

Д.Ф. Глузман, д.м.н., профессор, Л.М. Скляренко, д.м.н., В.А. Надгорная, к.б.н.,
Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины, г. Киев

Современная диагностика острых миелоидных лейкозов

Острые миелоидные лейкозы (ОМЛ) характеризуются клональной экспансией бластных клеток миелоидного происхождения, определяющихся в периферической крови, костном мозге и других тканях. Это гетерогенная группа заболеваний, что находит отражение в морфологии клеток, особенностях клинического течения и реакции на терапевтические воздействия. ОМЛ могут возникать de novo, на фоне предлейкемических состояний (миелодисплазии) или после химио- и лучевой терапии других форм злокачественных новообразований. В основе развития ОМЛ лежит трансформация полипотентной стволовой кроветворной клетки или мульти-, би- или унипотентных миелоидных клеток-предшественников.

Заболеваемость ОМЛ составляет 2,5-3,0 на 100 тыс. населения ежегодно. В большинстве стран средний возраст больных в момент установления диагноза составляет 65 лет. У детей до 15 лет ОМЛ встречаются значительно реже, чем у взрослых. Они составляют 15-20% всех случаев острых лейкозов, пик заболеваемости приходится на детей в возрасте 3-4 лет.

Краеугольным камнем диагностики ОМЛ до настоящего времени остаются результаты цитоморфологического исследования мазков периферической крови и стерильного пунктата костного мозга.

Основное требование для установления диагноза ОМЛ — обнаружение 20% и более миелобластов и/или монобластов/промиелоцитов, и/или мегакариобластов в периферической крови или костном мозге. Основой для выделения тех или иных форм ОМЛ служит общепринятая классификационная система, предложенная группой французских, американских и британских гематологов еще в 1976 г. В последующем все шире стала применяться модифицированная ФАБ-классификация, учитывающая при дифференциации отдельных нозологических форм и цитологических вариантов заболеваний результаты цитохимического, цитогенетического и иммунофенотипического анализа.

В последние годы в изучении различных биологических подтипов ОМЛ значительно шире стали использоваться цитогенетические и молекулярно-генетические методы. Была установлена связь ОМЛ М3 и ОМЛ М3v, выделяемых в соответствии с усовершенствованной ФАБ-классификацией, с транслокациями t(15;17), ОМЛ М4Эо с inv(16) или t(16;16). Более слабая связь была обнаружена между ОМЛ М2 и t(8;21). Аберрации 11q23, как оказалось, более часто встречаются при ОМЛ с вовлечением клеток моноцитарного ряда. В случае обнаружения указанных аномалий диагноз ОМЛ может быть верифицирован, если в периферической крови или костном мозге определяется менее 20% бластных клеток.

В 2001 г. в 3-м издании классификации ВОЗ опухолевых заболеваний кроветворной и лимфоидной тканей была предпринята первая попытка включения генетических аномалий в алгоритмы диагностики различных «клинико-патогенетических» нозологических форм ОМЛ.

В 4-м издании классификации ВОЗ (2008), разделе, в котором рассматриваются вопросы систематизации различных форм ОМЛ и родственных новообразований из клеток-предшественников, результаты молекулярно-генетических исследований лейкоэмических клеток представлены значительно шире. Они основываются на понимании того, что генетические аномалии, приводящие к развитию лейкоза, являются

не только гетерогенными, но и сложными. Многоэтапный процесс, завершающийся формированием определенного лейкоэмического фенотипа, обусловлен множественными хромосомными аберрациями.

Получены экспериментальные доказательства того, что во многих случаях для инициации образования, пролиферации и выживания клона лейкоэмических клеток, помимо приводящей к нарушению дифференцировки миелоидных клеток перестройки генов RUNX1, CBFB или RARA, кодирующих факторы транскрипции, необходимы еще дополнительные генетические аномалии.

