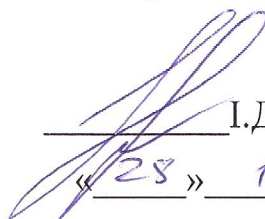


Міністерство охорони здоров'я України
Національна академія медичних наук України
Український центр наукової медичної інформації
та патентно-ліцензійної роботи



УЗГОДЖЕНО
Начальник лікувально-
організаційного
управління НАМН України
д-р мед.наук, проф.


І.Д. Шкробанець
« 28 » 12 2016 р.

УЗГОДЖЕНО

В.о. директора Медичного
департаменту
МОЗ України


А.О. Гаврилюк
« 28 » 12 2016 р.

**АЛГОРИТМ ДІАГНОСТИКИ МІЄЛОПРОЛІФЕРАТИВНИХ
НОВОУТВОРЕНЬ З ЕОЗИНОФІЛІЄЮ**
(методичні рекомендації)

Установи-розробники: ДУ «Національний науковий центр радіаційної медицини НАМН України»

Укладачі:

Д-р. мед. н. С.В. Клименко, (044) 484-18-74

Л.О. Полубень, (044) 484-18-74

канд. біол. н. Л.В. Неумержицька, (044) 484-18-74

Р. М. Вербиленко, (044) 484-18-74

О.О. Шумейко

Рецензенти:

д. мед. н., професор С.В. Видиборець

д. мед. н. І.С. Дягіль

Голова проблемної комісії МОЗ та НАМН України «Гематологія та трансфізіологія», чл.-кор. НАМН України Володимир Григорович Бебешко

ЗМІСТ

Перелік умовних скорочень	5
<hr/>	
Вступ	7
1. Основна частина	9
1.1 Епідеміологія еозинофілії	9
1.2 Визначення та класифікація еозинофілії	9
1.3 Клініка та діагностика	15
<hr/>	
2. Аналіз перебудов у генах <i>PDGFRA</i> , <i>PDGFRB</i> , <i>FGFR1</i>	17
3. Діагностичний алгоритм	20
Висновки	26
Перелік рекомендованої літератури	28

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АКЕ	-	Абсолютна кількість еозинофілів
ГЕ	-	Гіпереозинофілія
ГЕ _{нз}	-	Гіпереозинофілія невизначеного значення
ГЕ _к	-	Гіпереозинофілія клональна
ГЕ _р	-	Гіпереозинофілія реактивна
ГЕ _с	-	Гіпереозинофілія сімейна
ГЕС	-	Гіпереозинофільний синдром
ГЛЗФ	-	Гостра лейкемія змішаного фенотипу
ГЛЛ	-	Гостра лімфобластна лейкемія
ГМЛ	-	Гостра мієлоїдна лейкемія
ЕТ	-	Есенціальна тромбоцитемія
ІГЕ	-	Ідіопатична гіпереозинофілія
ІЛ	-	Інтерлейкін
МДС	-	Мієлодиспластичний синдром
МДС-КС	-	МДС із кільцевими сидеробластами
МНЕ	-	Мієлопроліферативне новоутворення з еозинофілією
МПН	-	Мієлопроліферативне новоутворення
ПМФ	-	Первинний мієлофіброз
ПЛР	-	Полімеразна ланцюгова реакція
ПЛР-РЧ	-	Полімеразна ланцюгова реакція в реальному часі
СП	-	Справжня поліцитемія
СМ	-	Системний мастоцитоз
ФАБ	-	Франко-американо-британська класифікація
ХЕЛ	-	Хронічна еозинофільна лейкемія
ХЕЛ-НУ	-	Хронічна еозинофільна лейкемія, неуточнена
ХМЛ	-	Хронічна мієлоїдна лейкемія
ХММЛ	-	Хронічна мієломоноцитарна лейкемія
ЧАЕС	-	Чорнобильська атомна електростанція

ЮММЛ	-	Ювенільна мієломоніцитарна лейкемія
ABL1	-	Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1
BCR	-	Breakpoint cluster region protein
CD	-	Кластер диференціації
CHIC2	-	Збагачений цистеїном гідрофобний домен 2
FIP1L1	-	FIP1-подібний-1 ген
FISH	-	Флюоресцентна гібридизація in situ
FGFR1	-	Рецептор 1 фактора росту фібробластів
ETV6	-	ETS варіант 6
HLA-DR	-	HLA-DR (Human Leukocyte Antigen - antigen D Related)
JAK2	-	Янус кіназа 2
PDGFRA	-	Рецептор до тромбоцитарного фактора росту альфа
PDGFRB	-	Рецептор до тромбоцитарного фактора росту бета
PCM1	-	Pericentriolar material 1
Ph	-	Філадельфійська (Ph) хромосома
SEER	-	Спостереження, епідеміологія та кінцеві результати
STAT5	-	Сигнальний трансдуктор та активатор транскрипції 5
TARC– хемокін	-	Тимус-асоційований регуляторний хемокін
Th	-	T-хелпер
ZNF198	-	Протеїн 198 типу цинкові пальці

ВСТУП

Мієлоїдні новоутворення з еозинофілією формують окрему групу мієлопроліферативних новоутворень (МПН), у контексті яких перспективним є визначення клональних маркерів, зокрема перебудов гена рецептора тромбоцитарного фактора росту альфа (*PDGFRA*), гена рецептора тромбоцитарного фактора росту бета (*PDGFRB*) та гена рецептора фактора росту фібробластів 1 (*FGFR1*), мутації гену *JAK2*.

Ген *PDGFRA* кодує рецептори до тромбоцитарного фактору росту, що містять тирозинкіназний домен та активуються під дією однойменного ліганду. У випадку перебудови *FIP1*-подібного-1 гена (*FIP1L1*) з геном *PDGFRA*, у результаті інтерстеціальної делеції на довгому плечі хромосоми 4-del(4)(q12q12), утворюється химерний ген *FIP1L1-PDGFRA*. Розриви в гені *PDGFRA* завжди відбуваються в 12 екзоні, а в гені *FIP1L1* – впродовж досить довгого проміжку, що локалізується від 7 до 10 інтрону. Химерний ген *FIP1L1-PDGFRA* визначається за низки гематологічних неоплазій, зокрема за системного мастоцитозу (СМ), хронічної еозинофільної лейкемії (ХЕЛ), гострої мієлоїдної лейкемії (ГМЛ), гострої лімфобластної лейкемії (ГЛЛ). Його розповсюдженість варіює від 3 % у осіб з еозинофілією до 20 % у хворих, яким верифіковано ідіопатичний еозинофільний синдром без проведення цитогенетичних або молекулярно-генетичних досліджень.

