

Федеральное медико-биологическое агентство
(ФМБА России)

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Российский научно-исследовательский институт гематологии
и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства»

ДИАГНОСТИКА И ЛЕЧЕНИЕ ХРОНИЧЕСКИХ МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ

Методические рекомендации

МР ФМБА России 33-2020

Санкт-Петербург
2020

Диагностика и лечение хронических миелопролиферативных новообразований: Методические рекомендации. — СПб., — Агентство «ВиТ-принт», 2020. — 36 с.

1. Разработано:

1.1. В Федеральном государственном бюджетном учреждении «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России):

Авторы: *С. С. Бессмельцев, А. В. Четкин, В. А. Шуваев, И. С. Мартынкевич, Л. С. Мартыненко, Е. В. Мотыко, Л. Б. Полушкина, М. С. Фоминых, М. П. Бакай*

Рецензенты: *А. Н. Богданов*, профессор кафедры постдипломного медицинского образования Санкт-Петербургского государственного университета, доктор медицинских наук, профессор
Е. В. Морозова, доцент кафедры гематологии, трансфузиологии и трансплантологии ПСПбГМУ им. И.П. Павлова кандидат медицинских наук

2. В настоящих рекомендациях реализованы требования Федерального закона Российской Федерации:
— от 21 ноября 2011 г. № 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации».
3. Утверждено и введено в действие Федеральным медико-биологическим агентством 04.06.2020 г.
4. Введены впервые

ВВЕДЕНИЕ

Миелопролиферативные новообразования (МПН) — группа заболеваний клональной природы, для которых характерна аномальная пролиферация миелоидного ростка кроветворения и соединительнотканых структур костного мозга. Частыми общими для них клиническими проявлениями также является развитие очагов экстрамедуллярного кроветворения и тромбозов. При длительном течении заболевания может происходить развитие миелофиброза или бластной трансформации.

Каждое из этих заболеваний идентифицируют по его преобладающему морфологическому проявлению или молекулярно-генетическим признакам. Хотя группа МПН имеет ряд общих симптомов, все же для каждой формы патологии характерно определенное сочетание клинических проявлений, особенностей течения и лабораторных данных. Объединяет все эти болезни тот факт, что причиной их развития является аномальное размножение клона на уровне плюрипотентных стволовых клеток, ведущее к пролиферации клеток эритропоэза, гранулоцитопоэза и мегакариоцитопоэза, выраженной в разной степени. Кроме того, всем миелопролиферативным новообразованиям свойственно в большей или меньшей степени завершаться трансформацией в бластный криз. В то же время каждый «представитель» миелопролиферативных заболеваний имеет свой доминирующий специфический признак. Для хронического миелолейкоза это преимущественно опухолевое поражение гранулоцитопоэза, при истинной полицитемии больше страдает эритроидный росток, а эссенциальной тромбоцитемии присущи аномальные проявления мегакариоцитарного ростка. Первичный миелофиброз проявляется развитием фиброза костного мозга, при хроническом эозинофильном лейкозе присутствует стойкая гиперэозинофилия. Отличием хронического нейтрофильного лейкоза является гиперплазия гранулоцитов, обусловленная мутацией в гене *CSF3R*, тогда как хроническим миелолейкозом сходной клинической картиной ассоциирован со слитным геном *BCR-ABL*. При наличии несомненных признаков миелопролиферации и невозможности установления диагноза конкретного заболевания используется термин миелопролиферативное новообразование, не классифицируемое.

Заболеваемость и распространенность различных нозологических форм МПН неодинакова. Свыше 98% численности больных в группе МПН составляют пациенты с ХМЛ, ИП, ЭТ, ПМФ, МПН-Н [1]. Эпидемиологических проспективных популяционных исследований по заболеваемости МПН в России не проводилось. Согласно зарубежным данным первичная заболеваемость ХМЛ в Европе составляет 0,96 на 100 000 населения в год; в США ИП 0,95; первичным миелофиброзом (ПМФ) 0,22; ЭТ 0,51;

хроническим нейтрофильным лейкозом (ХНЛ) 0,01; гиперэозинофильным синдромом 0,03; ХМПН-Н 0,41 на 100000 населения в год соответственно [1, 2]. При ретроспективном десятилетнем исследовании в г. Санкт-Петербурге первичная заболеваемость МПН составляла: ХМЛ 0,58; ИП 0,83; ПМФ 1,01; ЭТ 1,00 на 100000 населения в год соответственно [3, 4]. Общее количество больных МПН в Российской Федерации может составлять около 50 тысяч больных: 7,0 тысяч больных ХМЛ (по данным Российского регистра [5]); 8,5 тысяч больных ПМФ; 11,5 тысяч больных ЭТ; 20 тысяч больных ИП (при аппроксимации данных по распространенности МПН в г. Санкт-Петербурге), что может составлять около одной трети от общей распространенности гемобластозов [3, 6].

Диагноз каждой нозологической формы устанавливается в соответствии с диагностическими критериями ВОЗ на основании комплексного обследования с использованием молекулярно-генетических методов [7]. Достижения фундаментальных наук позволили в настоящее время превратить диагностику МПН из исключения других причин изменений крови в доказательно обоснованный процесс, основанный на выявлении специфических биологических маркеров, имеющих не только диагностическое, но и прогностическое значение [8].

Миелопролиферативные новообразования, в частности хронический миелолейкоз послужили первым опытом разработки и внедрения направленной (таргетной) терапии, то есть высокоточного воздействия на краеугольные звенья патогенеза заболевания, позволяющие с минимальными побочными эффектами прерывать патогенез заболевания. Внедрение уже первого препарата направленного действия — ингибитора тирозинкиназ иматиниба позволило превратить ХМЛ из ранее фатальной опухоли в заболевание, не ограничивающее продолжительность жизни подавляющего большинства пациентов [9]. Значительное накопление количества пациентов, связанное с значительным снижением смертности, в ближайшем будущем приведет к тому, что ХМЛ перестанет быть редким заболеванием [10]. Вместе с тем, обобщение накопленного опыта показало, что значительная часть больных имеет первичную резистентность к иматинибу или она может формироваться вторично на фоне терапии [11–14]. Данные обстоятельства привели к необходимости разработки ингибиторов тирозинкиназ второго и последующего поколений, имеющих еще более высокую стоимость, что обуславливает все возрастающую нагрузку на бюджет здравоохранения [10]. Попыткой снижения расходов является апробируемая в настоящее время методика ведения ремиссии хронического миелолейкоза без лечения, когда у пациентов с длительным глубоким подавлением опухоли прием препарата прекращается под тщательным клинико-лабораторным наблюдением [15–18].

В области других МПН также происходит активное внедрение новых инновационных диагностических и терапевтических методик, позволяющие достигать ранее недоступных результатов и сопровождающееся многократным ростом затрат.

Расшифровка молекулярно-генетических основ патогенеза других миелопролиферативных новообразований способствовали открытию роли янускиназы (*JAK2*) и мутаций в её гене, изменений в рецепторе тромбопоэтина (*MPL*), кальретикулине (*CALR*), рецепторе колониестимулирующего фактора 3-го типа (*CSF3R*), слитных генов с участием рецепторов фактора роста, вырабатываемых тромбоцитами (*PDGFR*), киназы KIT (с-*KIT*), что позволяет в настоящее время точно верифицировать диагноз и служит основой для классификации заболеваний. В настоящее время продолжается разработка и внедрение новых классов (ингибиторы янускиназы, теломераз и др.) и поколений лечебных препаратов, позволяющих коренным образом изменять течение этих заболеваний с увеличением продолжительности и качества жизни больных, а в части случаев и на излечение этих серьезных недугов [19–23].

Внедрение инновационных молекулярно-генетических диагностических методик и таргетных лекарственных препаратов с учетом их высокой стоимости и сложности использования требует разработки системы оказания медицинской помощи больным миелопролиферативными новообразованиями на разных этапах: первичной диагностики, персонализированного назначения терапии и мониторинга лечения с диспансерно-динамическим наблюдением.

Таким образом, пациенты с миелопролиферативными новообразованиями, в том числе хроническим миелолейкозом, истинной полицитемией, эссенциальной тромбоцитемией, первичным миелофиброзом, составляют существенную долю больных злокачественными новообразованиями кроветворной, лимфоидной и родственной им тканей, находящихся под наблюдением врачей-гематологов в РФ, а разработка оптимальной системы диагностики и лечения этой группы заболеваний является актуальной проблемой отечественного здравоохранения.

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель руководителя
Федерального медико-биологического
агентства

В. В. Романов
04.06.2020 г.

**Система стандартизации в здравоохранении Российской Федерации
Группа 12. Требования к профилактике заболеваний,
защите населения от повреждающих факторов,
охране репродуктивного здоровья
и оказанию медико-социальной помощи**

**ДИАГНОСТИКА И ЛЕЧЕНИЕ ХРОНИЧЕСКИХ
МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ**

*Методические рекомендации
МР ФМБА России 33-2020*

1. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

1. Методические рекомендации распространяются на этапы диагностики и лечения миелопролиферативных новообразований (истинная полицитемия, эссенциальная тромбоцитемия, первичный миелофиброз).
2. В документе представлены новые программы диагностики и лечения миелопролиферативных новообразований, имеющие целью персонализацию лечения на основе оценки индивидуальных рисков течения заболевания и внедрения инновационных диагностических и лечебных методик в практическую деятельность гематологических учреждений страны.
3. Методические рекомендации предназначены для применения в учреждениях ФМБА России и могут быть использованы гематологическими и онкологическими отделениями, осуществляющими лечение пациентов с миелопролиферативными новообразованиями.

2. НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

Настоящий документ разработан на основании рекомендаций и требований следующих нормативных правовых актов и нормативных документов:

1. Приказ Министерства здравоохранения и социального развития РФ от 8 июля 2005 года N449 «Об утверждении стандарта медицинской помощи больным с хроническим миелолейкозом».
2. Приказ Министерства здравоохранения РФ от 15 ноября 2012 года № 930н «Об утверждении Порядка оказания медицинской помощи населению по профилю «гематология»».
3. Федеральный закон от 21 ноября 2011 года № 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации».
4. СП 2.1.7.2790–10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

«Примечание — При пользовании настоящим документом целесообразно проверить действие ссылочных нормативных документов в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети интернет или по ежегодно издаваемому указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по соответствующим ежемесячно издаваемым информационным указателям, опубликованным в текущем году. Если ссылочный документ заменен (изменен), то при пользовании настоящей методикой следует руководствоваться заменяющим (измененным) документом. Если ссылочный документ отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку».

3. ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Миелопролиферативные новообразования	— клональные заболевания гемопоэтической стволовой клетки, характеризующимся пролиферацией одной миелоидной линии или более (гранулоцитарной, эритроидной, мегакариоцитарной)
Хронический миелолейкоз	— заболевание, характеризующееся преимущественно опухолевым поражением гранулоцитопоэза
Истинная полицитемия	— заболевание, характеризующееся поражением стволовой клетки, сопровождающееся соматической мутацией в гене янускиназы (<i>JAK2</i>) рецепторов цитокинов, проявляющееся пролиферацией миелоидного ростка кроветворения с возможным развитием экстрамедуллярного кроветворения, тромботическими осложнениями
Эссенциальная тромбоцитемия	— заболевание, которому присущи аномальные проявления мегакариоцитарного роста
Первичный миелофиброз	— миелопролиферативное новообразование, которое характеризуется фиброзом костного мозга, спленомегалией, экстрамедуллярным гемопоэзом
Ингибиторы тирозинкиназ	— препараты, обладающие селективностью по отношению к <i>BCR-ABL</i> тирозинкиназы

3.1. Обозначения и сокращения

АЛТ	— аланинаминотрансфераза
АСТ	— аспартатаминотрансфераза
БК	— бластный криз
БМО	— большой молекулярный ответ
БПВ	— беспрогрессивная выживаемость
Г-КСФ	— гранулоцитарный колониестимулирующий фактор

- ДХА** — дополнительные хромосомные aberrации
ИЛ — интерлейкин
ИП — истинная полицитемия
ИТК — ингибитор тирозинкиназ
ИТК2 — ингибитор тирозинкиназ второго поколения
ИФН — интерферон
ИФН-α — интерферон-альфа
минЦО — минимальный цитогенетический ответ
МО4.0 — молекулярный ответ со снижением уровня *BCR-ABL* менее 4 логарифмов
МПН — миелопролиферативные новообразования
МЦО — малый цитогенетический ответ
ОВ — общая выживаемость
ПГО — полный гематологический ответ
ПМО — полный молекулярный ответ
ПМФ — первичный миелофиброз
ПЦО — полный цитогенетический ответ
СЦИ — стандартное цитогенетическое исследование
ТКМ — трансплантация костного мозга
ФА — фаза акселерации
ХМЛ — хронический миелолейкоз
ХФ — хроническая фаза
ЧЦО — частичный цитогенетический ответ
ЭТ — эссенциальная тромбоцитемия
BCR-ABL — патологический ген, образованный слиянием генов *BCR* и *ABL*
CALR — ген кальретикулина
СТС АЕ — шкала токсичности Национального института рака
ELN — European Leukemia Net — Европейская организация по диагностике и лечению лейкозов
FISH — флуоресцентная гибридизация *in situ*
JAK2 — янускиназа рецепторов цитокинов II типа
JAK2V617F — точечная мутация в 617 положении, приводящая к замене фенилаланина на тирозин
JAK-STAT — сигнальный путь передачи сигнала с рецепторов цитокинов
MPL — ген рецептора тромбопоэтина
NCCN — National Cancer Comprehensive Network — Национальная онкологическая сеть США
Ph- — клетки, не содержащие филадельфийскую хромосому
Ph — филадельфийская хромосома
Ph+ — клетки, содержащие филадельфийскую хромосому

4. ОСНОВНЫЕ НОРМАТИВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ

4.1. Методики проведения исследования

В план обследования больных миелопролиферативными новообразованиями (истинная полицитемия, эссенциальная тромбоцитемия, первичный миелофиброз) входят результаты морфологических, цитогенетических и молекулярно-генетических биохимических, гистологических исследований.

Методы исследования

Обследование больных включает:

- сбор жалоб, анамнеза, объективное обследование с измерением размеров печени, селезенки;
- клиничко-лабораторное обследование (клинический анализ крови, определение биохимических показателей, при необходимости выполнение коагулограммы, иммунофенотипирование клеток костного мозга);
- морфологическое исследование (подсчет миелограммы, гистологическое исследование костного мозга с оценкой степени фиброза, при необходимости проведение иммуногистохимического исследования);
- цитогенетические (определение кариограммы клеток костного мозга) и молекулярно-генетические (флуоресцентной на стекле гибридизации (FISH), качественное и количественное определение *BCR-ABL* крови, определение драйверных мутаций (*JAK2V617F*, *CALR*, *MPL*, мутаций в 12 экзоне гена *JAK2*, аллельной нагрузки мутации *JAK2V617F*, мутаций в генах-эпигенетических регуляторах *ASXL1*, *EZH2*, *IDH1/2*, *SRSF2*);
- инструментальные методы (УЗИ, КТ, МРТ) при необходимости.

Клиничко-лабораторное, морфологическое, цитогенетическое и молекулярно-генетическое, инструментальное обследование проводится по общепринятым методикам.

Гистологическое исследование костного мозга.

Путем трепанобиопсии получают керн подвздошной кости длиной 2 см и более. Для фиксации и декальцинации полученного материала используют набор Mielodex. Полученный столбик костного мозга обрабатывают в течение 90 минут фиксатором, в последствии не менее 15 минут смывают остатки с помощью этилового спирта в концентрации 70° этанолом и помещают на 90 минут в декальцинирующий реактив. В дальнейшем осуществляют автоматическую проводку гистологического препарата с помощью процессора Tissue-Tek Vip 5Jr с последующим уда-

лением остатков воды посредством IsoPREP раствора. Среда HISTOMIX используется для приготовления блоков и пропитывания подготовленной ткани. Микропрепараты толщиной 3–5 мкм приготавливают с помощью ротационного микротомы Sakura Accu-cut SRM, которые затем окрашивают.

Для оценки степени фиброза костного мозга используют шкалу Европейского консенсуса патоморфологов. Оценка плотности ретикулинового фиброза проводится с помощью импрегнации серебром. Первоначально при температуре 56 °С микропрепараты обрабатывают 10 мин в термостате. Впоследствии парафин удаляется с неостывших препаратов двукратной обработкой ксилолом, затем проводится обработка 95° этиловым спиртом и последующей гидратацией. После этого используют активирующий кислотный буфер и калия перманганата, с последующей промывкой и нанесением раствора щавелевой кислоты и сульфатом ферроаммония. Окраска аммиачным серебром используется после отмывки срезов дважды в дистиллированной воде. Избыток красителя удаляют раствором формалина нейтральной концентрации и проводят фиксацию натрия гипосульфитом. После промывки и гидратации в 95° этиловом спирте проводят просветление ксилолом двукратно и переносят в биомаунт.

Степень фиброза устанавливают в сторону увеличения если участки с большей степенью фиброза составляют не менее 30% объема оцениваемого микропрепарата.

Цитогенетическое исследование проводят в соответствии с приведенной ниже методикой.

- 1) Пробу аспириата костного мозга в объеме 2,5–4 мл отбирают в стандартную пробирку, содержащую 500 ед. распыленной гепариновой соли.
- 2) К 4,0 мл среды для культур клеток и тканей (RPMI) с добавкой глутамина и антибиотика добавляют 1 мл сыворотки и аликвоту пробы костного мозга (достигая концентрации 2×10^9 клеток на 1 мл среды), а также колцемида в необходимой концентрации. Смесь культивируют 24 часа в закрытой системе при температуре +37 °С в пробирке объемом 15 мл.
- 3) После культивирования проводят отбор клеток с помощью центрифугирования при 1500 об/мин в течение 10 минут, супернатант удаляют пипеткой, оставляя 0,3–0,5 мл жидкости над осадком. Осадок разбивают энергичным встряхиванием и добавляют 8–10 мл гипотонического раствора (0,55% раствор KCl), перемешивают пипетированием и инкубируют 30 мин при +37 °С.
- 4) Для последующей фиксации осаждают клетки с помощью центрифугирования (10 мин, 1000 об/мин), полученный клеточный

осадок встряхивают в 0,5 мл оставшейся смеси. Затем добавляют 0,2 мл уксусной кислоты (5% раствор), смешивают и повторно проводят центрифугирование в течение 10 минут. Фиксацию клеток проводят смешиванием с 8–10 мл охлажденной смеси 3 частей метанола и 1 части ледяной уксусной кислоты. Фиксацию повторяют 2–3 раза, используя дополнительно по 5–7 мл смеси.

