонстрировано автоматическое определение мегакариоцитов в программе ilastik.

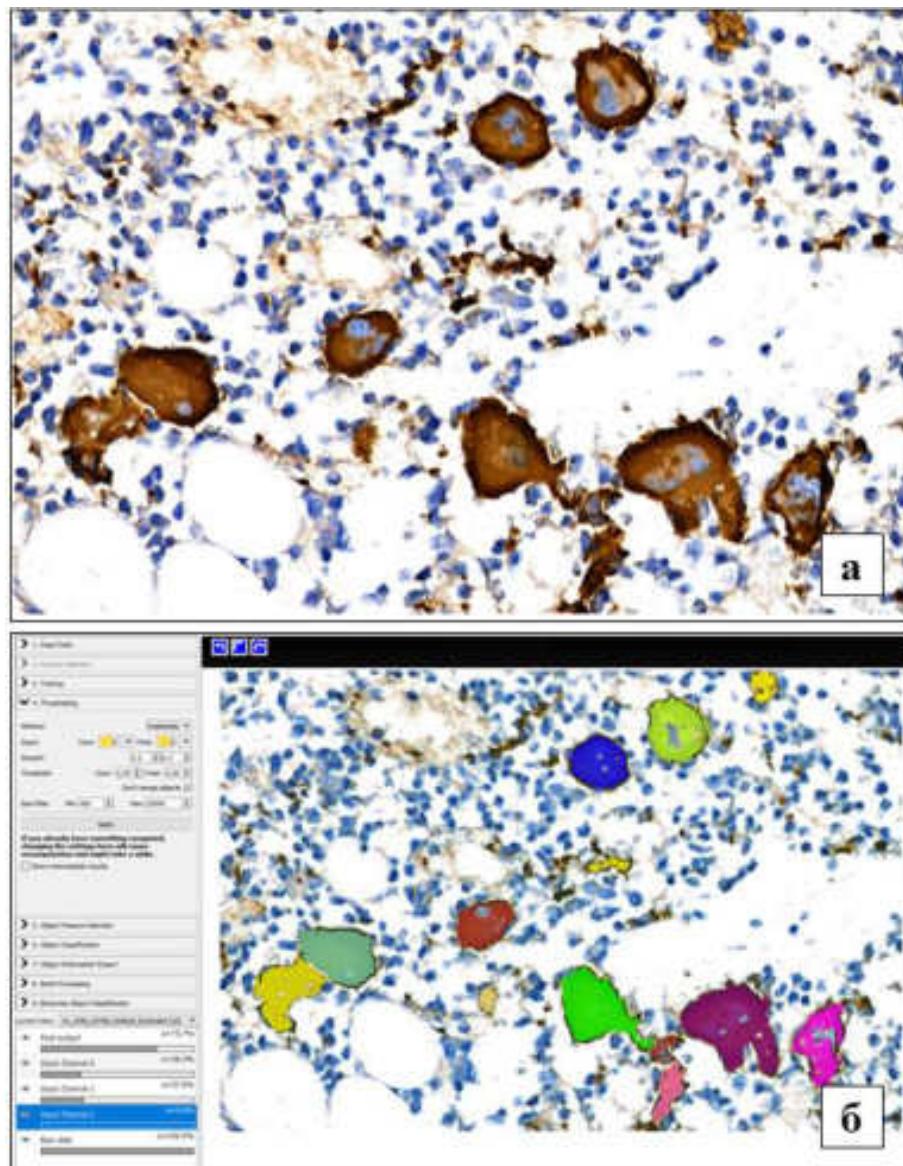


Рисунок 4 – Визуализация методики полуавтоматического выделения мегакариоцитов, экспрессирующих CD42b: а – исходное изображение; б – выделенные программным алгоритмом мегакариоциты окрашены разными цветами

Точность классификатора пикселей и объектов *ilastik* вычисляли по формуле (6):

$$\frac{(N \text{ истинноположительных решений})}{(N \text{ истинноположительных решений} + N \text{ ложноположительных решений})}. \quad (6)$$

Полноту классификатора пикселей и объектов *ilastik* вычисляли по формуле (7):

$$\frac{(N \text{ истинноположительных решений})}{(N \text{ истинноположительных решений} + N \text{ ложноотрицательных решений})}. \quad (7)$$

Для оценки взвешенного гармонического среднего полноты и точности классификатора пикселей и объектов *ilastik* вычисляли F-меру по формуле (8):

$$2 \times (\text{Точность} \times \text{Полнота}) / (\text{Точность} + \text{Полнота}) [145]. \quad (8)$$

2.4. Статистический анализ

Статистическую обработку данных проводили в программах IBM SPSS Statistics v.23.0 (IBM, USA, 2015), GraphPad Prism v. 8.4.3 (GraphPad Software, USA, 2020). Распределения количественных признаков характеризовались с помощью среднего значения и стандартного отклонения. Качественные признаки были представлены в виде абсолютных значений и относительных частот. Для сравнения количественных показателей двух независимых выборок использовали U-критерий Манна–Уитни. В случае трех и более групп был применен критерий Краскела–Уоллиса. Сравнение категориальных переменных было выполнено с использованием двустороннего точного критерия Фишера. Поиск ассоциативных связей между показателями выполняли с использованием рангового корреляционного анализа по Спирмену. Для решения задач бинарной классификации проводили многофакторный дисперсионный анализ, а также строили модели логистических регрессий. Для выявления наиболее общих закономерностей распределения исследованных в работе случаев использовали метод главных компонент.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Сравнительный анализ случаев первичного миелофиброза и эссенциальной тромбоцитемии

Клинико-лабораторная характеристика пациентов с первичным миелофиброзом и эссенциальной тромбоцитемией

Исследованы 63 больных первичным миелофиброзом и 59 пациентов с эссенциальной тромбоцитемией. Возраст больных первичным миелофиброзом на момент взятия биопсии костного мозга варьировал от 28 до 76 лет, среднее значение (стандартное отклонение – СО) составило 56,9 года (12,4 года). Возраст пациентов эссенциальной тромбоцитемией варьировал от 19 до 79 лет, среднее значение (СО) составило 53,4 года (16,6 года). Различия по возрасту статистически не значимы (р-значение = 0,33). Из 63 включенных в исследование больных первичным миелофиброзом было 37 женщин и 26 мужчин без статистически значимых различий по среднему значению возрастов (р-значение = 0,33). Из 59 пациентов с эссенциальной тромбоцитемией было 38 женщин и 21 мужчина, без статистически значимых различий по среднему значению возрастов (р-значение = 0,053).

На момент взятия биопсии костного мозга у 22 из 63 больных первичным миелофиброзом была выявлена спленомегалия, в группе эссенциальной тромбоцитемии спленомегалия обнаружена у 5 пациентов из 59. Гепатомегалия отмечалась у 13 больных первичным миелофиброзом и 5 больных эссенциальной тромбоцитемией. У 6 больных первичным миелофиброзом и лишь у 1 пациента с эссенциальной тромбоцитемией на момент взятия биопсии костного мозга была инструментально подтвержденная органомегалия (данные представлены в Таблице 13).

В общем анализе крови наблюдали следующие изменения: в группе больных первичным миелофиброзом количество тромбоцитов варьировало от $45 \times 10^9/\text{л}$ до

$2237 \times 10^9/\text{л}$, среднее значение (СО) составило $724,7 (447,7) \times 10^9/\text{л}$, у пациентов с эссенциальной тромбоцитемией количество тромбоцитов варьировало от $154 \times 10^9/\text{л}$ до $2521 \times 10^9/\text{л}$, среднее значение (СО) составило $970,3 (476,1) \times 10^9/\text{л}$. Количество лейкоцитов у больных первичным миелофиброзом варьировало от $1,40 \times 10^9/\text{л}$ до $59,18 \times 10^9/\text{л}$, среднее значение (СО) составило $14,03 (9,93) \times 10^9/\text{л}$, у пациентов с эссенциальной тромбоцитемией количество лейкоцитов варьировало от $4,0 \times 10^9/\text{л}$ до $23,0 \times 10^9/\text{л}$, среднее значение (СО) составило $10,14 (4,01) \times 10^9/\text{л}$. Количество эритроцитов у больных первичным миелофиброзом варьировало от $1,99 \times 10^{12}/\text{л}$ до $8,26 \times 10^{12}/\text{л}$, среднее значение (СО) составило $5,11 (1,50) \times 10^9/\text{л}$, у пациентов с эссенциальной тромбоцитемией количество эритроцитов варьировало от $2,70 \times 10^{12}/\text{л}$ до $7,42 \times 10^{12}/\text{л}$, среднее значение (СО) составило $5,04 (1,02) \times 10^9/\text{л}$. У больных первичным миелофиброзом показатель гемоглобина варьировал от 60 г/л до 205 г/л, среднее значение (СО) составило 137,0 (34,9) г/л, у пациентов с эссенциальной тромбоцитемией показатель гемоглобина варьировал от 72 г/л до 197 г/л, среднее значение (СО) составило 138,9 (24,0) г/л (Таблица 12, Рисунки 5, 6).

Таблица 12 – Лабораторные данные в группах пациентов с первичным миелофиброзом и эссенциальной тромбоцитемией

Показатель	Первичный миелофиброз (N = 63) среднее (СО) минимум–максимум	Эссенциальная тромбоцитемия (N = 59) среднее (СО) минимум–максимум	p-значение
Тромбоциты ($10^9/\text{л}$)	724,7 (447,7) 45–2237	970,3 (476,1) 154–2521	0,0022
Лейкоциты ($10^9/\text{л}$)	14,03 (9,93) 1,40–59,18	10,14 (4,01) 4,00–23,00	0,0016
Эритроциты ($10^{12}/\text{л}$)	5,11 (1,50) 1,99–8,26	5,04 (1,02) 2,70–7,42	0,66

Продолжение таблицы 12

Показатель	Первичный миелофиброз (N = 63) среднее (CO) минимум–максимум	Эссенциальная тромбоцитемия (N = 59) среднее (CO) минимум–максимум	р-значение
Гемоглобин (г/л)	137,0 (34,9) 60–205	138,9 (24,0) 72–197	0,98
Примечание – Для сравнения независимых выборок применен U-критерий Манна–Уитни.			

Таблица 13 – Клинико-лабораторные данные в группах пациентов с первичным миелофиброзом и эссенциальной тромбоцитемией

Показатель	Первичный миелофиброз (N = 63) количество (процентная доля)	Эссенциальная тромбоцитемия (N = 59) количество (процентная доля)	р-значение
Лейкоциты $>11 \times 10^9/\text{л}$	35/63 (55,5%)	16/59 (27,1%)	0,0018
Тромбоциты $>450 \times 10^9/\text{л}$	39/63 (61,9%)	54/59 (91,5%)	0,0001
Сplenомегалия, n (%)	22/63 (34,9%)	5/59 (8,5%)	0,0004
Гепатомегалия, n (%)	13/63 (20,6%)	5/59 (8,5%)	0,075
Органомегалия, n (%)	6/63 (9,5%)	1/59 (1,7%)	0,1156
Примечание – Сравнение категориальных переменных выполнено с использованием двустороннего точного критерия Фишера.			

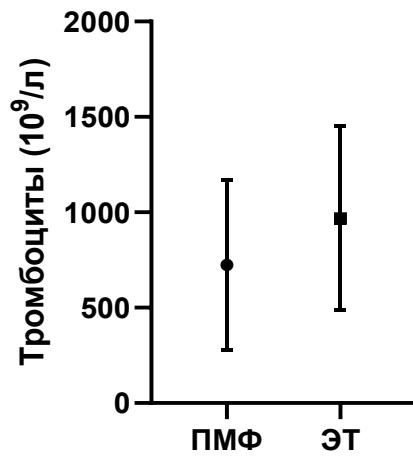


Рисунок 5 – Количество тромбоцитов в общем анализе крови у больных первичным миелофиброзом (ПМФ) и эссенциальной тромбоцитемией (ЭТ). Приведены средние значения и стандартные отклонения показателей

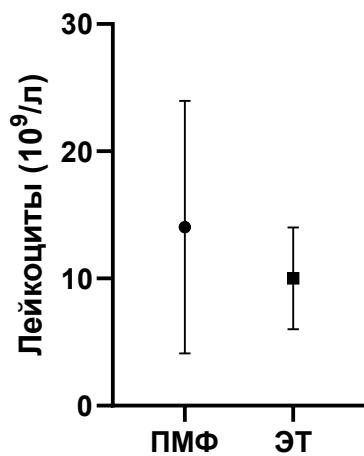


Рисунок 6 – Количество лейкоцитов в общем анализе крови у больных первичным миелофиброзом (ПМФ) и эссенциальной тромбоцитемией (ЭТ). Приведены средние значения и стандартные отклонения показателей

Особенности гистологического строения костного мозга у больных первичным миелофиброзом и эссенциальной тромбоцитемией

При гистологическом исследовании трепанобиоптатов костного мозга пациентов с первичным миелофиброзом визуализировали следующие изменения: у 2 из 63 больных клеточность костного мозга была ниже возрастной нормы, у

14 пациентов наблюдали нормоклеточный костный мозг и у 47 больных клеточность костного мозга превышала возрастную норму. В группе эссенциальной тромбоцитемии гипоклеточный костный мозг был выявлен у 19 из 59 больных, клеточность костного мозга соответствовала возрастной норме у 24 пациентов, гиперклеточный костный мозг наблюдали в 16 случаях из 59 (Рисунок 7).

В группе больных первичным миелофиброзом клеточность костного мозга варьировала от 10 до 100%, среднее значение (СО) составило 82% (19%), у пациентов с эссенциальной тромбоцитемией клеточность костного мозга варьировала от 10 до 80%, среднее значение (СО) составило 49% (16%). Различия статистически значимы (p -значение $< 0,0001$).

У больных первичным миелофиброзом пониженное лейко-эритробластическое соотношение наблюдали в 2 из 63 случаев, у 43 пациентов лейкоэритробластическое соотношение было нормальным (1,5–4:1) и у 18 больных было выявлено «расширение» гранулоцитарного ростка. В группе больных с эссенциальной тромбоцитемией пониженное лейко-эритробластическое соотношение было обнаружено у 2 из 59 пациентов, нормальное соотношение гранулоцитарного и эритроидного ростков наблюдали у 56 больных, повышенное лейкоэритробластическое соотношение отмечали в 1 случае (Рисунок 8).

В группе больных первичным миелофиброзом и эссенциальной тромбоцитемией выявлены статистически значимые различия степени выраженности ретикулинового и коллагенового фиброза, остеосклероза (Рисунки 9–11, данные представлены в Таблице 14).

Таблица 14 – Особенности гистологического строения костного мозга у больных первичным миелофиброзом и эссенциальной тромбоцитемией

Показатель	Первичный миелофиброз (N = 63) количество (процентная доля)	Эссенциальная тромбоцитемия (N = 59) количество (процентная доля)	p-значение
Клеточность костного мозга	понижена	2/63 (3,2%)	< 0,0001
	норма	14/63 (22,2%)	
	повышена	47/63 (74,6%)	
Лейко- эритробластическое соотношение	понижено	2/63 (3,2%)	< 0,0001
	норма	43/63 (68,2%)	
	повышено	18/63 (28,6%)	
Ретикулиновый фиброз	0	3/63 (4,7%)	< 0,0001
	1	29/63 (46,0%)	
	2	12/63 (19,0%)	
	3	19/63 (30,1%)	
Коллагеновый фиброз	0	38/63 (60,3%)	< 0,0001
	1	15/63 (23,8%)	
	2	7/63 (11,1%)	
	3	3/63 (4,8%)	
Остеосклероз	0	53/63 (84,1%)	0,0061
	1	8/63 (12,7%)	
	2	2/63 (3,2%)	
Примечание – 0–3 – степень выраженности. Сравнение категориальных переменных выполнено с использованием двустороннего точного критерия Фишера.			

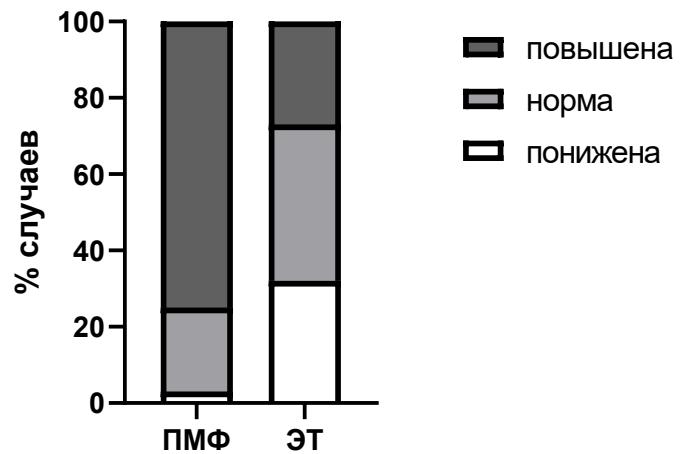


Рисунок 7 – Клеточность костного мозга у больных первичным миелофиброзом (ПМФ) и эссенциальной тромбоцитемией (ЭТ) с мутацией в гене *JAK2* или *CALR*

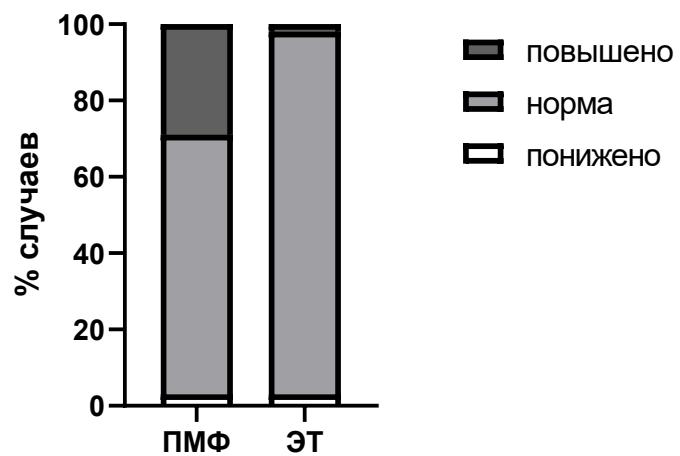


Рисунок 8 – Лейкоэритробластическое соотношение у больных первичным миелофиброзом (ПМФ) и эссенциальной тромбоцитемией (ЭТ)

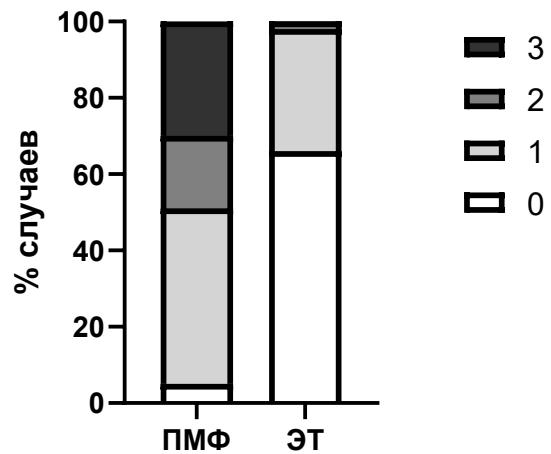


Рисунок 9 – Степень выраженности ретикулинового фиброза у больных первичным миелофиброзом (ПМФ) и эссенциальной тромбоцитемией (ЭТ)

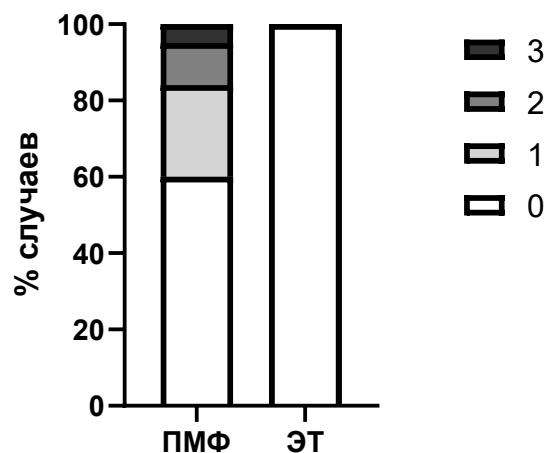


Рисунок 10 – Степень выраженности коллагенового фиброза у больных первичным миелофиброзом (ПМФ) и эссенциальной тромбоцитемией (ЭТ)

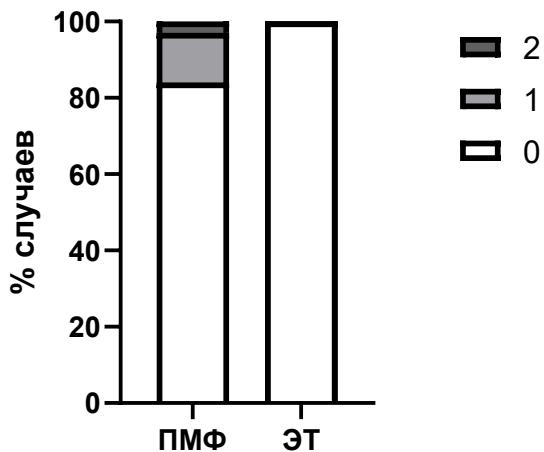


Рисунок 11 – Степень выраженности остеосклероза у больных первичным миелофиброзом (ПМФ) и эссенциальной тромбоцитемией (ЭТ)

Гистотопографические особенности мегакариоцитарного ростка у больных первичным миелофиброзом и эссенциальной тромбоцитемией

Сравнительный анализ гистотопографических особенностей строения мегакариоцитарного ростка позволил установить: у больных первичным миелофиброзом количество мегакариоцитов в 1 мм^2 миелоидной ткани варьировало от 13,9 до 151,2, среднее значение (СО) составило 48,9 (35,2) мегакариоцитов в 1 мм^2 , у пациентов с эссенциальной тромбоцитемией количество мегакариоцитов в 1 мм^2 миелоидной ткани варьировало от 11,1 до 80,0, среднее значение (СО) составило 34,6 (15,5) мегакариоцитов в 1 мм^2 (Рисунок 12).

Среднее количество мегакариоцитов в кластере в группе больных первичным миелофиброзом варьировало от 3,5 до 24,8, среднее значение (СО) составило 8,1 (4,4), в группе пациентов с эссенциальной тромбоцитемией среднее количество мегакариоцитов в кластере миелофиброзом варьировало от 3,6 до 18,3, среднее значение (СО) составило 6,5 (2,7) (Рисунок 13).

Сравнительный анализ среднего количества кластеров мегакариоцитов в 1 мм^2 миелоидной ткани, среднего расстояния мегакариоцитов до костных балок, доли перитрабекулярных мегакариоцитов не выявил статистически значимых различий в исследованных группах (данные представлены в Таблице 15).

Таблица 15 – Гистотопографические особенности мегакариоцитарного ростка в миелоидной ткани у больных первичным миелофиброзом и эссенциальной тромбоцитемией

Показатель	Первичный миелофиброз (N = 63) среднее (CO) минимум–максимум	Эссенциальная тромбоцитемия (N = 59) среднее (CO) минимум–максимум	p-значение
Количество мегакариоцитов в миелоидной ткани	848,9 (582,3) 57–2809	786,5 (512,6) 99–2855	0,5979
Мегакариоциты в 1 мм ²	58,9 (35,2) 13,9–151,2	34,6 (15,5) 11,1–80,0	< 0,0001
Кластеры мегакариоцитов в 1 мм ²	3,5 (1,5) 0,26–8,19	3,7 (1,2) 0,68–6,78	0,5196
Количество мегакариоцитов в кластере	8,1 (4,4) 3,5–24,8	6,5 (2,7) 3,6–18,3	0,0174
Среднее расстояние мегакариоцитов до костных балок (мкм)	233,6 (60,1) 128,7–434,3	234,9 (69,5) 122,4–451,9	0,6910
Доля (в %) перитрабекулярных мегакариоцитов	4,1 (3,7) 0,1–15,3	3,92 (1,8) 0,7–8,3	0,5682
Примечание – Для сравнения независимых выборок применен U-критерий Манна–Уитни.			

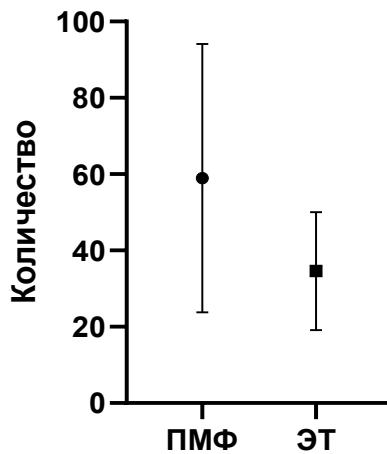


Рисунок 12 – Количество мегакариоцитов в 1 mm^2 у больных первичным миелофиброзом (ПМФ) и эссенциальной тромбоцитемией (ЭТ). Приведены средние значения и стандартные отклонения показателей

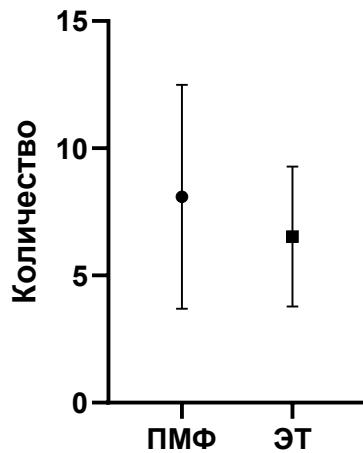


Рисунок 13 – Количество мегакариоцитов в кластере у больных первичным миелофиброзом (ПМФ) и эссенциальной тромбоцитемией (ЭТ). Приведены средние значения и стандартные отклонения показателей

Морфометрические особенности строения мегакариоцитов у больных первичным миелофиброзом и эссенциальной тромбоцитемией

Морфометрический анализ особенностей строения мегакариоцитов и их ядер у больных первичным миелофиброзом и эссенциальной тромбоцитемией продемонстрировал наличие статистически значимых различий периметра ядра

мегакариоцита и коэффициента кривизны ядра. У пациентов с эссенциальной тромбоцитемией ядра мегакариоцитов в миелоидной ткани характеризовались более извитыми и удлиненными контурами (Таблица 16, Рисунки 14, 15).

Таблица 16 – Морфометрические особенности строения мегакариоцитов у больных первичным миелофиброзом и эссенциальной тромбоцитемией

Показатель	Первичный миелофиброз (N = 63) среднее (CO) минимум–максимум	Эссенциальная тромбоцитемия (N = 59) среднее (CO) минимум–максимум	p-значение
Периметр ядра (мкм)	57,2 (10,4) 40,9–89,1	63,9 (11,5) 40,1–98,8	0,007
Площадь ядра (мкм ²)	139,8 (45,7) 81,2–195,5	140,7 (29,9) 81,2–64,3	0,5564
Периметр мегакариоцита (мкм)	95,2 (14,2) 67,6–139,2	97,7 (11,4) 69,6–127,1	0,2996
Площадь мегакариоцита (мкм ²)	570,6 (166,6) 270,9–1118,0	555,3 (82,2) 339,8–700,7	0,7723
Ядерно-цитоплазматический индекс	0,264 (0,030) 0,206–0,349	0,266 (0,026) 0,204–0,346	0,4457
Коэффициент кривизны ядра	0,53 (0,08) 0,33–0,74	0,48 (0,07) 0,33–0,66	0,0013
Примечание – Для сравнения независимых выборок применен U-критерий Манна–Уитни.			

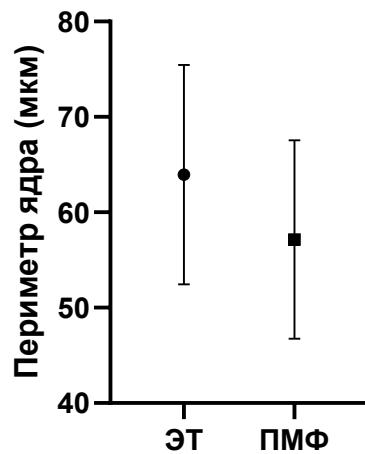


Рисунок 14 – Средний периметр ядра мегакариоцита (мкм) у больных первичным миелофиброзом (ПМФ) и эссенциальной тромбоцитемией (ЭТ). Приведены средние значения и стандартные отклонения показателей

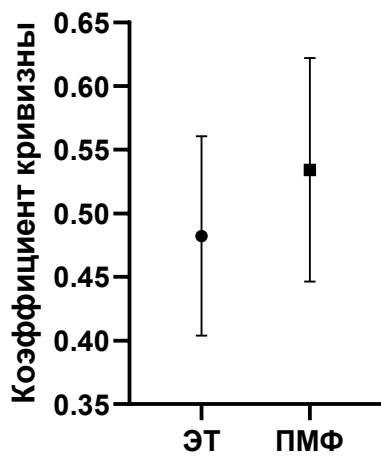


Рисунок 15 – Средний коэффициент кривизны ядра мегакариоцита у больных первичным миелофиброзом (ПМФ) и эссенциальной тромбоцитемией (ЭТ). Приведены средние значения и стандартные отклонения показателей

Морфометрический анализ CD42b-позитивных мегакариоцитов у больных первичным миелофиброзом и эссенциальной тромбоцитемией

Выполненное в каждом гистологическом препарате ручное морфометрическое исследование 10 наиболее информативных полей зрения суммарной площадью 1 мм^2 продемонстрировало, что в группе больных

первичным миелофиброзом среднее количество маркированных CD42b мегакариоцитов в 1 мм^2 варьировало от 115 до 377, среднее значение (CO) составило 211 (65) мегакариоцитов. В группе больных эссенциальной тромбоцитемией среднее количество CD42b-позитивных мегакариоцитов в поле зрения было ниже: оно варьировало от 80 до 307, среднее значение (CO) составило 149 (50) мегакариоцитов в 1 мм^2 (Рисунок 16).

Средняя площадь и периметр мегакариоцитов в костном мозге больных первичным миелофиброзом варьировали от 390,5 до 843,0 мкм^2 и от 74,7 до 114,7 мкм , соответственно. Средние значения (CO) составили 607,7 (109,7) мкм^2 и 96,6 (9,8) мкм , соответственно. У больных эссенциальной тромбоцитемией средняя площадь и периметр мегакариоцитов в костном мозге были меньше и составили 547,1 (89,9) мкм^2 и 89,8 (7,7) мкм при вариабельности средних значений 374,0–749,7 мкм^2 и 32,0–105,1 мкм , соответственно (Рисунки 17, 18, данные приведены в Таблице 17).

Таблица 17 – Количественные и структурные характеристики CD42b-позитивных мегакариоцитов при первичном миелофиброзе и эссенциальной тромбоцитемии (результаты морфометрического анализа, проведенного вручную)

Показатель	Первичный миелофиброз (N = 53) среднее (CO) минимум–максимум	Эссенциальная тромбоцитемия (N = 55) среднее (CO) минимум–максимум	p-значение
Мегакариоциты в 1 мм^2	211,6 (65,5) 115–377	149,7 (50,8) 80–307	< 0,0001
Площадь мегакариоцита (мкм^2)	607,7 (109,7) 390,5–843,0	547,1 (89,9) 374,0–749,7	0,0123

Продолжение таблицы 17

Показатель	Первичный миелофиброз (N = 53) среднее (CO) минимум–максимум	Эссенциальная тромбоцитемия (N = 55) среднее (CO) минимум–максимум	p-значение
Периметр мегакариоцита (мкм)	96,6 (9,8) 74,7–114,7	89,8 (7,7) 73,0–105,1	0,0016

Примечание – Для сравнения независимых выборок применен U-критерий Манна–Уитни.