Інший варіант клонального МПН з еозинофілією (МНЕ) пов'язаний з залученням у патологічний процес змін розташованого в 33 локусі 5 хромосоми гена *PDGFRB*. Найбільш вивченим є химерний ген *ETV6-PDGFRB*, що утворюється в результаті транслокації t(5;12)(q33;p13) та зустрічається за хронічної мієломоноцитарної лейкемії (ХММЛ), ГЛЛ. Проте частота даного генетичного патерну в когорті хворих на гематологічні новоутворення надзвичайно низька і складає менше 1 %.

Химерні гени *FIP1L1-PDGFRA* та *ETV6-PDGFRB* кодують білки з однойменними назвами, що мають постійну тирозинкіназну активність та забезпечують незалежну від цитокінів проліферацію клітин гемопоетичного ряду.

Поломки в локусі 11-12 короткого плеча 8 хромосоми, із залученням гена *FGFR1*, також призводять до розвитку МНЕ. Описано декілька транслокаційних

партнерів гена *FGFR1*. Найбільш розповсюдженою транслокацією є $t(8;13)(p11-12;q11-12)$, у результаті якої утворюється ген *FGFR1-ZNF198*, що кодує білок із постійною тирозинкіназною активністю та зумовлює *STAT5*-залежну проліферацію клітин. Розповсюдженість даного химерного гена поміж хворих із гематологічними неоплазіями також вкрай мала – менше 1% та спостерігається, у першу чергу, при МНЕ, а також при розвитку такого синдрому, як стовбуровоклітинна лейкемія–лімфома.

Хворі на МНЕ характеризуються певними особливостями клінічного перебігу, а також лабораторно-гематологічними показниками, залежно від наявності або відсутності перебудов генів *PDGFRA*, *PDGFRB* та *FGFR1*. Слід приймати до уваги, що існують молекулярно-генетичні особливості формування радіаційно-асоційованих МНЕ.

В Україні дотепер не було розроблено чіткого алгоритму верифікації діагнозу МНЕ, що вимагає від гематологів вивчення, а також впровадження в практику, тестування молекулярно-генетичних та цитогенетичних маркерів. Продовжується обговорення необхідності визначення перебудов генів *PDGFRA*, *PDGFRB* та *FGFR1* для діагностики МНЕ, оскільки їх використання в якості маркеру МНЕ може уможливити ранній скринінг онкопатології в осіб, які постраждали внаслідок аварії на ЧАЕС, та у хворих без радіаційного анамнезу, підвищити надійність та досягти своєчасності діагностики, уніфікувати обстеження хворих, уникнути використання коштовних, складних тестів, наблизитися до світових стандартів медицини.

Матеріали систематизовані науковцями відділу медичної генетики ДУ «Національний науковий центр радіаційної медицини НАМН України» у відповідності до сучасних міжнародних стандартів, у рамках виконання науково-дослідної роботи «Молекулярно-генетичні фактори тромбоутворення у хворих на Rh-негативні мієлопроліферативні неоплазії, які постраждали внаслідок аварії на Чорнобильській АЕС» (2014-2016 рр., № держреєстрації 0114U002849). Методичні рекомендації призначені для лікарів: гематологів, онкологів та лікарів загальної практики-сімейних лікарів.

Методичні рекомендації з даної проблеми видаються в Україні вперше.

1 ОСНОВНА ЧАСТИНА

1.1 Епідеміологія еозинофілії

Захворюваність і поширеність гіпереозинофільного синдрому (ГЕС) описані недостатньо. Згідно з даними Міжнародної класифікації хвороб для онкології (Classification of Disease for Oncology) версії 3 за кодом 9964/3 (ГЕС, ХЕЛ), та даними бази «Спостереження, епідеміологія та кінцеві результати» (SEER) від 2001 до 2005 року нормалізований за віком показник захворюваності складає близько 0.036 на 100 000 осіб. Захворюваність на еозинофілію з генетичними аномаліями (*PDGFRA/B*, *FGFR1*) складає меншість серед цих пацієнтів. Середня частота химерного генотипу *FIP1L1-PDGFRA* серед пацієнтів із гіпереозинофілією складає 23 % (від 3% до 56 %). Дослідження, проведені у країнах, що розвиваються, демонструють, що перебудова *FIP1L1-PDGFRA* спостерігається приблизно в 10 % хворих з ідіопатичною гіпереозинофілією. Незважаючи на те, що ідіопатичну гіпереозинофілію та ХЕЛ, як правило, діагностують у осіб віком від 20 до 50 років, маніфестувати наведені нозології можуть у будь-яких вікових групах, зокрема, зрідка описують випадки їх виникнення у дітей, включаючи немовлят. У базі даних SEER наведений 131 випадок ГЕС, діагностованого в період з 2001 р. по 2005 р. Співвідношення чоловіків до жінок із ГЕС складало 1.47, а частота ГЕС збільшувалась із віком, із досягненням піку у 65-74 роки.

1.2 Визначення та класифікація еозинофілії

Верхня межа референтних показників для відсоткового діапазону еозинофілів у периферичній крові становить 3-5 %, із відповідною абсолютною кількістю еозинофілів (АКЕ) 350-500/мм³. За тяжкістю еозинофілію умовно розділено на легку (АКЕ від верхньої межі норми до 1500/мм³), помірну (АКЕ – 1,500-5,000/мм³) та важку (АКЕ більше 5000/мм³).

Класифікація еозинофільних захворювань була переглянута ВООЗ у 2016 році (Таблиця 1). У зв'язку із зростаючою кількістю молекулярно-верифікованих первинних еозинофілій, створена категорія «Міелоїдні та лімфоїдні неоплазії з еозинофілією та перебудовами *PDGFRB*, *PDGFRA* або *FGFR1*» (Таблиця 2). В основній категорії МПН, хронічна еозинофільна

лейкемія, не уточнена (ХЕЛ-НУ), є однією з восьми нозологій в межах цієї групи (Таблиця 3). Хронічна еозинофільна лейкемія, не уточнена, діагностується за відсутності філадельфійської хромосоми (Ph-хромосоми), перебудови *PDGFRA/B* та *FGFR1*, а також за виключенням інших гострих або хронічних первинних новоутворень кісткового мозку, які можуть супроводжуватися еозинофілією, таких як ГМЛ, мієлодиспластичний синдром (МДС), СМ, класичні МПН (хронічна мієлоїдна лейкемія (ХМЛ), справжня поліцитемія (СП), есенціальна тромбоцитемія (ЕТ) та первинний мієлофіброз (ПМФ)), а також МДС/МПН суміжних розладів (наприклад, ХММЛ) (Таблиця 2-4). Хронічна еозинофільна лейкемія, не уточнена, характеризується збільшенням кількості бластів у кістковому мозку або периферійній крові (але кількість бластів становить менше, ніж 20 %, зважаючи на те, що більший їх відсоток є критерієм для верифікації діагнозу гострої лейкемії), і/або доказами клональності в паростку еозинофілів.