- 5) Полученную после фиксации суспензию клеток распределяют с высоты 30–50 см по 30–50 мкл суспензии на охлажденные и обезжиренные предметные стекла. Полученные препараты обрабатывают горячей спиртовкой и сушат при температуре помещения.
- 6) Для окраски используют трипсин по стандартной методике GTG. Препарат окрашивают 0,25% раствором трипсина. Затем переносят на 60 секунд в забуференный фосфатом краситель Гимзы. Удаление излишней краски проводят с помощью воды и последующей сушки.

Препарат считают качественным при возможности оценки 20 или более метафаз. Для оценки и записи кариограммы используют Международную номенклатуру дифференциально сегментированных хромосом (ISCN, 2013).

При неудовлетворительном качестве материала вследствие недостаточного количества клеток, невозможности проведения рутинного цитогенетического исследования выполняют исследование аспирата костного мозга или крови методом флуоресцентной гибридизации на стекле.

Для этого исследования используют клеточную взвесь с добавлением смеси метанола и уксусной кислоты.

Стекло с нанесенной клеточной взвесью в горизонтальном положении высушивают. Реактив, содержащий зонды ДНК (LSI BCR-ABL (Dual Color, Dual Fusion) наносят на стекло, покрытое клетками, и накрывают покровным стеклом. На полученный микропрепарат сверху наносят клей с последующим размещением в специальном термобрайте, где автоматически при гидратации осуществляют по очереди процесс денатурации (в течение 3 мин. при температуре 73 °C) и гибридизации (до 24 часов при температуре 37 °C).

Затем через сутки при 73 °C стакан Коплина с раствором 0,4% XSSC/0,3% NP-40 помещают в водяную баню. Из термобрайта извлекают подготовленный препарат и удаляют покровное стекло. Предметное стекло в течение 2 мин. находится в растворе 0,4% XSSC/0,3% NP-40, после чего на 2 минуты переносится в раствор 2XSSC/0,1% NP-40 комнатной температуры. Затем при минимальном освещении на обсушенное предметное стекло, добавляют разведенный DAPI в количестве 0,008–0,01

мл и повторно закрывают сверху покровным стеклом. Подсчет и анализ ядер выполняют при помощи микроскопа с люминесценцией. Оценку и итоговое заключение проводят по критериям Международной номенклатуры ISCN [364]. Двухцветная люминесценция $pus\ ish(ABL1 \times 3)(BCR \times 3)(ABL1\ con\ BCR \times 2)$ оценивается в относительной величине (процентной от общего количества оцененных ядер) и расценивается как положительный итог теста, в ходе исследования оценивается не менее 200 интерфазных ядер.

Методом качественного определения химерного гена *BCR-ABL* является обратнo-транскриптазная полимеразная цепная реакция (ОТ-ПЦР), для проведения которой в пробирки с ЭДТА забирают кровь пациентов куда впоследствии добавляют РНК-стабилизатор и выделяют РНК. Выделенную РНК разводят в ddH₂O в количестве 40мкл и хранят при -80°C .

Перед началом обратной транскрипции к растворам 1 мкл oligodT и 0,8 мкл гексамеров H6 добавляют 10 мкл раствора РНК. Полученную смесь размещают в амплификаторе и проводят инкубацию в течение 5 мин при температуре 65°C . После амплификации проводят добавление буфера для ревертазы, смеси dNTP, ревертазы и ингибитора обратной транскриптазы в соответствии с инструкцией к набору для проведения обратной транскрипции. Для обратной транскрипции используют следующую схему: 10 мин — 25°C , 60 мин — 43°C , 10 мин — 70°C . Хранение синтезированной кДНК проводили при 80°C .

Смесь из следующих составляющих: 0,4 мкл Taq-полимеразы, 0,6 мкл прямого и обратного праймеров (10 пмоль/мкл) для специфичной амплификации химерного гена, 2 мкл 2,5 mM dNTP, 2 мкл 10-кратного ПЦР-буфера, 12,2 мкл ddH₂O приготавливают для проведения ПЦР. Дополнительно к фрагменту гена ABL готовят контрольную пробу с праймерами для каждого образца. Используется 3 мкл кДНК на одну реакцию. Схема проведения амплификации, следующая: 5 мин — 95°C , 35 циклов по 30 сек при 95°C , 30 сек при 69°C , 30 сек при 72°C .

Анализ продуктов ПЦР проводят полиакриламидном геле в концентрации 6%. В одну из лунок наносят маркер молекулярного веса (ДНК фага λ ферментно-гидролизованная) и по 10 мкл амплификата в другие лунки геля. Для проведения электрофорез используется 0,5-кратный раствор трис-фосфатного буфера: первые 10 мин при 170В, после этого 200В до выхода из геля бромфенолового синего. Окраску геля проводят в растворе бромистого этидия (20 мкл / 400 мл) в течение 2–3 минут и после промывки в дистиллированной воде проводят анализ с использованием видеосистемы на трансиллюминаторе.

При отсутствии бендов, характерных для данной транслокации на дорожке геля и при условии наличия ПЦР-продукта на дорожке контрольного

фрагмента гена *ABL* результат анализа считают отрицательным (транслокации химерного гена нет). Результаты признают недействительными если бенд контрольного гена *ABL* отсутствует.

Если на дорожке с фрагментом контрольного гена *ABL* присутствует ПЦР-продукт и на соответствующей дорожке геля определяют бенды ПЦР-продуктов определенного размера относительно маркерных бендов, то результат считают положительным (транслокация данного химерного гена есть). Если бенд для гена *ABL* отсутствует, проводят повторную амплификацию для *ABL*. В случае повторного отрицательного результата для *ABL* результаты признают недействительными.

Для количественного определения уровня экспрессии химерного гена *BCR-ABL* используют ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Исследование включает следующие этапы.

- Выделение общей РНК из клеток периферической крови.
- Проведение реакции обратной транскрипции.
- Использование двух смесей олигонуклеотидов (ПЦР-смесь-1-FRT *M-BCR-ABL* и ПЦР-смесь-1-FRT *N-BAL* для *BCR-ABL* и *ABL* соответственно) для амплификации в режиме «реального времени».

Регистрация результатов осуществляется по каналу флуоресценции HEX. Кривые накопления флуоресцентного сигнала анализируют с помощью программного обеспечения: гена-нормализатора/внутреннего контроля *ABL* и продукта амплификации участка кДНК *M-BCR-ABL* для каждого образца. Расчет нормализованной концентрации РНК *M-BCR-ABL* в контрольном и исследуемом образцах производят следующим образом.

- Первоначально рассчитывают отношение *M-BCR-ABL/ABL* (число копий кДНК *M-BCR-ABL* к числу копий кДНК *N-ABL*).
- Затем определяют среднее значение отношения *M-BCR-ABL/ABL* для двух измерений каждого образца.

Итоговый результат выражают с использованием фактора конверсии последующей коррекцией полученных значений *BCR-ABL/ABL* в % по международной шкале (IS). Предшествующая международная стандартизация лаборатории молекулярной генетики определила фактор конверсии лаборатории — 1,236. Глубину ответов определяют следующим образом:

- $BCR-ABL/ABL \leq 0,1\%$ по международной шкале (IS) — БМО (МО3,0);
- $BCR-ABL/ABL \leq 0,01$ (IS) или неопределяемый уровень *BCR-ABL* при количестве копий $ABL \geq 1,0 \times 10^4$ — МО4,0;
- $BCR-ABL/ABL \leq 0,0032\%$ (IS) или неопределяемый уровень *BCR-ABL* при количестве копий $ABL \geq 3,2 \times 10^4$ — МО4,5;

- $BCR-ABL/ABL \leq 0,001\%$ (IS) или неопределяемый уровень $BCR-ABL$ при количестве копий $ABL \geq 1,0 \times 10^5$ — МО5,0.

Метод прямого секвенирования по Сэнгеру следует использовать для оценки мутационного статуса гена $BCR-ABL$ при анализе вариантов транскрипта b2a2, b2a3, b3a2, b3a3 и с не менее 2% относительным уровнем экспрессии гена $BCR-ABL$.

1. Интересующий участок гена $BCR-ABL$ амплифицируют следующими этапами:
 - в смесь реактивов состава 0,6 мкл каждого праймера B2A-F (5'-ТТСАГААГСТТСТССТГАСАТ-3') и 4065-R (5'-ССТТСТТАГСАГСТСАТАСАССТГ-3') (10 пмоль/мкл), 0,6 мкл 25мМ MgCl₂, 6 мкл 2,5-кратного реакционного буфера, 4,2 мкл ddH₂O добавляют 3 мкл кДНК, затем проводят ПЦР по следующей схеме: 10 мин — 95 °С, 40 циклов: 30 сек — 95 °С, 30 сек — 60 °С, 1 мин — 72 °С, финальная элонгация 10 мин — 72 °С;
 - во втором раунде амплификации в качестве матрицы используют 3 мкл полученного ПЦР-продукта со смесью концентраций 10 пмоль/мкл праймеров 4000-R (5'-GGACATGCCATAGGTAGCA-3') и 3306-F (5'-TGGTTCAТСАТСАТТСААСGG-3'). Объем смеси наращивают увеличением объемов компонентов до 50 мкл пропорционально предыдущему этапу. Используют режим ПЦР по следующей схеме: 10 мин — 95 °С, 40 циклов: 30 сек — 95 °С, 30 сек — 60 °С, 1 мин. 30 сек — 72 °С, финальная элонгация 10 мин — 72 °С;
 - затем проводят визуальную оценку качества продуктов амплификации в 6% полиакриламидном геле. Образец отправляют на секвенирование при наличии на электрофореграмме отчетливо видимого бенда, соответствующего длине 622 пар нуклеотидов.
2. Автоматическая капиллярная система MegaBACE1000 DNA Analysis System используется для секвенирования образцов с реагентами DYEnamic ET dye terminator cycle sequencing kit. Предварительно продукты ПЦР очищают от не связавшихся dNTP при помощи буфера (95% C₂H₅OH, 0,15M NH₄COOH). Далее реакционную смесь (10 пкмоль праймера 3306-F или 4000-R, 8 мкл Terminator Mix (5 мМ ddNTP и 1000 мМ dNTP), деионизированная вода — до объема 20 мкл) добавляется к 20 нг очищенного ПЦР-продукта. Необходимы следующие временные и температурные условия: начальная денатурация 1 мин — 96 °С; 27 циклов в режиме 10 сек — 96 °С, 5 сек — 60 °С, 4 мин — 65 °С. После этого ПЦР продукты снова очищались и растворялись в 12 мкл формамида и переносились в анализатор. Анализ последовательностей проводят программами VECTOR NTI и Sequence Scanner 2.0.