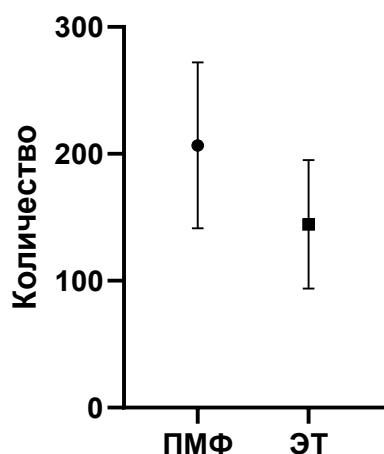


Рисунок 16 – Количество мегакариоцитов в 1 мм² у больных первичным миелофиброзом (ПМФ) и эссенциальной тромбоцитемией (ЭТ). Приведены средние значения и стандартные отклонения показателей

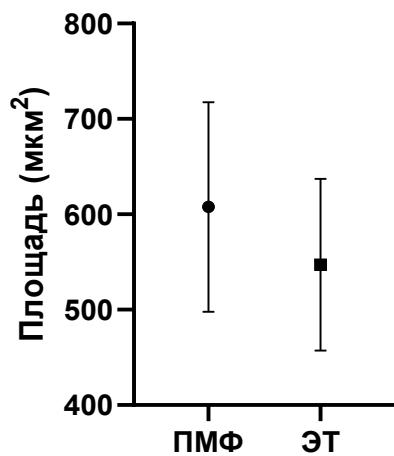


Рисунок 17 – Площадь мегакариоцита (мкм^2) у больных первичным миелофиброзом (ПМФ) и эссенциальной тромбоцитемией (ЭТ). Приведены средние значения и стандартные отклонения показателей

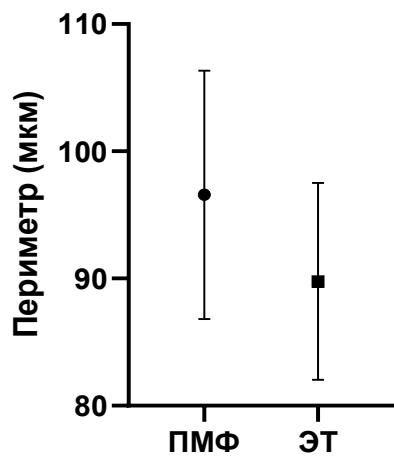


Рисунок 18 – Периметр мегакариоцита (мкм) у больных первичным миелофиброзом (ПМФ) и эссенциальной тромбоцитемией (ЭТ). Приведены средние значения и стандартные отклонения показателей

Для выявления связи между характеристиками мегакариоцитарного ростка, маркированного антителами к CD42b, и диагнозом был использован метод логистической регрессии, в котором зависимая переменная принимает значение 0 («эссенциальная тромбоцитемия») или 1 («первичный миелофиброз»). В Таблице 18 перечислены переменные, включенные в модель логистической регрессии.

Таблица 18 – Переменные, включенные в модель логистической регрессии

Переменная	β	Стандарт- ная ошибка	Статистика критерия Вальда	p- значение	Отношение шансов	95% ДИ
Мегакариоци- ты в 1 мм^2	0,2189	0,0507	18,634	< 0,0001	1,245	1,137– 1,389
Площадь мегакариоцита (мкм^2)	0,1127	0,0517	0,018	0,8935	1,119	1,018– 1,250
Периметр мегакариоцита (мкм)	-0,0006	0,0004	4,733	0,0296	0,999	0,990– 1,008

Значимость модели логистической регрессии с включением отобранных параметров равна $\chi^2 = 46,767$, p-значение = 0,001, Nagelkerke $R^2 = 46,9\%$.

Как видно из Таблицы 19, точность модели логистической регрессии с включенными независимыми переменными составляет 76,85%.

Таблица 19 – Процент корректных предсказаний диагноза на основе переменных, включенных в модель логистической регрессии

Диагноз	Предсказанный диагноз		Процент корректных предсказаний
	эссенциальная тромбоцитемия	первичный миелофиброз	
Эссенциальная тромбоцитемия	43	12	78,18%
Первичный миелофиброз	13	40	75,47%
Общий процент	76,85 %		

Общая оценка согласия модели и реальных данных оценивалась с использованием теста согласия Хосмера–Лемешова (Хи-квадрат = 2,164, число степеней свободы = 8, p-значение = 0,9755).

Для демонстрации зависимости количества верно классифицированных диагнозов одного заболевания от количества неверно классифицированных диагнозов другого заболевания был проведен ROC-анализ. Площадь под кривой ошибок (операционная характеристика приемника) = 0,84 (95% ДИ 0,7782–0,9199) свидетельствует об очень хорошем качестве модели согласно экспертной шкале AUC (Рисунок 19, Таблица 20) [5; 8; 76].

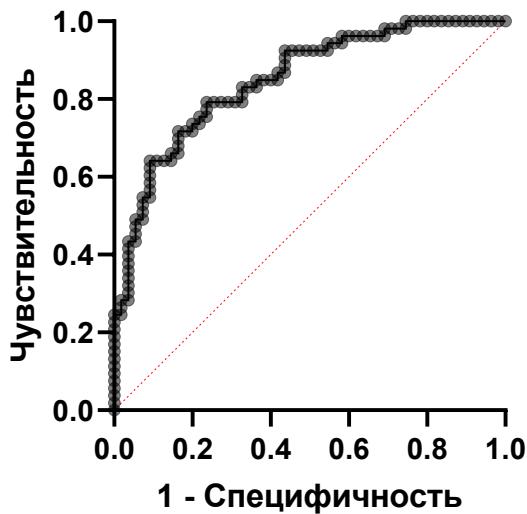


Рисунок 19 – Кривая ошибок (операционная характеристика приемника) для оценки эффективности модели логистической регрессии

Таблица 20 – Характеристики кривой ошибок модели логистической регрессии

Площадь под кривой ошибок	0,8491
Стандартная ошибка	0,03617
95% доверительный интервал (ДИ)	0,7782–0,9199
p-значение	< 0,0001

Вычисление оптимального порогового значения количества мегакариоцитов в 1 мм^2 , а также средней площади и периметра мегакариоцитов проводили с помощью следующей формулы: $[(1 - \text{чувствительность}) + (1 - \text{специфичность})]$. Чувствительность представляет собой долю случаев с положительным результатом теста в группе с исследуемым заболеванием. Специфичность – доля случаев с

отрицательным результатом теста в группе без исследуемого заболевания. Графически это выглядит как сочетание чувствительности и специфичности, наиболее близко расположенное к точке (0; 1) кривой ошибок каждого исследованного показателя на диаграмме [141]. В Таблице 21 представлены оптимальные пороговые значения показателей, позволяющие разграничить первичный миелофиброз и эссенциальную тромбоцитемию.

Таблица 21 – Дифференциальные пороговые значения характеристик мегакариоцитарного ростка в костном мозге у больных первичным миелофиброзом и эссенциальной тромбоцитемией

Показатель	Первичный миелофиброз (N = 53)	Эссенциальная тромбоцитемия (N = 55)	p-значение
Мегакариоциты в 1 мм ²	> 170 мегакариоцитов в 1 мм ²	< 170 мегакариоцитов в 1 мм ²	< 0,0001
Площадь мегакариоцита (мкм ²)	> 566 мкм ²	< 566 мкм ²	0,0098
Периметр мегакариоцита (мкм)	> 92 мкм	< 92 мкм	0,0017

Превышение пороговых значений количества мегакариоцитов в 1 мм², а также их размеров достоверно чаще наблюдали в гистологических препаратах костного мозга больных первичным миелофиброзом. Пороговые значения количества мегакариоцитов в одном поле зрения при увеличении × 400 приведены в Таблице 22.

Таблица 22 – Пороговые значения количества CD42b-позитивных мегакариоцитов в одном поле зрения при увеличении $\times 400$ у больных первичным миелофиброзом и эссенциальной тромбоцитемией

Диаметр поля зрения (мм)	Площадь (мм ²)	N мегакариоцитов в одном поле зрения $\times 400$	
		Эссенциальная тромбоцитемия	Первичный миелофиброз
0,40	0,126	< 21	> 21
0,45	0,159	< 27	> 27
0,50	0,196	< 33	> 33
0,55	0,237	< 40	> 40
0,60	0,283	< 48	> 48
0,65	0,332	< 56	> 56

Использование программного обеспечения *ilastik* позволило ускорить морфометрический анализ мегакариоцитарного ростка, маркированного антителами к CD42b. При использовании компьютера с операционной системой Windows 10, процессором Intel(R) Core(TM) i7-8750H CPU @ 2.20GHz 2.21 GHz, оперативной памятью 8,00 ГБ и видеокартой NVIDIA GeForce GTX 1050 средняя скорость анализа одного изображения площадью 0,1 мм² составляло около 30 секунд (без точного подсчета), что значительно превышает скорость ручного морфометрического анализа – в среднем 4–6 минут на обработку одной микрофотографии (без точного подсчета).

Оценку точности и полноты алгоритма выполняли на 90 микрофотографиях после предварительного обучения классификатора на 10 изображениях. Характеристики работы алгоритма *ilastik* на основе анализа 90 микрофотографий площадью 0,1 мм² каждое приведены в Таблице 23.

Таблица 23 – Расчетные значения точности, полноты и F-меры алгоритма ilastik

Характеристики алгоритма	Значение
Точность (%)	79,55
Полнота (%)	77,34
F-мера (%)	78,42

3.2. Сравнительный анализ случаев первичного миелофиброза и эссенциальной тромбоцитемии с мутацией в гене *JAK2* или *CALR*

Клинико-лабораторная характеристика пациентов с первичным миелофиброзом и эссенциальной тромбоцитемией с мутацией в гене *JAK2* или *CALR*

У 49 больных первичным миелофиброзом выявлена мутация в гене *JAK2*, у 14 человек подтверждено наличие мутации в гене *CALR*. Возраст больных первичным миелофиброзом с мутацией в гене *JAK2* на момент взятия биопсии костного мозга варьировал от 28 до 76 лет, среднее значение (СО) составило 58 лет (12,4 года). Возраст больных первичным миелофиброзом с мутацией в гене *CALR* на момент взятия биопсии костного мозга варьировал от 36 до 71 года, среднее значение (СО) составило 53,4 года (11,9 года). Различия статистически не значимы (р-значение = 0,17).

В группе больных эссенциальной тромбоцитемией мутация в гене *JAK2* обнаружена у 30 пациентов, у 29 больных выявлена мутация в гене *CALR*. Возраст больных эссенциальной тромбоцитемией с мутацией в гене *JAK2* на момент взятия биопсии костного мозга варьировал от 24 до 78 лет, среднее значение (СО) составило 59,6 года (14,2 года). Возраст больных эссенциальной тромбоцитемией с мутацией в гене *CALR* на момент взятия биопсии костного мозга варьировал от 19 до 79 лет, среднее значение (СО) составило 47,2 года (16,7 года). Различия по средним возрастам статистически значимы (р-значение = 0,005).

На момент взятия биопсии костного мозга у больных первичным миелофиброзом с мутацией в гене *JAK2* или *CALR* спленомегалия была обнаружена в 16 из 49 и 6 из 14 случаев, соответственно. У больных эссенциальной тромбоцитемией с мутацией в гене *JAK2* или *CALR* спленомегалия встречалась реже: в 4 из 30 случаев и 1 из 29 случаев, соответственно. Гепатомегалия была подтверждена у 9 из 49 больных первичным миелофиброзом с мутацией в гене *JAK2* и у 4 из 14 больных первичным миелофиброзом с мутацией в гене *CALR*. В группе больных эссенциальной тромбоцитемией с мутацией в гене *JAK2* гепатомегалия обнаружена в 5 случаях из 30. Во всех 29 случаях эссенциальной тромбоцитемии с мутацией в гене *CALR* гепатомегалия отсутствовала.

У больных первичным миелофиброзом и эссенциальной тромбоцитемией с мутацией в гене *JAK2* или *CALR* в общем анализе крови выявлены статистически значимые различия количества тромбоцитов, лейкоцитов и эритроцитов, концентрации гемоглобина (Рисунки 20–23, данные представлены в Таблицах 24, 25).

Таблица 24 – Лабораторная характеристика пациентов с первичным миелофиброзом (ПМФ) и эссенциальной тромбоцитемией (ЭТ) с мутацией в гене *JAK2* или *CALR*

Показатель	ПМФ <i>JAK2</i> ⁺ (N = 49) среднее (CO) минимум– максимум	ПМФ <i>CALR</i> ⁺ (N = 14) среднее (CO) минимум– максимум	ЭТ <i>JAK2</i> ⁺ (N = 30) среднее (CO) минимум– максимум	ЭТ <i>CALR</i> ⁺ (N = 29) среднее (CO) минимум– максимум	p- значение
Тромбоциты (10 ⁹ /л)	680,8 (391,0) 51–2058	888,6 (611,2) 45–2237	819,6 (370,6) 154–2000	1139,3 (529,1) 349–2521	0,0010
Лейкоциты (10 ⁹ /л)	15,50 (10,64) 5,45–59,18	9,00 (4,38) 1,40–17,40	11,63 (4,66) 6,50–23,00	8,17 (1,88) 4,00–12,87	< 0,0001

Продолжение таблицы 24

Показатель	ПМФ <i>JAK2</i> ⁺ (N = 49) среднее (CO) минимум– максимум	ПМФ <i>CALR</i> ⁺ (N = 14) среднее (CO) минимум– максимум	ЭТ <i>JAK2</i> ⁺ (N = 30) среднее (CO) минимум– максимум	ЭТ <i>CALR</i> ⁺ (N = 29) среднее (CO) минимум– максимум	p- значение
Эритроциты (10 ¹² /л)	5,49 (1,43) 2,41–8,26	3,98 (1,10) 1,99–5,60	5,53 (1,13) 2,70–7,42	4,47 (0,42) 3,70–5,30	< 0,0001
Гемоглобин (г/л)	143,6 (34,5) 65–205	116,1 (28,4) 60–148	145,4 (28,6) 72–197	131,7 (15,4) 106–164	0,0048

Примечание – Для сравнения независимых выборок применен критерий Краскела–Уоллиса.

Таблица 25 – Клиническая характеристика пациентов с первичным миелофиброзом (ПМФ) и эссенциальной тромбоцитемией (ЭТ) с мутацией в гене *JAK2* или *CALR*

Показатель	ПМФ <i>JAK2</i> ⁺ (N = 49) количество (% доля)	ПМФ <i>CALR</i> ⁺ (N = 14) количество (% доля)	ЭТ <i>JAK2</i> ⁺ (N = 30) количество (% доля)	ЭТ <i>CALR</i> ⁺ (N = 29) количество (% доля)	p-значение
Сplenомегалия	16/49 (32,6%)	6/14 (42,9%)	4/30 (13,3%)	1/29 (3,4%)	0,0031
Гепатомегалия	9/49 (18,4%)	4/14 (28,6%)	5/30 (16,7%)	0/29 (0%)	0,0517
Органомегалия	4/49 (8,2%)	2/14 (14,3%)	1/30 (3,3%)	0/29 (0%)	0,2030

Примечание – Сравнение категориальных переменных выполнено с использованием двустороннего точного критерия Фишера.

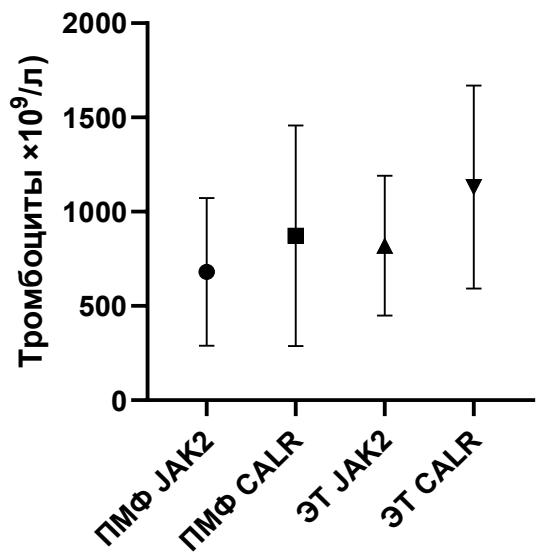


Рисунок 20 – Количество тромбоцитов в общем анализе крови у больных первичным миелофиброзом (ПМФ) и эссенциальной тромбоцитемией (ЭТ) с мутацией в гене *JAK2* или *CALR*. Приведены средние значения и стандартные отклонения показателей

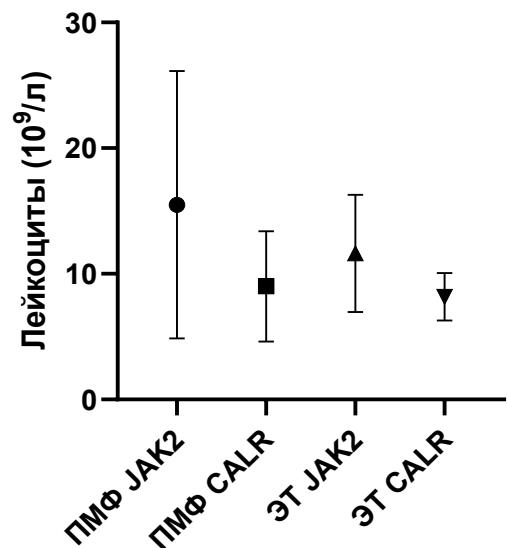


Рисунок 21 – Количество лейкоцитов в общем анализе крови у больных первичным миелофиброзом (ПМФ) и эссенциальной тромбоцитемией (ЭТ) с мутацией в гене *JAK2* или *CALR*. Приведены средние значения и стандартные отклонения показателей

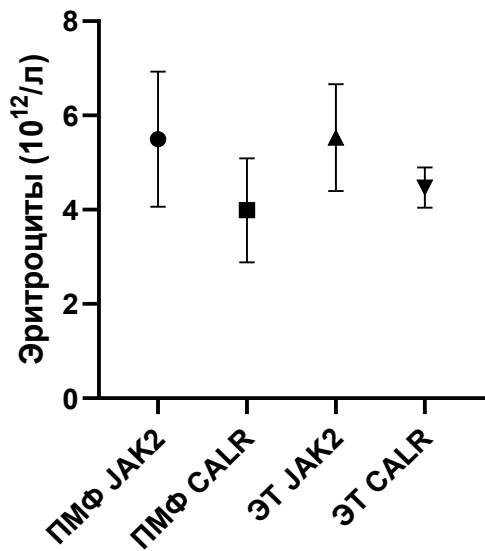


Рисунок 22 – Количество эритроцитов в общем анализе крови у больных первичным миелофиброзом (ПМФ) и эссенциальной тромбоцитемией (ЭТ) с мутацией в гене *JAK2* или *CALR*. Приведены средние значения и стандартные отклонения показателей

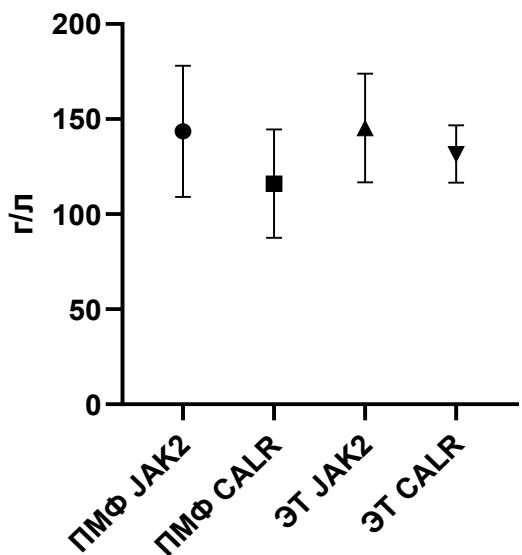


Рисунок 23 – Концентрация гемоглобина в общем анализе крови у больных первичным миелофиброзом (ПМФ) и эссенциальной тромбоцитемией (ЭТ) с мутацией в гене *JAK2* или *CALR*. Приведены средние значения и стандартные отклонения показателей

Анализ Международной прогностической шкалы (IPSET) продемонстрировал, что распределение больных эссенциальной тромбоцитемией

по группам риска зависит от мутационного статуса (Рисунок 24, данные приведены в Таблице 26).

Таблица 26 – Распределение больных эссенциальной тромбоцитемией с мутацией в гене *JAK2* или *CALR* согласно Международной прогностической шкале (IPSET)

Показатель		Эссенциальная тромбоцитемия <i>JAK2</i> ⁺ (N = 30) количество (процентная доля)	Эссенциальная тромбоцитемия <i>CALR</i> ⁺ (N = 29) количество (процентная доля)	p-значение
IPSET	низкий	5/30 (16,7%)	21/29 (72,4%)	< 0,0001
	промежуточный	18/30 (60,0%)	8/29 (27,6%)	
	высокий	7/30 (23,3%)	0/29 (0%)	

Примечание – Сравнение категориальных переменных выполнено с использованием двустороннего точного критерия Фишера.

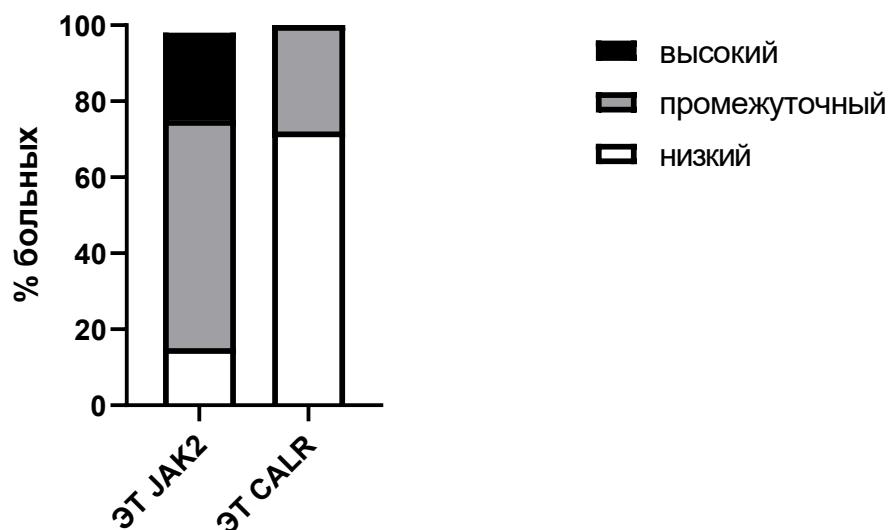


Рисунок 24 – Распределение больных эссенциальной тромбоцитемией с мутацией в гене *JAK2* или *CALR* согласно Международной прогностической шкале (IPSET)

**Особенности гистологического строения костного мозга
у больных первичным миелофиброзом и эссенциальной тромбоцитемией
с мутацией в гене *JAK2* или *CALR***

Оценка гистологического строения трепанобиоптатов костного мозга пациентов с первичным миелофиброзом и эссенциальной тромбоцитемией с мутацией в гене *JAK2* или *CALR* позволила определить: в двух группах больных первичным миелофиброзом в большинстве случаев наблюдали повышенную относительно возраста клеточность костного мозга, в то время как в двух группах больных эссенциальной тромбоцитемией чаще встречали нормальные или пониженные относительно возрастной нормы показатели клеточности костного мозга (Рисунок 25). У больных первичным миелофиброзом с мутацией в гене *JAK2* клеточность костного мозга варьировала от 10 до 100%, среднее значение (СО) составило 82,5% (19,0%). У пациентов с первичным миелофиброзом с мутацией в гене *CALR* клеточность костного мозга варьировала от 60 до 100%, среднее значение (СО) составило 82,0% (17,0%). В группе больных эссенциальной тромбоцитемией с мутацией в гене *JAK2* клеточность костного мозга варьировала от 30 до 80%, среднее значение (СО) составило 53,5% (14%). У пациентов с *CALR*-позитивной эссенциальной тромбоцитемией клеточность костного мозга была варьирована от 10 до 80%, среднее значение (СО) составило 44% (16%). Различия статистически значимы (р-значение < 0,0001).

В группе больных эссенциальной тромбоцитемией с мутацией в гене *JAK2* в 29 из 30 биопсий костного мозга находили нормальное соотношение гранулоцитарного и эритроидного ростков, в одном случае лейко-эритробластическое соотношение было понижено (<1,5:1). В группе больных эссенциальной тромбоцитемией с мутацией в гене *CALR* в 27/29 случаев соотношение гранулоцитарного и эритроидного ростков соответствовало норме, в одном случае лейкоэритробластическое соотношение было ниже нормы (<1,5:1), в одном случае выше нормы (>4:1). У больных первичным миелофиброзом с аналогичными драйверными мутациями наблюдали увеличение пропорции

больных с увеличенным лейкоэритробластическим соотношением – 12 из 49 случаев первичного миелофиброза с мутацией в гене *JAK2* и 6 из 14 случаев первичного миелофиброза с мутацией в гене *CALR* (Рисунок 26).

Выявлены статистически значимые различия выраженности ретикулинового и коллагенового фиброза у больных первичным миелофиброзом и эссенциальной тромбоцитемией с мутацией в гене *JAK2* или *CALR* (Рисунки 27, 28, данные представлены в Таблице 27).

Таблица 27 – Особенности гистологические строения костного мозга у больных первичным миелофиброзом (ПМФ) и эссенциальной тромбоцитемией (ЭТ) с мутацией в гене *JAK2* или *CALR*

Показатель		ПМФ <i>JAK2</i> ⁺ (N = 49) количество (% доля)	ПМФ <i>CALR</i> ⁺ (N = 14) количество (% доля)	ЭТ <i>JAK2</i> ⁺ (N = 30) количество (% доля)	ЭТ <i>CALR</i> ⁺ (N = 29) количество (% доля)	p- значение
Клеточность костного мозга	↓	2/49 (4,1%)	0/14 (0%)	9/30 (30,0%)	10/29 (34,5%)	< 0,001
	N	11/49 (22,4%)	3/14 (21,4%)	14/30 (46,7%)	10/29 (34,5%)	
	↑	36/49 (73,5%)	11/14 (78,6%)	7/30 (23,3%)	9/29 (31,0%)	
Лейкоэритро- бластическое соотношение	↓	1/49 (2,0%)	1/14 (7,1%)	1/30 (3,3%)	1/29 (3,4%)	0,0019
	N	36/49 (73,5%)	7/14 (50,0%)	29/30 (96,7%)	27/29 (93,1%)	
	↑	12/49 (24,5%)	6/14 (42,8%)	0/30 (0%)	1/29 (3,4%)	

Продолжение таблицы 27

Показатель		ПМФ <i>JAK2</i> ⁺ (N = 49) количество (% доля)	ПМФ <i>CALR</i> ⁺ (N = 14) количество (% доля)	ЭТ <i>JAK2</i> ⁺ (N = 30) количество (% доля)	ЭТ <i>CALR</i> ⁺ (N = 29) количество (% доля)	p- значение
Ретикулиновый фиброз	0	3/49 (6,1%)	0/14 (0%)	17/30 (56,7%)	22/29 (75,9%)	< 0,001
	1	23/49 (46,9%)	6/14 (42,8%)	12/30 (40,0%)	7/29 (24,1%)	
	2	9/49 (18,4%)	3/14 (21,4%)	1/30 (3,3%)	0/29 (0%)	
	3	14/49 (28,6%)	5/14 (35,7%)	0/30 (0%)	0/29 (0%)	
Коллагеновый фиброз	0	29/49 (59,2%)	9/14 (64,3%)	30/30 (100%)	29/29 (100%)	0,0002
	1	11/49 (22,4%)	4/14 (28,6%)	0/30 (0%)	0/29 (0%)	
	2	6/49 (12,2%)	1/14 (7,1%)	0/30 (0%)	0/29 (0%)	
	3	3/49 (6,1%)	0/14 (0%)	0/30 (0%)	0/29 (0%)	
Остеосклероз	0	41/49 (83,7%)	12/14 (85,7%)	30/30 (100%)	29/29 (100%)	0,0773
	1	6/49 (12,2%)	2/14 (14,3%)	0/30 (0%)	0/29 (0%)	
	2	2/49 (4,1%)	0/14 (0%)	0/30 (0%)	0/29 (0%)	

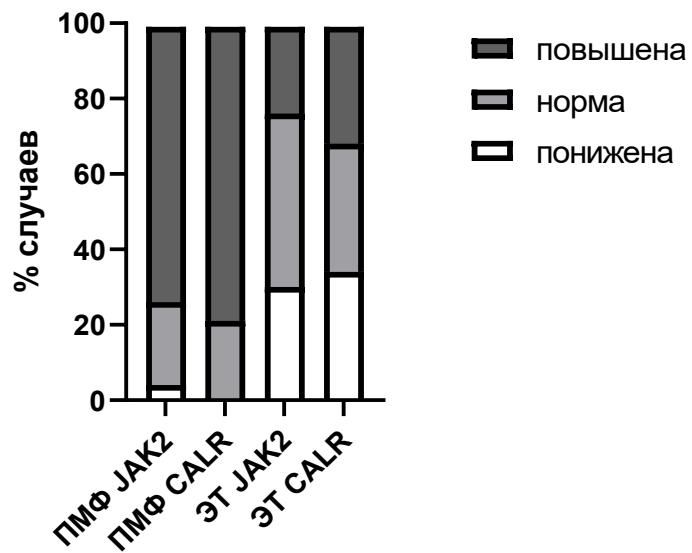


Рисунок 25 – Клеточность костного мозга у больных первичным миелофиброзом (ПМФ) и эссенциальной тромбоцитемией (ЭТ) с мутацией в гене *JAK2* или *CALR*

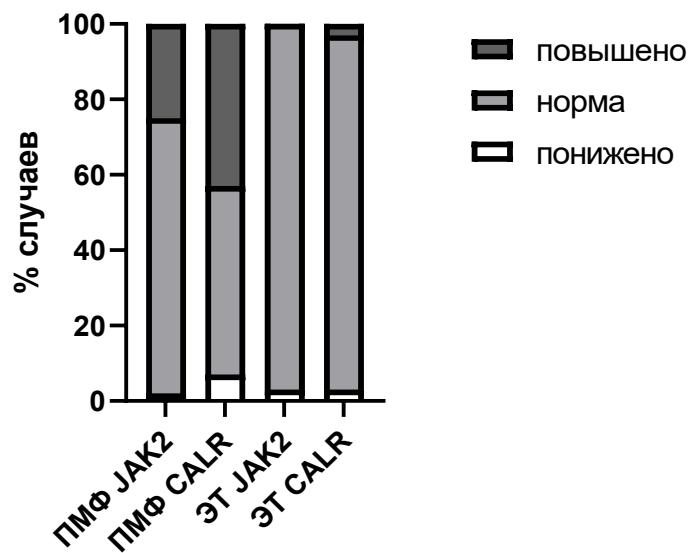


Рисунок 26 – Лейкоэритробластическое соотношение у больных первичным миелофиброзом (ПМФ) и эссенциальной тромбоцитемией (ЭТ) с мутацией в гене *JAK2* или *CALR*

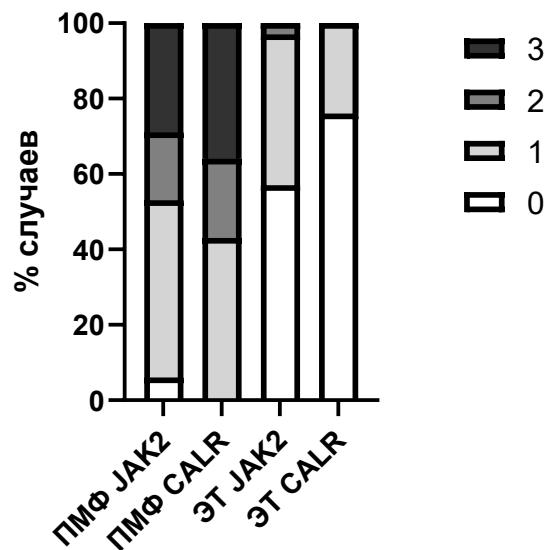


Рисунок 27 – Степень выраженности ретикулинового фиброза у больных первичным миелофиброзом (ПМФ) и эссенциальной тромбоцитемией (ЭТ) с мутацией в гене *JAK2* или *CALR*

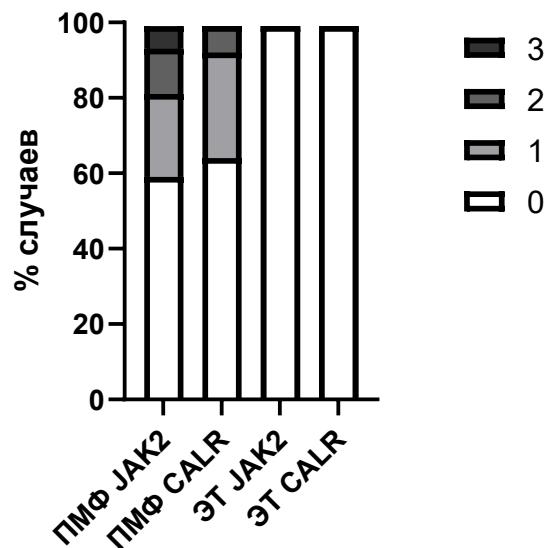


Рисунок 28 – Степень выраженности коллагенового фиброза у больных первичным миелофиброзом (ПМФ) и эссенциальной тромбоцитемией (ЭТ) с мутацией в гене *JAK2* или *CALR*

**Гистотопографические особенности мегакариоцитарного ростка
у больных первичным миелофиброзом и эссенциальной тромбоцитемией
с мутацией в гене *JAK2* или *CALR***

Морфометрический анализ мегакариоцитарного ростка в костном мозге продемонстрировал, что в группе больных первичным миелофиброзом с мутацией в гене *JAK2* или *CALR* встречается большее количество мегакариоцитов в 1 мм^2 миелоидной ткани, чем в группе больных эссенциальной тромбоцитемией с аналогичным мутационным статусом. В четырех сравниваемых группах обнаружены статистически значимые различия количества кластеров мегакариоцитов в 1 мм^2 миелоидной ткани, а также количества мегакариоцитов в одном кластере. У больных первичным миелофиброзом и эссенциальной тромбоцитемией с мутацией в гене *CALR* обнаружена большая доля перитрабекулярно расположенных мегакариоцитов, чем у *JAK2*-позитивных пациентов (Рисунки 29–32, данные представлены в Таблице 28).