Діагноз ідіопатичного ГЕС вимагає виключення усіх первинних і вторинних причин гіпереозинофілії, а також лімфоцитарного варіанту гіпереозинофілії (Таблиця 4). Сучасне визначення ГЕС базується на історичних критеріях, викладених Chusid та колегами в 1975 році: АКЕ більше 1500/мм³ протягом більше 6 місяців та наявність пошкодження тканин. Проте, критерій, щодо наявності еозинофілії протягом більше, ніж 6 місяців, набуває другорядного значення, враховуючи наявність удосконалених методів оцінки еозинофілії та необхідність прискорення початку терапії з метою зведення до мінімуму пошкодження органів та тканин.

На відміну від ГЕС, термін «ідіопатична гіпереозинофілія» використовується, коли пошкодження органу-мішені відсутнє. На сьогодні пул станів, що класично діагностувались як ідіопатичний ГЕС, зменшився, за рахунок збільшення частки випадків, що зумовлені клональними порушеннями. Тому ГЕС можна вважати тимчасовим діагнозом до визначення причини первинної або вторинної еозинофілії.

Класифікація мієлоїдних неоплазій ВООЗ (2016 р.)

Мієлопроліферативні неоплазії (МПН):

Хронічна мієлоїдна лейкемія (ХМЛ), BCR-ABL1⁺

Хронічна нейтрофільна лейкемія (ХНЛ)

Справжня поліцитемія (СП)

Первинний мієлофіброз (ПМФ):

ПМФ, префібротичний, рання стадія

ПМФ, розгорнута фібротична стадія

Есенціальна тромбоцитемія (ЕТ)

Хронічна еозинофільна лейкемія, не уточнена (ХЕЛ-НУ)

МПН, не уточнене

Мастоцитоз

Мієлоїдні/лімфоїдні неоплазії з еозинофілією і перебудовою *PDGFRA*, *PDGFRB* або *FGFR1*, або з *PCMI-JAK2*:

Мієлоїдна/лімфоїдна неоплазія з перебудовою *PDGFRA*

Мієлоїдна/лімфоїдна неоплазія з перебудовою *PDGFRB*

Мієлоїдна/лімфоїдна неоплазія з перебудовою *FGFR1*

Тимчасова категорія: Мієлоїдна/лімфоїдна неоплазія з перебудовою PCMI-JAK2

Мієлодиспластичний синдром / мієлопроліферативні неоплазії (МДС/МПН):

Хронічна мієломоноцитарна лейкемія (ХММЛ)

Атипова хронічна мієлоїдна лейкемія (аХМЛ) – BCR-ABL1⁻негативна

Ювенільна мієломоноцитарна лейкемія (ЮММЛ)

МДС/МПН із кільцевими сидеробластами та тромбоцитозом (МДС/МПН-КС-Т)

МДС/МПН, не уточнена

Діагностичні критерії мієлоїдних і лімфоїдних новоутворень з еозинофілією та аномаліями PDGFRA, PDGFRB або FGFR1

Діагностичні критерії в МПН^а з еозинофілією, пов'язаної з *FIP1L1-PDGFR A*:

Мієлопроліферативні новоутворення з відомою еозинофілією, і наявність перебудови гена^б *FIP1L1-PDGFR A*

Діагностичні критерії МПН, пов'язаної з перебудовою гена *ETV6-PDGFR B* або іншою перебудовою *PDGFR B*:

Мієлопроліферативні новоутворення, часто з вираженою еозинофілією, а іноді і з нейтрофіліозом або моноцитозом, і наявність t(5;12)(q31-q33;p12), або варіантної транслокації^в, або перебудови гена *ETV6-PDGFR B* або перебудови *PDGFR B*

Діагностичні критерії МПН або гострої лейкемії, пов'язаної з перебудовою *FGFR 1*:

Мієлопроліферативні новоутворення з вираженою еозинофілією, а іноді і з нейтрофіліозом або моноцитозом, **або**

Гостра мієлоїдна лейкемія або лімфобластна лейкемія/лімфома з клітин-попередників Т- або В-лімфоцитів (зазвичай асоціюється з еозинофілією в периферичній крові або кістковому мозку) і

наявність t(8;13)(p11;q12) або варіантної транслокації, що призводить до перебудови *FGFR 1* в мієлоїдних клітинах, лімфобластах, або обох видах клітин

а) Пацієнти з ГМЛ або ГЛЛ / лімфомою з еозинофілією і перебудовою гену *FIP1L1-PDGFR A* також віднесені до цієї категорії.

б) Якщо необхідний молекулярний аналіз не доступний, цей діагноз слід підозрювати, якщо є Rh-негативне МПН із гематологічними особливостями ХЕЛ, пов'язаною із спленомегалією, вираженим підвищенням сироваткового вітаміну В12, підвищенням сироваткової триптази і збільшенням кількості тучних клітин в кістковому мозку.

в) Оскільки t(5;12)(q31-q33;p12) не завжди призводить до утворення гібридного гена *ETV6-PDGFR B*, молекулярне підтвердження є бажаним. Якщо молекулярний аналіз недоступний, цей діагноз слід

підозрювати, якщо є Rh-негативне МПН, пов'язане з еозинофілією і транслокацією в сегменті 5q31-33.

Таблиця 3

**Діагностичні критерії хронічної еозинофільної лейкемії, неуточненої
(ХЕЛ-НУ)**

1. Еозинофілія (АКЕ більше $1,5 \times 10^9/\text{л}$)
2. Відсутня Ph-хромосома або химерний ген *BCR-ABL* або інші МПН (СП, ЕТ, ПМ, системний мастоцитоз) або МДС/МПН (ХММЛ або атиповий ХМЛ)
3. Відсутність *t(5;12)(q31-q35;p13)* або іншої перебудови *PDGFRB*
4. Відсутність перебудови гена *FIP1L1-PDGFRB* або іншої перебудови *PDGFRB*
5. Відсутність перебудови *FGFR1*
6. Кількість бластних клітин в периферійній крові і кістковому мозку становить менше 20 % і відсутні *inv(16)(p13q22)* або *t(16;16)(p13;q22)* або інші діагностичні маркери ГМЛ
7. Існує клональна цитогенетична або молекулярно-генетична аномалія, або кількість бластних клітин у периферичній крові більша, ніж 2 %, або більша, ніж 5 % в кістковому мозку.