Мутационный статус генов JAK2, CALR, MPL, ASXL1, EZH2, IDH1/2 определяют следующим образом.

- 1) Для экстракции из крови геномной ДНК используется хлороформ. Гемолиз эритроцитов проводят добавлением к 12 мл NH₄Cl (рН 6,97; 0,83 %) 3 мл крови или 1 мл костного мозга, затем инкубировали при +4 °С в течение 20 минут. После осаждения лейкоцитов забирают пробу в 10–20 мкл и переносят в лизирующий буфер объемом 400 мкл и инкубируют при +65 °С в течение 10 минут. После добавления хлороформа объемом 600 мкл проводят центрифугирование и переносят фазу, содержащую ДНК в буфер для преципитации, осадок растворяют в 1,2М растворе NaCl. После этого высаливают при –20 °С в 96 % растворе этилового спирта ДНК и затем проводят отмывку в 70 % растворе этилового спирта, высушивали и растворяли в 100 мкл воды.
- 2) Детекцию мутации в гене JAK2 в 617 кодоне (V617F) проводят с помощью анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ). Ферментативный гидролиз проводят путем амплификации участка гена JAK2, ограниченного праймерами F 5'-TGGTTTAAATTATGGACTA-3' и R5'-TCACAAGATATAACTGAATAG-3'. Для проведения ПЦР используется смесь в составе: 20–100 нг геномной ДНК (3мкл), по 10 пмоль каждого праймера, 0,6 мкл 25mM MgCl₂, 6,0 мкл 2,5-кратной реакционной смеси и ампулированная вода до объема 15мкл, реакцию проводят по схеме: 5 мин — 95°, (30 сек — 95°, 30 сек — 41°, 30 сек — 72°) × 35 циклов, 5 мин — 72°. Амплификат в реакционном объеме 15 мкл в количестве 2 мкл обрабатывают рестриктазой. После гидролиза его продукты разделяют в 6 % полиакриламидном геле. После окраски в бромистом этидии в УФ спектре проводят визуализацию. Часть продукта амплификации при наличии мутации остается негидролизованной, вследствие отсутствия сайта рестрикции.
- 3) Определение мутаций в кодоне 515 гена MPL также используют метод ПДРФ. Субстрат для проведения ферментативного гидролиза подготавливают с помощью амплификации участка гена MPL, выделенного праймерами F 5'-GGGCTGCTGCCACTGAG –3' (модифицированный для создания сайта рестрикции) и R5'-AGGAAGTGGCGAAGCCGTAG –3'. Для проведения реакции ПЦР используется следующую смесь реактивов: 20–100 нг геномной ДНК (3мкл), по 10 пмоль каждого праймера, 0,6 мкл 25mM MgCl₂, 6,0 мкл 2,5-кратной реакционной смеси, ампулированная вода до объема 15 мкл. ПЦР проводят по следующей схеме: 10 мин — 95°, 40 циклов по 50 сек — 95°, 50 сек — 66°. Получен-

ный амплификат в реакционном объеме 15 мкл обрабатывают рестриктазой BstXI в количестве 4 мкл. Продукты ферментативного гидролиза выделяют в 6% ПААГ. После окраски в бромистом этидии в УФ спектре проводят визуализацию. Часть продукта амплификации остается негидролизованной при наличии мутации из-за отсутствия сайта рестрикции.

- 4) Для определения мутаций (делеций/инсерций) в экзоне 9 гена кальретикулина (*CALR*) используется методом полиморфизма длин амплифицированных фрагментов (ПДАФ) с дальнейшей конкретизацией вида мутации секвенированием. Процесс амплификации проводят с помощью праймеров: 5'-TGCAAGCAGCAGAGAAACAA-3', 5'-CTCTACAGCTCGTCTTGGC-3'. Для проведения ПЦР используется следующая смесь реактивов: 20–100 нг геномной ДНК (3 мкл), по 10 пмоль каждого праймера, 1,2 мкл 25mM MgCl₂, 12,0 мкл 2,5-кратной реакционной смеси, ампулированная вода до объема 30 мкл. Реакцию проводят по схеме 10 мин — 95°, 35 циклов по 30 сек — 95°, 30 сек — 63°, 30 сек — 72°; затем 5 мин — 72°. Затем амплификат в количестве 2 мкл добавляют к 1мкл двойной краски (бромфеноловый синий, ксиленцианол, глицерин) и 3 мкл ddH₂O и вносят в 6% ПААГ. После окраски в бромистом этидии в УФ спектре выполняют визуализацию. Дополнительные бэнды, соответствующие мутантным аллелям гена и/или с гетеродуплексами фрагментов дикого типа свидетельствуют о предварительном наличии мутации. Заключительную верификацию проводят прямым секвенированием по Сенгеру.
- 5) Для секвенирования образцов используют набор реагентов DYEnamic ET dye terminator cycle sequencing kit в автоматической капиллярной системе MegaBACE1000 DNA Analysis System. Предварительную очистку от несвязавшихся dNTP продуктов ПЦР проводят предварительно приготовленным буфером (0,15 М раствора аммиака, 95% этиловый спирт). Затем в смесь реактивов (10 пкмоль прямого или обратного праймера, 8 мкл Terminator Mix (5 mM ddNTP и 1000 mM dNTP), деионизированная вода — до объема 20 мкл) добавляют 20 нг очищенного продукта ПЦР. Используют следующую температурную схему: начальная денатурация 1 мин — 96°C; 27 циклов в режиме 10 сек — 96°C, 5 сек — 60°C, 4 мин — 65°C. После этого продукты ПЦР очищают и к ним было добавляют 12 мкл формамида, затем смесь переносится в анализатор.
- 6) Для детекции мутаций в генах *ASXL1* и *IDH1/2* используется метод прямого секвенирования по Сенгеру. Для амплификации целевых фрагментов используется смесь реактивов в составе: 20–100 нг ге-

номной ДНК (3 мкл), по 10 пмоль каждого праймера (таблица 1), 1,2 мкл 25mM MgCl₂, 12,0 мкл 2,5-кратной реакционной смеси, ампулированная вода до объема 30 мкл. Для секвенирования используется прямой и обратный праймеры. Для анализа последовательностей применяется программы VECTOR NTI и Sequence Scanner 2.0.

Таблица 1.

**Последовательности праймеров
для амплификации фрагментов генов ASXL1, EZH2, IDH1/2**

Ген	Наименование праймера	Последовательность 5'-3'
ASXL1	ASXL_F1	CTGTATGCCATGACCCTTAAGCTAC
	ASXL_R1	GCTGTAGATCTGACGTACACTTTCC
	ASXL_F2	CAGCAGCAGTGGTGATGGTG
	ASXL_R2	GACGGAATGGGACCATTGTCTG
	ASXL_F3	GAATGTGAGTCTGGCACCCTTC
	ASXL_R3	TCAAATCCCCAGGCAATGCAGG
	ASXL_F4	CCAGAGAACACATACCATCTGTTG
	ASXL_R4	TGGCCAGCAGTAGGGAATCTG
EZH2	8ex F	CATCAAAAGTAACACATGGAAACC
	8ex R	TTGTAATAAATGATAGCACTCTCCAAG
	10ex F	TTCTCTCCATCAAAATGAGTTTATG
	10ex R	TCCTCACAACACGAACTTTCAC
	15ex F	GAGAGTCAGTGAGATGCCAG
	15ex R	TTTGCCCCAGCTAAATCATC
	17ex F	TTCTGTGAGCTTGATCACC
	17ex R	CTCGTTTCTGAACACTCGGC
	18ex F	AGGCAAACCTGAAGAACTG
	18ex R	TTCCAATTCTCACGTCAAAGGTA
	19ex F	CCGTCTTCATGCTCACTGAC
	19ex R	AAAAACCCTCCTTTGTCCAGA
IDH1	5ex F	AAATCTGGAGAACTGGGTAAGAC
	5ex R	TCATGCCCTATATGCTTCATAAAC
IDH1	DH1_F	TGAGAAGAGGGTTGAGGAGTT
	IDH1_R	AACATGCAAAATCACATTATTGCC
IDH2	IDH2_F	GGGTTCAAATTCTGGTTGAA
	IDH2_R	TAGGCGAGGAGCTCCAGT

4.2. Алгоритм диагностики миелопролиферативных новообразований

На основании комплексного анализа совокупности имеющихся в настоящее время методов и современных диагностических критериев создан оригинальный алгоритм диагностики миелопролиферативных новообразований (хронический миелолейкоз, миелофиброз, истинная полицитемия, эссенциальная тромбоцитемия) (*рисунок 1*).