В становлении опухолевого процесса, помимо указанных микроскопически определяемых хромосомных перестроек и других многочисленных аномалий, принимают участие и влияют на его морфологические и клинические характеристики также субмикроскопические мутации таких генов, как FLT3, JAK2, RAS, PTPN11, KIT. Эти гены кодируют белки, определяющие пути передачи сигналов, необходимых для пролиферации и/или выживания клеток неопластического клона. Установление значимости этих вновь открытых мутаций генов в развитии лейкозов и их связи с клинико-гематологическими, цитоморфологическими и фенотипическими признаками позволило идентифицировать некоторые специфические нозологические формы лейкозов.

Мутации ряда генов (FLT3, NPM1, CEBPA), выявляемые у больных ОМЛ с нормальным кариотипом, могут служить прогностическими критериями. Так, мутации NPM1 обнаруживаются в лейкоэмических клетках в 50-60% случаев цитогенетически нормальных ОМЛ, уровень 4-летней выживаемости составляет 50%. Мутация FLT3-ITD определяется в 30-40% случаев ОМЛ с нормальным кариотипом, уровень 4-летней выживаемости — 20-25%. В случае мутаций CEBPA, обнаруживаемых в 15% случаев ОМЛ с нормальным кариотипом, уровень 4-летней выживаемости достигает 60%. Подобный показатель 4-летней выживаемости больных отмечается при наличии одновременных мутаций генов NPM1 и FLT3-ITD.

Ниже приведена современная классификация миелоидных лейкозов и родственных новообразований из клеток-предшественников, предложенная экспертами ВОЗ и получившая одобрение клиницистов — членов наблюдательного комитета (CAC).

Классификация ВОЗ острых миелоидных лейкозов и родственных новообразований из клеток предшественников

- ОМЛ со стабильно выявляемыми генетическими аномалиями:
 - ОМЛ с t(8;21)(q22;q22); RUNX1-RUNX1T1;
 - ОМЛ с inv(16)(p13.1q22) или ОМЛ с t(16;16)(p13.1;q22); CBFB-MYH11;

- Острый промиелоцитарный лейкоз с t(15;17)(q22;q12); PML-RARA;
- ОМЛ с t(9;11)(p22;q23); MLLT3-MLL;
- ОМЛ с t(6;9)(p23;q34); DEK-NUP214;
- ОМЛ с inv(3)(q21q26.2) или t(3;3)(q21;q26.2); RPN1-EVI1;
- ОМЛ (мегакариобластный) с t(1;22)(p13;q13); RBM15-MKL1;
- предварительная форма: ОМЛ с мутированным геном NPM1;
- предварительная форма: ОМЛ с мутированным геном CEBPA;
- Острый миелоидный лейкоз с изменениями, связанными с миелодисплазией.
- Миелоидные новообразования, связанные с терапией.
- Острые миелоидные лейкозы, неспецифицированные иным образом:
 - ОМЛ с минимальными признаками дифференцировки;
 - ОМЛ без признаков созревания;
 - ОМЛ с признаками созревания;
 - острый миеломоноцитарный лейкоз;
 - острый монобластный/моноцитарный лейкоз;
 - острый эритролейкоз:
 - эритролейкоз, эритроидный/миелоидный;
 - чистый эритроидный лейкоз;
 - острый мегакариобластный лейкоз;
 - острый базофильный лейкоз;
 - острый панмиелоз с миелофиброзом.
- Миелосаркома.
- Миелопролиферативные процессы, связанные с синдромом Дауна:
 - транзитный аномальный миелопоз;
 - миелоидный лейкоз, ассоциированный с синдромом Дауна.
- Опухоль из бластных плазмцитоподобных дендритных клеток.

В 4-м издании классификации ВОЗ (2008) предлагается выделение следующих основных категорий ОМЛ и родственных новообразований из клеток-предшественников:

- 1) ОМЛ со стабильно выявляемыми генетическими аномалиями;
- 2) ОМЛ с изменениями, связанными с миелодисплазией;
- 3) миелоидные новообразования, ассоциированные с терапией;
- 4) ОМЛ, неспецифицированные иным образом;
- 5) миелосаркома;
- 6) миелопролиферативные процессы, связанные с синдромом Дауна;
- 7) новообразования из бластных плазмцитоподобных дендритных клеток.