Таблиця 4

Діагностичні критерії ідіопатичного гіпереозинофільного синдрому (ГЕС)

Критерії виключення:

1. Реактивна еозинофілія
2. Лімфоцитарний варіант ГЕ (цитокін-продукуюча, імунофенотипово-аберантна Т-клітинна популяція)
3. Хронічна еозинофільна лейкемія, неуточнена
4. Визначені ВООЗ мієлоїдні неоплазії, пов'язані з еозинофілією (наприклад, МДС, МПН, МДС/МПН, або ГМЛ)
5. Асоційовані з еозинофілією МПН або ГМЛ/ГЛЛ з перебудовою *PDGFRB*, *PDGFRB* або *FGFR1*.

6. Абсолютна кількість еозинофілів більше $1500/\text{мм}^3$, що зберігається щонайменше 6 місяців. Наявність пошкодження тканин. Якщо немає ніяких пошкоджень тканини, ІГЕ є найбільш прийнятним діагнозом.

У 2011 році Робоча конференція з еозинофільних розладів та синдромів запропонувала нову термінологію. Група рекомендувала застосовувати термін «гіпереозинофілія (ГЕ)» для стійкої та значної еозинофілії (АКЕ більше $1500/\text{мм}^3$). Також, ГЕ була розділена на підтипи: спадковий (сімейний) варіант (ГЕ_c), ГЕ невизначеного значення ($\text{ГЕ}_{\text{нз}}$), первинна (клональна / пухлинна) ГЕ, що походить із клональних / пухлинних еозинофілів (ГЕ_k), і вторинну (реактивну) ГЕ (ГЕ_p). Гіпереозинофілія невизначеного значення була представлена в якості нового терміну замість «ідіопатичної гіпереозинофілії (ІГЕ)». Рекомендовано застосовувати термін «ГЕС» із зазначенням конкретного варіанту, позначеного певним індексом (наприклад, $\text{ГЕ}_{\text{нз}}$, ГЕ_k і ГЕ_p), при будь-якій ГЕ, що сполучена з пошкодженням органів-мішеней.

Критерії для верифікації неоплазій, що асоційовані з еозинофілією та переглянуті ВООЗ у 2016 році, ґрунтуються на специфічних молекулярних або цитогенетичних маркерах. Хоча в певній кількості випадків, наявність молекулярно- або цитогенетичних маркерів, що належать до групи асоційованих з еозинофілією, може сполучатись із відсутністю еозинофілії.

У переглянутій класифікації ВООЗ 2016 року (Таблиця 1), у групу «Мієлоїдні/лімфоїдні неоплазії з еозинофілією та перебудовою гена *PDGFRA*, *PDGFRB* або *FGFR1*, або з *PCMI-JAK2*» включено мієлоїдну неоплазію з $t(8;9)(p22;p24.1)$ та *PCMI-JAK2*, як нову тимчасову категорію – мієлоїдна/лімфоїдна неоплазія з перебудовою *PCMI-JAK2*. Наявність перебудови *PCMI-JAK2* асоціюється з еозинофілією та змінами у кістковому мозку у вигляді зсуву в мієлоїдному паростку ліворуч, з еритроїдним переважанням, лімфоїдними агрегаціями та, часто, мієлофіброзом, що іноді імітує ПМФ. У рідкісних випадках мієлоїдна/лімфоїдна неоплазія з перебудовою *PCMI-JAK2* може проявлятися у вигляді Т-або В-ГЛЛ, що

відповідає на терапію JAK-інгібіторами. Інші новоутворення, пов'язані з перебудовою гена *JAK2*, наприклад: *t(9;12)(p24.1;p13.2)* і *ETV6-JAK2*, *t(9;22)(p24.1;q11.2)* та *BCR-JAK*, можуть мати описані вище клініко-гістологічні риси, але зустрічаються вкрай рідко, і на поточний момент, не включені в класифікацію в якості окремих категорій. Крім того, випадки з утворенням химерного гена *ETV6-JAK2* і *BCR-JAK2* переважно спостерігаються при В-клітинній ГЛЛ та включені в категорію «*BCR-ABL1*-подібні В-клітинні ГЛЛ», як нову тимчасову групу В-лімфобластних лейкемій/лімфом.

1.3 Клініка та діагностика

Різноманітні клінічні прояви первинної еозинофілії / ГЕС відображають їх гетерогенність. У двох серіях ретроспективних оглядів, опублікованих в 1982 (Fauci AS et al.) та 2009 році (Ogbogu P. et al.), зазначається, що у 12 % та 6 % осіб, відповідно, еозинофілія була визначена випадково. Найбільш поширеними скаргами та симптомами були слабкість і втома (26 %), кашель (24 %), диспное (16 %), біль у м'язах або набряки (14 %), висип або лихоманка (12 %) та риніт (10 %). При ГЕС лейкоцитоз (наприклад, 20.000 – 30.000/мм³ або вище) із периферійною еозинофілією в межах 30-70 % є звичайною знахідкою. У вищезгаданому ретроспективному аналізі 2009 року (Ogbogu P. et al.) у 188 пацієнтів середнє значення АКЕ складало 6.600/мм³, а їх діапазон коливався в межах 1.500 – 400.000/мм³. Інші гематологічні зміни периферійної крові або кісткового мозку включали в себе: підвищення кількості нейтрофілів, базофілів, зсув у мієлоїдному паростку до молодих форм, наявність різного ступеню дисплазії як зрілих, так і незрілих еозинофілів. В іншому ретроспективному огляді 1982 року (Fauci AS et al.) показано, що у пацієнтів із первинною еозинофілією / ГЕС анемія зустрічалась у 53 % випадків, тромбоцитопенія – у 31% випадків, тромбоцитоз - у 16 % випадків, а зміни в кістковому мозку характеризувались коливанням кількості еозинофілів у межах від 7 % до 57 % (у середньому 33 %) та наявністю кристалів Шарко-Лейдена, а у деяких випадках - збільшенням кількості бластів і фіброзом.