Таблица 28 – Гистотопографические особенности мегакариоцитарного ростка у больных первичным миелофиброзом (ПМФ) и эссенциальной тромбоцитемией (ЭТ) с мутацией в гене *JAK2* или *CALR*

Параметр	ПМФ <i>JAK2⁺</i> (N = 49) среднее (CO) минимум– максимум	ПМФ <i>CALR⁺</i> (N = 14) среднее (CO) минимум– максимум	ЭТ <i>JAK2⁺</i> (N = 30) среднее (CO) минимум– максимум	ЭТ <i>CALR⁺</i> (N = 29) среднее (CO) минимум– максимум	p-значение
Мегакариоциты в 1 мм^2	58,2 (36,8) 13,9–165,1	61,4 (30,3) 23,5–146,4	39,9 (19,2) 14,4–104,0	50,3 (20,0) 16,4–102,8	0,0292

Продолжение таблицы 28

Параметр	ПМФ <i>JAK2</i> ⁺ (N = 49) среднее (CO) минимум– максимум	ПМФ <i>CALR</i> ⁺ (N = 14) среднее (CO) минимум– максимум	ЭТ <i>JAK2</i> ⁺ (N = 30) среднее (CO) минимум– максимум	ЭТ <i>CALR</i> ⁺ (N = 29) среднее (CO) минимум– максимум	p-значение
Кластеры мегакариоцитов в 1 мм ²	3,3 (1,4) 0,3–6,1	4,1 (1,8) 1,5–8,9	3,3 (1,3) 0,68–6,8	4,1 (1,1) 1,7–5,7	0,0275
Количество мегакариоцитов в кластере	8,2 (4,9) 3,5–24,8	7,7 (1,4) 5,7–10,3	5,9 (2,4) 3,6–16,3	7,2 (2,9) 4,0–18,3	0,0023
Среднее расстояние мегакариоцитов до костных балок (мкм)	228,1 (52,1) 128,7–365,2	254,8 (85,4) 150,4–434,3	243,1 (77,7) 122,4–451,9	210,8 (26,9) 175,0–253,7	0,6391
Доля (в %) перитрабекуляр- ных мегакарио- цитов	3,7 (3,9) 0,01–15,3	5,6 (2,2) 2,2–7,1	3,8 (1,9) 0,7–8,3	4,49 (1,4) 1,8–6,2	0,0443
Примечание – Для сравнения независимых выборок применен критерий Краскела–Уоллиса.					

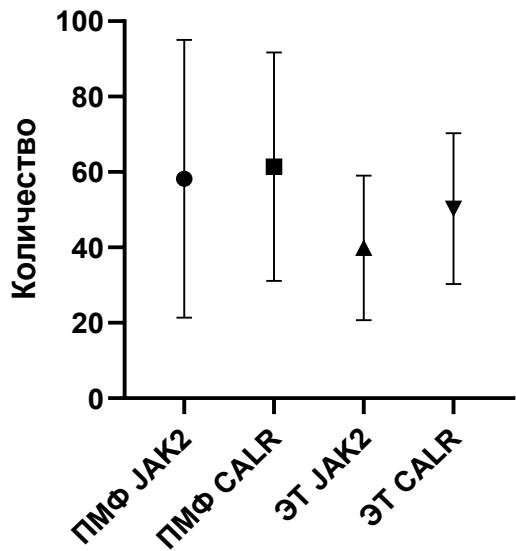


Рисунок 29 – Количество мегакариоцитов в 1 мм^2 у больных первичным миелофиброзом (ПМФ) и эссенциальной тромбоцитемией (ЭТ) с мутацией в гене *JAK2* или *CALR*.
Приведены средние значения и стандартные отклонения показателей

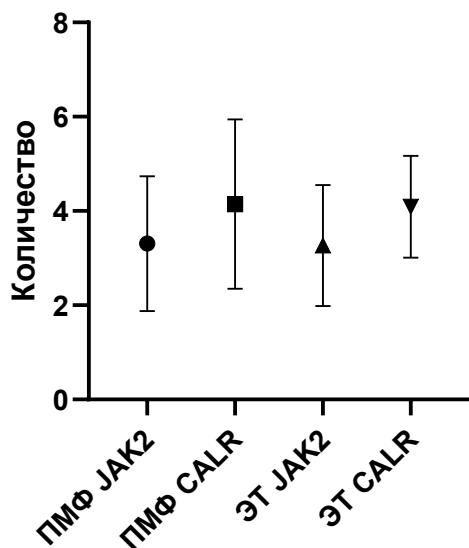


Рисунок 30 – Количество кластеров мегакариоцитов в 1 мм^2 у больных первичным миелофиброзом (ПМФ) и эссенциальной тромбоцитемией (ЭТ) с мутацией в гене *JAK2* или *CALR*. Приведены средние значения и стандартные отклонения показателей

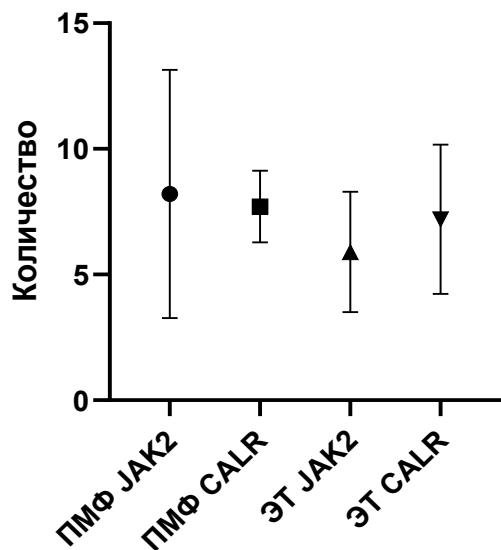


Рисунок 31 – Количество мегакариоцитов в кластере у больных первичным миелофиброзом (ПМФ) и эссенциальной тромбоцитемией (ЭТ) с мутацией в гене *JAK2* или *CALR*. Приведены средние значения и стандартные отклонения показателей

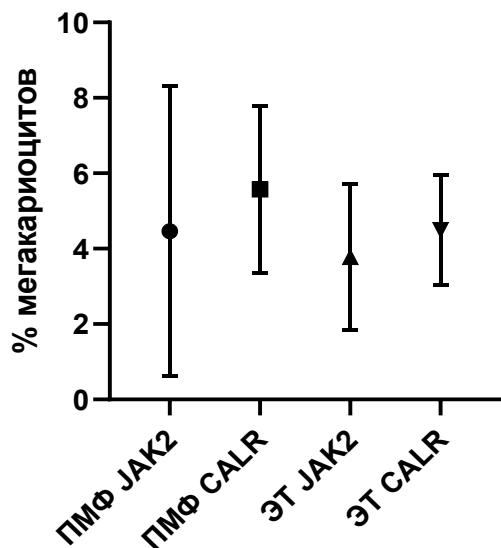


Рисунок 32 – Доля (в %) перитрабекулярных мегакариоцитов у больных первичным миелофиброзом (ПМФ) и эссенциальной тромбоцитемией (ЭТ) с мутацией в гене *JAK2* или *CALR*. Приведены средние значения и стандартные отклонения показателей

**Морфометрические особенности строения мегакариоцитов
у больных первичным миелофиброзом и эссенциальной тромбоцитемией
с мутацией в гене *JAK2* или *CALR***

Морфометрический анализ особенностей строения мегакариоцитов и их ядер у больных первичным миелофиброзом и эссенциальной тромбоцитемией продемонстрировал наличие статистически значимых различий периметра ядра мегакариоцитов и коэффициента кривизны ядра при отсутствии статистически значимых различий остальных параметров (Рисунки 33, 34, данные приведены в Таблице 29).

Таблица 29 – Морфометрические особенности строения мегакариоцитов у больных первичным миелофиброзом (ПМФ) и эссенциальной тромбоцитемией (ЭТ) с мутацией в гене *JAK2* или *CALR*

Показатель	ПМФ <i>JAK2</i> ⁺ (N = 49) среднее (СО) минимум– максимум	ПМФ <i>CALR</i> ⁺ (N = 14) Среднее (СО) минимум– максимум	ЭТ <i>JAK2</i> ⁺ (N = 30) среднее (СО) минимум– максимум	ЭТ <i>CALR</i> ⁺ (N = 29) среднее (СО) минимум– максимум	p- значение
Периметр ядра (мкм)	56,1 (11,1) 40,9–89,1	60,1 (6,2) 48,2–72,1	61,2 (10,1) 40,1–86,1	66,8 (12,3) 44,57–98,88	0,0005
Площадь ядра (мкм ²)	134,8 (47,1) 64,3–277,1	157,1 (37,2) 98,4–206,3	135,8 (29,0) 81,2–185,5	146,2 (30,7) 86,5–195,5	0,1053
Периметр мегакариоцита (мкм)	94,9 (15,5) 67,6–139,2	95,9 (8,9) 77,9–110,9	95,3 (11,7) 69,6–117,5	100,2 (10,8) 80,9–127,1	0,3783

Продолжение таблицы 29

Показатель	ПМФ <i>JAK2</i> ⁺ (N = 49) среднее (CO) минимум– максимум	ПМФ <i>CALR</i> ⁺ (N = 14) среднее (CO) минимум– максимум	ЭТ <i>JAK2</i> ⁺ (N = 30) среднее (CO) минимум– максимум	ЭТ <i>CALR</i> ⁺ (N = 29) среднее (CO) минимум– максимум	p- значение
Площадь мегакариоцита (мкм^2)	560,5 (177,7) 270,9–1118	605,5 (119,7) 398,6–812,3	541,3 (89,1) 339,8–678,3	571,3 (72,2) 440,9–700,7	0,3861
Ядерно- цитоплазмати- ческий индекс	0,259 (0,029) 0,206–0,349	0,278 (0,031) 0,222–0,342	0,262 (0,023) 0,223–0,307	0,269 (0,029) 0,204–0,346	0,0738
Коэффициент кривизны ядра	0,53 (0,08) 0,38–0,73	0,53 (0,10) 0,33–0,74	0,49 (0,08) 0,38–0,67	0,46 (0,07) 0,34–0,57	0,0055

Примечание – Для сравнения независимых выборок применен критерий Краскела–Уоллиса.

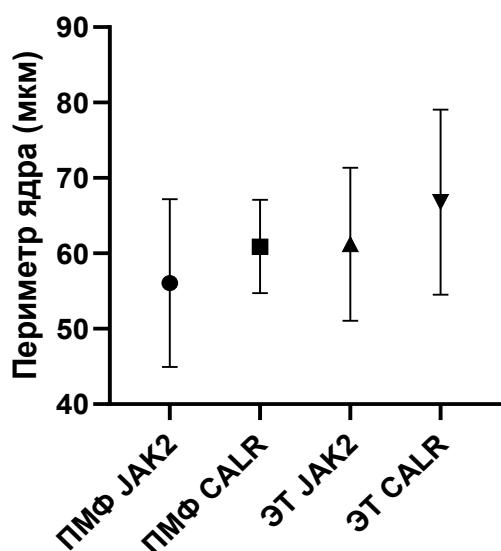


Рисунок 33 – Средний периметр ядра мегакариоцита (мкм) у больных первичным миелофиброзом (ПМФ) и эссенциальной тромбоцитемией (ЭТ) с мутацией в гене *JAK2* или *CALR*. Приведены средние значения и стандартные отклонения показателей

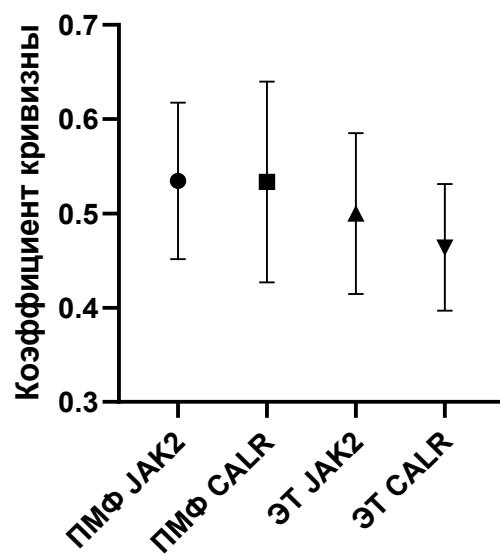
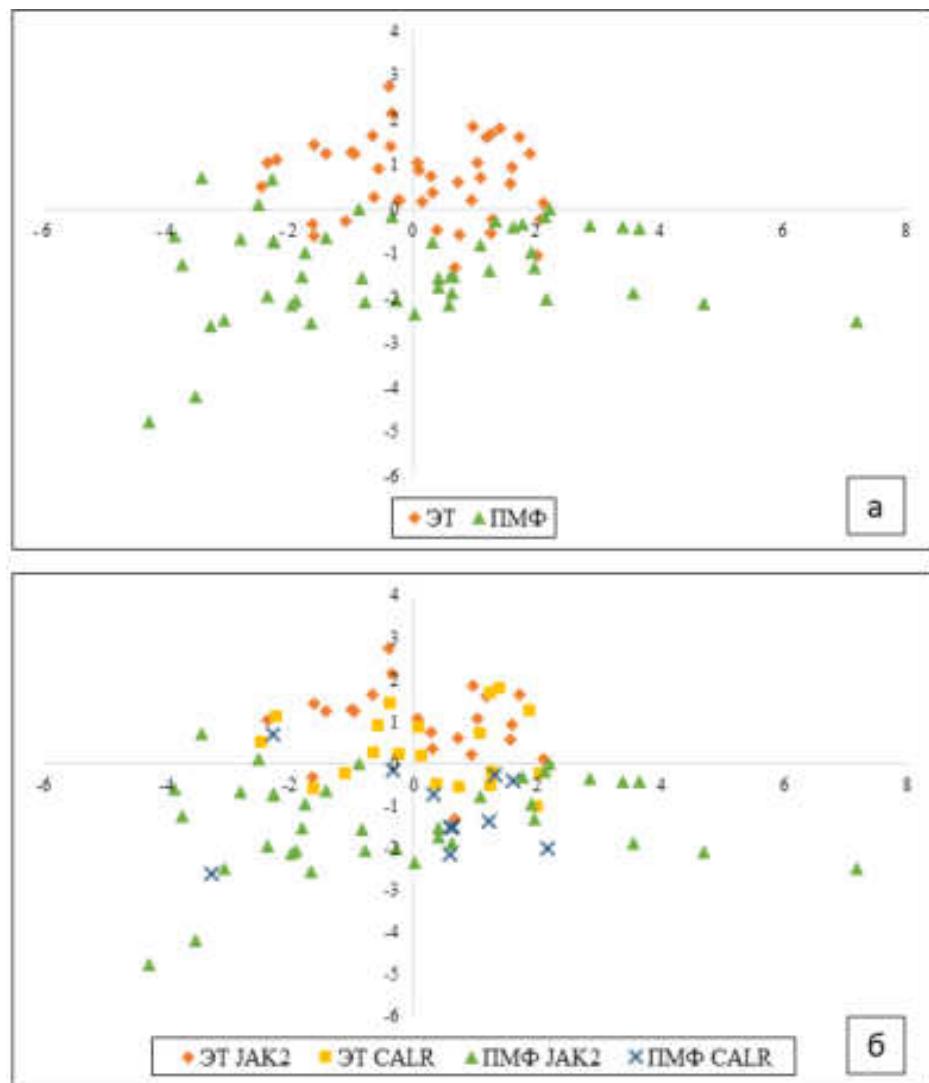


Рисунок 34 – Средний коэффициент кривизны ядра мегакариоцита у больных первичным миелофиброзом (ПМФ) и эссенциальной тромбоцитемией (ЭТ) с мутацией в гене *JAK2* или *CALR*. Приведены средние значения и стандартные отклонения показателей

При проекции у больных первичным миелофиброзом и эссенциальной тромбоцитемией гистотопографических и морфометрических характеристик мегакариоцитов в биоптатах костного мозга на первые две главные компоненты исследованные в нашей работе случаи продемонстрировали разделение на несколько групп (Рисунок 35).



Примечание – По оси абсцисс – значения второй главной компоненты, по оси ординат – значения первой главной компоненты.

Рисунок 35 – Распределение исследованных случаев в пространстве двух первых главных компонент: а – больные первичным миелофиброзом (ПМФ) и эссенциальной тромбоцитемией (ЭТ); б – больные первичным миелофиброзом (ПМФ) и эссенциальной тромбоцитемией (ЭТ) с мутациями в гене *JAK2* или *CALR*

Для оценки связи между значениями двух главных компонент (PC1 и PC2) и диагнозом использован метод логистической регрессии, в котором зависимая переменная принимает значение 0 («эссенциальная тромбоцитемия») или 1 («первичный миелофиброз»). В Таблице 30 перечислены переменные, включенные в модель логистической регрессии.

Таблица 30 – Переменные, включенные в модель логистической регрессии

Переменная	β	Стандарт-ная ошибка	Статистика критерия Вальда	p-значение	Отношение шансов	95% ДИ
PC1	-0,177	0,177	1,005	0,316	0,838	0,593–1,184
PC2	-280	0,481	22,462	0,0001	0,102	0,040–0,263

Значимость модели логистической регрессии с включением отобранных параметров равна $\chi^2 = 64,808$, p-значение = 0,0001, Nagelkerke $R^2 = 68,0\%$.

Как видно из Таблицы 31, точность модели логистической регрессии с включенными двумя независимыми переменными составляет 78,0%.

Таблица 31 – Процент корректных предсказаний диагноза на основе переменных, включенных в модель логистической регрессии

Диагноз	Предсказанный диагноз		Процент корректных предсказаний
	эссенциальная тромбоцитемия	первичный миелофиброз	
Эссенциальная тромбоцитемия	35	8	81,4%
Первичный миелофиброз	12	36	75,0%
Общий процент			78,0%

Общая оценка согласия модели и реальных данных проводилась с использованием теста согласия Хосмера–Лемешова (Хи-квадрат = 8,273, число степеней свободы = 8, p-значение = 0,407).

**Морфометрический анализ CD42b-позитивных мегакариоцитов
у больных первичным миелофиброзом и эссенциальной тромбоцитемией
с мутацией в гене *JAK2* или *CALR***

Выполненное вручную морфометрическое исследование 10 наиболее информативных полей зрения суммарной площадью 1 мм^2 в каждом гистологическом препарате, окрашенном в реакции с антителами к CD42b, продемонстрировало, что в группе больных первичным миелофиброзом с мутацией в гене *JAK2* или *CALR* обнаруживают большее количество мегакариоцитов в сравнении с группой больных эссенциальной тромбоцитемией с мутацией в гене *JAK2* или *CALR* (Рисунок 36).

Средняя площадь и периметр мегакариоцитов в костном мозге у больных первичным миелофиброзом с мутацией в гене *JAK2* или *CALR* превышали средние значения площади и периметра мегакариоцитов в костном мозге у больных с эссенциальной тромбоцитемией с аналогичными драйверными мутациями (Рисунки 37, 38, Таблица 32).

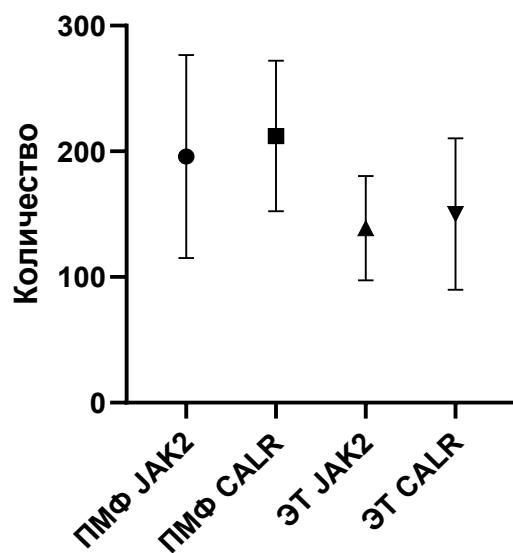
Таблица 32 – CD42b: количественные и структурные характеристики мегакариоцитов при первичном миелофиброзе (ПМФ) и эссенциальной тромбоцитемии (ЭТ) с мутацией в гене *JAK2* или *CALR* (результаты морфометрического анализа, проведенного вручную)

Показатель	ПМФ <i>JAK2</i> ⁺ (N = 49) среднее (СО) минимум– максимум	ПМФ <i>CALR</i> ⁺ (N = 14) Среднее (СО) минимум– максимум	ЭТ <i>JAK2</i> ⁺ (N = 30) среднее (СО) минимум– максимум	ЭТ <i>CALR</i> ⁺ (N = 29) среднее (СО) минимум– максимум	p- значение
Мегакариоциты в 1 мм^2	200,9 (60,8) 110,5–370,7	210,6 (50,9) 150,4–360,1	140,2 (40,1) 80,3–210,5	150,5 (60,0) 80,0–300,7	< 0,0001

Продолжение таблицы 32

Показатель	ПМФ <i>JAK2</i> ⁺ (N = 49) среднее (CO) минимум– максимум	ПМФ <i>CALR</i> ⁺ (N = 14) Среднее (CO) минимум– максимум	ЭТ <i>JAK2</i> ⁺ (N = 30) среднее (CO) минимум– максимум	ЭТ <i>CALR</i> ⁺ (N = 29) среднее (CO) минимум– максимум	p- значение
Площадь мегакариоцита ($\mu\text{мм}^2$)	607,0 (111,1) 390,5–843,0	609,7 (110,5) 494,5–790,5	531,4 (94,4) 374,0–749,7	574,4 (76,9) 385,8–688,3	0,0344
Периметр мегакариоцита ($\mu\text{мм}$)	95,5 (9,9) 74,6–114,7	96,8 (9,6) 83,4–110,5	88,6 (7,8) 73,9–105,1	91,8 (7,4) 73,0–101,5	0,0097

Примечание – Для сравнения независимых выборок применен критерий Краскела–Уоллиса.

Рисунок 36 – Количество мегакариоцитов в 1 мм^2 у больных первичным миелофиброзом(ПМФ) и эссенциальной тромбоцитемией (ЭТ) с мутацией в гене *JAK2* или *CALR*.

Приведены средние значения и стандартные отклонения показателей

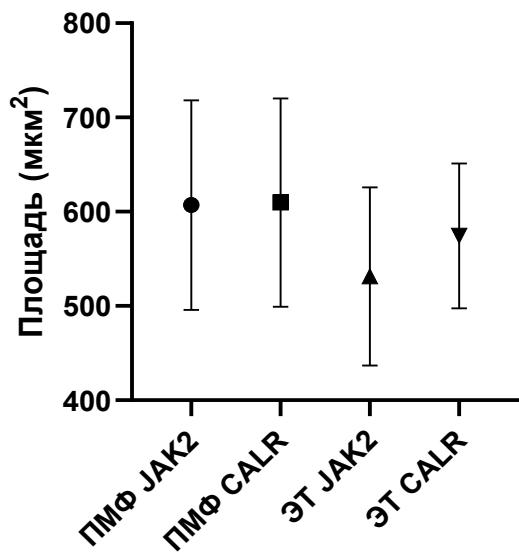


Рисунок 37 – Площадь мегакариоцита (мкм^2) у больных первичным миелофиброзом (ПМФ) и эссенциальной тромбоцитемией (ЭТ) с мутацией в гене *JAK2* или *CALR*.
Приведены средние значения и стандартные отклонения показателей

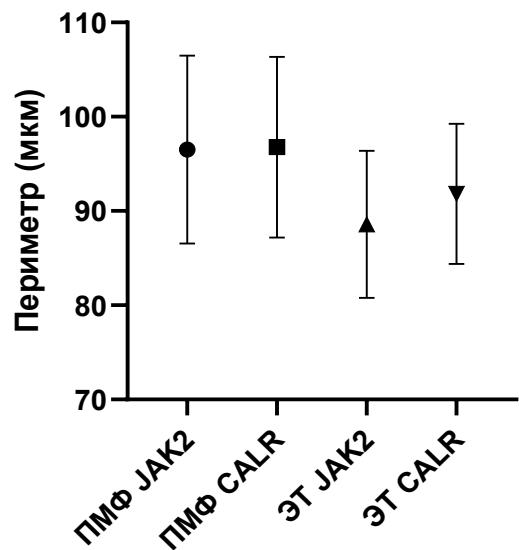


Рисунок 38 – Периметр мегакариоцита (мкм) у больных первичным миелофиброзом (ПМФ) и эссенциальной тромбоцитемией (ЭТ) с мутацией в гене *JAK2* или *CALR*.
Приведены средние значения и стандартные отклонения показателей

**3.3. Сравнительный анализ случаев первичного миелофиброза
в префибротической и фибротической стадии с мутацией в гене *JAK2*
или *CALR***

**Клинико-лабораторная характеристика больных первичным миелофиброзом
в префибротической и фибротической стадии с мутацией
в гене *JAK2* или *CALR***

Из 63 больных первичным миелофиброзом, включенных в исследование, у 34 пациентов при гистологическом исследовании подтверждена префибротическая стадия заболевания. Мутация в гене *JAK2* была обнаружена у 26 пациентов, мутация в гене *CALR* – у 8 пациентов. В группе из 29 больных первичным миелофиброзом в фибротической стадии у 23 пациентов обнаружена мутация в гене *JAK2*, у 6 – мутация в гене *CALR*.

Возраст больных с патоморфологически подтвержденным первичным миелофиброзом в префибротической стадии варьировал от 28 до 76 лет, среднее значение (СО) составило 53,6 лет (12,6 года). Возраст пациентов с патоморфологически подтвержденным первичным миелофиброзом в фибротической стадии варьировал от 36 до 76 лет, среднее значение (СО) составило 61,0 лет (10,9 года). Различия по средним возрастам статистически значимы (р-значение = 0,0179).

В общем анализе крови у больных первичным миелофиброзом в префибротической и фибротической стадии с мутацией в гене *JAK2* или *CALR* обнаружены статистически значимые различия количества лейкоцитов, эритроцитов и концентрации гемоглобина.

Анализ Международной шкалы оценки прогноза (IPSS) и Динамической международной прогностической шкалы (DIPSS) продемонстрировал, что распределение пациентов по группам риска зависит от мутационного статуса и стадии заболевания (Рисунки 39–43, данные приведены в Таблицах 33, 34).

Таблица 33 – Лабораторные данные у больных первичным миелофиброзом в префибротической (префибр) и фибротической (фибр) стадии с мутацией в гене *JAK2* или *CALR*

Показатель	Префибр <i>JAK2</i> ⁺ (N = 26)	Префибр <i>CALR</i> ⁺ (N = 8)	Фибр <i>JAK2</i> ⁺ (N = 23)	Фибр <i>CALR</i> ⁺ (N = 6)	p-значение
	Среднее (CO) минимум– максимум	среднее (CO) минимум– максимум	среднее (CO) минимум– максимум	среднее (CO) минимум– максимум	
Тромбоциты (10 ⁹ /л)	764,7 (383,1) 160–2058	1076,0 (569,8) 472–2237	573,5 (384,7) 51–1405	465,0 (407,3) 45–829	0,0675
Лейкоциты (10 ⁹ /л)	15,08 (8,29) 9,44–44,80	11,22 (3,35) 7,92–17,40	16,01 (13,23) 5,45–69,18	5,12 (3,18) 1,40–8,13	0,0106
Эритроциты (10 ¹² /л)	6,02 (0,98) 4,43–7,76	4,50 (0,66) 3,57–5,60	4,93 (1,64) 2,41–8,26	3,08 (1,20) 1,99–4,77	0,0011
Гемоглобин (г/л)	153,1 (28,4) 71–194	130,0 (10,5) 113–148	132,4 (38,5) 65–205	91,7 (35,1) 60–139	0,0064
Примечание – Для сравнения независимых выборок применен критерий Краскела–Уоллиса.					