В подгруппу ОМЛ с повторяющимися генетическими аномалиями к первым четырем нозологическим формам, содержащимся в 3-м издании классификации, добавлены три новые, охарактеризованные на основе хромосомных транслокаций и однотипных цитоморфологических и клинических признаков: ОМЛ



Д.Ф. Глузман

с t(6;9)(p23;q34), ОМЛ с inv(3)(q21;q26.2) или t(3;3)(q21;q26.2) и ОМЛ (мегакариобластный) с t(1;22)(p13;q13).

Нозологическая форма, ранее входившая в 3-е издание классификации ВОЗ под названием «ОМЛ с аномалией 11q23 (MLL)», была пересмотрена и детальнее охарактеризована в отношении MLL. Было показано участие в транслокациях с MLL более 80 генов-партнеров, оказывающих влияние на природу возникающих ОМЛ. Рекомендуется, чтобы вариант транслокаций MLL также учитывался при установлении диагноза, например ОМЛ с t(1;19)(q23;p13.3); MLL-ENL.

В подгруппу ОМЛ со стабильно выявляемыми генетическими аномалиями в качестве «предварительных» (временных) нозологических форм введены случаи с наличием мутаций генов NPM1 и CEBPA. Понадобятся дополнительные исследования для их полной характеристики и выделения в качестве отдельных нозологических форм.

В виде отдельного варианта заболевания не рассматриваются случаи ОМЛ с наличием мутаций гена FLT3, так как таковые обнаруживаются при ряде других нозологических форм. Однако значение этих мутаций нельзя недооценивать: важным является их определение у всех больных с нормальными цитогенетическими показателями, включая тех, у которых обнаруживаются мутации NPM1 и CEBPA.

Определенные уточнения внесены в подгруппу, прежде называвшуюся «ОМЛ с миелодисплазией». Первоначально предполагалось, что эта подгруппа должна включать уникальные в биологическом отношении ОМЛ, характеризующиеся наличием присущих миелодисплазии (МДС) признаков, включая неблагоприятные хромосомные аномалии, высокую частоту гиперэкспрессии гена множественной лекарственной устойчивости (MDR-1), неблагоприятный ответ на терапию.

В качестве универсально принятого дополнительного маркера связанных с миелодисплазией признаков учитывались признаки дисплазии, обнаруживавшиеся в 50% и более клеток двух или более линий гемопоэза. Клиническая значимость выделения на этих принципах данной подгруппы ОМЛ была подтверждена в ряде работ. Однако мультивариантный анализ с включением цитогенетических данных, проведенный другими исследователями, показал, что наличие миелодисплазии не имеет самостоятельного значения, определяющего клиническое течение заболевания.

После проведенного анализа эта подгруппа заболеваний была переименована в «ОМЛ с изменениями, связанными с миелодисплазией». В нее могут быть включены: больные, у которых ранее был документирован диагноз МДС и в периферической крови или костном

Продолжение на стр. 36.

Д.Ф. Глузман, д.м.н., профессор, Л.М. Скляренко, д.м.н., В.А. Надгорная, к.б.н.,
Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины, г. Киев

Современная диагностика острых миелоидных лейкозов

Продолжение. Начало на стр. 35.

мозге определяется 20% и более бластных клеток; пациенты, имеющие специфические, связанные с миелодисплазией цитогенетические аномалии; больные, у которых более чем в 50% клеток двух или более линий миелопоэза обнаруживаются признаки дисплазии. У последней категории пациентов при наличии нормального кариотипа должен проводиться анализ на наличие мутаций в генах FLT3, NPM1 и CEBPA. Если они будут обнаружены, это обязательно должно указываться в диагностическом заключении.