Всі системи та органи можуть вражатися під впливом стійкої еозинофілії. Проте, під час клінічного дослідження пацієнтів із ГЕ, найбільш поширеними

проявами були симптоми з боку покривної тканини, що зустрічаються у 69 % випадків, ураження легеневої та травної систем, частота залучення яких складає 44 % та 38 % відповідно. Симптоми зі сторони легеневої та травної систем неспецифічні та варіюють від ступеню інфільтрації тканин еозинофілами та рівню ураження. Так, залучення легеневої системи у хворих із різними варіантами ГЕ_к клінічно проявляється пневмонітами, обструктивними захворюваннями легень, васкулітами та ін., а залучення травної системи – панкреатитами із ферментативною недостатністю, езофагітами, гастродуоденітами, колітами та ін.. До типового прикладу пошкодження серцево-судинної системи належить прогресивна серцева недостатність. Розвиток серцевої недостатності при ГЕ патологічно зумовлений пошкодженням тканин серця, в першу чергу міокарду, внаслідок його інфільтрації еозинофілами та впливу низки біологічно-активних медіаторів. При ушкодженні ендокарду, зумовленого ГЕ, збільшується ймовірність тромбоутворення, а отже підвищується ризик розвитку тромбоемболії. На більш пізній стадії патологічного процесу можливе виникнення гіперплазії та фіброзу ендокарду, що клінічно маніфестує у вигляді рестриктивної кардіоміопатії, а при залученні клапанного апарату серця призводить до набутих клапанних вад. У випадку інфільтрації еозинофілами перикарду та ендотелію коронарних судин розвиваються перикардит та ішемія міокарду відповідно.

2 АНАЛІЗ ПЕРЕБУДОВ У ГЕНАХ *PDGFRA*, *PDGFRB*, *FGFR1*

Поміж низки перебудов у генах *PDGFRA*, *PDGFRB*, *FGFR1* найпоширенішою є інтерстеційна делеція на довгому плечі хромосоми 4 – del(4)(q12q12) з утворенням химерного гена *FIP1L1-PDGFRB*. Аналіз перебудов у гені *PDGFRA* нами проведено за допомогою методу FISH у 19 хворих з гіпереозинофільним синдромом, із них 2 особи зазнали дії іонізуючої радіації внаслідок аварії на ЧАЕС. В одного пацієнта було виявлено наявність химерного гена *FIP1L1-PDGFRB*, що дозволило верифікувати діагноз МНЄ, розпочати негайну специфічну таргетну терапію іматинібом та досягнути повної відповіді на лікування.

Скринінг на наявність делеції del(4)(q12q12) проводили за допомогою проби FIP1L1/CHIC2/PDGFRB Deletion/Fusion (Cytocell, Велика Британія). Кістковий мозок або периферійну кров в об'ємі 1-4 мл поміщали в 4-мілілітрові пробірки з літєвою сіллю гепарину. Для виділення мононуклеарів у суху пробірку поміщали 4 мл суміші урографін-фікол щільністю 1,077 г/л і обережно нашаровували 8 мл ядерних клітин кісткового мозку чи периферійної крові, задалегідь розведених до концентрації $10\text{--}20 \times 10^6/\text{мл}$ стерильним забуференим ізотонічним розчином хлориду натрію (фосфатно-сольовим буфером, PBS). Центрифугували 20 хв за частоти 3000 об/хв і температури 20°C та зупиняли без гальмування. Клітини, розміщені на межі розподілу плазми та суміші урографін-фіколу збирали, переносили в іншу пробірку та розводили в 5 разів розчином PBS чи середовищем Хенкса. Виділені клітини осаджували центрифугуванням протягом 10 хв за частоти 1000 об/хв. Приблизно 200 мкл суспензії мононуклеарних клітин кісткового мозку або периферичної крові з вмістом бластів, більшим за 30 %, ресуспендували в 10 мл фізіологічного розчину, центрифугували 5 хв за частоти 3000 об/хв та видаляли супернатант. Клітини ресуспендували в залишках фізіологічного розчину пастерівською піпеткою та додавали 5 мл 0,075 моль розчину KCl. Після гіпотонічної обробки, суспензію центрифугували протягом 5 хв із частотою 3000 об/хв та видаляли супернатант. Клітини ресуспендували в залишках розчину і краплями за постійного обережного перемішування додавали 3–4 мл охолодженої суміші абсолютного метанолу та льодяної оцтової кислоти у співвідношенні 3:1.

Пробірки з клітинною сумішшю витримували на льоду 15 хв, а далі центрифугували за частоти 3000 об/хв протягом 5 хв. Видаляли фіксувальний розчин за винятком 200–500 мкл, у яких ресуспендували клітинну суспензію. Стандартною пастерівською піпеткою капали 2–3 краплі суспензії фіксованих клітин із висоти 5–10 см на вологе охолоджене предметне скельце, яке потім висушували на повітрі. Алмазним маркером помічали на склі зони для гібридизації. Препарати витримували від 1 до 7 діб в інкубаторі за температури 37 С, а потім зберігали при температурі мінус 20 С до подальшого використання. Перед гібридизацією *in situ* препарати прогрівали 5–10 хв за температури 65°C, потім інкубували з пепсином в концентрації 100 мкг/мл в 0,01 моль розчину HCl протягом 150 С за температури 37 С. Далі, в глибоких склянках, за кімнатної температури препарати ополіскували в розчині PBS, промивали по 5 хв у двох змінах розчину PBS та 0,05 моль розчину MgCl₂ у PBS, фіксували в 1 %-му параформальдегіді в розчині PBS протягом 4 хв, ополіскували в розчині PBS, промивали по 5 хв в двох змінах розчину PBS, дегідратували в трьох змінах етанолу: 70, 90 та 100 %-му, по 2 хв у кожній.

Препарати денатурували 4–5 хв при 73°C в 70 %-му розчині формаміду в 2× SSC (рН 7,0). Після денатурації препарати дегідратували в трьох змінах охолодженого етанолу: 70, 90 та 100 %-му, по 2 хв у кожній. Паралельно за температури 73 С протягом 5 хв денатурували гібридизаційну суміш. Потім на плиті за температури 45–50 С на означену ділянку предметного скла наносили денатуровану гібридизаційну суміш, накривали її покривним скельцем, краї якого промазували гумовим клеєм.

Препарат інкубували у вологій камері протягом 16 годин за температури 37 С. Після інкубації з препаратів знімали покривні скельця, у темряві за температури 42 С ополіскували в 2 × SSC, промивали у трьох змінах 50 %-го розчину формаміду у 2 × SSC по 10 хв у кожній, ополіскували в 2 × SSC, промивали 5 хв у 2 × SSC, у двох змінах 0,2 × SSC по 5 хв в кожній. Далі за кімнатної температури 5 хв препарати промивали в 0,1 %-му розчині NP 40 у фосфатному буфері, 30–40 с у DAPI (4',6'-діамідін-2-феніліндол) у концентрації 150 нг/мл у 2 × SSC, ополіскували в дистильованій воді, висушували на повітрі

та наносили реагент, який запобігає вицвітання препарату (Vectashield mounting medium; Vector Laboratories, США). Препарати після гібридизації зберігали за температури мінус 20 С.