Таблица 34 – Клинико-лабораторные данные у больных первичным миелофиброзом в префибротической (префибр) и фибротической (фибр) стадии с мутацией в гене *JAK2* или *CALR*

Показатель	Префибр <i>JAK2</i> ⁺ (N = 26) количество (% доля)	Префибр <i>CALR</i> ⁺ (N = 8) количество (% доля)	Фибр <i>JAK2</i> ⁺ (N = 23) количество (% доля)	Фибр <i>CALR</i> ⁺ (N = 6) количество (% доля)	p- значение
Тромбоциты < 100 × 10 ⁹ /л	0/26 (0%)	0/8 (0%)	1/23 (4,3%)	1/6 (16,7%)	0,1894
Лейкоциты > 25 × 10 ⁹ /л	2/26 (7,7%)	0/8 (0%)	2/23 (8,7%)	0/6 (0%)	0,7432
Гемоглобин < 100 г/л	1/26 (4,3%)	0/8 (0%)	8/23 (34,8%)	3/6 (50,0%)	0,0042
Циркулирующие бласты ≥ 1%	1/26 (4,3%)	0/8 (0%)	5/23 (21,7%)	2/6 (33,3%)	0,0718
IPSS	низкий	18/26 (69,2%)	8/8 (100%)	3/23 (13,0%)	1/6 (16,7%)
	промежу- точный-1	3/26 (11,5%)	0/8 (0%)	6/23 (26,1%)	0/6 (0%)
	промежу- точный-2	3/26 (11,5%)	0/8 (0%)	8/23 (34,8%)	3/6 (50,0%)
	высокий	2/26 (7,7%)	0/8 (0%)	6/23 (26,1%)	2/6 (33,3%)
DIPSS	низкий	18/26 (69,2%)	8/8 (100%)	3/23 (13,0%)	1/6 (16,7%)
	промежу- точный-1	5/26 (19,2%)	0/8 (0%)	8/23 (34,8%)	0/6 (0%)
	промежу- точный-2	2/26 (7,7%)	0/8 (0%)	8/23 (34,8%)	4/6 (66,7%)
	высокий	1/26 (3,8%)	0/8 (0%)	4/23 (17,4%)	1/6 (16,7%)

Продолжение таблицы 34

Показатель	Префибр <i>JAK2</i> ⁺ (N = 26) количество (% доля)	Префибр <i>CALR</i> ⁺ (N = 8) количество (% доля)	Фибр <i>JAK2</i> ⁺ (N = 23) количество (% доля)	Фибр <i>CALR</i> ⁺ (N = 6) количество (% доля)	p- значение
Сplenомегалия, n (%)	8/26 (30,8%)	3/8 (37,5%)	8/23 (34,8%)	3/6 (50,0%)	0,8444
Гепатомегалия, n (%)	6/26 (23,1%)	2/8 (25,0%)	3/23 (13,0%)	2/6 (33,3%)	0,5460
Органомегалия, n (%)	2/26 (7,7%)	1/8 (12,5%)	2/23 (8,7%)	1/6 (16,7%)	0,9062

Примечание – Сравнение категориальных переменных выполнено с использованием двустороннего точного критерия Фишера.

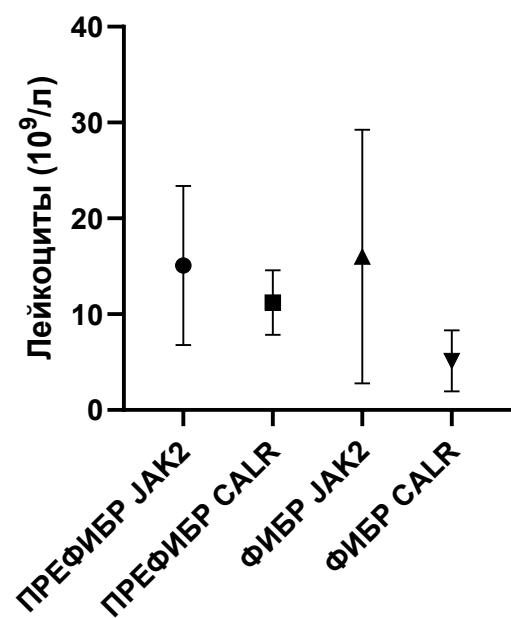


Рисунок 39 – Количество лейкоцитов в общем анализе крови у больных первичным миелофиброзом в префибротической (префибр) и фибротической (фибр) стадии с мутацией в гене *JAK2* или *CALR*. Приведены средние значения и стандартные отклонения показателей

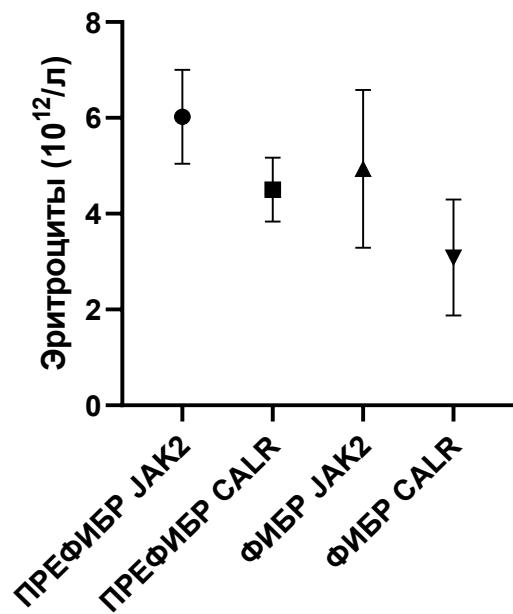


Рисунок 40 – Количество эритроцитов в общем анализе крови у больных первичным миелофиброзом в префибротической (префибр) и фибротической (фибр) стадии с мутацией в гене *JAK2* или *CALR*. Приведены средние значения и стандартные отклонения показателей

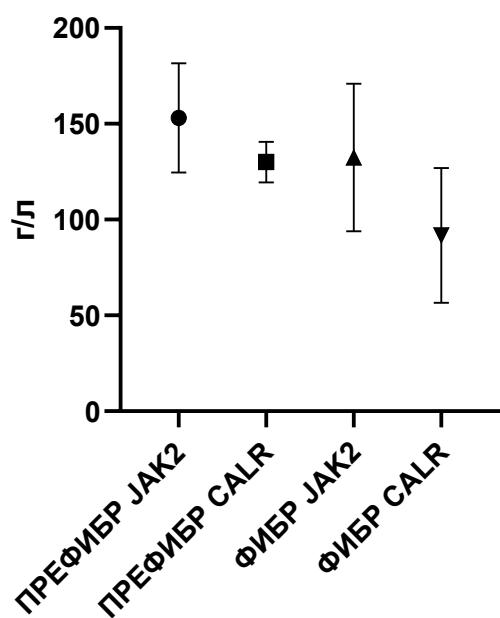


Рисунок 41 – Концентрация гемоглобина в общем анализе крови у больных первичным миелофиброзом в префибротической (префибр) и фибротической (фибр) стадии с мутацией в гене *JAK2* или *CALR*. Приведены средние значения и стандартные отклонения показателей

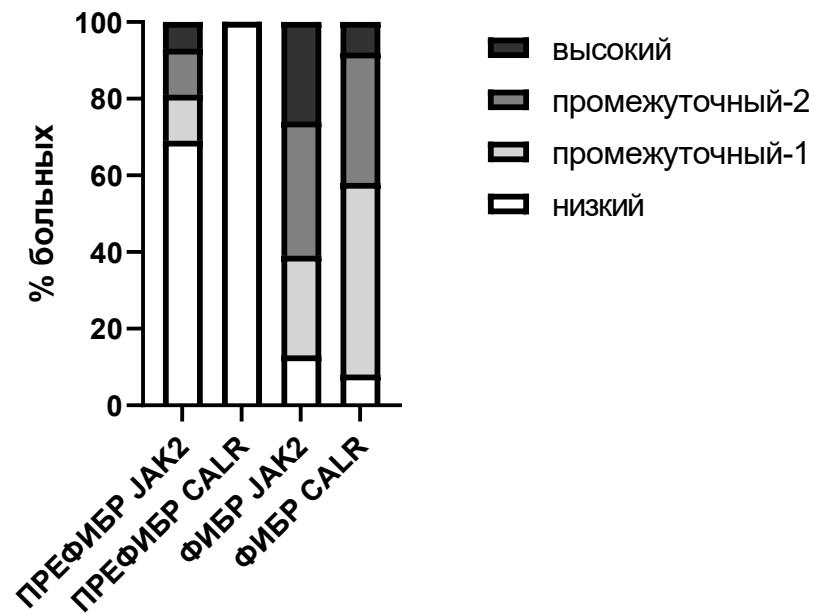


Рисунок 42 – Распределение больных первичным миелофиброзом в префибротической (префибр) и фибротической (фибр) стадии с мутацией в гене *JAK2* или *CALR* согласно Международной прогностической шкале (IPSS)

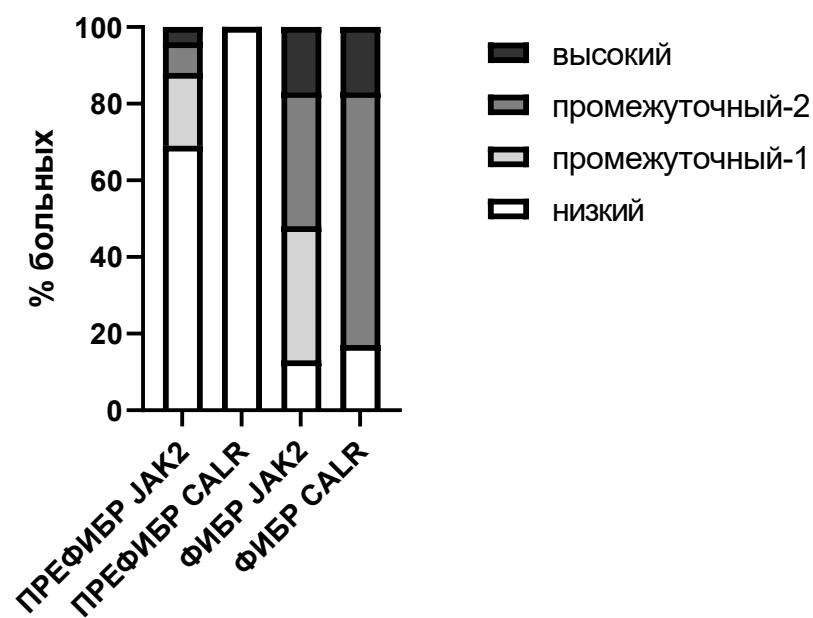


Рисунок 43 – Распределение больных первичным миелофиброзом в префибротической (префибр) и фибротической (фибр) стадии с мутацией в гене *JAK2* или *CALR* согласно Динамической международной прогностической шкале (DIPSS)

Для описания причинно-следственных связей между количеством баллов по системам стратификации рисков IPSS и DIPSS и степенью выраженности ретикулинового и коллагенового фиброза, остеосклероза выполняли поиск ассоциаций. В исследованных случаях первичного миелофиброза были обнаружены положительные высоко статистически значимые связи средней силы между количеством баллов IPSS, DIPSS и степенью выраженности ретикулинового и коллагенового фиброза. Направления ассоциативных связей, их сила, а также статистическая значимость приведены в Таблице 35.

Таблица 35 – Коэффициенты ассоциации между количеством баллов по системам стратификации рисков IPSS и DIPSS, степенью выраженности ретикулинового (рет. фиброз) и коллагенового (кол. фиброз) фиброза, остеосклероза

		IPSS	DIPSS	Рет. фиброз	Кол. фиброз	Остео- склероз
IPSS	коэффициент корреляции	1,000	0,983**	0,546**	0,583**	0,236
	знач. (двухсторонняя)	.	0,000	0,000	0,000	0,065
	N	63	63	63	63	63
DIPSS	коэффициент корреляции	0,983**	1,000	0,608**	0,624**	0,265*
	знач. (двухсторонняя)	0,000	.	0,000	0,000	0,038
	N	63	63	63	63	63
Рет. фиброз	коэффициент корреляции	0,546**	0,608**	1,000	0,818**	0,486**
	знач. (двухсторонняя)	0,000	0,000	.	0,000	0,000
	N	63	63	63	63	63
Кол. фиброз	коэффициент корреляции	0,583**	0,624**	0,818**	1,000	0,622**
	знач. (двухсторонняя)	0,000	0,000	0,000	.	0,000
	N	63	63	63	63	63

Продолжение таблицы 35

		IPSS	DIPSS	Рет. фиброз	Кол. фиброз	Остеосклероз
Остеосклероз	коэффициент корреляции	0,236	0,265*	0,486**	0,622**	1,000
	знач. (двухсторонняя)	0,065	0,038	0,000	0,000	.
	N	63	63	63	63	63
Примечания – ** – корреляция значима на уровне 0,01 (двухсторонняя); * – корреляция значима на уровне 0,05 (двухсторонняя).						

Особенности гистологического строения костного мозга у больных первичным миелофиброзом в префибротической и фибротической стадии с мутацией в гене *JAK2* или *CALR*

У больных *JAK2*-позитивным первичным миелофиброзом с префибротической стадией клеточность костного мозга варьировала от 35 до 100%, среднее значение (СО) составило 79% (19%). У пациентов с *CALR*-позитивным первичным миелофиброзом с префибротической стадией клеточность костного мозга варьировала от 60 до 100%, среднее значение (СО) составило 79% (16%). В группе пациентов с *JAK2*-позитивным первичным миелофиброзом в фибротической стадии клеточность костного мозга варьировала от 10 до 100%, среднее значение (СО) составило 86,5% (19%), в группе с *CALR*-позитивными случаями первичного миелофиброза в фибротической стадии клеточность костного мозга варьировала от 60 до 100%, среднее значение (СО) составило 87% (17,5%). Различия по клеточности костного мозга статистически не значимы (р-значение = 0,2514). Выявлены статистически значимые различия выраженности ретикулинового и коллагенового фиброза, а также остеосклероза в костном мозге у больных первичным миелофиброзом в префибротической и фибротической стадии с мутацией в гене *JAK2* или *CALR*. Не обнаружено влияния стадии заболевания и мутационного статуса на клеточность костного мозга и лейкоэритробластическое соотношения (Таблица 36).

Таблица 36 – Особенности гистологического строения костного мозга у больных первичным миелофиброзом в префибротической (префибр) и фибротической (фибр) стадии с мутацией в гене *JAK2* или *CALR*

Показатель		Префибр <i>JAK2</i> ⁺ (N = 26) количество (% доля)	Префибр <i>CALR</i> ⁺ (N = 8) количество (% доля)	Фибр <i>JAK2</i> ⁺ (N = 23) количество (% доля)	Фибр <i>CALR</i> ⁺ (N = 6) количество (% доля)	p- значение
Клеточ- ность костного мозга, n (%)	↓	1/26 (3,8%)	0/8 (0%)	1/23 (4,3%)	0/6 (0%)	0,4803
	N	9/26 (34,6%)	2/8 (25,0%)	2/23 (8,7%)	1/6 (16,7%)	
	↑	16/26 (61,5%)	6/8 (75,0%)	20/23 (86,9%)	5/6 (83,3%)	
Лейко- эритро- бласти- ческое соотно- шение, n (%)	↓	0/26 (0%)	0/8 (0%)	1/23 (4,3%)	1/6 (16,7%)	0,1241
	N	22/26 (84,6%)	5/8 (62,5%)	14/23 (60,9%)	2/6 (33,3%)	
	↑	4/26 (15,4%)	3/8 (37,5%)	8/23 (34,8%)	3/6 (50,0%)	
Ретику- линовый фиброз, n (%)	0	2/26 (7,7%)	0/8 (0%)	1/23 (4,3%)	0/6 (0%)	< 0,0001
	1	20/26 (76,9%)	5/8 (62,5%)	3/23 (13,0%)	1/6 (16,7%)	
	2	4/26 (15,4%)*	3/8 (37,5%)*	5/23 (21,7%)	0/6 (0%)	
	3	0/26 (0%)	0/8 (0%)	14/23 (60,9%)	5/6 (83,3%)	

Продолжение таблицы 36

Показатель	Префибр <i>JAK2</i> ⁺ (N = 26) количество (% доля)	Префибр <i>CALR</i> ⁺ (N = 8) количество (% доля)	Фибр <i>JAK2</i> ⁺ (N = 23) количество (% доля)	Фибр <i>CALR</i> ⁺ (N = 6) количество (% доля)	p- значение
Коллагеновый фиброз, n (%)	0 25/26 (96,1%)	8/8 (100%)	4/23 (17,4%)	1/6 (16,7%)	< 0,0001
	1 1/26 (3,8%)**	0/8 (0%)	10/23 (43,5%)	4/6 (66,7%)	
	2 0/26 (0%)	0/8 (0%)	6/23 (26,1%)	1/6 (16,7%)	
	3 0/26 (0%)	0/8 (0%)	3/23 (13,0%)	0/6 (0%)	
Остеосклероз, n (%)	0 26/26 (100%)	8/8 (100%)	15/23 (65,2%)	4/6 (66,7%)	0,0183
	1 0/26 (0%)	0/8 (0%)	6/23 (26,1%)	2/6 (33,3%)	
	2 0/26 (0%)	0/8 (0%)	2/23 (8,7%)	0/6 (0%)	

Гистотопографические особенности мегакариоцитарного ростка у больных первичным миелофиброзом в префибротической и фибротической стадии с мутацией в гене *JAK2* или *CALR*

В костном мозге больных первичным миелофиброзом в фибротической стадии было увеличено количество перитрабекулярно расположенных мегакариоцитов в сравнении с пациентами с префибротической стадией. Подтверждено отсутствие статистически значимых различий количества мегакариоцитов и кластеров в 1 мм^2 , количества мегакариоцитов в кластере и среднего расстояния мегакариоцитов до костных балок у больных первичным миелофиброзом в префибротической и фибротической стадии с мутацией в гене *JAK2* или *CALR* (Рисунок 44, данные представлены в Таблице 37).

Таблица 37 – Гистотопографические особенности мегакариоцитарного ростка у больных первичным миелофиброзом в префибротической (префибр) и фибротической (фибр) стадии с мутацией в гене *JAK2* или *CALR*

Показатель	Префибр <i>JAK2⁺</i> (N = 26)	Префибр <i>CALR⁺</i> (N = 8)	Фибр <i>JAK2⁺</i> (N = 23)	Фибр <i>CALR⁺</i> (N = 6)	р- значение
	среднее (CO)	Среднее (CO)	Среднее (CO)	Среднее (CO)	
Мегакарио- циты в 1 мм^2	58,4 (35,2) 17,2–165,1	52,9 (14,2) 23,5–65,8	57,9 (39,3) 13,9–154,3	72,7 (42,9) 28,8–146,4	0,7834
Кластеры мегакарио- цитов в 1 мм^2	3,5 (1,3) 1,2–6,1	3,8 (1,1) 1,5–5,0	3,1 (1,5) 0,3–5,5	4,6 (2,5) 1,9–8,9	0,4357

Продолжение таблицы 37

Показатель	Префибр <i>JAK2</i> ⁺ (N = 26) среднее (CO) минимум– максимум	Префибр <i>CALR</i> ⁺ (N = 8) среднее (CO) минимум– максимум	Фибр <i>JAK2</i> ⁺ (N = 23) среднее (CO) минимум– максимум	Фибр <i>CALR</i> ⁺ (N = 6) среднее (CO) минимум– максимум	p- значение
Количество мегакарио- цитов в кластере	7,8 (4,5) 4,1–23,8	7,2 (1,5) 5,7–10,3	8,6 (5,4) 3,5–24,8	8,5 (0,8) 7,5–9,7	0,4850
Среднее расстояние мегакарио- цитов до костных балок (мкм)	237,1 (51,3) 150,8–365,2	242,3 (37,6) 198,0–307,5	206,0 (50,1) 128,7–298,2	292,4 (200,7) 150,4–434,3	0,4503
Доля (в %) перитра- бекулярных мегакарио- цитов	3,3 (2,7) 0,4–10,9	4,7 (1,8) 2,2–6,8	7,9 (3,8) 1,8–15,3	8,1 (1,7) 6,9–9,3	0,0071
Примечание – Для сравнения независимых выборок применен критерий Краскела–Уоллиса.					

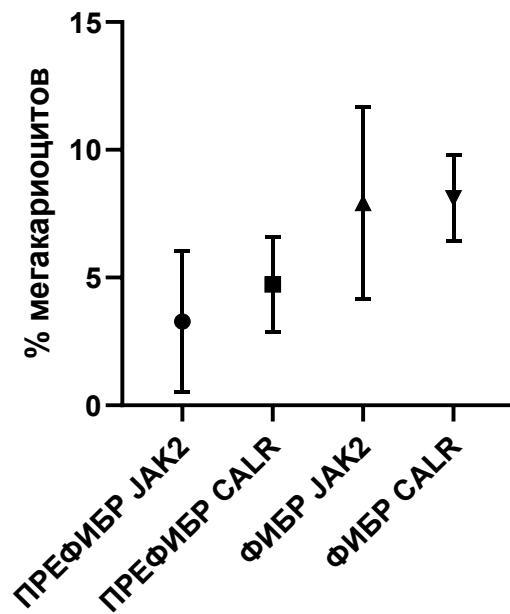


Рисунок 44 – Доля (в %) перитрабекулярных мегакариоцитов у больных первичным миелофиброзом в префибротической (префибр) и фибротической (фибр) стадии с мутацией в гене *JAK2* или *CALR*. Приведены средние значения и стандартные отклонения показателей

Морфометрические особенности строения мегакариоцитов у больных первичным миелофиброзом в префибротической и фибротической стадии с мутацией в гене *JAK2* или *CALR*

В исследованных группах больных первичным миелофиброзом в префибротической и фибротической стадии с мутацией в гене *JAK2* или *CALR* обнаружены статистически значимые различия коэффициента кривизны ядра мегакариоцита при отсутствии статистически значимых различий остальных исследованных морфометрических показателей (Рисунок 45, данные приведены в Таблице 38).

Таблица 38 – Морфометрические особенности строения мегакариоцитов у больных первичным миелофиброзом в префибротической (префибр) и фибротической (фибр) стадии с мутацией в гене *JAK2* или *CALR*

Показатель	Префибр <i>JAK2⁺</i> (N = 26) среднее (СО) минимум– максимум	Префибр <i>CALR⁺</i> (N = 8) среднее (СО) минимум– максимум	Фибр <i>JAK2⁺</i> (N = 23) среднее (СО) минимум– максимум	Фибр <i>CALR⁺</i> (N = 6) среднее (СО) минимум– максимум	p- значение
Периметр ядра (мкм)	55,1 (11,6) 41,3–85,6	60,1 (6,1) 48,2–67,2	57,2 (10,7) 40,9–89,1	61,9 (6,7) 53,6–72,1	0,1705
Площадь ядра (мкм ²)	137,8 (49,2) 75,4–238,4	173,3 (35,1) 107,9–206,3	131,2 (45,2) 64,3–277,1	135,6 (30,0) 98,4–182,5	0,0808
Периметр мегакарио-цита (мкм)	94,5 (14,5) 73,7–120,1	98,4 (9,7) 77,9–110,9	95,47 (17,0) 67,6–139,2	92,54 (7,2) 83,6–101,8	0,7462
Площадь мегакариоцита (мкм ²)	567,3 (166,5) 308,0–915,3	658,8 (118,2) 398,6–812,3	552,3 (193,8) 270,9–1118,0	534,6 (84,3) 417,5–645,0	0,2349
Ядерно- цитоплаз- матический индекс	0,260 (0,027) 0,219–0,327	0,278 (0,034) 0,222–0,342	0,258 (0,033) 0,206–0,349	0,278 (0,030) 0,231–0,316	0,2073
Коэффициент кривизны ядра	0,56 (0,08) 0,40–0,73	0,59 (0,05) 0,55–0,74	0,49 (0,07) 0,38–0,63	0,44 (0,09) 0,33–0,56	0,0007
Примечание – Для сравнения независимых выборок применен критерий Краскела–Уоллиса.					

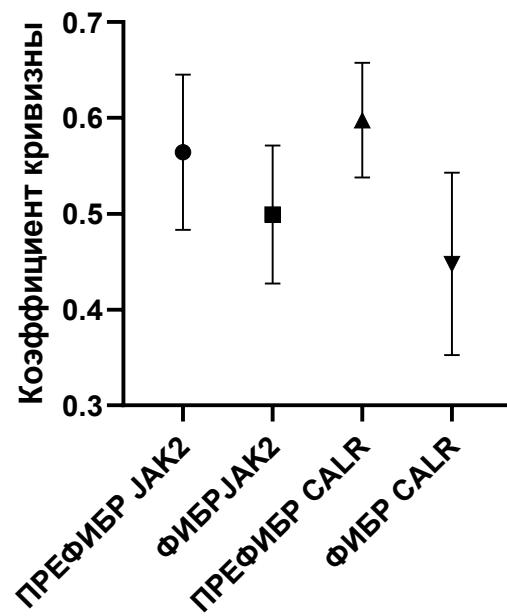


Рисунок 45 – Средний коэффициент кривизны ядра мегакариоцита у больных первичным миелофиброзом в префибротической (префибр) и фибротической (фибр) стадии с мутацией в гене *JAK2* или *CALR*. Приведены средние значения и стандартные отклонения показателей

Морфометрический анализ CD42b-позитивных мегакариоцитов у больных первичным миелофиброзом в префибротической и фибротической стадии с мутацией в гене *JAK2* или *CALR*

Выполненный вручную морфометрический анализ 10 наиболее информативных полей зрения суммарной площадью 1 мм^2 в каждом гистологическом препарате, окрашенном в реакции с антителами к CD42b, продемонстрировал отсутствие в сравниваемых группах больных первичным миелофиброзом статистически значимых различий количества мегакариоцитов и их размеров (данные приведены в Таблице 39).

Таблица 39 – Количественные и структурные характеристики CD42b-позитивных мегакариоцитов при первичном миелофиброзе в префибротической (префибр) и фибротической (фибр) стадии с мутацией в гене *JAK2* или *CALR* (результаты морфометрического анализа, проведенного вручную)

Показатель	Префибр <i>JAK2⁺</i> (N = 26)	Префибр <i>CALR⁺</i> (N = 8)	Фибр <i>JAK2⁺</i> (N = 23)	Фибр <i>CALR⁺</i> (N = 6)	p- значение
	среднее (CO)	среднее (CO)	среднее (CO)	среднее (CO)	
	минимум– максимум	минимум– максимум	минимум– максимум	минимум– максимум	
Мегакарио- циты в 1 мм ²	190,4 (50,7) 110,5–330,9	200,3 (30,0) 160,9–250,2	230,65 (70,9) 130,5–370,7	230,73 (90,3) 150,4–360,1	0,3341
Площадь мегакарио- цита (мкм ²)	637,2 (98,8) 495,6–843,0	642,3 (100,9) 530,5–790,5	551,7 (115,1) 390,5–771,3	552,8 (116,3) 454,5–721,0	0,0868
Периметр мегакарио- цита (мкм)	98,9 (8,5) 84,9–113,9	99,4 (8,6) 87,9–110,5	92,0 (11,3) 74,6–114,70	92,2 (10,7) 83,4–107,0	0,1363
Примечание – Для сравнения независимых выборок применен критерий Краскела– Уоллиса.					

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

Постановка диагноза первичного миелофиброза или эссенциальной тромбоцитемии имеет критериальный характер и помимо результатов гистологического исследования костного мозга основывается на анализе клинико-лабораторной картины заболевания и результатах молекулярно-генетических исследований.

Все включенные в представленную работу пациенты были старше 18 лет, поставленный диагноз строго соответствовал диагностическим критериям ВОЗ (наблюдения отбирались в диссертационное исследование только в случае совпадения результатов патоморфологического исследования у четырех независимых экспертов-патологоанатомов), обязательным большим критерием включения служило наличие мутации в гене *JAK2* или *CALR*.

У пациентов, включенных в проведенное исследование, были получены статистически значимые различия частоты обнаружения спленомегалии: в 35% случаев первичного миелофиброза и 8,5% случаев эссенциальной тромбоцитемии. В общем анализе крови лейкоцитоз $> 11 \times 10^9/\text{л}$ был обнаружен у 55,5% больных первичным миелофиброзом и у 27% больных эссенциальной тромбоцитемией (различия статистически значимы). Тромбоцитоз $> 450 \times 10^9/\text{л}$ был подтвержден у 91,5% больных эссенциальной тромбоцитемией и у 62% больных первичным миелофиброзом (различия статистически значимы). Сравнительный анализ частоты встречаемости перечисленных выше клинико-лабораторных показателей подтверждает обоснованность их использования в качестве критериев диагностики первичного миелофиброза и эссенциальной тромбоцитемии.

У больных первичным миелофиброзом в фибротической стадии наблюдали статистически значимое снижение количества лейкоцитов, эритроцитов и показателей гемоглобина в общем анализе крови. Эти изменения лабораторных показателей связаны с прогрессией ретикулинового и коллагенового фиброза, вытесняющего миелоидную ткань. Для оценки ассоциативных связей между степенью выраженности фиброза, остеосклероза и группой риска, согласно

международным прогностическим шкалам (IPSS, DIPSS), был применен ранговый корреляционный анализ по Спирмену. Полученные нами результаты о наличии положительных высоко статистически значимых связей средней силы между количеством баллов IPSS, DIPSS и степенью выраженности ретикулинового и коллагенового фиброза подтверждают данные литературы о целесообразности рассмотрения этого патоморфологического признака в качестве независимого прогностического фактора [27; 167].