Как видно из *рисунка 1*, исходной временной точкой применения алгоритма является обращение пациента на консультацию врача-гематолога с данными клинического анализа крови. Результатом применения алгоритма является установление диагноза нозологической формы миелопролиферативного новообразования у пациентов, направленных к гематологу с изменениями крови, предполагающими наличие миелопролиферативного новообразования и состоящим из следующих этапов:

- На первом этапе проводится сбор анамнеза для исключения реактивных причин изменений и других заболеваний крови, при сохранении подозрения о наличии МПН проводится молекулярно-генетический скрининг крови на наличие мутаций *BCR-ABL* и *JAK2V617F*. В случае качественного выявления *BCR-ABL* проводится дальнейшее обследование (стерильная пункция с подсчетом миелограммы и цитогенетическим исследованием) для подтверждения диагноза ХМЛ. При выявлении *JAK2V617F* проводится трепанобиопсия с гистологическим исследованием костного мозга.
- При отсутствии *BCR-ABL* и *JAK2V617F* и реактивных причин изменений крови проводится дальнейший молекулярно-генетический скрининг мутаций в генах *CALR*, *MPL*, экзоне 12 гена *JAK2*. На следующем этапе проводится трепанобиопсия костного мозга с гистологическим исследованием.
- Гистологическое исследование трепанобиоптата костного мозга обязательно включает оценку степени фиброза. Также проводится аспирационная биопсия с подсчетом миелограммы и цитогенетическим исследованием.
- По результатам гистологического исследования может быть установлен диагноз ЭТ, при картине ИП для подтверждения диагноза проводится дополнительное определение уровня эритропоэтина, для подтверждения диагноза ПМФ проводить дообследование для оценки наличия малых диагностических критериев и определения прогноза, при наличии признаков миелопроли-

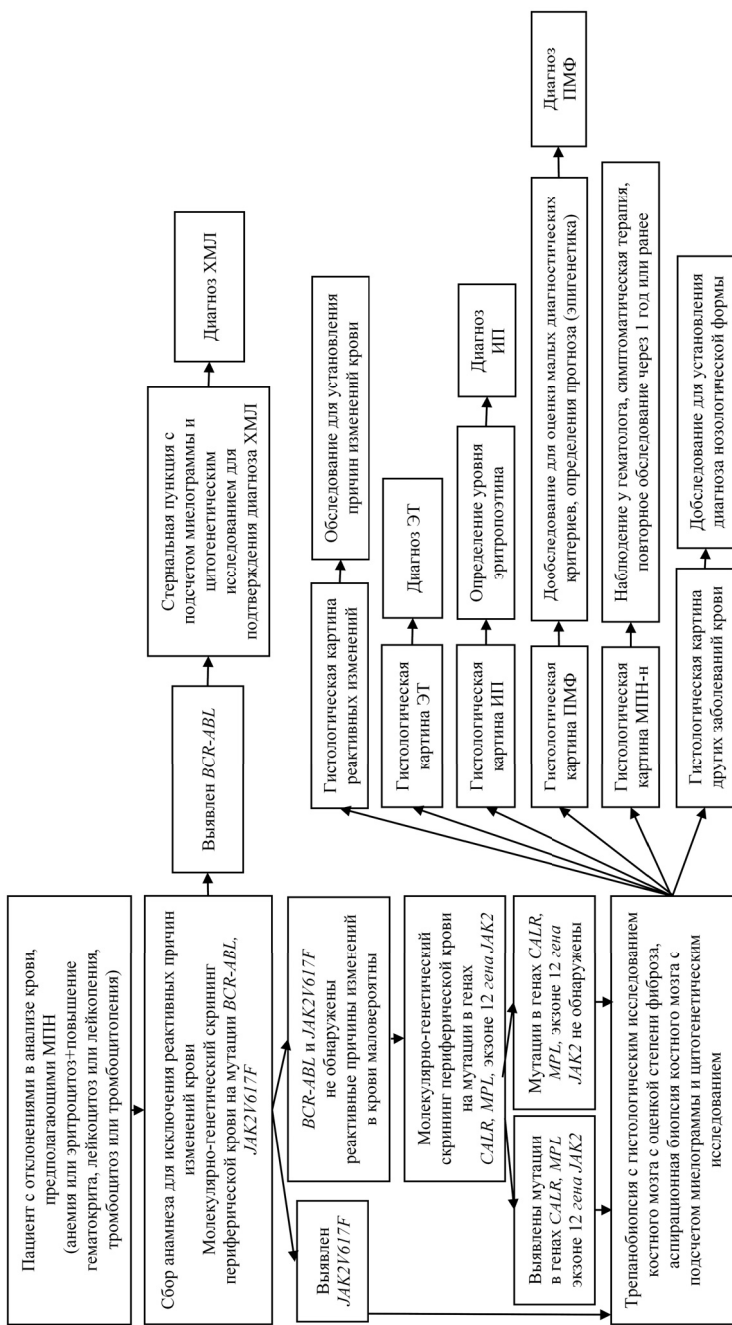


Рисунок 1. Алгоритм диагностики миелопролиферативных новообразований (хронический миелолейкоз, миелофиброз, истинная полицитемия, эссенциальная тромбоцитемия)

феративного новообразования, но невозможности установления диагноза конкретной нозологической формы устанавливается диагноз МПН-н с рекомендациями наблюдения у гематолога и периодического обследования для установления окончательного диагноза; при наличии признаков других заболеваний системы крови проводится их дополнительная диагностика; в случае когда гистологическая картина костного мозга не предполагает наличия новообразования кроветворной системы и соответствует реактивным изменениям пациент направляется к врачам других клинических специальностей в соответствии с симптоматикой для определения диагноза основного заболевания.

Разработанный алгоритм позволяет существенно повысить точность диагностики и снизить срок установления окончательного диагноза с гистологической и молекулярно-генетической верификацией с 57 дней до 16 (или менее 12 рабочих) дней для установления окончательного диагноза МПН и других заболеваний со схожей симптоматикой и назначения необходимой терапии.

4.3. Программа лечения хронического миелолейкоза с оценкой ведения больных в фазе ремиссии

На основании анализа данных литературы и собственного опыта диагностики и лечения разработана программа лечения ХМЛ, направленная на устранение молекулярно-генетических и биологических дефектов опухолевых клеток с фармакоэкономической оценкой эффективности ведения больных в фазе ремиссии без лечения.

В общем виде разработанная программа лечения представлена на рисунке 2.

При достижении длительного (не менее 3 лет) стойкого глубокого молекулярного ответа (МО4,0 и глубже) пациенты ХМЛ, при их согласии, могут быть переведены в наблюдение фазы ремиссии без лечения. При этом проводится прекращение приема ИТК при частом молекулярно-генетическом мониторинге уровня *BCR-ABL*.

При повышении уровня *BCR-ABL* более 0,1% проводится возобновление прежней терапии с последующим контролем уровня *BCR-ABL* 1 раз в 3 месяца до достижения и подтверждения БМО, затем 1 раз в 6 месяцев.

Полученные экономические результаты апробации методики ведения пациентов с диагнозом ХМЛ в фазе ремиссии без лечения вызвали интерес в оценке клинических и экономических последствий внедрения данной методики в масштабах всей страны.

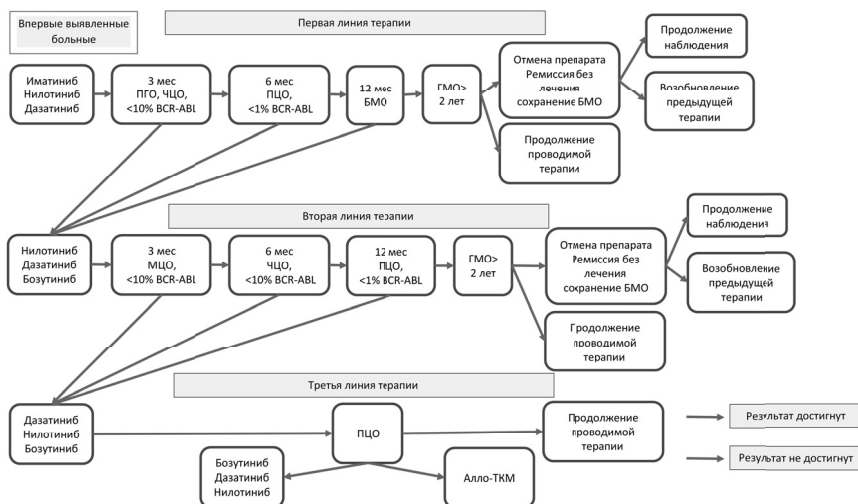


Рисунок 2. Программа лечения ХМЛ с фармакоэкономической оценкой эффективности ведения больных в фазе ремиссии без лечения

Результаты фармакоэкономического моделирования величины затрат на диагностику и лечение ХМЛ на популяционном уровне в течение 2015–2020 гг. по результатам симуляции затрат в ходе анализа «стоимость-минимизация» представлены на *рисунке 3*.