Для перегляду препаратів використовували флуоресцентний мікроскоп з пристроями захвату зображень, фільтрами для DAPI, FITC, TexasRED, ртутною лампою 100 Вт Olympus BX 51 з програмою аналізу зображень CytoVision/V. 3.00 build 61 (Applied Imaging Corp., США). У кожному випадку аналізувалось 200 інтерфазних клітин.

Результати проведених власних досліджень свідчать про відтворюваність загальноприйнятих критеріїв діагностики новоутворень з еозинофілією в Україні та частоту химерного гена *FIP1L1-PDGFRΑ* у осіб з еозинофільним синдромом у нашій країні, що є порівнюваною з даними літератури щодо інших країн, що дозволяє використовувати алгоритм діагностики, наведений нижче.

3 ДІАГНОСТИЧНИЙ АЛГОРИТМ

Крок 1: виключити причини вторинної (реактивної) еозинофілії

Вторинна еозинофілія може бути наслідком низки станів, які потребують діагностичної оцінки з боку суміжних спеціалістів. У країнах, що розвиваються, еозинофілія найчастіше зумовлена інфекційними процесами, зокрема інвазіями тканинних паразитів. В певному клінічному контексті доцільно в першу чергу диференціювати з алергічними/атопічними реакціями, реакціями на лікарські препарати, системними захворюваннями сполучної тканини (наприклад, синдром Черджа-Стросса, гранулематоз Вегенера, системний червоний вовчак), легеневиими еозинофільними захворюваннями (наприклад, ідіопатична гостра або хронічна еозинофільна пневмонія, тропічна легенева еозинофілія, алергічний бронхолегеневий аспергільоз і т.д.), алергічним гастроентеритом (асоційованим з периферійною еозинофілією), а також метаболічними порушеннями (наприклад, при недостатності надниркових залоз). Лімфоїдні неоплазії, що не належать до групи «Мієлоїдні/лімфоїдні неоплазії з еозинофілією і перебудовою *PDGFRA*, *PDGFRB* або *FGFR1*, або з *PCM1-JAK2*» також можуть асоціюватись з появою вторинної еозинофілії, що виникає в результаті синтезу низки цитокінів, а саме ІЛ-3, ІЛ-5, ГМ-КСФ та Г-КСФ, які сприяють диференціації і виживанню еозинофілів. Наприклад, підвищеним синтезом зазначених цитокінів можуть характеризуватися злоякісні клітини при Т-клітинних лімфомах, хворобі Ходжкіна та ГЛЛ.

Рідкісні стани, асоційовані з еозинофілією, включають сімейну еозинофілію, генетичне підґрунтя якої залишається невідомим, гіпер-IgE синдром, синдром Омена, епізодичний ангіоневротичний набряк з еозинофілією (синдром Глейча) та синдром еозинофілії-міалгії, що може бути спричинений вживанням триптофану або, в історичному аспекті, токсичного масла. Повторне дослідження на наявність гельмінтів, а саме дослідження копрокультур хворих та визначення антитіл до специфічних паразитів (наприклад, *Strongyloides*) мають першорядне значення для встановлення інфекційної еозинофілії. Додаткові лабораторні та інструментальні дослідження (рентгенографія органів грудної порожнини, електрокардіографія та

ехокардіографія, комп'ютерна томографія грудної та черевної порожнини, а також тазу) необхідні при наявності інформації щодо відвідування екзотичних країн, відповідних симптомів та результатів фізикального дослідження. При підозрі на еозинофільне захворювання легень необхідне визначення функції зовнішнього дихання, проведення бронхоскопії та серологічних тестів (наприклад, визначення *Aspergillus* IgE для виключення алергічного бронхолегеневого аспергільозу).

Крок 2: Оцінка первинної (клональної) еозинофілії

Якщо вторинні причини еозинофілії виключені, слід приступити до виявлення та оцінки первинного ураження кісткового мозку. Дослідження мазка крові і біохімічні аналізи крові (наприклад, циркулюючі бласти, диспластичні клітини, моноцитоз, підвищений рівень сироваткового В12 або триптази) в поєднанні з морфологічним, цитогенетичним та імунофенотиповим аналізом кісткового мозку допоможе з'ясувати, чи можливо виключити, чітко визначені Класифікацією ВООЗ 2016 році, мієлоїдні новоутворення, такі як СМ, ХМЛ, ГМЛ (особливо підтипи М2 і М4 Ео згідно ФАБ класифікації), МДС або МДС/МПН граничні розлади (наприклад, ХММЛ). Хоча, формально не включений в монографію ВООЗ термін «Мієлопроліферативний варіант гіпереозинофілії» використовується для позначення деяких із цих еозинофільних мієлоїдних злоякісних новоутворень через клініко-патологічні подібності з ХМЛ та *BCR-ABL1* негативними МПН.

Лабораторна оцінка первинної еозинофілії повинна починатись зі скринінгу периферійної крові на гібридний ген *FIP1L1-PDGFR*A (за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) в реальному часі (ПЛР-РЧ) або інтерфазного/метафазного FISH). Зонди FISH, які гібридизуються в ділянці між генами *FIP1L1* та *PDGFR*A використовуються для виявлення цитогенетично-прихованої 800-kb делеції на 4q12, яка призводить до утворення *FIP1L1-PDGFR*A. Оскільки ген *CHIC2* знаходиться в цьому видаленому генетичному сегменті, цей широко доступний клінічний тест часто називається «FISH для делеції *CHIC2*».

У тих випадках, коли *FIP1L1-PDGFR*A скринінг не доступний, оцінка концентрації сироваткової триптази є корисним сурогатним маркером *FIP1L1-PDGFR*A-позитивного новоутворення, оскільки значне підвищений її рівня виявляється при збільшені проліферативної активності клітин із *FIP1L1-PDGFR*A перебудовою та у випадках мієлопроліферативних варіантів ГЕ. Наявність химерного гена *FIP1L1-PDGFR*A часто ідентифікують у випадках зі збільшенням кількості тучних клітин у кістковому мозку з периферійною еозинофілією. Кістковий мозок таких пацієнтів, як правило, при імунному фарбуванні на наявність триптази демонструє вільні кластери мастоцитів, на відміну від класичного СМ, при якому виявляють щільні агрегати тучних клітин, що асоційовані з мутацією *KIT D816V*. Перебудова *FIP1L1-PDGFR*A також може спостерігатись при ГМЛ і Т-клітинних лімфобластних лімфомах, пов'язаних з еозинофілією.