В 2012 году F. Passamonti и соавт. была разработана Международная прогностическая шкала (International Prognostic Score – IPSET), позволяющая предсказать выживаемость у больных эссенциальной тромбоцитемией. С помощью многовариантного регрессионного анализа Кокса была выполнена оценка выживаемости 867 пациентов с эссенциальной тромбоцитемией, позволившая выделить и определить в баллах прогностически значимые признаки: 1) возраст ≥ 60 лет (2 балла); 2) лейкоцитоз более $11 \times 10^9/\text{л}$ (1 балл); 3) эпизоды тромбозов в анамнезе (1 балл). Международная прогностическая шкала дала возможность классифицировать включенных в исследование больных на три группы со статистически значимыми различиями выживаемости: группа низкого риска (сумма баллов = 0; медиана выживаемости не достигнута), группа промежуточного риска (сумма баллов = 1–2; медиана выживаемости 24,5 года) и группа высокого риска (сумма баллов = 3–4, медиана выживаемости 13,8 года). Валидность Международной прогностической шкалы IPSET подтверждена на примере двух независимых выборок, включающих 132 и 234 пациента с эссенциальной тромбоцитемией [12].

В представленной работе были выявлены статистически значимые различия распределения больных эссенциальной тромбоцитемией с мутацией в гене *JAK2* или *CALR* согласно прогностической шкале IPSET. Большинство случаев эссенциальной тромбоцитемии с мутацией в гене *JAK2* относились к группе промежуточного и высокого риска, в то время как *CALR*-позитивные случаи эссенциальной тромбоцитемии отличались отсутствием больных из группы

высокого риска и характеризовались преобладанием пациентов из группы низкого риска.

По данным многоцентровых исследований, тип драйверной мутации влияет на клинико-лабораторную картину первичного миелофиброза и эссенциальной тромбоцитемии. *CALR*-позитивные больные моложе пациентов с подтвержденной мутацией в гене *JAK2*, у них меньше количество лейкоцитов крови и отмечается более выраженный тромбоцитоз [44; 35].

Описываемые в литературе отличия между *JAK2*+ и *CALR*+ пациентами имели место и в этой работе: *JAK2*-позитивные пациенты были старше, в общем анализе крови у них были повышена концентрация гемоглобина, увеличено количество лейкоцитов и эритроцитов и уменьшено количество тромбоцитов. В отличие от данных литературы, в этом исследовании были продемонстрированы статистически значимые различия частоты встречаемости спленомегалии в зависимости от мутационного статуса. У включенных в представленную работу больных эссенциальной тромбоцитемией с мутацией в гене *CALR* спленомегалия была подтверждена в 4% случаев, в то время как в *JAK2*-позитивной группе пациентов спленомегалия была обнаружена в 13% случаев. В группе первичного миелофиброза у *JAK2*-позитивных больных спленомегалия была диагностирована в 33% случаев, у больных с мутацией в гене *CALR* – в 43% случаев. По данным литературы, спленомегалия служит фактором прогноза у больных эссенциальной тромбоцитемии, так как ее наличие связано с риском тромботических осложнений, в то время как у больных первичным миелофиброзом прогностическая значимость спленомегалии не доказана [34; 150; 37; 58; 178].

Таким образом, мутации в гене *JAK2* или *CALR* связаны с различиями клинико-лабораторных проявлений эссенциальной тромбоцитемии и первичного миелофиброза в префибротической и фибротической стадии. Мутации в гене *JAK2* ассоциированы с более выраженным лейкоцитозом, эритроцитозом, повышенными показателями гемоглобина и большим числом случаев заболевания со спленомегалией. Мутации в гене *CALR* – с молодым возрастом и более высокой концентрацией тромбоцитов в общем анализе крови.

В группе больных первичным миелофиброзом с мутацией в гене *JAK2* было выявлено одиннадцать пациентов с концентрацией гемоглобина, превышающей диагностический порог, используемый для диагностики истинной полицитемии. Критериальный характер диагностики миелопролиферативных новообразований позволил классифицировать эти случаи как первичный миелофиброз. Ограничением исследования было отсутствие данных о динамике клинико-лабораторных показателей, сведений о характере эритроцитоза – отсутствовали доказательства его вторичного характера.

Дифференциальная диагностика первичного миелофиброза и эссенциальной тромбоцитемии крайне важна, так как ее результат – правильный диагноз – определяет прогноз и тактику лечения больного. Несмотря на возросшую роль патоморфологического заключения в постановке диагноза первичного миелофиброза и эссенциальной тромбоцитемии, важно понимать, что возможности гистологического исследования биопсий костного мозга ограничены. На итоговый результат влияют погрешности преаналитического этапа: объем материала, декальцинация, фиксация препарата, микротомия, окрашивание и др. При микроскопическом исследовании правильная интерпретация большого количества субъективных и трудно различимых признаков (некоторые из них имеют комплексный характер) зависит от опыта и профессиональной компетенции врача-патологоанатома. Следует отметить влияние стадий заболевания (клеточная и фибротическая стадия первичного миелофиброза), а также мутационного статуса на фенотипические проявления первичного миелофиброза и эссенциальной тромбоцитемии. Одновременно мутации в гене *JAK2* или *CALR* служат не только критериями диагностики, но и имеют прогностическую значимость.

Степень выраженности трехростковой гиперплазии миелоидной ткани – важнейший дифференциально-диагностический признак первичного миелофиброза и эссенциальной тромбоцитемии. На сегодняшний день опубликованы единичные работы, посвященные сравнению качественных и/или количественных характеристик костного мозга у больных первичным миелофиброзом и эссенциальной тромбоцитемией. Первые исследования, в

которых была поставлена задача объективизировать морфологические изменения костного мозга, были выполнены J. Thiele и соавт. [87; 119]. Морфометрический анализ эритроидного, гранулоцитарного и мегакариоцитарного ростков продемонстрировал, что дифференцировать эссенциальную тромбоцитемию от первичного миелофиброза позволяют следующие характеристики: клеточность костного мозга, лейкоэритробластическое соотношение, а также особенности строения мегакариоцитов: более крупные клетки с гиперlobулярными ядрами у больных эссенциальной тромбоцитемией.

В представленном исследовании у больных первичным миелофиброзом повышенную и соответствующую возрасту клеточность костного мозга наблюдали в 74% и 22% случаев, соответственно. Анализ клеточности костного мозга в префибротической и фибротической стадиях выявил статистически незначимые различия. У больных эссенциальной тромбоцитемией при гистологическом исследовании обнаруживали нормоклеточный (41% случаев), гиперклеточный (32%) и гипоклеточный (27%) костный мозг. Повышенная относительно возрастной нормы клеточность костного мозга у больных первичным миелофиброзом обусловлена гиперплазией миелоидной ткани за счет гранулоцитарного и мегакариоцитарного ростков. При эссенциальной тромбоцитемии наблюдают преимущественно одноростковую гиперплазию, приводящую к увеличению числа зрелых мегакариоцитов, которая не оказывает существенного влияния на объем миелоидной ткани в межбалочных пространствах (Рисунки 46, 47).

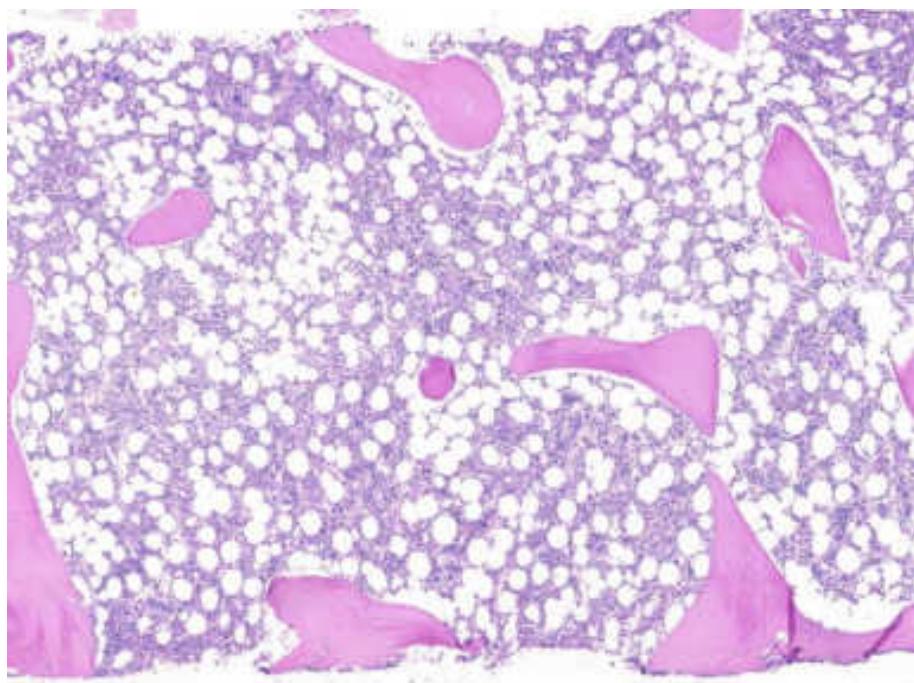


Рисунок 46 – Эссенциальная тромбоцитемия. Окраска азуром II и эозином, $\times 50$

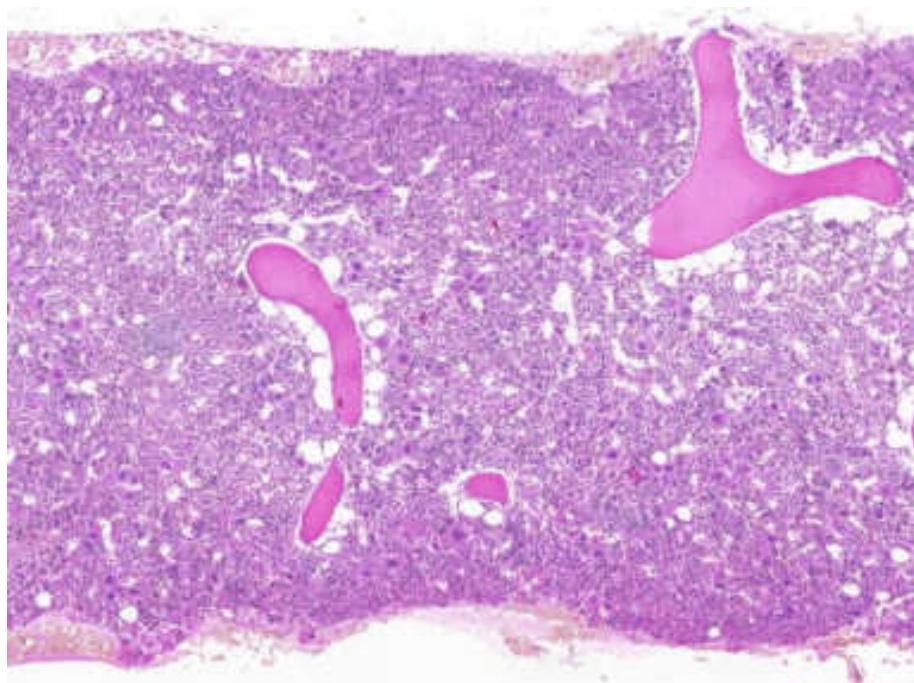


Рисунок 47 – Первичный миелофиброз, префибротическая стадия.
Окраска азуром II и эозином, $\times 50$

В дифференциальной диагностике первичного миелофиброза и эссенциальной тромбоцитемии диагностическое значение имеет оценка лейко-эритробластического соотношения. Результаты представленного исследования

продемонстрировали, что у больных первичным миелофиброзом нормальное и повышенное лейкоэритробластическое соотношение встречается в 68% и 29% случаев, соответственно. Сравнение этого параметра у больных первичным миелофиброзом в клеточной и фибротической стадии не выявило статистически значимых различий. Эти результаты тождественны данным, опубликованным W.J. Wong и соавт. При этом, согласно W.J. Wong и соавт., у больных эссенциальной тромбоцитемией нормальное и повышенное лейкоэритробластическое соотношение наблюдали в 48% и 34% случаев, в то время как результаты, полученные в предложенном диссертационном исследовании, свидетельствуют об отсутствии изменений лейкоэритробластического соотношения в биоптатах костного мозга у 95% больных эссенциальной тромбоцитемией.

Мутации в гене *JAK2* или *CALR* не показали статистически значимого влияния на клеточность костного мозга и лейкоэритробластическое соотношение в группах больных первичным миелофиброзом и эссенциальной тромбоцитемией, что подтверждает данные литературы [104].

Оценка доли миелоидной ткани и лейкоэритробластического соотношения субъективна и может представлять определенные сложности при неравномерном распределении миелоидной ткани в межбалочных пространствах, сужении эритроидного и/или гранулоцитарного ростков. Сведения о воспроизведимости этих показателей противоречивы; по данным литературы, межисследовательское согласие при оценке клеточности костного мозга и лейкоэритробластического соотношения варьирует от минимального (коэффициент Каппа $\leq 0,20$) до почти полного (коэффициент Каппа $> 0,80$) [153; 190].

Полученные в этой работе статистически значимые различия степени выраженности ретикулинового и коллагенового фиброза, а также остеосклероза у больных первичным миелофиброзом и эссенциальной тромбоцитемией подтверждают значимость этого патоморфологического признака для дифференциальной диагностики. Степень выраженности ретикулинового фиброза служит важным морфологическим признаком, позволяющим отличить

префибротическую стадию первичного миелофиброза от эссенциальной тромбоцитемии. Разделение клеточной и фибротической стадии первичного миелофиброза следует проводить с учетом степени выраженности ретикулинового и коллагенового фиброза, а также остеосклероза (Рисунки 48–52).

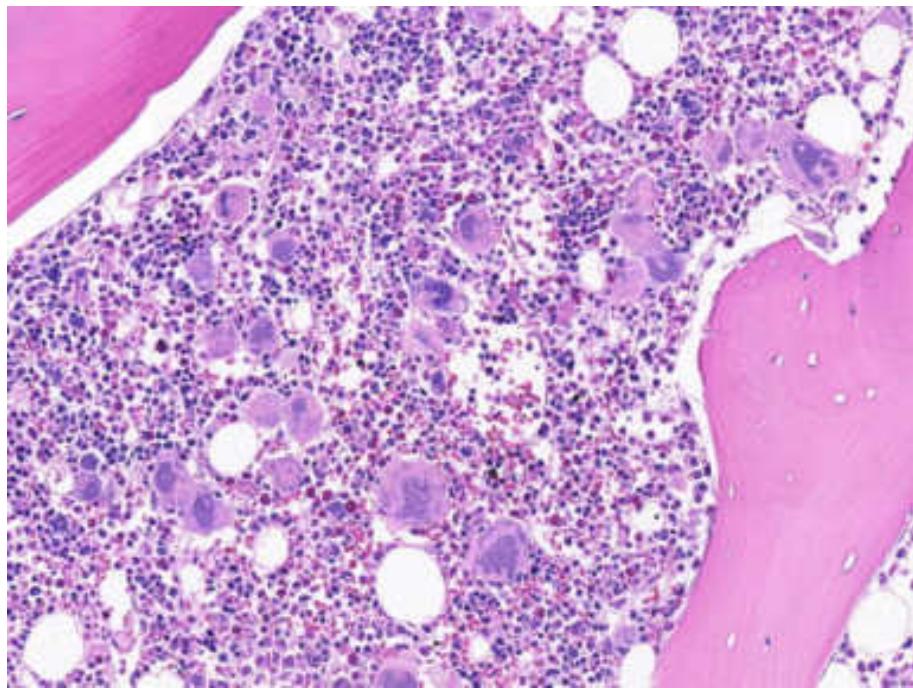


Рисунок 48 – Первичный миелофиброз, префибротическая стадия.

Окраска азуром II и эозином, $\times 200$

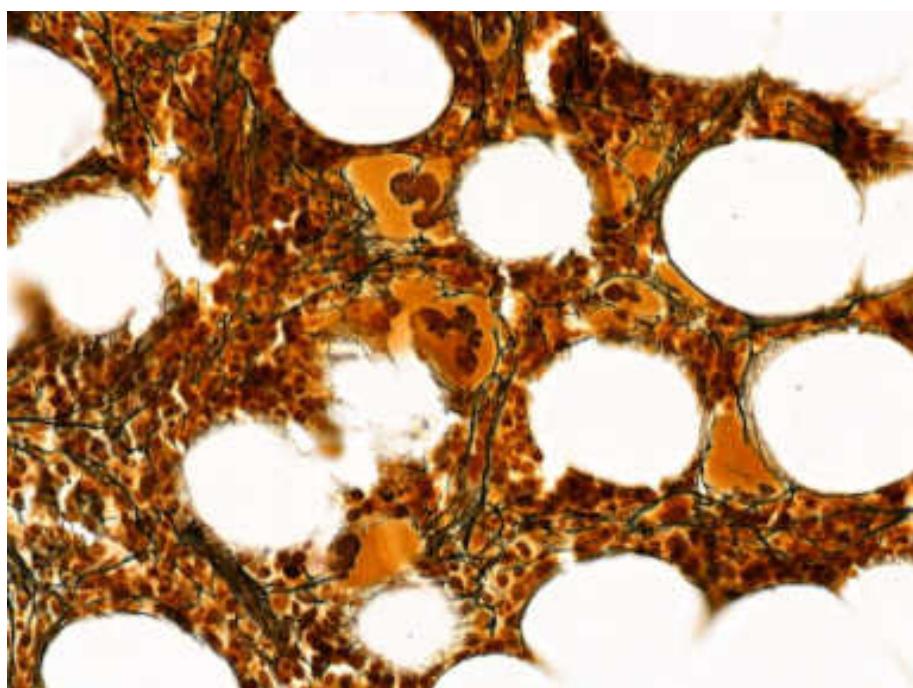


Рисунок 49 – Первичный миелофиброз, префибротическая стадия (MF-1).

Импрегнация солями серебра по Гордону–Свиту, $\times 400$

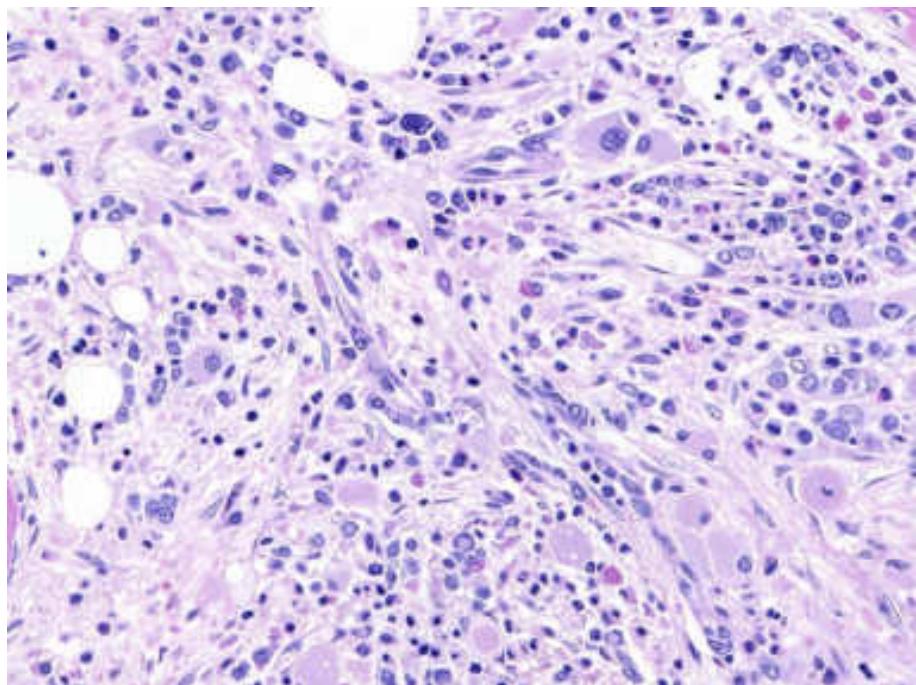


Рисунок 50 – Первичный миелофиброз, фибротическая стадия. Ряды клеток между коллагеновыми волокнами. Окраска азуром II и эозином, $\times 200$

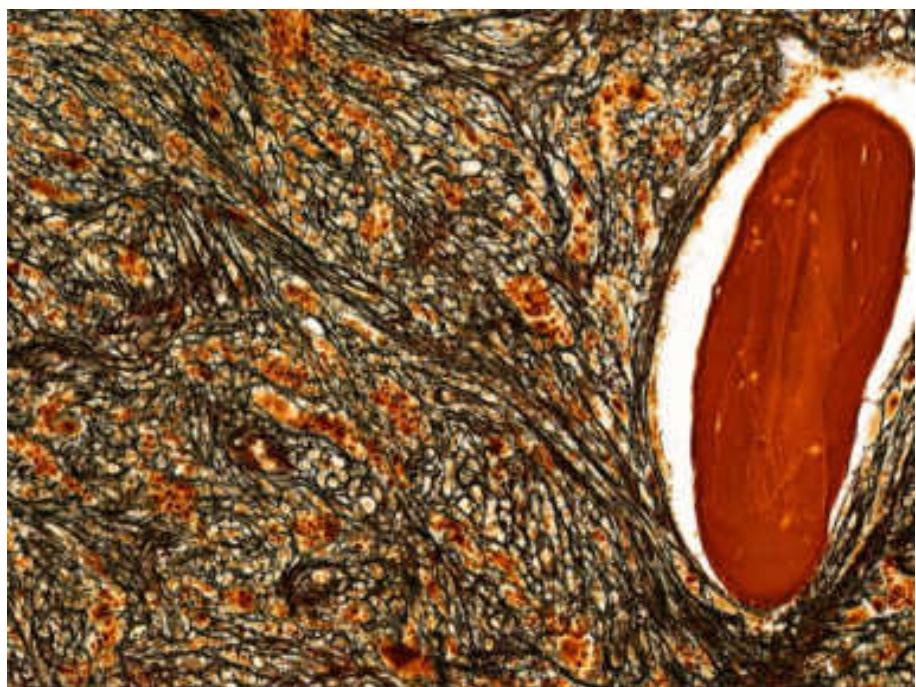


Рисунок 51 – Первичный миелофиброз, фибротическая стадия (MF-3).
Импрегнация солями серебра по Гордону–Свиту, $\times 200$

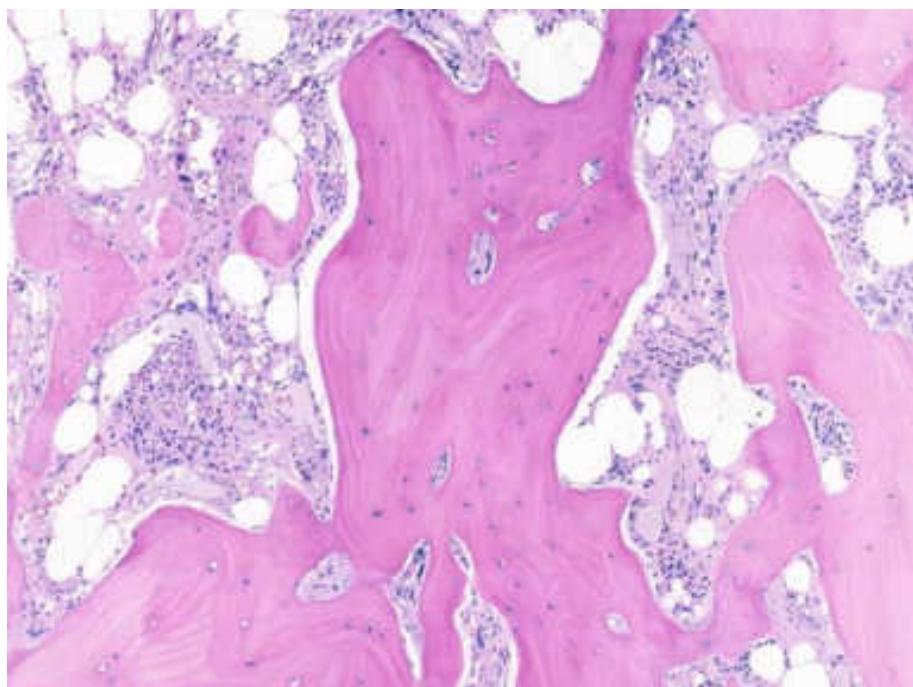


Рисунок 52 – Первичный миелофиброз, проявления остеосклероза (Os-2).

Окраска азуром II и эозином, $\times 100$

Сравнительный анализ гистотопографических характеристик мегакариоцитов у больных первичным миелофиброзом и эссенциальной тромбоцитемией продемонстрировал более выраженную гиперплазию мегакариоцитарного ростка в группе больных первичным миелофиброзом. При первичном миелофиброзе в гистологических препаратах костного мозга обнаруживали большее количество мегакариоцитов в 1 мм^2 и большее число мегакариоцитов в одном кластере, что свидетельствует о более крупных размерах мегакариоцитарных скоплений. Полученные в представленном исследовании результаты тождественны данным литературы [29; 34; 109; 111; 175; 176]. Проведенная в этой работе оценка тропности мегакариоцитов к костным балкам продемонстрировала статистически незначимые различия у пациентов с первичным миелофиброзом и эссенциальной тромбоцитемией. Это может быть связано с гетерогенностью группы больных первичным миелофиброзом, представленной случаями болезни в префибротической и фибротической стадии. Анализ у пациентов с первичным миелофиброзом количества перитрабекулярно

расположенных мегакариоцитов в зависимости от стадии заболевания продемонстрировал наличие статистически значимых различий (Рисунки 53–57).

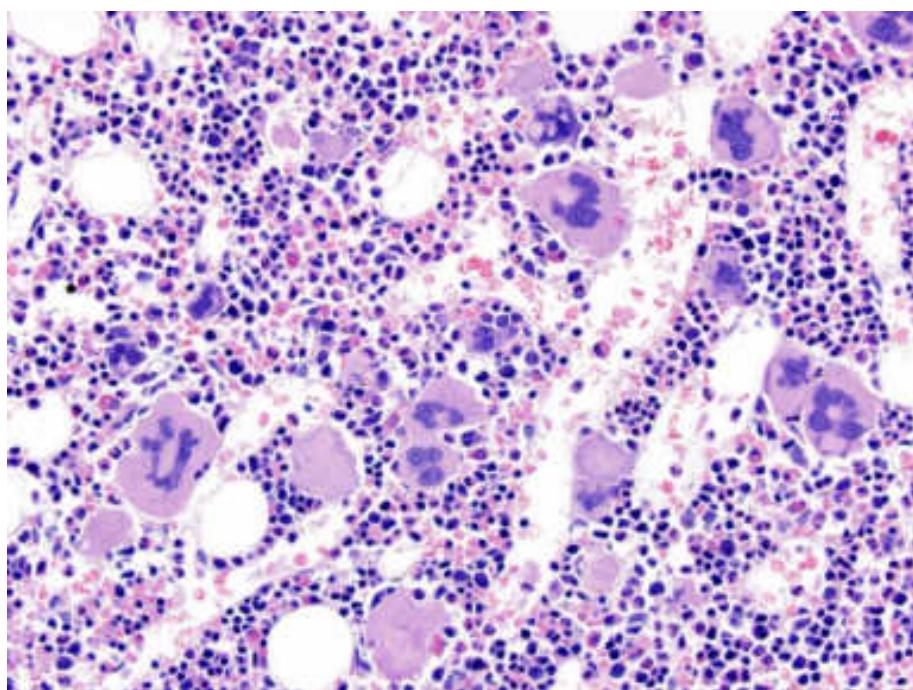


Рисунок 53 – Эссенциальная тромбоцитемия. Мегакариоциты с гиперсегментированными ядрами формируют рыхлые скопления.
Окраска азуром II и эозином, $\times 400$

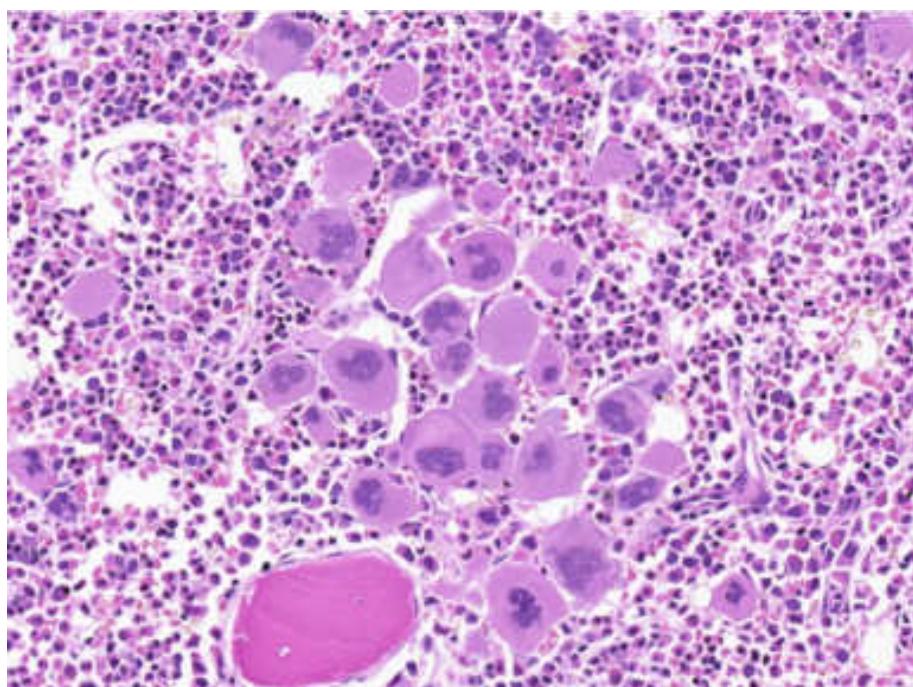


Рисунок 54 – Первичный миелофиброз, префибротическая стадия. Крупное скопление мегакариоцитов с признаками атипии. Окраска азуром II и эозином, $\times 300$

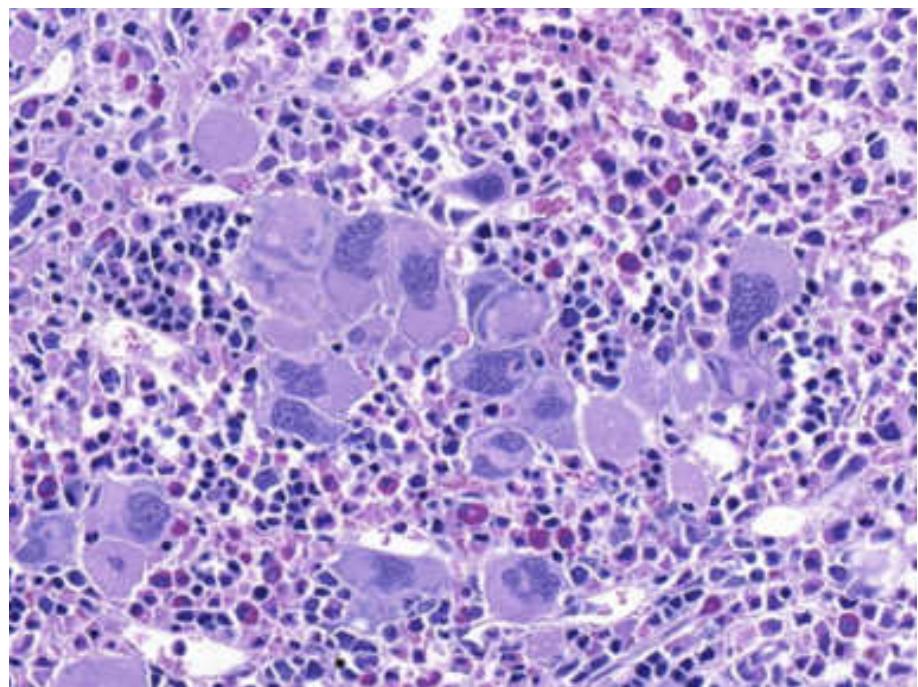


Рисунок 55 – Первичный миелофиброз, фибротическая стадия. Крупное плотное скопление мегакариоцитов с признаками выраженной атипии.