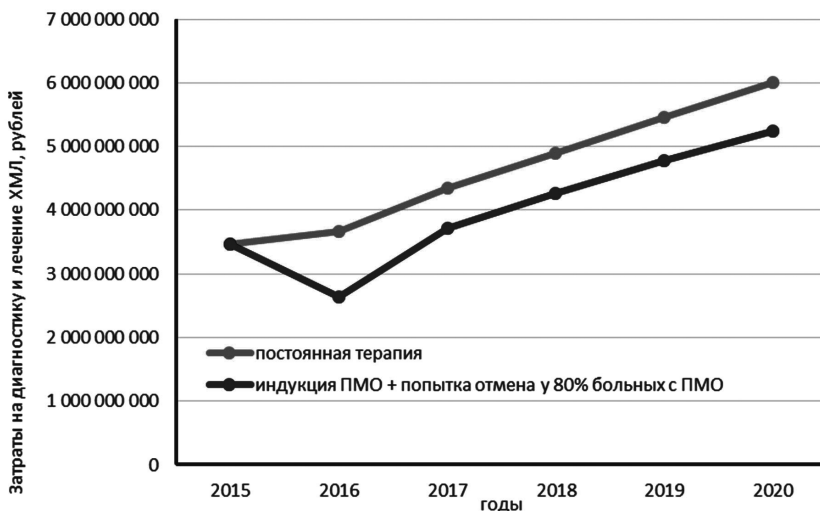


Рисунок 3. Сравнение затрат на диагностику и лечение ХМЛ в Российской Федерации при постоянной терапии и индукции ПМО с последующей отменой ИТК при стабильном ПМО в течение 2015–2020 гг.

Анализ моделирования затрат на диагностику и лечение ХМЛ в масштабах страны показал, что при их объеме в 2015 г. 3,46 миллиардов (млрд) рублей в год, в 2020 г. при постоянной терапии их величина будет составлять 6,01 млрд. рублей, применение методики отмены ИТК при глубоком молекулярном ответе позволит снизить их до 5,24 млрд. рублей в год. Общая совокупная величина затрат бюджета здравоохранения на диагностику и лечение ХМЛ в течение периода моделирования составит 27,8 млрд. рублей при постоянной терапии и 24,11 млрд. рублей при использовании фазы ремиссии без лечения, что позволит сохранить около 3,7 млрд. рублей. При этом уже в первый год внедрения отмены ИТК у больных с ПМО экономия бюджетных средств составит более 1 млрд. рублей. Результаты анализа «стоимость-полезность» показали, что использование фазы ремиссии без лечения по сравнению с постоянной терапией позволит получить более 400 дополнительных лет жизни, прожитых качественно (QALY). При этом стоимость 1 QALY при использовании постоянной терапии составляет 724 тысяч рублей, при использовании

фазы ремиссии без лечения 621 тысяч рублей. Таким образом стратегия отмены ИТК при глубоком МО (МО4.0) является доминирующей над стратегией постоянной терапии как по показателям стоимости, так и по «стоимости-полезности», то есть позволяющей при меньших затратах получить больший клинический эффект.

4.4. Программа диагностики и риск-адаптированной терапии эссенциальной тромбоцитемии с мероприятиями профилактики тромботических осложнений

Разработана программа диагностики и риск-адаптированной терапии эссенциальной тромбоцитемии с мероприятиями профилактики тромботических осложнений. Диагноз эссенциальной тромбоцитемии устанавливается на основании комплексного обследования и включает проверку соответствия диагностическим критериям ВОЗ 2016 и стратификацию больных по группам риска в соответствии со шкалой WHO-IPSET. Признаки, составляющие эту шкалу, и соответствующая балльная оценка представлены в *таблице 2*.

Лечение ЭТ в рамках разработанной программы носит многокомпонентный характер и его составляющими являются: профилактика и терапия тромботических осложнений, различные варианты циторедуктивной терапии.

Таблица 2.

Международная прогностическая шкала риска развития тромбозов ВОЗ при эссенциальной тромбоцитемии (IPSET-thrombosis)

Признак	Отношение рисков	Балл по шкале
Возраст старше 60 лет	1,50	1
Факторы риска сердечно-сосудистых заболеваний *	1,56	1
Тромбозы в анамнезе	1,93	2
JAK2V617F	2,04	2

* сахарный диабет, артериальная гипертензия, курение

Профилактика и лечение тромботических осложнений.

Усилия по профилактике тромбозов и тромбоэмболий при ЭТ должны быть направлены прежде всего на нормализацию образа жизни, повышение физической активности, снижение артериальной гипертензии, гиперхолестеринемии и ожирения, борьбу с курением, купирование сахарного диабета. Лекарственная терапия, влияющая на снижение

активности агрегации тромбоцитов, у большинства больных проводится с помощью постоянного приема антиагрегантов.

Разработанный в рамках программы алгоритм лечения с определением показаний и вида циторедуктивной терапии представлен на *рисунке 4*.

При применении разработанной программы в два раза чаще отсутствовала необходимость в назначении циторедуктивной терапии, что предупреждало большую часть пациентов от токсичности, связанной с лечением, позволило снизить отношение рисков тромбозов с 0,039 случая/лет до 0,032 случая/лет.



Рисунок 4. Алгоритм лечебной тактики при эссенциальной тромбоцитемии

Использование разработанной диагностики и риск-адаптированной терапии эссенциальной тромбоцитемии с мероприятиями профилактики тромботических осложнений позволила достичь большей частоты ответов на лечение, повысить общую выживаемость и выживаемость без тромбозов.

4.5. Персонализированная программа лечения больных истинной полицитемией с включением лекарственных препаратов таргетного действия

Разработана программа диагностики и лечения истинной полицитемии, основанная на современных достижениях молекулярно-генетиче-

ских методов исследования и прогнозирования течения заболевания, используемые для индивидуализации лечения.

Для верификации диагноза в программе используются диагностические критерии, принятые ВОЗ в 2016 г. После установления диагноза определяются индивидуальные риски осложнений течения заболевания, позволяющие провести персонализированный выбор терапии для больного.

Для прогноза риска развития тромбозов использована шкала риска сердечно-сосудистых событий при ИП — PV-thrombosis. Шкала включает два статистически значимых фактора: возраст старше 65 лет и наличие тромбозов в анамнезе, определяющие риск развития тромбозов от 2,5% до 10,9% в год (таблица 3).

Целью терапии ИП в настоящее время является профилактика тромботических осложнений заболевания и купирование его симптомов для улучшения качества жизни. Терапия ИП в первую очередь имеет целью снижение рисков нарушений микроциркуляции, для чего применяются ангиагреганты, сосудистые препараты. Другим важным составляющим профилактики тромбозов является контроль факторов риска: течение сопутствующих заболеваний (гипертензия, диабет), нормализация массы тела, отказ от курения.

Таблица 3.

Прогностическая шкала риска развития тромбозов при истинной полицитемии PV-thrombosis

Факторы	Риск развития тромбозов	Частота развития тромбозов, % в год
Возраст моложе 65 лет Отсутствие тромбозов в анамнезе	Низкий	2,5 %
Возраст 65 лет и старше Отсутствие тромбозов в анамнезе	промежуточный	4,9 %
Возраст моложе 65 лет Тромбозы в анамнезе		5,0 %
Возраст 65 лет и старше Тромбозы в анамнезе	Высокий	10,9 %

Циторедуктивная терапия назначается при клинически значимых отклонениях показателей крови, обуславливающих риск тромботических осложнений. Медикаментозная циторедукция при ИП проводится в виде моноклониотерапии, интерферонотерапии или их сочетанного применения. У части больных, наиболее часто молодого возраста при низком риске сосудистых осложнений, коррекция показателей крови может проводиться с помощью физического удаления избыточной клеточной массы (гемоэкспфузии, эритроцитаферез).

В общем виде алгоритм выбора лечебной тактики в разработанной программе представлен на *рисунке 5*.

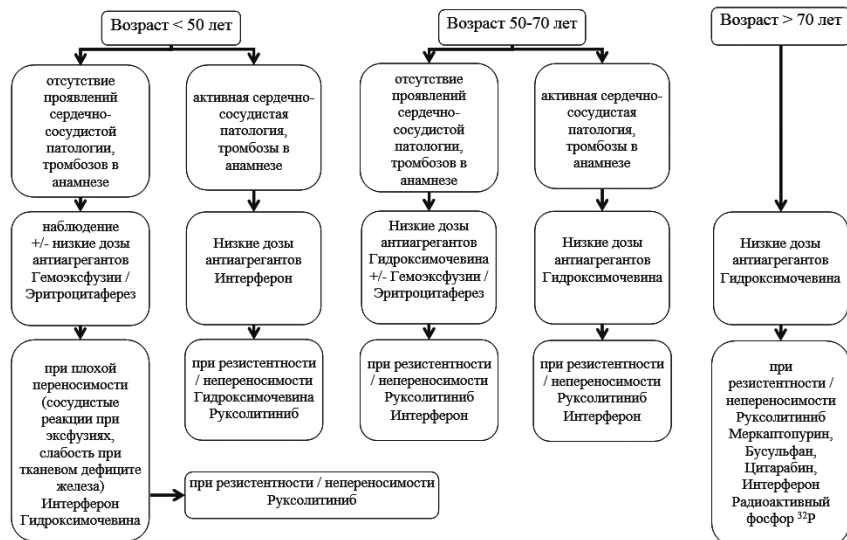


Рисунок 5. Алгоритм выбора лечебной тактики при ИП

4. 6. Риск-адаптированная программа лечения миелофиброза с включением препаратов направленной терапии

На основании анализа предыдущего опыта и результатов внедрения инновационных молекулярно-генетических методов обследования разработана риск-адаптированная программа лечения миелофиброза с включением препаратов таргетной терапии. Программа включает перечень исследований, позволяющих установить диагноз ПМФ в соответствии с диагностическими критериями ВОЗ и определить прогноз с использованием шкал IPSS, DIPSS, DIPSS+, MIPSS, GPSS.

После установления окончательного диагноза в соответствии с разработанной программой проводится выбор риск-адаптированной стратегии лечения, позволяющей соблюсти баланс между побочными эффектами лечения и ожидаемой эффективностью терапии.