У хворих із *FIP1L1-PDGFR*A-позитивною ГЕ_к, на додаток до дисрегуляції гена *PDGFR*A через його перебудову з геном *FIP1L1* або іншими генами-партнерами, були ідентифіковані активуючі точкові мутації в самому гені *PDGFR*A. Зазначимо, що хоча існує певна мінливість у трансформуючій здатності точкових мутації в гені *PDGFR*A, введення клітин із їх наявністю піддослідним мишам спричиняє виникнення захворювань, подібних на лейкемію. Лікування іматинібом хворих із перебудовою *PDGFR*A значно знижує лейкемічний ріст та збільшує виживаність.

Відсутність химерного гена *FIP1L1-PDGFR*A має спонукати до пошуку інших причин первинних еозинофілій, пов'язаних із повторюваними молекулярними аномаліями. Молекулярно підтверджена наявність перебудов генів *PDGFR*A, *PDGFR*B або *FGFR*1 часто супроводжується аномальним каріотипом – перегрупованням 4q12 (партнерів перебудов *PDGFR*A, окрім *FIP1L1*), 5q31-33 (*PDGFR*B) або 8p11-13 (*FGFR*1).

Незважаючи на вкрай рідку частоту (< 1 %) перебудов в гені *PDGFR*B, в цитогенетично підтверджених випадках ХММЛ та інших МДС/МПН (наприклад, атипового ХМЛ, ЮММЛ, інших МДС/МПН граничних розладів), їх ідентифікація є критичною, з огляду на їх високу чутливість до терапії

імаїнібом. Описано більше 20 генів-партнерів для перебудови з геном *PDGFRB*.

Еозинофільні мієлоїдні новоутворення, пов'язані з перебудовою гена *FGFR1*, також є рідкісними. У цих випадках виявлена асоціація t(8p11-13)-точки зламу з лімфобластною лімфомою з еозинофілією та мієлоїдною гіперплазією, що вперше описана в 1995 році та раніше згадувалася як «8p11 мієлопроліферативний синдром», або «лейкемія/лімфома з стовбурових клітин». Після відкриття гена *ZNF198-FGFR1* у 1998 році, було зареєстровано ще 15 генів-партнерів для перебудов з геном *FGFR1*.

Негативний скрінінг на *PDGFRA/B*- або *FGFR1*- перебудови при еозинофілії має спонукати до розгляду діагнозу ХЕЛ-НУ, у випадку, коли є цитогенетичні та/або морфологічні ознаки еозинофільної мієлоїдної неоплазії, що інакше не класифікується. Хронічна еозинофільна лейкемія, неуточнена відрізняється від хронічного еозинофільного синдрому наявністю неспецифічної клональної цитогенетичної аномалії або підвищеною кількістю бластних клітин (> 2 % у периферійній крові або > 5 % у кістковому мозку, але < 20 %).

Якщо жоден із вищезазначених станів не виявлений, але наявне пошкодження органа, встановлюється діагноз ГЕС, а за відсутності ураження органів та систем – діагноз ІГЕ. При постановці панелей секвенування нового покоління з'являється можливість виявлення додаткових мутацій у випадках ІГЕ/ГЕС, що в майбутньому набудуть більш широкого використання.

Лімфоцитарний варіант гіпереозинофілії

Лімфоцитарний варіант ГЕ, пов'язаний з надмірною продукцією еозинофілопоетичних цитокінів (наприклад, сироваткового ІЛ-5), характеризується аномальною популяцією Т-клітин, що ідентифікують за допомогою імунофенотипування лімфоцитів периферійної крові або дослідження перегрупування гена Т-клітинного рецептора. Цей стан являє собою суміш клонального та реактивного процесу. Клональність процесу підтверджується наявністю імунофенотипово- або Т-рецепторно ідентичних Т-лімфоцитів, проте, еозинофілія є реактивною внаслідок дії

еозинофілопоетичних факторів росту, що синтезуються Т-клітинами. Продукція ІЛ-5, а в деяких випадках ІЛ-4 і ІЛ-13, Т-лімфоцитами хворих із Т-клітинно-опосередкованою ГЕ з підвищеним рівнем ІgЕ, дозволяє припустити, що ці клітини переважно мають цитокиновий профіль Т-хелперів 2 типу (Th 2).

Імунофенотип лімфоцитів є характерним для подвійно негативних, незрілих Т-клітин (наприклад, CD3⁺CD4⁻CD8⁻), проте може бути відсутня і експресія CD3 (наприклад, CD3⁻CD4⁺). Додаткові імунофенотипові порушення включають підвищену експресію CD5 на CD3⁻CD4⁺ клітинах, втрату поверхневого CD7 і/або експресію CD27.

У пацієнтів з лімфоцитарним варіантом ГЕ, зазвичай, в якості первинного прояву захворювання, присутні симптоми зі сторони покривної тканини. Так, за результатами дослідження 60-ти пацієнтів у 1999 році (Simon HU et al.), переважно дерматологічних клінік, показано, що імунофенотип 16-ти із них характеризується аномальним профілем Т-клітини, а клональне перегрупування генів Т-рецепторів виявлено у 8-ми із 60-ти осіб. Клональні Т-клітини секретували високий рівень ІЛ-5 *in vitro* і характеризувались активованим імунофенотипом, а саме високою експресією CD25 і/або HLA-DR.

Проте, недавнє дослідження 2013 року (Kilon AD et al.) з включенням 21-го пацієнта з CD3⁻CD4⁺ Т-клітинним фенотипом та ГЕ дозволило підтвердити, що це захворювання характеризується поліорганим залученням до патологічного процесу. Зокрема, у зазначеній групі хворих визначалась лімфоаденопатія (62 %), були наявні ревматологічні (29 %), шлунково-кишкові (24 %), легеневі (19 %), неврологічні (10 %) та серцево-судинні (5 %) симптоми.

Також у пацієнтів із лімфоцитарним варіантом ГЕ часто спостерігається хронічна активна Епштейн-Барр (EBV) вірусна інфекція із продукцією EBV-інфікованим Т-клітинним клоном еозинофілопоетичних цитокінів.

Консенсусні критерії для діагностики лімфоцитарного варіанту ГЕ ще не встановлені. Виявлення ізольованої Т-клітинної клональності за допомогою ПЛР без Т-клітинних імунофенотипових аномалій або демонстрації продукції Th 2-цитокінів недостатнє, щоб поставити діагноз лімфоцитарного варіанту ГЕ.