Окраска азуром II и эозином, $\times 400$

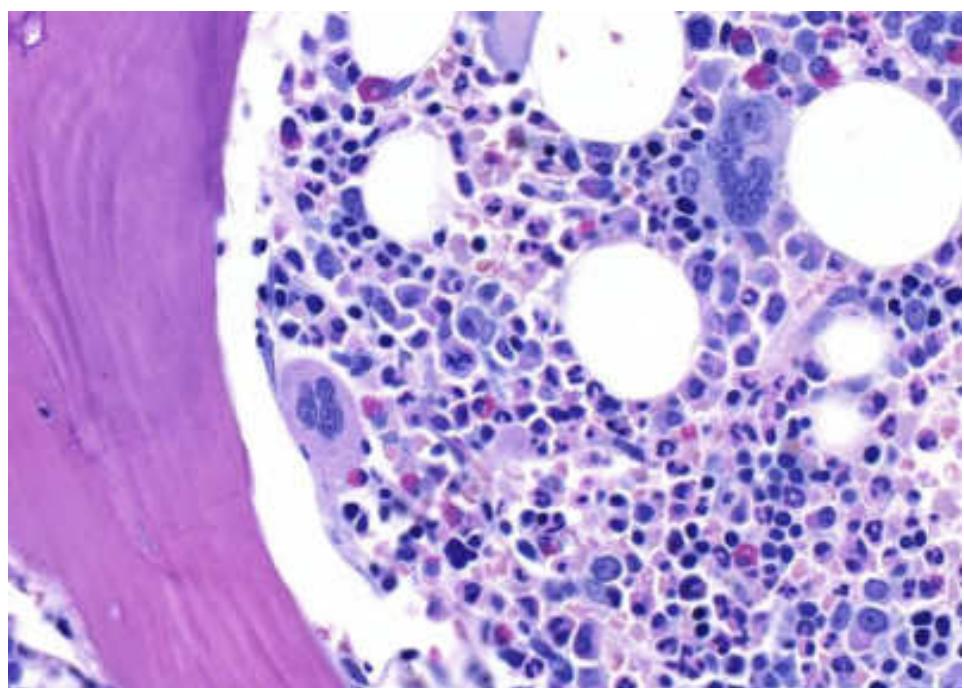


Рисунок 56 – Эссенциальная тромбоцитемия. Перитрабекулярно расположенный мегакариоцит. Окраска азуром II и эозином, $\times 400$

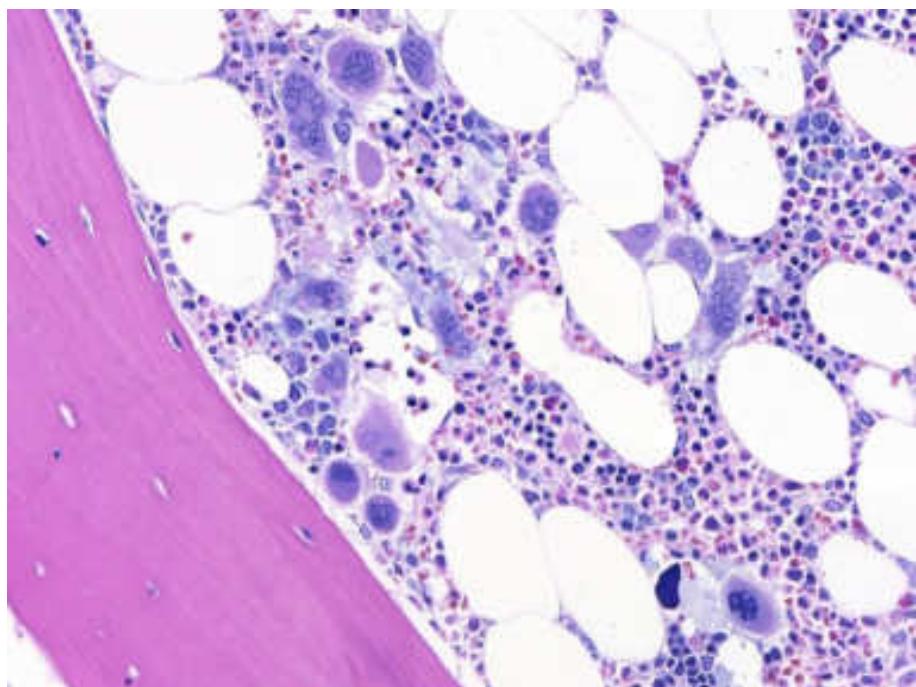


Рисунок 57 – Первичный миелофиброз, префибротическая стадия. Перитрабекулярное скопление мегакариоцитов. Окраска азуром II и эозином, $\times 200$

Сравнительная оценка качественных и количественных характеристик мегакариоцитарного ростка у больных первичным миелофиброзом и эссенциальной тромбоцитемией с мутациями в гене *JAK2* или *CALR* обнаружила статистически значимые различия гистотопографических характеристик мегакариоцитов.

Наибольшую плотность расположения мегакариоцитов в миелоидной ткани наблюдали у больных первичным миелофиброзом. При делении этой группы больных на *JAK2* и *CALR*-позитивные случаи было продемонстрировано, что у больных первичным миелофиброзом с мутацией в гене *JAK2* мегакариоцитарные кластеры крупнее (включают в себя большее число мегакариоцитов), но обнаруживаются реже, чем в случаях с подтвержденной мутацией в гене *CALR*. У *JAK2*-позитивных больных эссенциальной тромбоцитемией признаки гиперплазии мегакариоцитарного ростка были выражены в наименьшей степени при сопоставлении с тремя группами сравнения. Об этом свидетельствует уменьшенное количество мегакариоцитов, мегакариоцитарных кластеров в 1 мм^2 и число мегакариоцитов в кластере в этой группе пациентов. Результаты

представленного исследования показали, что гистотопографические характеристики мегакариоцитов в случаях эссенциальной тромбоцитемии с мутацией в гене *CALR* имеют сходство с *JAK2* и *CALR*-позитивными случаями первичного миелофиброза. Тропность мегакариоцитов к костным балкам была выражена сильнее у больных первичным миелофиброзом и эссенциальной тромбоцитемией с мутацией в гене *CALR*, чем у *JAK2*-позитивных больных. Таким образом, особенности гистотопографии мегакариоцитарного ростка, связанные с типом драйверной мутации, обуславливают важность учета мутационного статуса при дифференциальной диагностике первичного миелофиброза и эссенциальной тромбоцитемии.

При сопоставлении полученных в этой работе результатов оценки гистотопографии мегакариоцитарного ростка с данными литературы были выявлены некоторые различия. В публикации W.J. Wong и соавт. оценочная интерпретация гистотопографических характеристик мегакариоцитарного ростка не обнаружила статистически значимых различий в группах больных первичным миелофиброзом с мутациями в гене *JAK2* или *CALR* и группах больных эссенциальной тромбоцитемии с аналогичными драйверными мутациями [104]. В другом исследовании примененный N. Vytrva и соавт. морфометрический метод оценки мегакариоцитарного ростка, позволяющий объективизировать наблюдаемые патоморфологические изменения, продемонстрировал, что в костном мозге *JAK2*-позитивных больных эссенциальной тромбоцитемией гиперплазия мегакариоцитарного ростка выражена слабее, чем в группе *JAK2*-негативных пациентов. Ограничением представленной работы служит разделение пациентов на две группы в зависимости от наличия или отсутствия изменений в гене *JAK2* (*JAK2V617F* и *JAK2* «дикий» тип) без учета остальных драйверных мутаций (мутации в гене *CALR*, *MPL*) [118].

Анализ пространственного расположения мегакариоцитов у больных первичным миелофиброзом обнаружил увеличение количества перитрабекулярно расположенных мегакариоцитов в фибротической стадии заболевания, что связано, вероятно, с оттеснением миелоидной ткани к поверхности костных балок пучками

ретикулиновых и коллагеновых волокон. Мутационный статус пациентов не оказывал существенного влияния на выраженность этих изменений (Рисунок 58).

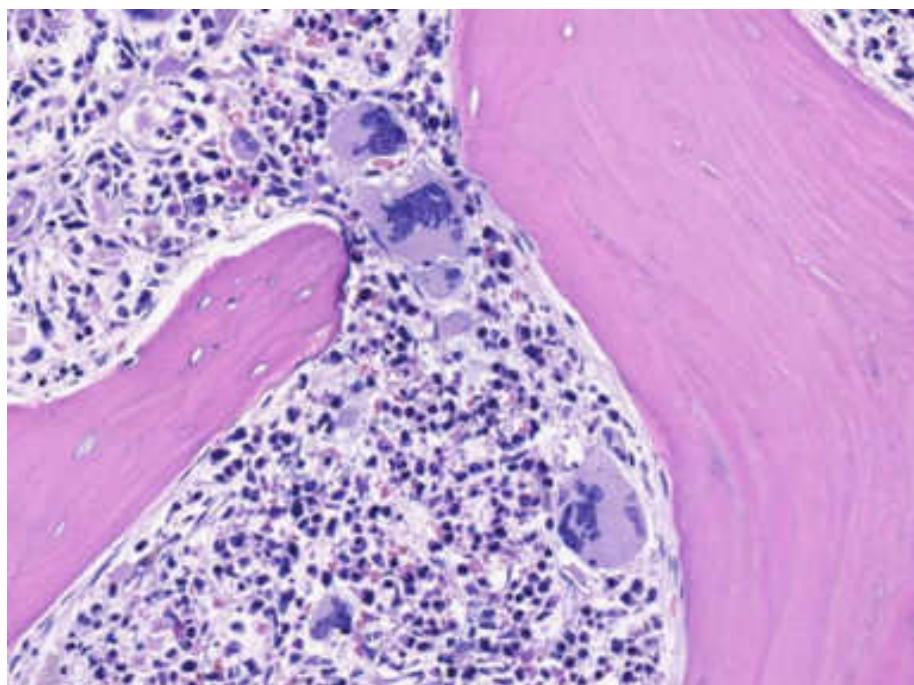


Рисунок 58 – Первичный миелофиброз, фибротическая стадия. Перитрабекулярно расположенные мегакариоциты. Окраска азуром II и эозином, $\times 300$

Представленное в этой работе морфометрическое исследование мегакариоцитов в костном мозге больных первичным миелофиброзом и эссенциальной тромбоцитемией обнаружило статистически не значимые различия средних значений площади ядер, а также площади и периметра мегакариоцитов. Полученные результаты имеют некоторые отличия от литературных данных. По сведениям ряда авторов, эссенциальная тромбоцитемия характеризуется наибольшим средним размером мегакариоцитов в костном мозге в сравнении с первичным миелофиброзом [78]. Наличие статистически незначимых различий размеров мегакариоцитов в представленном исследовании может быть связано с ограниченным количеством клеток, анализируемых в каждом отдельном случае, – сто объектов, при среднем количестве (стандартное отклонение) мегакариоцитов в одном гистологическом препарате – 774,2 (516,5).

Полученные результаты морфометрического анализа подтверждают данные литературы об особенностях строения ядер мегакариоцитов у больных первичным миелофиброзом и эссенциальной тромбоцитемией. У больных первичным миелофиброзом ядра имели более округлую форму, о чем свидетельствуют средние значения периметра и коэффициента кривизны (Рисунки 59, 60).

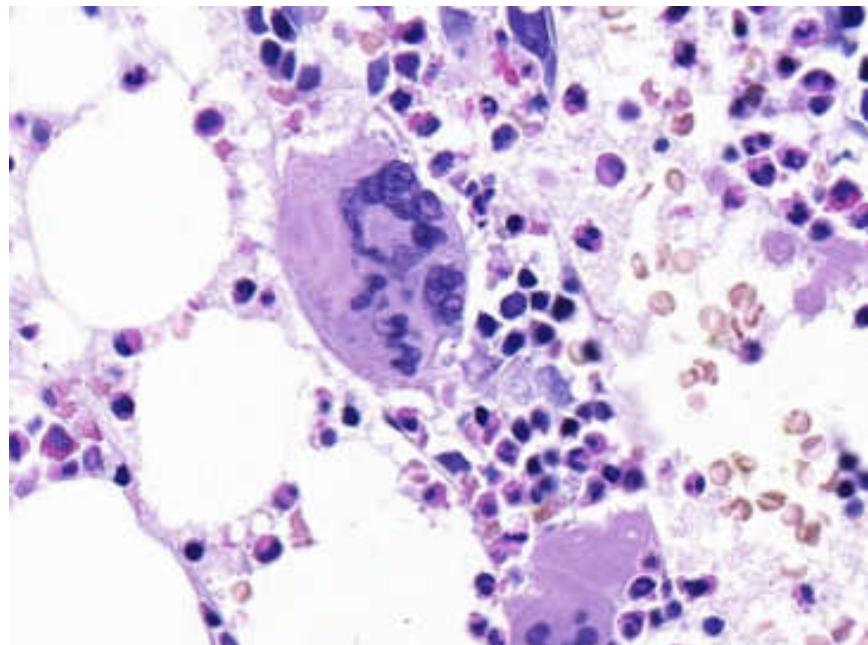


Рисунок 59 – Эссенциальная тромбоцитемия. Мегакариоцит с гиперлобулярным ядром.
Окраска азуром II и эозином, $\times 600$

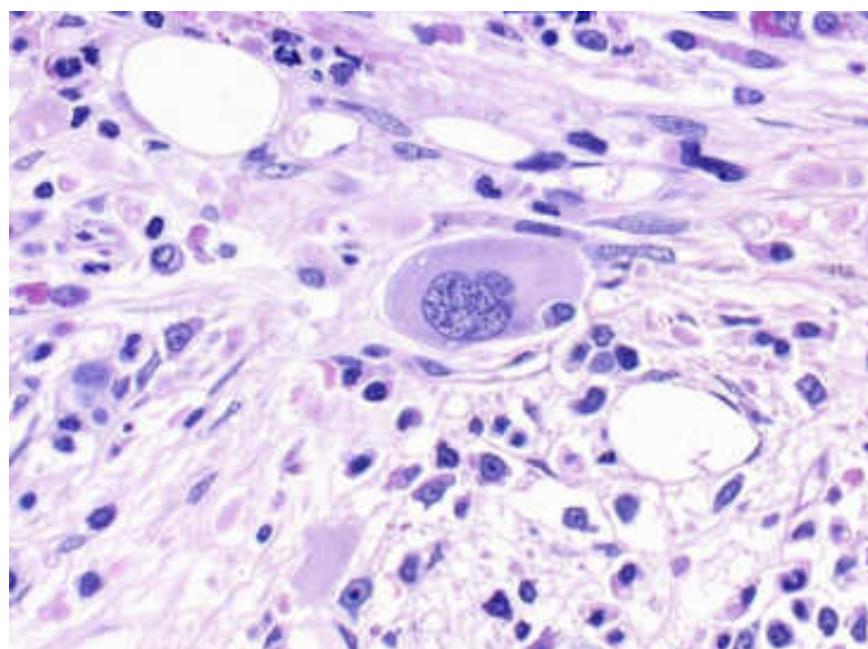


Рисунок 60 – Первичный миелофиброз, фибротическая стадия. Мегакариоцит с гиполобулярным ядром. Окраска азуром II и эозином, $\times 600$

Разграничение включенных в работу пациентов на четыре группы в зависимости от типа драйверной мутации продемонстрировало, что мегакариоциты в костном мозге больных с мутацией в гене *CALR* имеют более извивные контуры, на что указывают средние значения периметра и коэффициента кривизны ядра. Наиболее выраженную гиперлобулярность ядер обнаруживали в группе *CALR*-позитивных больных эссенциальной тромбоцитемией. Обнаруженные изменения строения ядер мегакариоцитов в зависимости от типа драйверной мутации отражают влияние мутационного статуса на фенотип опухоли.

Деление больных первичным миелофиброзом на две группы в зависимости от стадии заболевания обнаружило изменение строения ядер мегакариоцитов в фибротической стадии. В стадии миелофиброза ядра мегакариоцитов приобретали более выраженные черты гиперлобулярности, контуры ядер были более извивными, что подтверждают изменения средних значений коэффициента кривизны ядер мегакариоцитов (Рисунки 61, 62).

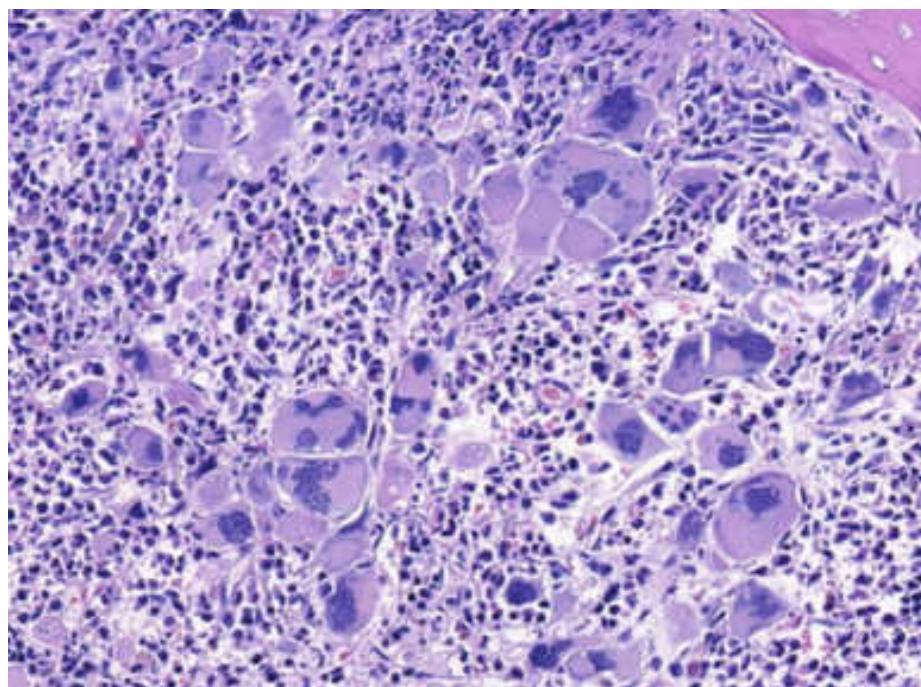


Рисунок 61 – Первичный миелофиброз, фибротическая стадия. Крупные плотные скопления мегакариоцитов с признаками выраженной атипии.

Окраска азуром II и эозином, $\times 300$

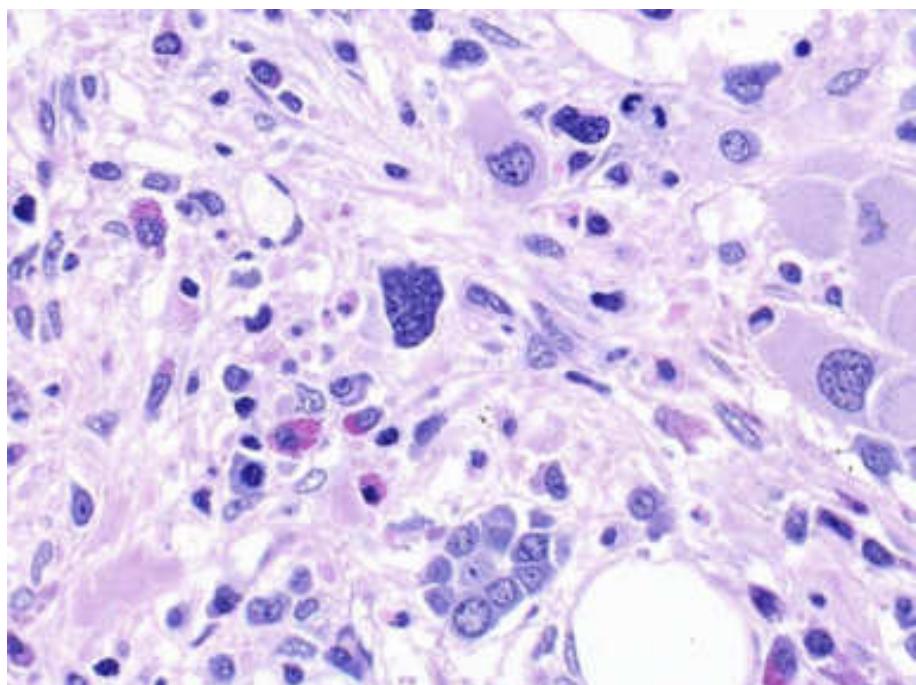


Рисунок 62 – Первичный миелофиброз, фибротическая стадия. «Голое ядро» мегакариоцита. Окраска азуром II и эозином, $\times 600$

Несмотря на то, что обнаруженные различия строения мегакариоцитов в зависимости от заболевания и мутационного профиля были статистически значимыми, они не могут считаться практически значимыми, так как столь малую разницу значений этих показателей можно обнаружить только с использованием морфометрического метода анализа.

Для более детальной интерпретации и объяснения содержательной сути изменений мегакариоцитарного ростка у больных первичным миелофиброзом и эссенциальной тромбоцитемией был использован метод главных компонент [7; 70]. Главная цель метода главных компонент заключается в понижении размерности исходных данных путем извлечения признаков. Результатом служит построенное пространство признаков, которое имеет ту же размерность, что и исходные данные. Для ответа на вопрос: «Возможна ли дифференциальная диагностика первичного миелофиброза и эссенциальной тромбоцитемии на основе данных гистотопографического и морфометрического анализа мегакариоцитарного ростка?» полученные в этой работе значения первых двух главных компонент были использованы для построения модели логистической регрессии. Модель

логистической регрессии продемонстрировала 78% точность правильного распознавания диагноза, что свидетельствует о хорошем качестве модели и доказывает возможность морфологической дифференциальной диагностики на основе изученных показателей.

Анализ групп пациентов, разделенных в зависимости от мутационного статуса, показал, что пересечение случаев первичного миелофиброза и эссенциальной тромбоцитемии в двухмерном пространстве, образованном первыми двумя главными компонентами, происходит преимущественно за счет больных эссенциальной тромбоцитемией с мутацией в гене *CALR*. Это означает, что характеристики пространственного расположения мегакариоцитов и особенности их строения у больных эссенциальной тромбоцитемией с мутацией в гене *CALR* имеют наибольшее сходство с первичным миелофиброзом в префибротической стадии, что демонстрируют результаты проведенного нами гистотопографического анализа. Поэтому возможности морфологической дифференциальной диагностики *CALR*-позитивных случаев первичного миелофиброза и эссенциальной тромбоцитемии могут быть ограничены или даже невозможны без катамнестических сведений и детального анализа клинико-лабораторных показателей.

Полученные в представленной работе результаты имеют ряд ограничений. В проведенном исследовании сравнительный анализ *JAK2*+ и *CALR*+ случаев выполняли без учета величины аллельной нагрузки. Еще одно ограничение в выполненное исследование вносит отсутствие разделения пациентов с подтвержденной мутацией в гене *CALR* на случаи с мутацией типа 1 (del52) и мутацией типа 2 (ins5).

Для поиска дополнительных морфологических дифференциально-диагностических критериев первичного миелофиброза и эссенциальной тромбоцитемии было выполнено иммуногистохимическое исследование с антителами к CD42b (клон EP409). В отсканированных гистологических препаратах костного мозга отбирали 10 полей зрения с наибольшей плотностью расположения мегакариоцитов. Количественный подсчет и морфометрическую

оценку значений площади и периметра мегакариоцитов проводили в два этапа: вручную – на первом этапе и полуавтоматически с использованием программного алгоритма *ilastik* на втором этапе. Проведенный анализ мегакариоцитарного ростка, окрашенного в реакции с антителами к CD42b, обнаружил за счет лучшей визуализации увеличение в 3–4 раза количества мегакариоцитов в участках их наибольшего скопления в сравнении со средней плотностью расположения мегакариоцитов в препаратах костного мозга, окрашенных гематоксилином и эозином или азуром и эозином. Полученные в этой работе результаты подтверждают сведения J. Thiele и соавт. о том, что применение иммуногистохимического метода увеличивает количество обнаруженных мегакариоцитов более чем вдвое [177].

Проведенная у больных первичным миелофиброзом и эссенциальной тромбоцитемией сравнительная оценка количества мегакариоцитов в поле зрения, среднего значения их площадей и периметров продемонстрировала наличие статистически значимых различий. В участках наибольшей клеточности миелоидной ткани у больных первичным миелофиброзом определяли увеличение количества и размеров мегакариоцитов в сравнении со случаями эссенциальной тромбоцитемии. Основная задача анализа гистологических препаратов костного мозга, окрашенных в реакции с антителами к CD42b, заключалась в поиске морфологических признаков, подходящих для дифференциальной диагностики. С этой целью была построена модель логистической регрессии, точность которой достигла 76,85%. Анализ ROC-кривой позволил рассчитать пороговые значения размеров мегакариоцитов, а также их количества в поле зрения, позволяющие дифференцировать первичный миелофиброз и эссенциальную тромбоцитемию. Например, при диаметре поля зрения микроскопа 0,55 мм и увеличении ×400 обнаружение в наиболее информативных участках миелоидной ткани более 40 мегакариоцитов в одном поле зрения свидетельствует в пользу первичного миелофиброза (Рисунки 63, 64).

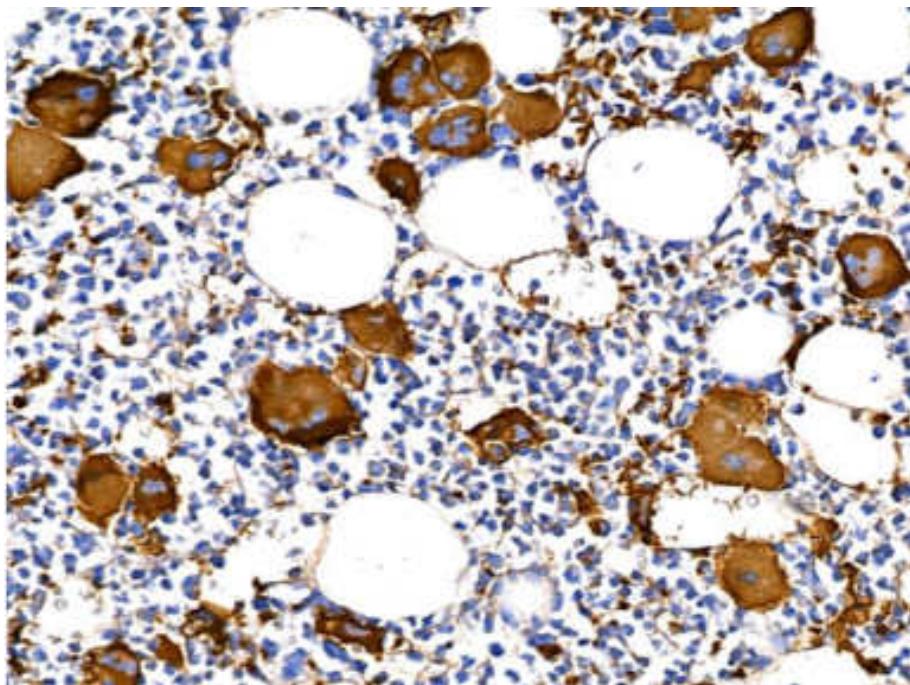


Рисунок 63 – Эссенциальная тромбоцитемия. Мегакариоциты, формирующие рыхлые скопления, маркированы антителами к CD42b, $\times 300$

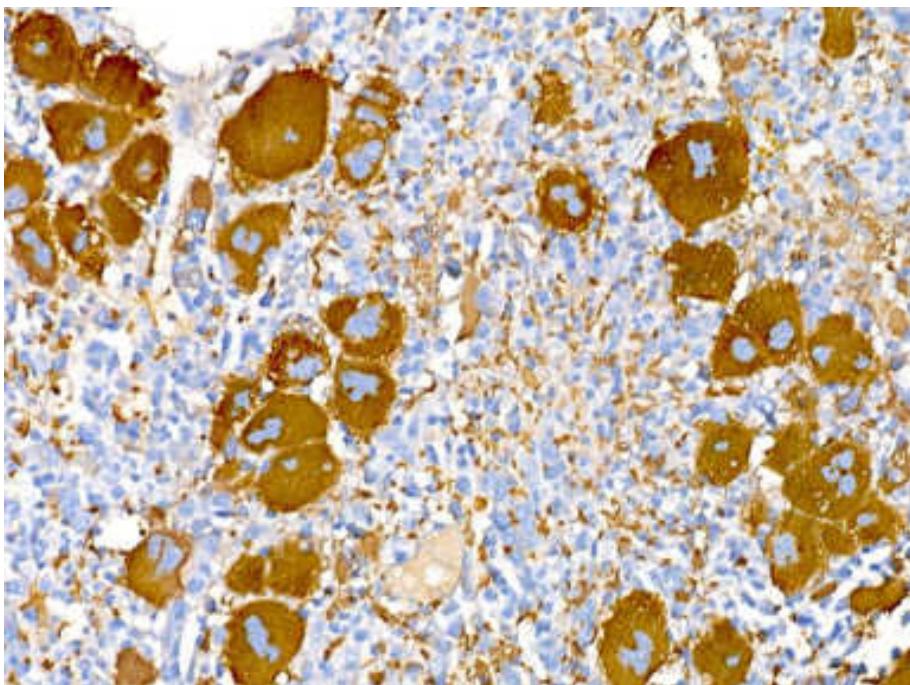


Рисунок 64 – Первичный миелофиброз, префибротическая стадия. Формирующие плотные скопления мегакариоциты и многочисленные тромбоциты маркированы антителами к CD42b, $\times 300$

Ограничениями предложенного метода служат размеры препарата, а также особенности гистологической обработки трепанобиоптатов костного мозга, влияющие на характер имmunогистохимического окрашивания. Диагностические пороговые значения количества CD42b-позитивных мегакариоцитов в одном поле зрения при увеличении $\times 400$ представлены в Таблице 22. Визуальная оценка врачом-патологоанатомом размеров мегакариоцитов, экспрессирующих CD42b, в гистологическом препарате не может рассматриваться в качестве воспроизводимого диагностического признака в практической работе, так как трудоемка и требует наличия окулярной морфометрической сетки или окулярной измерительной линейки.