В настоящее время клиническое значение мутаций в одном или более из указанных генов и их роль в становлении морфологических проявлений миелодисплазии остаются неясными. Результаты последующих исследований покажут, не лучше ли классифицировать подобные случаи в соответствии с выявленными генетическими аномалиями. Пока же эксперты ВОЗ рекомендуют классифицировать их как ОМЛ с изменениями, связанными с миелодисплазией (мультилинейной дисплазией), с указанием в приложении мутационного статуса генов.

В новой классификации ВОЗ сохраняются в качестве самостоятельной подгруппы миелоидные новообразования, связанные с терапией (т-ОМЛ/т-МДС и т-ОМЛ/т-МДС/Миелопротрофиеративные новообразования). Отдельные формы заболеваний (т-ОМЛ, т-МДС и другие) выделяются с учетом содержания бластов в периферической крови и костном мозге.

Большинство больных, у которых развились связанные с терапией новообразования, подвергались лучевой терапии, получали алкилирующие препараты и ингибиторы топоизомеразы II, так что дальнейшее подразделение этой подгруппы заболеваний с учетом применявшихся медикаментозных средств не имеет практического значения и не рекомендуется в 4-м издании классификации. Предлагается рассматривать их все как разновидности единого в биологическом смысле патологического процесса со сходными молекулярно-генетическими признаками.

Считается, что у 90% больных с ятрогенными новообразованиями выявляются цитогенетические аномалии, идентичные наблюдающимся при ОМЛ, связанных с миелодисплазией, или при ОМЛ со стабильно выявляемыми генетическими аномалиями. Однако, за исключением больных с т-ОМЛ с inv(16)(p13.1;q22), t(16;16)(p13.1;q22) или t(15;17)(q22;q12), клиническое течение заболевания у пациентов с миелоидными новообразованиями, связанными с ранее проводившейся терапией, значительно тяжелее, чем при ОМЛ с теми же генетическими аномалиями, развившемся de novo. Эти данные свидетельствуют о значимых биологических отличиях указанных форм ОМЛ.

Изучение ятрогенных миелоидных новообразований может пролить свет на патогенетические механизмы заболеваний, развивающихся de novo. Ключевым при этом остается вопрос: почему ОМЛ развивается только у некоторых больных, подвергшихся идентичным терапевтическим воздействиям? При установлении диагноза у данной группы больных обязательно указание на наличие тех или иных специфических аномалий, например «ОМЛ, связанный с терапией, с t(9;11)(p22;q23)».

В подгруппу острых миелоидных лейкозов, неспецифицированных иным образом (ОМЛ НИО), включают случаи, при которых не могут быть полностью выполнены требования, предъявляемые для верификации других категорий ОМЛ. В настоящее время в ОМЛ НИО входят 25-30% всех случаев ОМЛ, которые нельзя отнести к другим указанным в вышеприведенной схеме категориям. Количество больных, относимых к данной категории, будет постепенно уменьшаться по мере идентификации новых генетических разновидностей ОМЛ.

На встрече экспертов ВОЗ и клиницистов — членов наблюдательного комитета (САС) — обсуждался вопрос, необходимо ли рекомендовать проведение субклассификации внутри этой подгруппы в соответствии с критериями прежней ФАБ-классификации или необходимо просто обозначать такие случаи как ОМЛ НИО. Утвердили последнее предложение. В подгруппу ОМЛ НИО, учитывая их прогностическую значимость, были введены такие разновидности заболеваний, как острый мегакариобластный лейкоз, острый базофильный лейкоз, острый панмиелоз с миелодисплазией, эритробластоз.