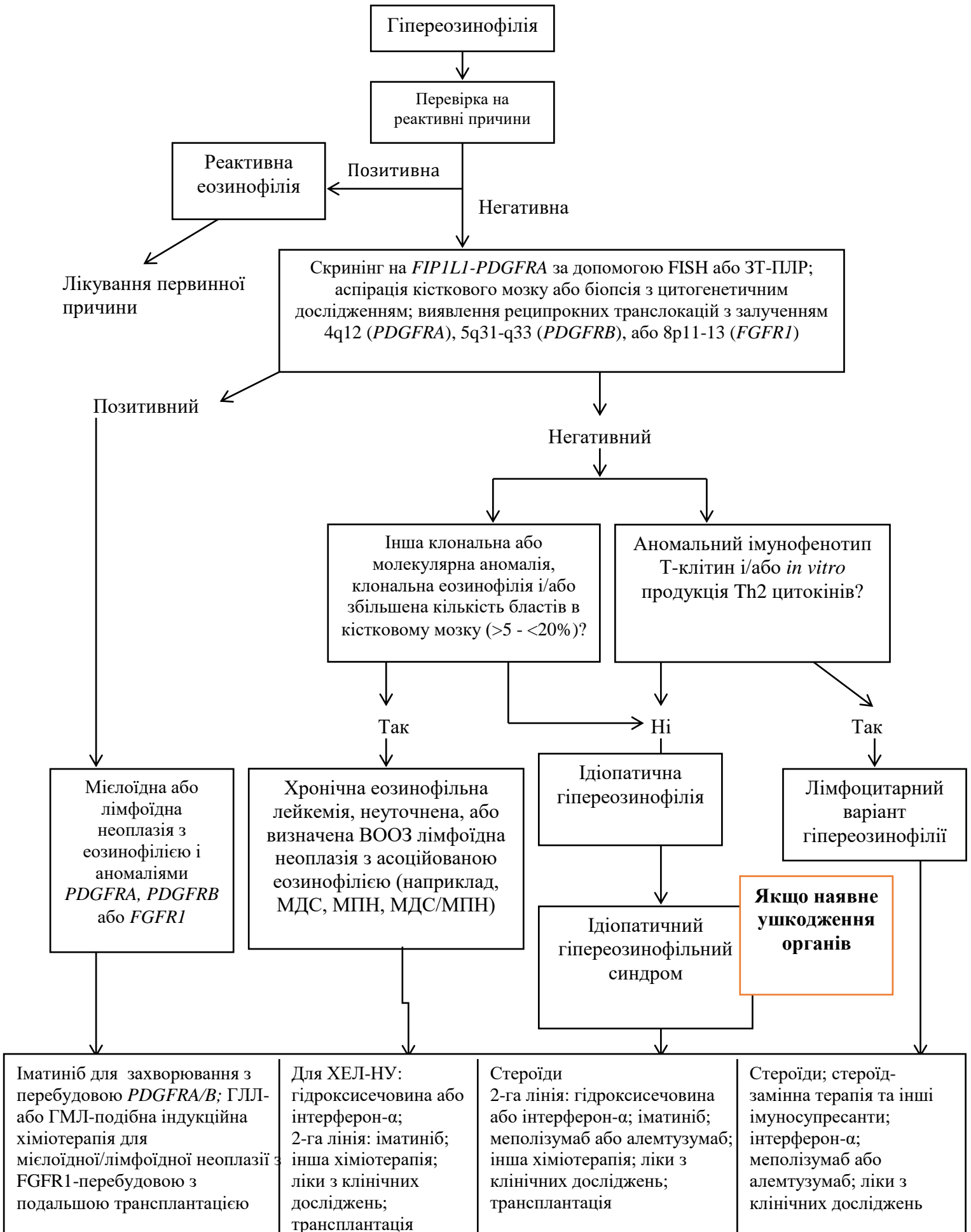
Незважаючи на нещодавнє дослідження 2009 року (Helbig G. Et al.), за результатами якого підтверджено, що у значної частини хворих з ідіопатичним ГЕС (у 18 із 42 осіб, 43 %) за допомогою ПЛР виявляють перегрупування гена Т-клітинного рецептора, невідомо, чи останнє буде завжди супроводжуватись розвитком даного патологічного процесу. Проте, виявлення в сироватці крові підвищених рівнів TARC–хемокіну (тимус-асоційований регуляторний хемокін), причетного до Th 2-опосередкованих захворювань, при поєднанні з виявленням *in vitro* підвищеної продукції цитокінів із культивованих мононуклеарних клітин периферичної крові і/або Т-клітин (дослідження на основі аналізів), може скласти додаткове підґрунтя для діагностики лімфоцитарного варіанту ГЕ.

Узагальнена схема діагностики та лікування еозинофільних розладів представлена на рисунку 1.

ВИСНОВКИ

1. Діагноз мієлопроліферативної неоплазії з еозинофілією вимагає перш за все виключення усіх можливих вторинних причин гіпереозинофілії.
2. Оцінка первинної еозинофілії повинна починатися із скринінгу периферичної крові на наявність химерного гена *FIP1L1-PDGFRΑ*, що являється високоінформативним та надійним діагностичним методом для верифікації діагнозу мієлопроліферативної неоплазії з еозинофілією.
3. Використання запропонованого алгоритму діагностики в практиці охорони здоров'я уможливить застосування в Україні класифікації МПН ВООЗ 2016 р., яка має суттєві переваги за економічністю та надійністю, порівняно з попередніми класифікаціями МПН ВООЗ.
4. Результати власних досліджень щодо скринінгу пацієнтів з еозинофільним синдромом на наявність химерного гена *FIP1L1-PDGFRΑ* з метою верифікації діагнозу мієлопроліферативної неоплазії із еозинофілією свідчать про відтворюваність алгоритму в Україні.

Алгоритм діагностики та лікування, заснований на класифікації еозинофільних розладів ВООЗ 2016 р.



ПЕРЕЛІК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Наказ Міністерства охорони здоров'я України від 30.07.2010 № 647 Про затвердження клінічних протоколів надання медичної допомоги хворим зі спеціальності "Гематологія".
2. Молекулярно-генетичні характеристики онкогематологічних захворювань мієлоїдного походження у постраждалих внаслідок аварії на ЧАЕС» / С.В. Клименко, І.В. Дмитренко, О.М. Костюкевич та ін. // Архів клінічної та експериментальної медицини. – 2012. –Т. 21, № 2. - С. 167-169.
3. World Health Organization-defined eosinophilic disorders: 2015 update on diagnosis, risk stratification, and management / J. Gotlib // Am. J. Hematol. – 2015. – Vol.90. - №11. – P. 1077-89.
4. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia / D. Arber, A. Orazi et al. // Blood. – 2016. – Vol.19. - №127(20). – P. 2391-405.
5. Hematologic malignancies with PCM1-JAK2 gene fusion share characteristics with myeloid and lymphoid neoplasms with eosinophilia and abnormalities of PDGFRA, PDGFRB, and FGFR1 / V. Patterer, S. Schnittger et al. // Ann. Hematol. – 2013. – Vol.92. - №6. – P. 759-769.