В связи с трудоемкостью мануального морфометрического анализа (4–6 минут на одно поле зрения площадью $0,1 \text{ мм}^2$), в программном обеспечении *ilastik* был разработан классификатор пикселей и объектов, способный полуавтоматически идентифицировать мегакариоциты. Точность и полнота классификатора составили 79,5% и 77,3%, соответственно при значительно большей скорости обработки одного поля зрения (30 секунд). Субоптимальные характеристики алгоритма были связаны с неправильным выделением отдельных мегакариоцитов в плотных кластерах – ложноотрицательные решения. Ложноположительные решения классификатора пикселей и объектов наблюдали при интенсивном фоновом окрашивании. Таким образом, использование программного обеспечения *ilastik* для полуавтоматического выделения мегакариоцитов, экспрессирующих CD42b, имеет преимущества и недостатки. Преимуществом служит скорость работы, недостатки заключаются в невозможности 100% точного выделения требуемых объектов в поле зрения. Проведенный анализ работы программного обеспечения *ilastik* обосновывает его использование для разведочного анализа участков интереса с целью поиска патоморфологических феноменов и дальнейшего уточнения характеристик наблюдаемых изменений врачом-патологоанатомом вручную.

Подводя итоги, следует отметить, что возможности гистологического исследования костного мозга в дифференциальной диагностике первичного

миелофиброза и эссенциальной тромбоцитемии ограничены. Результаты этой работы демонстрируют наличие большого количества патоморфологических признаков, позволяющих отличить эти две болезни: клеточность костного мозга, лейкоэритробластическое соотношение, степень выраженности ретикулинового и коллагенового фиброза, пространственные особенности расположения мегакариоцитов, особенности строения их ядер и др. Являясь статистически значимыми, многие из представленных показателей не могут считаться значимыми диагностически, так как практически не различимы глазом врача-патологоанатома при микроскопическом исследовании. Гистологическое сходство гистотопографических и морфометрических особенностей мегакариоцитарного ростка, субъективность оценки полукачественных показателей состояния миелоидной ткани демонстрируют необходимость изучения дополнительных методов визуализации ростков гемопоэза с целью их дальнейшего внедрения в практическую работу, а также использования программных алгоритмов, позволяющих объективизировать наблюдаемые патоморфологические изменения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В представленной диссертационной работе впервые выполнен комплексный анализ морфологических и гистотопографических особенностей мегакариоцитов в костном мозге при первичном миелофиброзе и эссенциальной тромбоцитемии с учётом молекулярно-генетического статуса. Продемонстрирована высокая диагностическая значимость таких клинико-лабораторных признаков, как тромбоцитоз, лейкоцитоз и спленомегалия, которые позволяют заподозрить первичный миелофиброз уже на этапе первичного обследования. Установлено, что совокупная оценка этих признаков в сочетании с результатами патоморфологических и иммуногистохимических исследований существенно повышает точность дифференциации первичного миелофиброза и эссенциальной тромбоцитемии.

Проведённый анализ гистотопографических и морфометрических параметров продемонстрировал, что пространственная организация мегакариоцитарных кластеров может рассматриваться как воспроизводимый и объективный морфологический критерий для патоморфологической дифференциальной диагностики указанных заболеваний. В ходе исследования была обоснована высокая информативность гистотопографических аномалий мегакариоцитарного ростка по сравнению с оценкой морфологических и морфометрических характеристик мегакариоцитов и их ядер, что особенно важно в условиях вариабельности гистологических изменений костного мозга.

Иммуногистохимическое исследование мегакариоцитарного ростка в трепанобиоптатах костного мозга, окрашенных в реакции с антителами к CD42b, позволило не только объективизировать количественные и морфометрические характеристики мегакариоцитов, но и выявить значимые различия между первичным миелофиброзом и эссенциальной тромбоцитемией ($AUC = 0,84$, 95% ДИ 0,7782–0,9199). Включение предложенного метода в диагностический алгоритм позволяет повысить надёжность патоморфологической верификации, в том числе в сложных диагностических случаях, и обосновывает его использование

в рутинной патоморфологической практике при диагностике миелопролиферативных новообразований.

Анализ клинико-лабораторных и морфологических проявлений первичного миелофиброза и эссенциальной тромбоцитемии в зависимости от драйверных мутаций продемонстрировал выраженные различия между *JAK2*-позитивными и *CALR*-позитивными случаями, что отражает фенотипическую гетерогенность этих нозологических форм. Случаи с мутацией в гене *CALR* характеризуются более выраженной гиперплазией мегакариоцитарного ростка и формированием крупных скоплений мегакариоцитов, а также более молодым возрастом пациентов и более высоким количеством тромбоцитов в крови. В диссертационной работе убедительно показана обоснованность комплексного подхода, интегрирующего клинико-лабораторные, морфологические, гистотопографические, иммуногистохимические и молекулярно-генетические данные.

Оценка морфологических характеристик ядер мегакариоцитов подтвердила, что, несмотря на статистически значимые различия между группами, их выраженность минимальна и выявляется в основном морфометрическими методами, что ограничивает использование оценки ядерной атипии в качестве самостоятельного объективного критерия для дифференциальной диагностики первичного миелофиброза и эссенциальной тромбоцитемии.

Таким образом, полученные результаты расширяют современные представления о возможностях патоморфологической диагностики Ph-негативных миелопролиферативных новообразований, подчёркивают диагностическую ценность гистотопографической и иммуногистохимической оценки мегакариоцитарного ростка, а также подтверждают важность учёта молекулярного профиля заболевания. Предложенный комплексный подход способствует не только повышению точности дифференциальной диагностики первичного миелофиброза и эссенциальной тромбоцитемии, но и обладает выраженной прогностической значимостью, позволяя объективно оценивать риск и характер возможных осложнений у пациентов с Ph-негативными миелопролиферативными новообразованиями.

Внедрение методов искусственного интеллекта и машинного обучения в рутинную патоморфологическую практику с учётом результатов, полученных в диссертационном исследовании, открывает новые возможности для повышения точности дифференциальной диагностики Ph-негативных миелопролиферативных новообразований. Представленные морфометрические и гистотопографические характеристики, несмотря на их статистическую значимость, часто остаются недостаточно заметными или субъективно интерпретируемыми при традиционном микроскопическом анализе. Настоящее работа создаёт важный задел и методологический фундамент для разработки инструментов искусственного интеллекта, способных выявлять структурные и пространственные паттерны, неуловимые для человеческого зрения и восприятия. Внедрение технологий искусственного интеллекта на основе полученных в диссертационной работе данных способно повысить объективность и воспроизводимость результатов патоморфологического исследования, что существенно улучшит достоверность диагностических решений у пациентов с Ph-негативными миелопролиферативными новообразованиями.

ВЫВОДЫ

1. Выраженность тромбоцитоза, лейкоцитоза в общем анализе крови, а также наличие спленомегалии по данным инструментального исследования (35% случаев первичного миелофиброза и 8,5% случаев эссенциальной тромбоцитемии, $p = 0,0004$) служат дифференциально-диагностическими признаками первичного миелофиброза и эссенциальной тромбоцитемии.

2. В дифференциальной диагностике первичного миелофиброза и эссенциальной тромбоцитемии оценка гистотопографических характеристик мегакариоцитарного ростка имеет больший диагностический вес, чем анализ особенностей строения мегакариоцитов и их ядер. Анализ аномалий мегакариоцитарного ростка в совокупности с изменениями клеточности костного мозга, лейкоэритробластического соотношения, степени выраженности ретикулинового и коллагенового фиброза, остеосклероза позволяют разграничить эти два заболевания (процент корректных предсказаний на основе переменных, включенных в модель логистической регрессии – 78,0%, $p = 0,0001$).

3. Иммуногистохимический метод исследования биоптатов костного мозга у пациентов с первичным миелофиброзом и эссенциальной тромбоцитемией с использованием антител к CD42b показал различия количественных и размерных характеристик мегакариоцитов. ROC-анализ ($AUC = 0,84$, 95% ДИ 0,7782–0,9199) обосновывает включение этих параметров в дифференциально-диагностическую панель в качестве дополнительного критерия.

4. Влияние драйверных мутаций в гене *JAK2* или *CALR* на клинико-лабораторные показатели, особенности гистологического строения костного мозга, в частности пространственные особенности расположения мегакариоцитарного ростка, требует учета мутационного статуса при оценке гистологических изменений костного мозга у больных первичным миелофиброзом и эссенциальной тромбоцитемией.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Гистологическое исследование костного мозга у больных первичным миелофиброзом и эссенциальной тромбоцитемией следует проводить с учетом результатов молекулярно-генетического исследования.

2. Патоморфологическую дифференциальную диагностику первичного миелофиброза и эссенциальной тромбоцитемии необходимо выполнять в несколько этапов: в первую очередь оценить основные характеристики миелоидной ткани: клеточность костного мозга и лейкоэритробластическое соотношение. На втором этапе с помощью гистохимических методов окрашивания определить степень выраженности ретикулинового и коллагенового фиброза. Анализ изменений мегакариоцитарного ростка рекомендуется проводить в последнюю очередь – это связано с его комплексностью и субъективностью.

3. В случаях, когда результаты анализа изменений мегакариоцитарного ростка не позволяют принять однозначного решения в пользу первичного миелофиброза или эссенциальной тромбоцитемии, большее диагностическое значение следует придавать гистотопографическим характеристикам мегакариоцитарного ростка: количеству мегакариоцитов в поле зрения, числу мегакариоцитов в кластере, доле перитрабекулярно расположенных мегакариоцитов.

4. В качестве дополнительного дифференциально-диагностического признака первичного миелофиброза и эссенциальной тромбоцитемии рекомендовано использование иммуногистохимических методов исследования в срезах костного мозга для окрашивания мегакариоцитов и анализа их количества в полях зрения с наибольшей плотностью расположения.

5. Морфологическую дифференциальную диагностику *CALR*-позитивных случаев эссенциальной тромбоцитемии и первичного миелофиброза в префибротической стадии следует проводить с учетом катамнестических сведений и клинико-лабораторных показателей, что связано со сходными изменениями мегакариоцитарного ростка в биоптатах костного мозга.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Достижения в области анализа изображений, а также развитие искусственного интеллекта открывают новые возможности для поиска дифференциально значимых патоморфологических аномалий в тканях. Объективизация и стандартизация в трепанобиоптатах костного мозга характеристик ростков гемопоэза, качественный и количественный анализ особенностей гистоархитектоники костной и миелоидной ткани, с учетом анамнестических сведений и клинико-лабораторной информации, позволяют облегчить диагностическую задачу для врача-патологоанатома, а также улучшить воспроизводимость межисследовательского согласия.

Целесообразность разработки программных алгоритмов для оценки изменений в костном мозге у больных миелопролиферативными новообразованиями связана с тем, что для постановки диагноза в большинстве случаев достаточны гистологические препараты, окрашенные гематоксилином и эозином / азуром II и эозином, а также отсутствует необходимость выполнения иммуногистохимического исследования. Импрегнация солями серебра по Гордону–Свиту, окраска трихромовым методом по Массону предоставляют врачу-патологоанатому дополнительную информацию для патоморфологического стадирования, но в формировании диагностического мнения служат, скорее, вспомогательным элементом.

Выполненные в представленной работе морфометрическая и гистотопографическая оценка цифровых копий трепанобиоптатов костного мозга могут быть использованы в разработке новых методов анализа гистологических препаратов с помощью машинного обучения, например обучения глубоких нейронных сетей задачам семантической сегментации и/или детекции.

Разнообразие доступных для анализа патоморфологических изменений в костном мозге у больных миелопролиферативными новообразованиями, а также отсутствие необходимости сравнительной микроскопической оценки гистологических и иммуногистохимических препаратов – факторы, облегчающие

практическую реализацию технологий компьютерного зрения. Ограничительными факторами следует считать артефакты гистологической обработки трепанобиоптатов костного мозга. Сложность техники гистологической обработки костного мозга связана с отсутствием стандартизации и систематического контроля качества преаналитического и аналитического этапов. Субоптимальные режимы фиксации, декальцинации, обезвоживания и пропитывания парафином образцов, дефекты микротомии и окрашивания приводят к появлению артефактов, влияющих на интерпретацию микроскопической картины и, следовательно, на способность программного алгоритма распознавать и оценивать анализируемые параметры.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВОЗ	Всемирная организация здравоохранения
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
ЛДГ	лактатдегидрогеназа
ПМФ	первичный миелофиброз
префибр	префибротическая стадия первичного миелофиброза
ПЦР	полимеразная цепная реакция
фибр	фибротическая стадия первичного миелофиброза
СО	стандартное отклонение
ХМЛ	хронический миелоидный лейкоз
ЭТ	эссенциальная тромбоцитемия
AUC	площадь под кривой ROC (Area Under the Curve)
<i>BCR::ABL1</i>	гибридный ген, образующийся при транслокации <i>t(9;22)</i> , кодирующий онкогенный белок с тирозинкиназной активностью
<i>CALR</i>	ген кальретикулина
CD	клuster дифференцировки (Cluster of Differentiation)
Coll	степень выраженности коллагенового фиброза
DIPSS	динамическая международная прогностическая шкала для первичного миелофиброза (Dynamic International Prognostic Scoring System for Primary Myelofibrosis)
IPSET	международная прогностическая шкала риска для эссенциальной тромбоцитемии (International Prognostic Score for Essential Thrombocythemia)
IPSS	международная прогностическая шкала для первичного миелофиброза (International Prognostic Scoring System for Primary Myelofibrosis)
<i>JAK2</i>	ген янус-киназы второго типа
MF	степень выраженности ретикулинового фиброза

<i>MPL</i>	ген тромбопоэтинового рецептора
Os	степень выраженности остеосклероза
Ph	филадельфийская хромосома
ROC-анализ	анализ рабочей характеристики приемника (Receiver Operating Characteristic)
VAF	частота мутантного аллеля (Variant Allele Frequency)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абдулкадыров, К.М. Миелопролиферативные новообразования / К.М. Абдулкадыров, В.А. Шуваев, И.С. Мартынкевич. М.: Литтерра, 2016. 298 с.
2. Исследование системы крови в клинической практике / Г.И. Козинец, Ю.С. Арутюнян, Г.Д. Ашурев [и др.] // Триада-Х. 1997. С. 120–149.
3. Ковригина, А.М. Патоморфологическая дифференциальная диагностика первичного миелофиброза: Учебное пособие / А.М. Ковригина, В.В. Байков М., СПб.: [б. и.], 2014. С. 27–34.
4. Криволапов, Ю.А. Биопсии костного мозга / Ю.А. Криволапов. М.: Практическая медицина, 2014. С. 189–201.
5. Лэнг, Т.А. Как описывать статистику в медицине: руководство для авторов, редакторов и рецензентов / Т.А. Лэнг, М. Сесик; пер. с англ. под ред. В.П. Леонова. М.: Практическая медицина, 2011. 477 с.: ил., табл.; 24 см.
6. Национальные клинические рекомендации по диагностике и лечению Ph-негативных миелопролиферативных заболеваний (истинной полицитемии, эссенциальной тромбоцитемии, первичного миелофиброза) (редакция 2024 г.). / А.Л. Меликян, И.Н. Суборцева, А.М. Ковригина [и др.] // Клиническая онкогематология. 2024. Т. 17, № 3. С. 291–334. doi: 10.21320/2500-2139-2024-17-3-291-334.
7. Нохрин, Д.Ю. Лабораторный практикум по биостатистике / Д.Ю. Нохрин. Челябинск: Изд-во Челябинского государственного университета, 2018. 289 с. (Классическое университетское образование).
8. Трухачёва, Н.В. Математическая статистика в медико-биологических исследованиях с применением пакета Statistica / Н.В. Трухачёва. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. С. 83–95.
9. A dynamic prognostic model to predict survival in primary myelofibrosis: a study by the IWG-MRT (International Working Group for Myeloproliferative Neoplasms

- Research and Treatment) / F. Passamonti, F. Cervantes, A.M. Vannucchi [et al.] // Blood. 2010. Vol. 115. Is. 9. P. 1703–1708.
10. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders / R. Kralovics, F. Passamonti, A.S. Buser [et al.] // N. Engl. J. Med. 2005. Vol. 352. Is. 17. P. 1779–1790.
 11. A novel activating, germline JAK2 mutation, JAK2R564Q, causes familial essential thrombocytosis / S.L. Etheridge, M.E. Cosgrove, V. Sangkhae [et al.] // Blood. 2014. Vol. 123. Is. 7. P. 1059–1068.
 12. A prognostic model to predict survival in 867 World Health Organization-defined essential thrombocythemia at diagnosis: a study by the International Working Group on Myelofibrosis Research and Treatment / F. Passamonti, J. Thiele, F. Girodon [et al.] // Blood. 2012. Vol. 120. Is. 6. P. 1197–1201.
 13. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera / C. James, V. Ugo, J.P. Le Couédic [et al.] // Nature. 2005. Vol. 434. Is. 7037. P. 1144–1148.
 14. Accelerated Phase of Myeloproliferative Neoplasms / O.A. Shahin, H.T. Chifotides, P. Bose [et al.] // Acta Haematol. 2021. Vol. 144. Is. 5. P. 484–499.
 15. Acquired copy-neutral loss of heterozygosity of chromosome 1p as a molecular event associated with marrow fibrosis in MPL-mutated myeloproliferative neoplasms / E. Rumi, D. Pietra, P. Guglielmelli [et al.] // Blood. 2013. Vol. 121. Is. 21. P. 4388–4395.
 16. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders / E.J. Baxter, L.M. Scott, P.J. Campbell [et al.] // Lancet. 2005. Vol. 365. Is. 9464. P. 1054–1061.
 17. Acquisition of the V617F mutation of JAK2 is a late genetic event in a subset of patients with myeloproliferative disorders / R. Kralovics, S.S. Teo, S. Li [et al.] // Blood. 2006. Vol. 108. Is. 4. P. 1377–1380.
 18. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis / R.L. Levine, M. Wadleigh, J. Cools [et al.] // Cancer Cell. 2005. Vol. 7. Is. 4. P. 387–397.

19. An amphipathic motif at the transmembrane-cytoplasmic junction prevents autonomous activation of the thrombopoietin receptor / J. Staerk, C. Lacout, T. Sato [et al.] // *Blood*. 2006. Vol. 107. Is. 5. P. 1864–1871.
20. Analysis of phenotype and outcome in essential thrombocythemia with CALR or JAK2 mutations / C. Al Assaf, F. Van Obbergh, J. Billiet [et al.] // *Haematologica*. 2015. Vol. 100. Is. 7. P. 893–897.
21. Appleby, N. Clinical and laboratory assessment of a patient with thrombocytosis / N. Appleby, D. Angelov // *Br. J. Hosp. Med. (Lond)*. 2017. Vol. 78. Is. 10. P. 558–564.
22. Askanazy, M. Ueber extrauterine Bildung von Blutzellen in der Leber / M. Askanazy // *Verh. Dtsch. Pathol. Ges.* 1904. Vol. 7. P. 58–65.
23. Assmann, H. Beitrage zur osteosklerotischen anamie / H. Assmann // *Beitr. Pathol. Anat. Allgemeinen Pathologie (Jena)*. 1907. Vol. 41. P. 565–595.
24. Barosi, G. Essential thrombocythemia vs. early/prefibrotic myelofibrosis: why does it matter / G. Barosi // *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 2014. Vol. 27. Is. 2. P. 129–140.
25. Barosi, G. Idiopathic myelofibrosis / G. Barosi, R. Hoffman // *Semin. Hematol.* 2005. Vol. 42 Is. 4. P. 248–258.
26. Bone marrow CD34+ progenitor cells in Philadelphia chromosome-negative chronic myeloproliferative disorders – a clinicopathological study on 575 patients / J. Thiele, H.M. Kvasnicka, V. Diehl [et al.] // *Leuk. Lymphoma*. 2005. Vol. 46. Is. 5. P. 709–715.
27. Bone marrow fibrosis grade is an independent risk factor for overall survival in patients with primary myelofibrosis / B. Li, P. Zhang, G. Feng [et al.] // *Blood Cancer Journal*. 2016. Vol. 6. Is. 12. P. 505–510.
28. Bone marrow fibrosis in myelofibrosis: pathogenesis, prognosis and targeted strategies / A.A. Zahr, M.E. Salama, N. Carreau [et al.] // *Haematologica*. 2016. Vol. 101. Is. 6. P. 660–671.

29. Bone marrow histopathology in myeloproliferative disorders – current diagnostic approach / J. Thiele, H.M. Kvasnicka, A. Orazi [et al.] // *Semin. Hematol.* 2005. Vol. 42. Is. 4. P. 184–195.
30. Bone marrow megakaryocytic activation predicts fibrotic evolution of Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms / M. Schino, V. Fiorentino, E. Rossi [et al.] // *Haematologica*. 2021. Vol. 106. Is. 12. P. 3162–3169.
31. Bone marrow microvessel density in chronic myeloproliferative disorders: a study of 115 patients with clinicopathological and molecular correlations / E. Boveri, F. Passamonti, E. Rumi [et al.] // *Br. J. Haematol.* 2008. Vol. 140. Is. 2. P. 162–168.
32. Bone marrow pathology in essential thrombocythemia: interobserver reliability and utility for identifying disease subtypes / B.S. Wilkins, W.N. Erber, D. Bareford [et al.] // *Blood*. 2008. Vol. 111. Is. 1. P. 60–70.
33. Brown, D.C. The bone marrow trephine biopsy: a review of normal histology / D.C. Brown, K.C. Gatter // *Histopathology*. 1993 May. Vol. 22. Is. 5. P. 411–422. doi: 10.1111/j.1365-2559.1993.tb00154.x.
34. Buhr, T. Myelofibrosis in chronic myeloproliferative disorders. Incidence among subtypes according to the Hannover Classification / T. Buhr, A. Georgii, H. Choritz // *Pathol. Res. Pract.* 1993. Vol. 189. Is. 2. P. 121–132.
35. CALR vs JAK2 vs MPL-mutated or triple-negative myelofibrosis: clinical, cytogenetic and molecular comparisons / A. Tefferi, T.L. Lasho, C.M. Finke [et al.] // *Leukemia*. 2014. Vol. 28. Is. 7. P. 1472–1477.
36. Calreticulin mutants in mice induce an MPL-dependent thrombocytosis with frequent progression to myelofibrosis / C. Marty, C. Pecquet, H. Nivarthi [et al.] // *Blood*. 2016. Vol. 127. Is. 10. P. 1317–1324.
37. Calreticulin mutation profile in Indian patients with primary myelofibrosis / S. Sazawal, N. Singh, M. Mahapatra [et al.] // *Hematology*. 2015. Vol. 20. Is. 10. P. 567–570.
38. Calreticulin variant stratified driver mutational status and prognosis in essential thrombocythemia / Y.C. Elala, T.L. Lasho, N. Gangat [et al.] // *Am. J. Hematol.* 2016. Vol. 91. Is. 5. P. 503–506.

39. Cervantes, F. Myelofibrosis with myeloid metaplasia: diagnosis, prognostic factors, and staging / F. Cervantes, G. Barosi // *Semin Oncol.* 2005. Vol. 32. Is. 4. P. 395–402.
40. Chachoua, I. Thrombopoietin receptor activation by myeloproliferative neoplasm associated calreticulin mutants / I. Chachoua, C. Pecquet, M. El-Khoury // *Blood.* 2016. Vol. 127. Is. 10. P. 1325–1335.
41. Changes in the incidence and overall survival of patients with myeloproliferative neoplasms between 2002 and 2016 in the United States / S. Verstovsek, J. Yu, R.M. Scherber [et al.] // *Leuk Lymphoma.* 2022. Vol. 63. Is. 3. P. 694–702.
42. Classification and Personalized Prognosis in Myeloproliferative Neoplasms / J. Grinfeld, J. Nangalia, E. J. Baxter [et al.] // *N. Engl. J. Med.* 2018. Vol. 379. Is. 15. P. 1416–1430.
43. Clinical characteristics, prognosis and treatment of myelofibrosis patients with severe thrombocytopenia / J.C. Hernández-Boluda, J.G. Correa, A. Alvarez-Larrán [et al.] // *Br. J. Haematol.* 2018. Vol. 181. Is. 3. P. 397–400.
44. Clinical effect of driver mutations of JAK2, CALR, or MPL in primary myelofibrosis / E. Rumi, D. Pietra, C. Pascutto [et al.] // *Blood.* 2014. Vol. 124. Is. 7. P. 1062–1069.
45. Clonal analysis of TET2 and JAK2 mutations suggests that TET2 can be a late event in the progression of myeloproliferative neoplasms / F.X. Schaub, R. Looser, S. Li [et al.] // *Blood.* 2010. Vol. 115. Is. 10. P. 2003–2007.
46. Clonal evolution and clinical correlates of somatic mutations in myeloproliferative neoplasms / P. Lundberg, A. Karow, R. Nienhold [et al.] // *Blood.* 2014. Vol. 123. Is. 14. P. 2220–2228.
47. Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes / D.P. Steensma, R. Bejar, S. Jaiswal [et al.] // *Blood.* 2015. Vol. 126. Is. 1. P. 9–16.
48. Clonal history of a cord blood donor cell leukemia with prenatal somatic JAK2 V617F mutation / P. Hirsch, A.C. Mamez, R. Belhocine [et al.] // *Leukemia.* 2016. Vol. 30. Is. 8. P. 1756–1759.

49. Cole, S.R. Estimation of cumulative odds ratios / S.R. Cole, P.D. Allison, C.V. Ananth // *Ann. Epidemiol.* 2004. Vol. 14. Is. 3. P. 172–178.
50. Dameshek, W. Some speculations on the myeloproliferative syndromes [editorial] / W. Dameshek // *Blood*. 2016. Vol. 127. Is. 6. P. 659–663.
51. Darnell, J.E. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins / J.E. Darnell, I.M. Kerr, G.R. Stark // *Science*. 1994. Vol. 264. Is. 5164. P. 1415–1421.
52. Density-Based Clustering in Spatial Databases: The Algorithm GDBSCAN and Its Applications / J. Sander, M. Ester, H.P. Kriegel [et al.] // *Data Mining and Knowledge Discovery*. 1998. Vol. 2. Is. 2. P. 169–194.
53. Differential association of calreticulin type 1 and type 2 mutations with myelofibrosis and essential thrombocytemia: relevance for disease evolution / X. Cabagnols, J.P. Defour, V. Ugo [et al.]/ *Leukemia*. 2015. Vol. 29. Is. 1. P. 249–252.
54. Differential clinical effects of different mutation subtypes in CALR-mutant myeloproliferative neoplasms / D. Pietra, E. Rumi, V.V. Ferretti [et al.] // *Leukemia*. 2016. Vol. 30. Is. 2. P. 431–438.
55. DIPSS plus: a refined Dynamic International Prognostic Scoring System for primary myelofibrosis that incorporates prognostic information from karyotype, platelet count, and transfusion status / N. Gangat, D. Caramazza, R. Vaidya [et al.] // *J. Clin. Oncol.* 2011. Vol. 29. Is. 4. P. 392–397.
56. Distinct clinical characteristics of myeloproliferative neoplasms with calreticulin mutations / H. Andrikovics, T. Krahling, K. Balassa [et al.] // *Haematologica*. 2014. Vol. 99. Is. 7. P. 1184–1190.
57. Driver mutations and prognosis in primary myelofibrosis: Mayo-Careggi MPN alliance study of 1,095 patients / A. Tefferi, M. Nicolosi, M. Mudireddy [et al.] // *Am. J. Hematol.* 2018. Vol. 93. Is. 3. P. 348–355.
58. Early-stage idiopathic (primary) myelofibrosis – current issues of diagnostic features / J. Thiele, H.M. Kvasnicka, R. Zankovich [et al.] // *Leuk. Lymphoma*. 2002. Vol. 43. Is. 5. P. 1035–1041.

59. Effect of Mutation Order on Myeloproliferative Neoplasms / C.A. Ortmann, D.G. Kent, J. Nangalia [et al.] // New England Journal of Medicine. 2015. Vol. 372. Is. 7. P. 601–612.
60. Ellis, J.T. Myelofibrosis in the myeloproliferative disorders / J.T. Ellis, P. Peterson // Prog. Clin. Biol. Res. 1984. Vol. 154. P. 19–42.
61. Ellis, J.T. The bone marrow in polycythemia vera / J.T. Ellis, P. Peterson // Pathol. Annu. 1979. Vol. 14. Is. 1. P. 383–403.
62. Epidemiology of myelofibrosis, essential thrombocythemia, and polycythemia vera in the European Union / O. Moulard, J. Mehta, J. Fryzek [et al.] // Eur. J. Haematol. 2014. Vol. 92. Is. 4. P. 289–297.
63. Epstein, E.G.A. Hamorrhagische thrombozythämie bei vascularer schrumpfmilz (Hemorrhagic thrombocythemia with a vascular, sclerotic spleen) / E.G.A. Epstein // Virchows Archiv A Pathol Anat. Histopathology. 1934. Vol. 293. P. 233–248.
64. Essential thrombocythemia or chronic idiopathic myelofibrosis? A single-center study based on hematopoietic bone marrow histology / U. Gianelli, C. Vener, P.R. Raviele [et al.] // Leuk. Lymphoma. 2006. Vol. 47. Is. 9. P. 1774–1781.
65. Essential thrombocythemia versus early primary myelofibrosis: a multicenter study to validate the WHO classification / J. Thiele, H.M. Kvasnicka, L. Müllauer [et al.] // Blood. 2011. Vol. 117. Is. 21. P. 5710–5718.
66. Estimation of diagnosis and prognosis in ET by assessment of CALR and JAK2(V617F) mutations and laboratory findings: a meta-analysis / N. Saki, R. Shirzad, F. Rahim [et al.] // Clin. Transl. Oncol. 2017. Vol. 19. Is. 7. P. 874–883.
67. European Bone Marrow Working Group trial on reproducibility of World Health Organization criteria to discriminate essential thrombocythemia from prefibrotic primary myelofibrosis / T. Buhr, K. Hebeda, V. Kaloutsi [et al.] // Haematologica. 2012. Vol. 97. Is. 3. P. 360–365.
68. European consensus on grading bone marrow fibrosis and assessment of cellularity / J. Thiele, H.M. Kvasnicka, F. Facchetti [et al.] // Haematologica. 2005. Vol. 90. Is. 8. P. 1128–1132.