В новой классификации ВОЗ в числе ОМЛ и родственных новообразований из клеток-предшественников представлена также миелосаркома, являющаяся по клиническим проявлениям первоначально экстрамедуллярной опухолью и известная также под названием гранулоцитарной саркомы, или хлоромы. Очаги поражения, представленные бластными клетками одной или более миелоидных линий, могут обнаруживаться в коже, органах желудочно-кишечного тракта и предшествовать или сопутствовать инфильтрации костного мозга с последующим появлением лейкоэмических клеток в периферической крови. В случае появления миелосаркомы de novo она приравнивается к ОМЛ, и дальнейшая ее категоризация и отнесение к тем или иным вариантам заболевания проводится с учетом цитоморфологических, иммунофенотипических и молекулярно-генетических признаков. Возникновение миелосаркомы может быть также проявлением рецидива у больных ОМЛ, подвергавшихся терапии, или показателем прогрессирования заболевания и перехода в стадию бластного криза у больных с ранее установленным диагнозом МДС или миелопротрофиеративного новообразования.

Еще одна категория, отнесенная к ОМЛ и родственным новообразованиям из клеток-предшественников, включает миелопротрофиеративные процессы, связанные с синдромом Дауна (транзитный аномальный миелопоэз и миелоидный лейкоз, ассоциированный с синдромом Дауна). Последний биологически идентичен МДС, ассоциированному с синдромом Дауна, поэтому в классификации ВОЗ они рассматриваются в качестве единой нозологической формы. Миелопротрофиеративные процессы, связанные с синдромом Дауна, имеют особые клинические, цитоморфологические, иммунофенотипические и молекулярно-генетические признаки, включая и мутации гена GATA1, позволяющие дифференцировать их с другими миелоидными новообразованиями.

К этой подгруппе заболеваний также отнесена опухоль из бластных плазматических дендритных клеток (или плазматический моноцитоз), ассоциирующаяся с высокой частотой поражения

кожи, костного мозга и выявлением лейкоэмических клеток в периферической крови.

Кратко остановимся на характеристике основных групп заболеваний, выделяемых в соответствии с новой классификацией ОМЛ.

ОМЛ со сбалансированными транслокациями/инверсиями

Эта группа характеризуется наличием в лейкоэмических клетках повторяющихся (рекуррентных) генетических аномалий. Наиболее часто идентифицируются сбалансированные аномалии: t(8;21)(q22;q22), inv(16)(p13.1;q22) или t(16;16)(p13.1;q22), t(15;7)(q22;q12) и t(9;11)(p22;q23). Каждая из указанных структурных перестроек хромосом приводит к образованию слитного гена, кодирующего химерный белок, играющего важную роль, но недостаточного для инициации патологического процесса. Многие из этих транслокаций определяются с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), обладающей более высокой чувствительностью (1×10^{-3}), чем цитогенетический анализ (1×10^{-2}).

ОМЛ с t(8;21)(q22;q22); RUNX1-RUNX1T1

Эта группа составляет около 5% всех случаев ОМЛ и 10% ОМЛ М2 (по ФАБ-классификации). Встречается преимущественно у молодых пациентов. Редко диагностируется у детей до 3 лет и у больных старше 60 лет.

Предполагаемый нормальный аналог — миелоидная стволовая клетка с потенциальной дифференцировкой по нейтрофильному ряду.

Заболевание впервые может проявляться в виде изолированной опухоли — миелосаркомы. В таких случаях инициальное содержание бластов может быть ниже 20%.

Морфология и цитохимия

Общая морфологическая картина включает наличие крупных бластных клеток с обширной базофильной цитоплазмой, содержащей многочисленные азурофильные гранулы, с зоной перинуклеарного просветления. В немногих случаях в бластах обнаруживаются очень крупные гранулы (псевдогранулы, схожие с таковыми синдрома Чедика-Хигаси). В бластных клетках и зрелых нейтрофильных лейкоцитах могут определяться палочки Ауэра. Наряду с крупными бластными клетками присутствуют и более мелкие (преимущественно в периферической крови). В костном мозге определяются промиелоциты, миелоциты и зрелые нейтрофильные лейкоциты с признаками диспластических изменений, схожих с аномалией лейкоцитов Пельгера. Нередко выявляется атипия в окраске цитоплазмы зрелых клеток, которая может быть гомогенно розовой или содержать крупные включения — так называемые «озера цвета семги». Часто увеличено количество незрелых клеток эозинофильного ряда, но без цитологических и цитохимических аномалий, характерных для ОМЛ, ассоциированного с аномалиями 16 хромосомы. Нередко отмечается повышенное содержание базофилов и/или тучных клеток. Моноцитарный компонент обычно редуцирован или отсутствует. Эритробласты и мегакариоциты в костном мозге морфологически не отличаются от обнаруживаемых в норме. Редкие случаи с содержанием бластов в костном мозге менее 20%,