В общем виде алгоритм выбора лечебной тактики в разработанной программе представлен на *рисунке 6*.

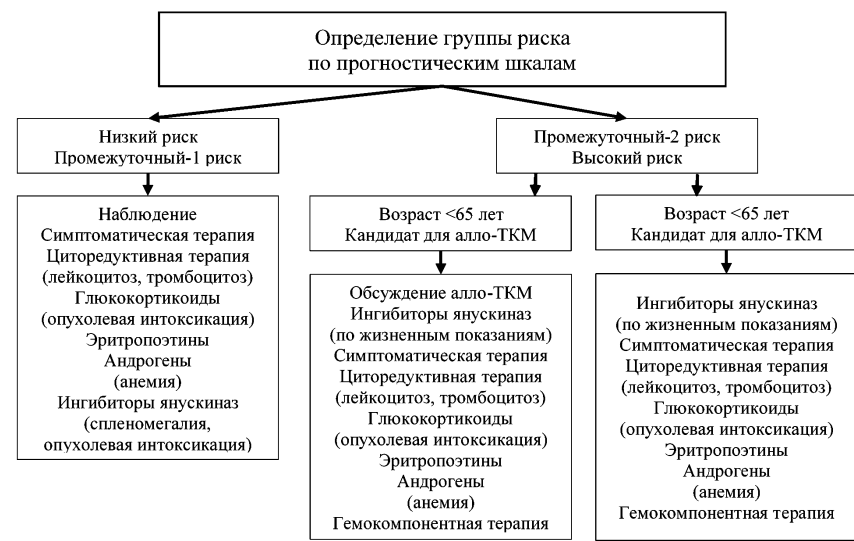


Рисунок 6. Алгоритм лечения больных миелофиброзом

При использовании руксолитиниба в качестве препарата таргетной терапии большее количество пациентов испытывали клиническое улучшение. Общая пятилетняя выживаемость пациентов при использовании руксолитиниба составляет 78 %.

Также применение разработанной программы привело к снижению частоты летальных исходов с 0,070 (95 % Д. И. 0,045–0,103) случая/лет наблюдения до 0,058 (95 % Д. И. 0,047–0,70) случая/лет наблюдения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Миелопролиферативные новообразования — заболевания, составляющие большую долю гематологической патологии. До недавнего времени подходы к диагностике и лечению этих болезней часто основывались на эмпирических методах: диагноз ставился методом исключения, а терапия носила сдерживающий характер без существенной систематизации.

Достижения последних лет, связанные с расшифровкой молекулярно-генетических основ патогенеза, дали возможность существенно расширить представления о механизмах развития заболеваний, создать диагностические критерии, прогностические шкалы и программы терапии, основанные на методах доказательной медицины. В настоящее время миелопролиферативные новообразования из заболеваний с неясной природой превратились в четко очерченную патологию. Разработанные под эгидой ВОЗ диагностические критерии позволяют при проведении определенного перечня исследований быстро установить точный, верифицированный и воспроизводимый диагноз. Ретроспективные и проспективные многоцентровые исследования послужили основой для создания шкал, позволяющих прогнозировать продолжительность жизни больных и вероятность развития осложнений заболевания. Стандартизация диагностики способствовала проведению широкомасштабных международных многоцентровых испытаний новых лекарственных препаратов таргетного действия — высокоточного оружия, позволяющего прицельно воздействовать на ключевые молекулярно-генетические основы патогенеза при малой токсичности — сохранении и улучшении не только продолжительности, но и качества жизни пациентов. Это позволяет перейти от неизбирательного химиотерапевтического лечения, наносящего вред всему организму, к высокоточной таргетной терапии, дающей возможность постоянного подавления опухоли при минимальном воздействии на физиологические процессы. Разработка и внедрение инновационных препаратов привели к коренному изменению прогноза при некоторых миелопролиферативных новообразованиях и дали импульс к применению направленной терапии при других онкологических заболеваниях и иных областях медицины. Отдаленные результаты применения таргетной терапии, например, при хроническом миелолейкозе, дают основания у части больных надеяться на полное излечение этих фатальных заболеваний.

При подготовке данных методических рекомендаций был проведен анализ собственного многолетнего опыта диагностики и лечения миелопролиферативных новообразований и, по результатам его обобщения, разработаны алгоритм дифференциально-диагностического поиска, риск-адаптированные программы диагностики и лечения наиболее частых миелопролиферативных новообразований (хронический миелолейкоз, эссенциальная тромбоцитемия, истинная полицитемия, первичный миелофиброз).

Созданный в рамках исследования алгоритм дифференциальной диагностики миелопролиферативных новообразований не имеет аналогов в отечественной практике и существенно сокращает сроки установления окончательного диагноза, что позволяет быстрее определять нозологическую форму заболевания и проводить диагностику и лечения уже непосредственно ориентируясь на особенности проявлений болезни и индивидуальные характеристики пациента.

Разработанная программа лечения хронического миелолейкоза с фармакоэкономической оценкой ведения больных в фазе ремиссии нацелена на достижение оптимальных ответов на терапию, позволяющих предупредить прогрессирование заболевания и сохранять жизнь пациентов, а у части больных и приводить к излечению. Сутью разработанного и апробированного подхода является быстрое переключение между линиями терапии при недостижении необходимого результата к контрольному сроку обследования. Раннее активное переключение между ингибиторами тирозинкиназ с учётом коморбидности пациента и мутационного статуса заболевания позволяет предупреждать развитие резистентности и быстрее достигать целевых результатов лечения позволяющих быть спокойным за судьбу пациента. Результатами использования разработанной программы явилось значимое улучшение общей выживаемости пациентов и снижения рисков смерти при использовании не только первой линии терапии, но и при лечении резистентных больных с использованием препаратов во второй и третьих линиях.

Апробированная в ходе исследования методика ведения ремиссии без лечения с её фармакоэкономической оценкой демонстрирует не только клиническую целесообразность в виде возможности полной отмены терапии и сохранении стойкой ремиссии у части пациентов, то есть практически излечение больных ХМЛ, но и экономическую перспективность — дополнительные затраты на проведение более частого мониторинга в фазе ремиссии без лечения составили не более 3–5 % от финансовых средств, которые были сохранены, благодаря безопасной отмене дорогостоящих препаратов.

Программа диагностики и риск-адаптированной терапии эссенциальной тромбоцитемии с мероприятиями профилактики тромбоцитических осложнений, разработана в отечественной практике впервые и уже вошла в национальные клинические рекомендации. Использование программной диагностики и лечения позволяет систематизировать диагностику эссенциальной терапии и индивидуализировать выбор объема и вида терапии. Результатами её применения является безопасное снижение частоты использования циторедуктивных препаратов. В то время как использование индивидуального прогнозирования наступления тромбоцитических осложнений и выбора лечения приводит к снижению их частоты, увеличению времени от постановки диагноза до развития тромбозов, повышению

общей выживаемости больных и значимому снижению рисков наступления тромбозов и смерти.

Использование прогностической шкалы развития тромбозов у больных истинной полицитемии с включением лекарственных препаратов таргетного действия позволяет создать алгоритм выбора персонализированной лечебной тактики при истинной полицитемии. Применение риск-адаптированного подхода также, как и в случае с эссенциальной тромбоцитемией позволяет снизить частоту назначения циторедуктивной терапии, тогда как эффективность в виде достижения полных ответов на терапию существенно повышается. Всё это приводит к увеличению общей выживаемости и выживаемости без тромбозов, двукратному снижению рисков наступления тромботических осложнений и смерти пациентов.

При разработке риск-адаптированной программы лечения миелофиброза с включением препаратов направленной терапии проанализирован большой объем информации о расшифровке молекулярно-генетических основ патогенеза. Благодаря полученному обобщению впервые в отечественной практике в программу диагностики и лечения миелофиброза включен комплекс молекулярно-генетических методов определения не только драйверных мутаций, но и мутаций в генах-эпигенетических регуляторах. Использование современных методов диагностики позволяет проводить стратификацию пациентов с помощью современных международных прогностических шкал с оптимальным выбором баланса между агрессивностью лечения и необходимостью влияния на течение болезни с минимизацией негативных последствий для пациента в каждом индивидуальном случае.

Использование разработанной программы диагностики и лечения миелофиброза повышает частоту достижения ответов при использовании циторедуктивной терапии. Эффективность таргетной терапии руксолитинибом оказывается более высокой при использовании программного подхода. При этом статистическая значимость положительного влияния использования руксолитиниба в продвинутых группах риска подтверждается с помощью регрессионного анализа. Результатом этого является повышение общей выживаемости и снижение риска летальных исходов у больных первичным миелофиброзом.