69. Evaluation and clinical correlations of bone marrow angiogenesis in myelofibrosis with myeloid metaplasia / R.A. Mesa, C.A. Hanson, S.V. Rajkumar [et al.] // Blood. 2000. Vol. 96. Is. 10. P. 3374–3380.
70. Everitt, B.S. Statistical aspects of the design and analysis of clinical trials / B.S. Everitt, A. Pickles. London: Imperial College Press; 1999.
71. Evidence for MPL W515L/K mutations in hematopoietic stem cells in primitive myelofibrosis / R. Chaligné, C. James, C. Tonetti [et al.] // Blood. 2007. Vol. 110. Is. 10. P. 3735–3743.
72. Evidence that essential thrombocythemia is a clonal disorder with origin in a multipotent stem cell / P.J. Fialkow, G.B. Faguet, R.J. Jacobson [et al.] // Blood. 1981. Vol. 58. Is. 5. P. 916–919.
73. Evolution of myelofibrosis in chronic idiopathic myelofibrosis as evidenced in sequential bone marrow biopsy specimens / T. Buhr, G. Büsche, H. Choritz [et al.] // Am. J. Clin. Pathol. 2003. Vol. 119. Is. 1. P. 152–158.
74. Familial essential thrombocythemia associated with a dominant-positive activating mutation of the c-MPL gene, which encodes for the receptor for thrombopoietin / J. Ding, H. Komatsu, A. Wakita [et al.] // Blood. 2004. Vol. 103. Is. 11. P. 4198–4200.
75. Finazzi, G. Essential thrombocythemia / G. Finazzi, C. Harrison // Semin. Hematol. 2005. Vol. 42. Is. 4. P. 230–238.
76. Fischer, J.E. A readers' guide to the interpretation of diagnostic test properties: clinical example of sepsis / J.E. Fischer, L.M. Bachmann, R. Jaeschke // Intensive Care Med. 2003. Vol. 29. Is. 7. P. 1043–1051.
77. Follow-up examinations including sequential bone marrow biopsies in essential thrombocythemia (ET): a retrospective clinicopathological study of 120 patients / J. Thiele, H.M. Kvasnicka, A. Schmitt-Graeff A. [et al.] // Am. J. Hematol. 2002. Vol. 70. Is. 4. P. 283–291.
78. Fox, N. Sampling and Sample Size Calculation. [Электронный ресурс] // National Institute for Health Research – URL: <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:18078987> (дата обращения: 15.11.2023)

79. Gender and survival in essential thrombocythemia: A two-center study of 1,494 patients / A. Tefferi, S. Betti, D. Barraco [et al.] // Am. J. Hematol. 2017. Vol. 92. Is. 11. P. 1193–1197.
80. Germline JAK2 mutation in a family with hereditary thrombocytosis / A.J. Mead, M.J. Rugless, S.E. Jacobsen [et al.] // N. Engl. J. Med. 2012. Vol. 366. Is. 10. P. 967–969.
81. Germ-line JAK2 mutations in the kinase domain are responsible for hereditary thrombocytosis and are resistant to JAK2 and HSP90 inhibitors / C. Marty, C. Saint-Martin, C. Pecquet [et al.] // Blood. 2014. Vol. 123. Is. 9. P. 1372–1383.
82. Goasguen, J.E. Quality control initiative on the evaluation of the dysmegakaryopoiesis in myeloid neoplasms: Difficulties in the assessment of dysplasia / J.E. Goasguen, J.M. Bennett, B.J. Bain // Leuk. Res. 2016. Vol. 45. P. 75–81.
83. Greenfield, G. Molecular pathogenesis of the myeloproliferative neoplasms / G. Greenfield, M.F. McMullin, K. Mills // J. Hematol. Oncol. 2021. Vol. 14. Is. 1. P. 100–103.
84. Harrison, C.N. Essential thrombocythemia / C.N. Harrison, A.R. Green // Hematol. Oncol. Clin. North Am. 2003. Vol. 17. Is. 5. P. 1175–1190.
85. Heuck, G. Zwei Fälle von Leukämie mit eigenthümlichem Blutresp. Knochenmarksbefund / G. Zwei Heuck // Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medicin. 1879. Vol. 78. Is. 3. P. 475–496.
86. Hinds, D.A. Germ line variants predispose to both JAK2 V617F clonal hematopoiesis and myeloproliferative neoplasms / D.A. Hinds, K.E. Barnholt, R.A. Mesa // Blood. 2016. Vol. 128. Is. 8. P. 1121–1128.
87. Histomorphometry of bone marrow biopsies in chronic myeloproliferative disorders with associated thrombocytosis – features of significance for the diagnosis of primary (essential) thrombocythaemia / J. Thiele, G. Schneider, B. Hoeppner [et al.] // Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol. 1988. Vol. 413. Is. 5. P. 407–417.

88. Homologous recombination of wild-type JAK2, a novel early step in the development of myeloproliferative neoplasm. / M. Vilaine, D. Olcaydu, A. Harutyunyan [et al.] // *Blood*. 2011 Vol. 118. Is. 24. P. 6468–6470.
89. How common are myeloproliferative neoplasms? A systematic review and meta-analysis / G.J. Titmarsh, A.S. Duncombe, M.F. McMullin [et al.] // *Am. J. Hematol.* 2014. Vol. 89. Is. 6. P. 581–587.
90. How, J. Mutant calreticulin in myeloproliferative neoplasms / J. How, G.S. Hobbs, A. Mullally // *Blood*. 2019. Vol. 134. Is. 25. P. 2242–2248.
91. Hussein, K. Conventional cytogenetics in myelofibrosis: literature review and discussion / K. Hussein, D.L. Van Dyke, A. Tefferi // *European Journal of Haematology*. 2009. Vol. 82. Is. 5. P. 329–338.
92. Idiopathic primary osteo-myelofibrosis: a clinico-pathological study on 208 patients with special emphasis on evolution of disease features, differentiation from essential thrombocythemia and variables of prognostic impact / J. Thiele, H.M. Kvasnicka, C. Werden [et al.] // *Leuk. Lymphoma*. 1996. Vol. 22. Is. 3. P. 303–317.
93. Ilastik: Interactive learning and segmentation toolkit / C. Sommer, C.N. Straehle, U. Köthe [et al.] // 2011 IEEE International Symposium on Biomedical Imaging: From Nano to Macro. 2011. P. 230–233.
94. Impact of calreticulin mutations on clinical and hematological phenotype and outcome in essential thrombocythemia / G. Rotunno, C. Mannarelli, P. Guglielmelli [et al.] // *Blood*. 2014. Vol. 123. Is. 10. P. 1552–1155.
95. Improved survival in patients with CALR1 compared to CALR2 mutated primary myelofibrosis: a meta-analysis / H.R. Kourie, L. Ameye, M. Paesmans [et al.] // *Br. J. Haematol.* 2017. Vol. 179. Is. 5. P. 846–848.
96. In essential thrombocythemia, multiple JAK2-V617F clones are present in most mutant-positive patients: a new disease paradigm / J.R. Lambert, T. Everington, D.C. Linch [et al.] // *Blood*. 2009. Vol. 114. Is. 14. P. 3018–3023.
97. Initial (latent) polycythemia vera with thrombocytosis mimicking essential thrombocythemia / J. Thiele, H.M. Kvasnicka, V. Diehl [et al.] // *Acta Haematol.* 2005. Vol. 113. Is. 4. P. 213–219.

98. Initial (prefibrotic) stages of idiopathic (primary) myelofibrosis (IMF) – a clinicopathological study / J. Thiele, H.M. Kvasnicka, B. Boeltken [et al.] // Leukemia. 1999. Vol. 13. Is. 11. P. 1741–1748.
99. Integrated genomic analysis illustrates the central role of JAK-STAT pathway activation in myeloproliferative neoplasm pathogenesis / R. Rampal, F. Al-Shahrour, O. Abdel-Wahab [et al.] // Blood. 2014. Vol. 123. Is. 22. P. 123–133.
100. Interferon-induced nuclear signalling by Jak protein tyrosine kinases / O. Silvennoinen, J.N. Ihle, J. Schlessinger [et al.] // Nature. 1993. Vol. 366. Is. 6455. P. 583–585.
101. Jacobson, R.J. Agnogenic myeloid metaplasia: a clonal proliferation of hematopoietic stem cells with secondary myelofibrosis / R.J. Jacobson, A. Salo, P.J. Fialkow // Blood. 1978. Vol. 51. Is. 2. P. 189–194.
102. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis / L.M. Scott, W. Tong, R.L. Levine, [et al.] // N. Engl. J. Med. 2007. Vol. 356. Is. 5. P. 459–468.
103. JAK2 or CALR mutation status defines subtypes of essential thrombocythemia with substantially different clinical course and outcomes / E. Rumi, D. Pietra, V. Ferretti [et al.] // Blood. 2014. Vol. 123. Is. 10. P. 1544–1551.
104. JAK2, CALR, MPL and ASXL1 mutational status correlates with distinct histological features in Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative neoplasms / W.J. Wong, R.P. Hasserjian, G.S. Pinkus [et al] // Haematologica. 2018. Vol. 103. Is. 2. P. 63–68.
105. JAK2V617F, CALR, and MPL Mutations and Bone Marrow Histology in Patients with Essential Thrombocythaemia / A. Pich, L. Riera, P. Francia di Celle [et al.] // Acta Haematol. 2018. Vol. 140. Is. 4. P. 234–239.
106. Kralovics, R. Acquired uniparental disomy of chromosome 9p is a frequent stem cell defect in polycythemia vera / R. Kralovics, Y. Guan, J.T. Prchal // Exp. Hematol. 2002. Vol. 30. Is. 3. P. 229–236.

107. Kvasnicka, H.M. Bone marrow angiogenesis: methods of quantification and changes evolving in chronic myeloproliferative disorders / H.M. Kvasnicka, J. Thiele // *Histol. Histopathol.* 2004. Vol. 19. Is. 4. P. 1245–1260.
108. Kvasnicka, H.M. Problems and pitfalls in grading of bone marrow fibrosis, collagen deposition and osteosclerosis – a consensus-based study / H.M. Kvasnicka, C. Beham-Schmid, R. Bob // *Histopathology*. 2016. Vol. 68. Is. 6. P. 905–915.
109. Kvasnicka, H.M. Prodromal myeloproliferative neoplasms: the 2008 WHO classification / H.M. Kvasnicka, J. Thiele // *Am. J. Hematol.* 2010. Vol. 85. Is. 1. P. 62–69.
110. Kvasnicka, H.M. The impact of clinicopathological studies on staging and survival in essential thrombocythemia, chronic idiopathic myelofibrosis, and polycythemia rubra vera / H.M. Kvasnicka, J. Thiele // *Semin. Thromb. Hemost.* 2006. Vol. 32. Is. 4. P. 362–371.
111. Kvasnicka, H.M. WHO classification of myeloproliferative neoplasms (MPN): A critical update / H.M. Kvasnicka // *Curr. Hematol. Malig. Rep.* 2013. Vol. 8. Is. 4. P. 333–341.
112. Leukocytosis is associated with poor survival but not with increased risk of thrombosis in essential thrombocythemia: a population-based study of 311 patients / F. Girodon, F. Dutrillaux, J. Broséus [et al.] // *Leukemia*. 2010. Vol. 24. Is. 4. P. 900–903.
113. Levine, R.L. New advances in the pathogenesis and therapy of essential thrombocythemia / R.L. Levine, M. Heaney // *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program*. 2008. P. 76–82.
114. Long-term outcome of 231 patients with essential thrombocythemia: prognostic factors for thrombosis, bleeding, myelofibrosis, and leukemia / C.S. Chim, Y.L. Kwong, A.K. Lie [et al.] // *Arch. Intern. Med.* 2005. Vol. 165. Is. 22. P. 2651–2658.
115. Long-term survival and blast transformation in molecularly annotated essential thrombocythemia, polycythemia vera, and myelofibrosis / A. Tefferi, P. Guglielmelli, D.R. Larson [et al.] // *Blood*. 2014. Vol. 124. Is. 16. P. 2507–2513.

116. Mc, F.W. Biopsy of bone marrow with the Vim-Silverman needle / F.W. Mc, W. Dameshek // *J. Am. Med. Assoc.* 1958. Vol. 166. Is. 12. P. 1464–1466.
117. McKerrell, T. Leukemia-associated somatic mutations drive distinct patterns of age-related clonal hemopoiesis / T. McKerrell, N. Park, T. Moreno // *Cell Rep.* 2015. Vol. 10. Is. 8. P. 1239–1245.
118. Megakaryocytic morphology and clinical parameters in essential thrombocythemia, polycythemia vera, and primary myelofibrosis with and without JAK2 V617F / N. Vytrva, E. Stacher, P. Regitnig [et al.] // *Arch. Pathol Lab Med.* 2014. Vol. 138. Is. 9. P. 1203–1209.
119. Megakaryopoiesis in chronic myeloproliferative diseases. A morphometric evaluation with special emphasis on primary thrombocythemia / J. Thiele, S. Funke, S. Holgado [et al.] // *Anal. Quant. Cytol.* 1984. Vol. 6. Is. 3. P. 155–167.
120. Mejía-Ochoa, M. Systematization of analytical studies of polycythemia vera, essential thrombocythemia and primary myelofibrosis, and a meta-analysis of the frequency of JAK2, CALR and MPL mutations: 2000–2018 / M. Mejía-Ochoa, P. A. Acevedo Toro, J.A. Cardona-Arias // *BMC Cancer.* 2019. Vol. 19. Is. 1. P. 587–590.
121. Molecular Pathogenesis of Myeloproliferative Neoplasms: From Molecular Landscape to Therapeutic Implications / E. Morsia, E. Torre, A. Poloni [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. Vol. 23. Is. 9.
122. Morris, C.M. Chronic myeloid leukemia: cytogenetic methods and applications for diagnosis and treatment / C.M. Morris // *Methods Mol. Biol.* 2011. Vol. 730. P. 33–61.
123. MPL mutations in myeloproliferative disorders: analysis of the PT-1 cohort / P.A. Beer, P.J. Campbell, L.M. Scott [et al.] // *Blood.* 2008. Vol. 112. Is. 1. P. 141–149.
124. MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients / A.D. Pardanani, R.L. Levine, T. Lasho [et al.] // *Blood.* 2006. Vol. 108. Is. 10. P. 3472–3476.

125. Mutant Calreticulin Requires Both Its Mutant C-terminus and the Thrombopoietin Receptor for Oncogenic Transformation / S. Elf, N.S. Abdelfattah, E. Chen [et al.] // *Cancer Discov.* 2016. Vol. 6. Is. 4. P. 368–381.
126. Mutant calreticulin-expressing cells induce monocyte hyperreactivity through a paracrine mechanism / M.R. Garbati, C.A. Welgan, S.H. Landefeld [et al.] // *Am. J. Hematol.* 2016. Vol. 91. Is. 2. P. 211–219.
127. Mutation profile in Indian primary myelofibrosis patients and its clinical implications / V.R. Patil, S. Chandrakala, S. Mantri [et al.] // *South Asian J. Cancer.* 2019. Vol. 8. Is. 3. P. 186–188.
128. Mutation status of essential thrombocythemia and primary myelofibrosis defines clinical outcome / J. Asp, B. Andréasson, U. Hansson [et al.] // *Haematologica.* 2016. Vol. 101. Is. 4. P. 129–132.
129. Myelodysplastic Syndrome/Myeloproliferative Neoplasm with Ring Sideroblasts and Thrombocytosis with Cooccurrent SF3B1 and MPL Gene Mutations: A Case Report and Brief Review of the Literature / C.H. Park, J.W. Yun, H.Y. Kim [et al.] // *Lab Med.* 2020. Vol. 51. Is. 3. P. 315–319.
130. Myeloproliferative neoplasm (MPN) symptom assessment form total symptom score: prospective international assessment of an abbreviated symptom burden scoring system among patients with MPNs / R.M. Emanuel, A.C. Dueck, H.L. Geyer [et al.] // *J. Clin. Oncol.* 2012. Vol. 30. Is. 33. P. 4098–4103.
131. Myeloproliferative neoplasms can be initiated from a single hematopoietic stem cell expressing JAK2-V617F / P. Lundberg, H. Takizawa, L. Kubovcakova [et al.] // *J. Exp. Med.* 2014. Vol. 211. Is. 11. P. 2213–2230.
132. Myeloproliferative neoplasms with concurrent BCR-ABL1 translocation and JAK2 V617F mutation: a multi-institutional study from the bone marrow pathology group / C.R. Soderquist, M.D. Ewalt, D.R. Czuchlewski [et al.] // *Mod. Pathol.* 2018. Vol. 31. Is. 5. P. 690–704.
133. Myeloproliferative neoplasms: Morphology and clinical practice / T. Barbui, J. Thiele, A. M. Vannucchi [et al.] // *Am. J. Hematol.* 2016. Vol. 91. Is. 4. P. 430–433.

134. Naresh, K.N. Classification of Philadelphia translocation-negative myeloproliferative neoplasms: its impact on data from clinical trials / K.N. Naresh // J. Clin. Oncol. 2009. Vol. 27 Is. 31. P. 175–178.
135. New mutations of MPL in primitive myelofibrosis: only the MPL W515 mutations promote a G1/S-phase transition / R. Chaligné, C. Tonetti, R. Besancenot [et al.] // Leukemia. 2008. Vol. 22. Is. 8. P. 1557–1566.
136. New prognostic scoring system for primary myelofibrosis based on a study of the International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment / F. Cervantes, B. Dupriez, A. Pereira [et al.] // Blood. 2009. Vol. 113. Is. 13. P. 2895–2901.
137. Ogawa, T. Age-related changes of human bone marrow: a histometric estimation of proliferative cells, apoptotic cells, T cells, B cells and macrophages / T. Ogawa, M. Kitagawa, K. Hirokawa // Mech. Ageing Dev. 2000 Aug 15. Vol. 117. Is. 1–3. P. 57–68. doi: 10.1016/s0047-6374(00)00137-8.
138. Orientation-specific signalling by thrombopoietin receptor dimers / J. Staerk, J.P. Defour, C. Pecquet [et al.] // Embo J. 2011. Vol. 30. Is. 21. P. 4398–4413.
139. Pathologic activation of thrombopoietin receptor and JAK2-STAT5 pathway by frameshift mutants of mouse calreticulin / T. Balligand, Y. Achouri, C. Pecquet [et al.] // Leukemia. 2016. Vol. 30. Is. 8. P. 1775–1778.
140. Pediatric bone marrow cellularity: are we expecting too much? / S.E. Friebert, L.B. Shepardson, S.B. Shurin [et al.] // J. Pediatr. Hematol. Oncol. 1998 Sep-Oct. Vol. 20. Is. 5. P. 439–443. doi: 10.1097/00043426-199809000-00006.
141. Perkins, N.J. The inconsistency of "optimal" cutpoints obtained using two criteria based on the receiver operating characteristic curve / N.J. Perkins, E.F. Schisterman // Am. J. Epidemiol. 2006. Vol. 163. Is. 7. P. 670–675.
142. Ph-Negative Chronic Myeloproliferative Neoplasms – Population Analysis, a Single Center 10-years' Experience / V. Shubaev, I. Martynkevich, A. Abdulkadyrova [et al.] // Blood. 2014. Vol. 124. Is. 21. P. 5556–5556.

143. Pikman, Y. MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia / Y. Pikman, B.H. Lee, T. Mercher // PLoS Med. 2006. Vol. 3. Is. 7. P. 265–270.
144. Polycythemia vera: stem-cell and probable clonal origin of the disease / J.W. Adamson, P.J. Fialkow, S. Murphy [et al.] // N. Engl. J. Med. 1976. Vol. 295. Is. 17. P. 913–916.
145. Powers, D. Evaluation: From Precision, Recall and F-Factor to ROC, Informedness, Markedness & Correlation / D. Powers // Mach. Learn. Technol. 2008. Vol. 2.
146. Practical application and clinical impact of the WHO histopathological criteria on bone marrow biopsy for the diagnosis of essential thrombocythemia versus prefibrotic primary myelofibrosis / M. Brousseau, E. Parot-Schinkel, M.P. Moles [et al.] // Histopathology. 2010. Vol. 56. Is. 6. P. 758–767.
147. Presentation and outcome of patients with 2016 WHO diagnosis of prefibrotic and overt primary myelofibrosis / P. Guglielmelli, A. Pacilli, G. Rotunno [et al.] // Blood. 2017. Vol. 129. Is. 24. P. 3227–3236.
148. Primary myelofibrosis (PMF), post polycythemia vera myelofibrosis (post-PV MF), post essential thrombocythemia myelofibrosis (post-ET MF), blast phase PMF (PMF-BP): Consensus on terminology by the international working group for myelofibrosis research and treatment (IWG-MRT) / R.A. Mesa, S. Verstovsek, F. Cervantes [et al.] // Leuk. Res. 2007. Vol. 31. Is. 6. P. 737–740.
149. Problems and pitfalls regarding WHO-defined diagnosis of early/prefibrotic primary myelofibrosis versus essential thrombocythemia / T. Barbui, J. Thiele, A. M. Vannucchi [et al.] // Leukemia. 2013. Vol. 27. Is. 10. P. 1953–1958.
150. Prognostic value of CALR vs. JAK2V617F mutations on splenomegaly, leukemic transformation, thrombosis, and overall survival in patients with primary fibrosis: a meta-analysis / Y.Q. Pei, Y. Wu, F. Wang [et al.] // Ann Hematol. 2016. Vol. 95. Is. 9. P. 1391–1398.
151. Relevance of bone marrow features in the differential diagnosis between essential thrombocythemia and early stage idiopathic myelofibrosis / J. Thiele,

- H. M. Kvasnicka, R. Zankovich [et al.] // *Haematologica*. 2000. Vol. 85. Is. 11. P. 1126–1134.
152. Reproducibility of histologic classification in nonfibrotic myeloproliferative neoplasia / S.M. Koopmans, F.J. Bot, K.H. Lam [et al.] // *Am. J. Clin. Pathol.* 2011. Vol. 136. Is. 4. P. 618–624.
153. Reproducibility of the WHO histological criteria for the diagnosis of Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative neoplasms / U. Gianelli, A. Bossi, I. Cortinovis [et al.] // *Modern Pathology*. 2014. Vol. 27. Is. 6. P. 814–822.
154. Rolles, B. Molecular Pathogenesis of Myeloproliferative Neoplasms / B. Rolles, A. Mullally // *Curr. Hematol. Malig. Rep.* 2022. Vol. 17. Is. 6. P. 319–329.
155. Rumi, E. Diagnosis, risk stratification, and response evaluation in classical myeloproliferative neoplasms / E. Rumi, M. Cazzola // *Blood*. 2017. Vol. 129. Is. 6. P. 680–692.
156. Somatic CALR Mutations in Myeloproliferative Neoplasms with Nonmutated JAK2 / J. Nangalia, C. Massie, E. Baxter [et al.] // *The New England journal of medicine*. 2013. Vol. 369.
157. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms / T. Klampfl, H. Gisslinger, A.S. Harutyunyan [et al.] // *N. Engl. J. Med.* 2013. Vol. 369. Is. 25. P. 2379–2390.
158. Spleen enlargement is a risk factor for thrombosis in essential thrombocythemia: Evaluation on 1,297 patients / A. Andriani, R. Latagliata, B. Anaclerico [et al.] // *Am. J. Hematol.* 2016. Vol. 91. Is. 3. P. 318–321.
159. Studies of the bone marrow in polycythemia vera and the evolution of myelofibrosis and second hematologic malignancies / J.T. Ellis, P. Peterson [et al.] // *Semin. Hematol.* 1986. Vol. 23. Is. 2. P. 144–155.
160. Survival and disease progression in essential thrombocythemia are significantly influenced by accurate morphologic diagnosis: an international study / T. Barbui, J. Thiele, F. Passamonti [et al.] // *J. Clin. Oncol.* 2011. Vol. 29. Is. 23. P. 3179–3184.

161. Tefferi A. Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2021 update on diagnosis, risk-stratification and management / A. Tefferi, T. Barbui // Am. J. Hematol. 2020. Vol. 95. Is. 12. P. 1599–1613.
162. Tefferi, A. Genetic Risk Assessment in Myeloproliferative Neoplasms / A. Tefferi, A.M. Vannucchi // Mayo Clin. Proc. 2017. Vol. 92. Is. 8. P. 1283–1290.
163. Tefferi, A. Pathogenesis of myelofibrosis with myeloid metaplasia / A. Tefferi // J. Clin. Oncol. 2005. Vol. 23. Is. 33. P. 8520–8530.
164. Tefferi, A. Primary myelofibrosis: 2023 update on diagnosis, risk-stratification, and management / A. Tefferi // American Journal of Hematology. 2023. Vol. 98. Is. 5. P. 801–821.
165. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia / D.A. Arber, A. Orazi, R. Hasserjian [et al.] // Blood. 2016. Vol. 127. Is. 20. P. 2391–2405.
166. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms / J.D. Khoury, E. Solary, O. Abla [et al.] // Leukemia. 2022. Vol. 36. Is. 7. P. 1703–1719.
167. The European Consensus on grading of bone marrow fibrosis allows a better prognostication of patients with primary myelofibrosis / U. Gianelli, C. Vener, A. Bossi [et al.] // Mod. Pathol. 2012. Vol. 25. Is. 9. P. 1193–1202.
168. The incidence of myelofibrosis in essential thrombocythaemia, polycythaemia vera and chronic idiopathic myelofibrosis: a retrospective evaluation of sequential bone marrow biopsies / A. Kreft, G. Büche, M. Ghalibafian [et al.] // Acta Haematol. 2005. Vol. 113. Is. 2. P. 137–143.
169. The JAK2V617F activating mutation occurs in chronic myelomonocytic leukemia and acute myeloid leukemia, but not in acute lymphoblastic leukemia or chronic lymphocytic leukemia / R.L. Levine, M. Loriaux, B.J. Huntly [et al.] // Blood. 2005. Vol. 106. Is. 10. P. 3377–3379.

170. The number of prognostically detrimental mutations and prognosis in primary myelofibrosis: an international study of 797 patients / P. Guglielmelli, T.L. Lasho, G. Rotunno [et al.] // Leukemia. 2014. Vol. 28. Is. 9. P. 1804–1810.
171. Thiele, J. A critical reappraisal of the WHO classification of the chronic myeloproliferative disorders / J. Thiele, H.M. Kvasnicka // Leuk. Lymphoma. 2006. Vol. 47. Is. 3. P. 381–396.
172. Thiele, J. Chronic myeloproliferative disorders with thrombocythemia: a comparative study of two classification systems (PVSG, WHO) on 839 patients / J. Thiele, H.M. Kvasnicka // Ann. Hematol. 2003. Vol. 82. Is. 3. P. 148–152.
173. Thiele, J. Clinicopathological criteria for differential diagnosis of thrombocythemias in various myeloproliferative disorders / J. Thiele, H.M. Kvasnicka // Semin. Thromb. Hemost. 2006. Vol. 32. Is. 3. P. 219–230.
174. Thiele, J. Diagnostic differentiation of essential thrombocythaemia from thrombocythaemias associated with chronic idiopathic myelofibrosis by discriminate analysis of bone marrow features a clinicopathological study on 272 patients / J. Thiele, H.M. Kvasnicka // Histol. Histopathol. 2003. Vol. 18. Is. 1. P. 93–102.
175. Thiele, J. Grade of bone marrow fibrosis is associated with relevant hematological findings – a clinicopathological study on 865 patients with chronic idiopathic myelofibrosis / J. Thiele, H.M. Kvasnicka // Ann. Hematol. 2006. Vol. 85. Is. 4. P. 226–232.
176. Thiele, J. Hematopathologic findings in chronic idiopathic myelofibrosis / J. Thiele, H.M. Kvasnicka // Semin. Oncol. 2005. Vol. 32. Is. 4. P. 380–394.
177. Thiele, J. Megakaryocytopoiesis in haematological disorders: diagnostic features of bone marrow biopsies / J. Thiele, R. Fischer // An overview Virchows Arch A Pathol. Anat. Histopathol. 1991. Vol. 418. Is. 2. P.87–97.
178. Thiele, J. Prefibrotic chronic idiopathic myelofibrosis a diagnostic enigma / J. Thiele, H.M. Kvasnicka // Acta Haematol. 2004. Vol. 111. Is. 3. P. 155–159.

179. Thiele, J. The 2008 WHO diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocythemia, and primary myelofibrosis / J. Thiele, H.M. Kvasnicka // Curr. Hematol. Malig. Rep. 2009. Vol. 4. Is. 1. P. 33–40.
180. Thrombopoietin receptor is required for the oncogenic function of CALR mutants / H. Nivarthi, D. Chen, C. Cleary [et al.] // Leukemia. 2016. Vol. 30. Is. 8. P. 1759–1763.
181. Travlos, G.S. Normal structure, function, and histology of the bone marrow / G.S. Travlos // Toxicol Pathol. 2006. Vol. 34. Is. 5. P. 548–565. doi: 10.1080/01926230600939856.
182. Tremblay, D. Overview of Myeloproliferative Neoplasms: History, Pathogenesis, Diagnostic Criteria, and Complications / D. Tremblay, A. Yacoub, R. Hoffman // Hematol. Oncol. Clin. North Am. 2021. Vol. 35. Is. 2. P. 159–176.
183. Tryptophan at the transmembrane-cytosolic junction modulates thrombopoietin receptor dimerization and activation / J.P. Defour, M. Itaya, V. Gryshkova [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2013. Vol. 110. Is. 7. P. 2540–2545.
184. Type 1 versus Type 2 calreticulin mutations in essential thrombocythemia: a collaborative study of 1027 patients / A. Tefferi, A.W. Emnet, P. Guglielmelli [et al.] // Am. J. Hematol. 2014. Vol. 89. Is. 8. P. 121–124.
185. Vainchenker, W. Genetic basis and molecular pathophysiology of classical myeloproliferative neoplasms / W. Vainchenker, R. Kralovics // Blood. 2017. Vol. 129. Is. 6. P. 667–679.
186. Vainchenker, W. JAK/STAT signaling in hematological malignancies / W. Vainchenker, S.N. Constantinescu // Oncogene. 2013. Vol. 32. Is. 21. P. 2601–2613.
187. Value of bone marrow biopsy in the diagnosis of essential thrombocythemia / A.M. Florena, C. Tripodo, E. Iannitto [et al.] // Haematologica. 2004. Vol. 89. Is. 8. P. 911–919.
188. Vannucchi, A.M. Molecular pathophysiology of Philadelphia-negative myeloproliferative disorders: beyond JAK2 and MPL mutations / A.M. Vannucchi, P. Guglielmelli // Haematologica. 2008. Vol. 93. Is. 7. P. 972–976.

189. WHO Classification of Tumours of the Haematopoietic and Lymphoid Tissues / E. Jaffe, S.H. Swerdlow, E. Campo [et al.]. Lyon: IARC, 2008. Vol. 4. P. 88–93.
190. WHO-histological criteria for myeloproliferative neoplasms: reproducibility, diagnostic accuracy and correlation with gene mutations and clinical outcomes / A. Alvarez-Larrán, A. Ancochea, M. García M [et al.] // British journal of haematology. 2014. Vol. 166. Is. 6. P. 911–919.
191. Widespread occurrence of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders / A.V. Jones, S. Kreil, K. Zoi [et al.] // Blood. 2005. Vol. 106. Is. 6. P. 2162–2168.
192. Wojtaszewska, M. Frequency and molecular characteristics of calreticulin gene (CALR) mutations in patients with JAK2-negative myeloproliferative neoplasms / M. Wojtaszewska, M. Iwoła, K. Lewandowski // Acta Haematol. 2015. Vol. 133. Is. 2.P. 193–198.