ассоциирующиеся с t(8;21)(q22;q22), должны диагностироваться как ОМЛ, а не МДС.

В бластных клетках отмечается положительная реакция на миелопероксидазу (МПО) в виде умеренной равномерной диффузной окраски цитоплазмы. Положительная реакция наблюдается также при выявлении активности нафтол-AS-D-хлорацетатэстеразы (ХАЭ), слабая — при определении активности кислой фосфатазы. Цитоплазма бластов не окрашивается при повышенной активности неспецифической α -нафтилацетатэстеразы (НЭ) и кислой неспецифической эстеразы (КНЭ). При проведении PAS-реакции отмечается слабое или умеренное диффузное окрашивание цитоплазмы лейкоэмических клеток.

Иммунофенотип

У большинства больных ОМЛ с t(8;21)(q22;q22) бластные клетки обладают характерным иммунофенотипом. Они отличаются высокой экспрессией на поверхностных мембранах антигенов CD34, HLA-DR, наличием МПО и CD13 и слабой экспрессией антигена CD33. Бластные клетки обнаруживают признаки гранулоцитарной дифференцировки, сопровождающейся экспрессией антигена CD15 и/или CD68. Иногда в бластных клетках определяются признаки асинхронного созревания, что проявляется в одновременной коэкспрессии антигенов CD34 и CD15. На лейкоэмических клетках нередко выявляется экспрессия лимфоидных маркеров CD19 и PAX5 и возможна экспрессия цитоплазматического антигена CD79a. В некоторых случаях обнаруживается слабая экспрессия терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазы (TdT) и имеющая неблагоприятное прогностическое значение экспрессия антигена CD56.

Данные цитогенетического и молекулярно-генетического анализа

В перестройки, ассоциированные с развитием данной формы острого лейкоза, вовлечены гены обоих гетеродимерных компонентов ключевого белкового комплекса CBF (core binding factor), RUNX1 (известного также как AML1 или CBFA) и CBFb. В транслокацию t(8;21)(q22;q22) вовлечен ген RUNX1, кодирующий α -субъединицу CBF, и ген RUNX1T1 (ETO). В клетках больных ОМЛ с подобной транслокацией постоянно определяется транскрипт слитного гена RUNX1-RUNX1T1 (AML1/ETO). Фактор транскрипции CBF играет важную роль в процессе кроветворения. Трансформация, связанная с образованием RUNX1-RUNX1T1, вероятно, вследствие aberrантной рекрутировки ядерных транскрипционных корепрессорных комплексов ведет к транскрипционной репрессии нормальных генов-мишеней RUNX1. Примерно у 70% пациентов с t(8;21)(q22;q22) обнаруживаются дополнительные хромосомные аномалии, такие как потеря полового хромосомы или del(9q) с утратой 9q22. У детей с CBF-ассоциированным ОМЛ в 30% случаев определяются вторичные мутации генов KRAS или NRAS. Мутации гена KIT выявляются у 20-25% больных и характеризуются неблагоприятным прогнозом.

Прогноз

ОМЛ с t(8;21)(q22;q22) обычно характеризуется хорошей реакцией на терапию, высокой частотой наступления полной ремиссии и длительным периодом выживаемости без проявления признаков заболевания в случае лечения высокими дозами цитарабина в фазе консолидации.

Продолжение следует.