Таким образом, данные методические рекомендации содержат впервые разработанные и актуальные для отечественного здравоохранения алгоритмы, позволяющие проводить дифференциальную диагностику миелопролиферативных новообразований, а также диагностику и лечения эссенциальной тромбоцитемии, истинной полицитемии, первичного миелофиброза, что дает возможность оценивать индивидуальные риски и использовать персонализированный выбор терапии с улучшением выживаемости и снижением риска осложнений и смерти.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Epidemiology of myelodysplastic syndromes and chronic myeloproliferative disorders in the United States, 2001–2004, using data from the NAACCR and SEER programs / D. E. Rollison, N. Howlader, M. T. Smith, et al. // *Blood*. — 2008. — Vol.112, N1. — P. 45–52.
2. The EUTOS population-based registry: incidence and clinical characteristics of 2904 CML patients in 20 European Countries / V. S. Hoffmann, M. Baccarani, J. Hasford, et al. // *Leukemia*. — 2015. — Vol.29, N 6. — P. 1336–1343.
3. Ph-Negative Chronic Myeloproliferative Neoplasms — Population Analysis, a Single Center 10-years' Experience / V. Shuvaev, I. Martynkevich, A. Abdulkadyrova, V. Udaleva et al. // *Blood* (56th ASH Annual Meeting Abstracts). — 2014. — Vol.124, N21. — P. 5556.
4. Опыт лечения хронического миелолейкоза в Санкт-Петербурге / В. А. Шуваев, А. С. Абдулкадырова, И. С. Мартынкевич и др. // *Вестник гематологии*. — 2011. — Т. 7, № 1. — С. 43.
5. Регистр больных хроническим миелолейкозом в Российской Федерации: от наблюдательного исследования к оценке эффективности терапии в клинической практике / А. Г. Туркина, Н. В. Новицкая, А. К. Голенков и др. // *Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика*. — 2017. — Т. 10, № 3. — С. 390–401.
6. Жигулева Л. Ю. Научно-организационные основы совершенствования качества медицинской помощи больным опухолевыми заболеваниями системы крови. Дисс. д-ра мед. наук // СПб.: 2017. — С. 351.
7. 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, N20. — P. 2391–2405.
8. Clonal evolution and clinical correlates of somatic mutations in myeloproliferative neoplasms / P. Lundberg, A. Karow, R. Nienhold, et al. // *Blood*. — 2014. — Vol.123, № 14. — P. 2220.
9. International Randomized Study of Interferon Vs STI571 (IRIS) 8-Year Follow up: Sustained Survival and Low Risk for Progression or Events in Patients with Newly Diagnosed Chronic Myeloid Leukemia in Chronic Phase (CML-CP) Treated with Imatinib / M. Deininger, S. G. O'Brien, F. Guilhot, et al. // *ASH Annual Meeting Abstracts*. — 2009. — Vol.114, N22. — P. 1126.
10. Фармакоэкономическое моделирование таргетной терапии у больных хроническим миелолейкозом в ремиссии / К. М. Абдулкадыров, В. А. Шуваев, И. С. Мартынкевич, М. С. Фоминых // *Онкогематология*. — 2014. — № 3. — P. 16–24.
11. Response and resistance in 300 patients with BCR-ABL-positive leukemias treated with imatinib in a single center / T. Lahaye, B. Riehm, U. Berger, et al. // *Cancer*. — 2005. — Vol.103, N8. — P. 1659–1669.
12. Отдаленные результаты терапии ингибиторами тирозинкиназ у больных хроническим миелолейкозом в ранней и поздней хронической фазе / А. Г. Туркина, О. А. Шухов, Е. Ю. Чельшева и др. // *Клиническая онкоге-*

- матология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. — 2016. — Т. 9, № 3. — С. 368. Four-Year (Yr) Follow-Up Of Patients (Pts) With Newly Diagnosed Chronic Myeloid Leukemia In Chronic Phase (CML–CP) Receiving Dasatinib Or Imatinib: Efficacy Based On Early Response / J. E. Cortes, A. Hochhaus, D.-W. Kim et al. // *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)*. — 2013. — Abstract 653.
13. Хронический миелолейкоз: многолетний опыт таргетной терапии / В. А. Шуваев, К. М. Абдулкадыров, И. С. Мартынкевич и др. // *Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика*. — 2016. — Т. 9, № 1. — С. 54–60.
 14. Five-Year Follow-up of Patients Receiving Imatinib for Chronic Myeloid Leukemia / B. J. Druker, F. Guilhot, S. G. O'Brien, et al. // *New England Journal of Medicine*. — 2006. — Vol.355, N23. — P. 2408–2417.
 15. Interim Analysis of a Pan European Stop Tyrosine Kinase Inhibitor Trial in Chronic Myeloid Leukemia: The EURO-SKI study / D. Rea, F.-X. Mahon, J. Guilhot et al. // *Blood*. — 2015. — N56th Annual Meeting and Exposition, San Francisco, CA December 6–9, 2014. — P. Abstract 151.
 16. Discontinuation of imatinib in patients with chronic myeloid leukaemia who have maintained complete molecular remission for at least 2 years: the prospective, multicentre Stop Imatinib (STIM) trial / F.-X. Mahon, D. Rea, J. Guilhot et al. // *The Lancet Oncology*. — 2010. — Vol.11, N11. — P. 1029–1035.
 17. Discontinuation of tyrosine kinase therapy in CML / F.-X. Mahon // *Annals of Hematology*. — 2015. — Vol.94, N2. — P. 187–193.
 18. Moving treatment-free remission into mainstream clinical practice in CML / T. P. Hughes, D. M. Ross // *Blood*. — 2016. — Vol.128, N1. — P. 17.
 19. Molecular pathophysiology of Philadelphia-negative myeloproliferative disorders: beyond JAK2 and MPL mutations / A. M. Vannucchi, P. Guglielmelli // *Haematologica*. — 2008. — Vol.93, N7. — P. 972–976.
 20. A pooled analysis of overall survival in COMFORT-I and COMFORT-II, 2 randomized phase III trials of ruxolitinib for the treatment of myelofibrosis / A. M. Vannucchi, H. M. Kantarjian, J.-J. Kiladjan, et al. // *Haematologica*. — 2015. — Vol.100, N9. — P. 1139–1145.
 21. Ruxolitinib Efficacy By Hematocrit Control in Patients with Polycythemia Vera: An Analysis of the RESPONSE Trial / S. Verstovsek, J.-J. Kiladjan, R. Mesa, et al. // *Blood*. — 2014. — Vol.124, N21. — P. 3201–3201.
 22. Somatic Mutations of Calreticulin in Myeloproliferative Neoplasms / T. Klampfl, H. Gisslinger, A. S. Harutyunyan, et al. // *New England Journal of Medicine*. — 2013. — Vol.369, N25. — P. 2379–2390.
 23. Somatic CALR Mutations in Myeloproliferative Neoplasms with Nonmutated JAK2 / J. Nangalia, C. E. Massie, E. J. Baxter, et al. // *New England Journal of Medicine*. — 2013. — Vol.369, N25. — P. 2391–2405.

Федеральное медико-биологическое агентство
Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Российский научно-исследовательский институт гематологии
и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства»
(ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России)

Система стандартизации в здравоохранении Российской Федерации
Группа 12. Требования к профилактике заболеваний, защите населения
от повреждающих факторов, охране репродуктивного здоровья
и оказанию медико-социальной помощи

**ДИАГНОСТИКА И ЛЕЧЕНИЕ ХРОНИЧЕСКИХ
МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ**

*Методические рекомендации
МР ФМБА России 33-2020*

Директор , д-р мед. наук, профессор	<i>А. В. Четкин</i>
Заместитель директора , д-р мед. наук	<i>С. С. Бессмельцев</i>
Ответственный за метрологию, обеспечение и стандартизацию	<i>В. С. Маркетов</i>

Исполнители:

Научный руководитель

заместитель директора по научной работе, д-р мед. наук, профессор	<i>С. С. Бессмельцев</i>
вед. науч. сотр., канд. мед. наук	<i>В. А. Шуваев</i>
руководитель лаборатории, молекулярной генетики д-р биол. наук	<i>И. С. Мартынкевич</i>
науч. сотр.	<i>Л. С. Мартыненко</i>
науч. сотр., канд. мед. наук	<i>Е. В. Мотыко</i>
науч. сотр., канд. мед. наук	<i>Л. Б. Полушкина</i>
науч. сотр., канд. мед. наук	<i>М. С. Фоминых</i>
врач, канд. мед. наук	<i>М. П. Бакай</i>

Библиографические данные:

УДК: 616.155.392.8-07

Ключевые слова: миелопролиферативные новообразования, первичный миелофиброз, истинная полицитемия, эссенциальная тромбоцитемия, хронический миелолейкоз, фармакоэкономика, алгоритм, таргетная терапия, ингибиторы тирозинкиназ, ингибиторы янускиназ, персонализация терапии

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	3
1. Область применения	6
2. Нормативные ссылки	7
3. Термины и определения	8
3.1. Обозначения и сокращения	8
4. Основные нормативные положения.....	10
4.1. Методики проведения исследования	10
4.2. Алгоритм диагностики миелопролиферативных новообразований	19
4.3. Программа лечения хронического миелолейкоза с оценкой ведения больных в фазе ремиссии	22
4.4. Программа диагностики и риск-адаптированной терапии эссенциальной тромбоцитемии с мероприятиями профилактики тромботических осложнений	24
4.5. Персонализированная программа лечения больных истинной полицитемией с включением лекарственных препаратов таргетного действия.....	25
4.6. Риск-адаптированная программа лечения миелофиброза с включением препаратов направленной терапии	27
Заключение	29
Библиография	32

Методические рекомендации

ДИАГНОСТИКА И ЛЕЧЕНИЕ ХРОНИЧЕСКИХ МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ

Технический редактор: *Кронберг Т. В.*
Компьютерная верстка: *Дмитриева О. С.*

Бумага офсетная «Светокопи». Печать офсетная.
Гарнитура «Calibri». Подписано в печать 20.10.2020 г.
Печ. л. 2,25. Формат 60×90¹/₁₆.
Тираж 500 экз. Заказ № 212.

Отпечатано в типографии ООО «Агентство “ВиТ-принт”».
191167, Санкт-Петербург, наб. Обводного канала, д. 23, лит. «Б».
Тел.: (812) 612-40-92, 612-40-93
E-mail: vit-print@mail.ru