

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

Современная лабораторная диагностика миелопролиферативных новообразований

К группе миелопролиферативных новообразований относится ряд клональных патологических процессов, возникающих в результате трансформации гемопоэтической стволовой клетки (ГСК) и характеризующихся пролиферацией клеток одной или более линий миелопоэза (гранулоцитов, мегакариоцитов, эритроидных и тучных клеток).

Эти заболевания встречаются преимущественно у взрослых (пик заболеваемости приходится на возрастную группу 50-70 лет), но могут диагностироваться и у детей. В наибольшей степени это касается хронического миелолейкоза (ХМЛ) и эссенциальной тромбоцитемии (ЭТ). В целом частота всех типов миелопролиферативных новообразований (МПН) составляет 6-10 случаев на 100 тыс. населения ежегодно.

Наличие у больных МПН спленомегалии и гепатомегалии обусловлено возникновением в соответствующих органах, как и в костном мозге, очагов лейкоэмической инфильтрации и избытком кроветворных клеток, сохраняющих способность к созреванию.

Различные формы МПН (табл. 1) имеют ряд сходных и перекрывающихся морфологических и клинико-гематологических признаков. Наряду с этим между ними существуют значительные различия, касающиеся клинических особенностей и данных лабораторного исследования, важных в прогностическом плане.

Таблица 1. Формы миелопролиферативных новообразований, выделяемые в соответствии с классификацией ВОЗ (2008)

Хронический миелолейкоз, BCR-ABL1-положительный
Хронический нейтрофильный лейкоз (ХНЛ)
Истинная полицитемия (ИП)
Первичный миелофиброз (ПМФ)
Эссенциальная тромбоцитемия
Хронический эозинофильный лейкоз, не специфицированный иным образом (ХЭЛНИО)
Мастоцитоз
Миелопролиферативное заболевание неклассифицируемое (Н-МПН)

Незаметное и постепенное развитие болезни в дальнейшем проходит различные этапы, обусловленные клональной эволюцией. Они сопровождаются гиперпродукцией клеточных элементов той или иной линии миелопоэза, сменяющейся вызванной миелофиброзом недостаточностью кроветворения и трансформацией в острую фазу бластного криза в терминальном периоде заболевания.

В прежних классификационных схемах для подтверждения диагноза ХМЛ использовалось определение филадельфийской (Ph) хромосомы или слитного гена BCR-ABL1. Специфические генетические аномалии при большинстве других заболеваний, входящих в группу МПН, не были идентифицированы. Их диагностика и дифференциация с реактивными гиперпластическими процессами с вовлечением клеток гранулоцитарного, эритробластического и мегакариоцитарного ряда проводились на основе учета клинических признаков, лабораторных данных и, в меньшей степени, результатов морфологических исследований.

В настоящее время установлена связь ряда форм МПН с клональными аномалиями (транслокациями или точечными мутациями) генов, кодирующих цитоплазматические или рецепторные протеинкиназы (ПТК). В свою очередь, ПТК активируют пути сигнальной трансдукции, приводящие к аномальной

пролиферации клеток тех или иных линий миелопоэза. Так, установлена важная роль в патогенезе многих пациентов с BCR-ABL1-отрицательными МПН приобретенных мутаций гена JAK2 на хромосоме 9p24. Наиболее частая из мутаций JAK2 V617F приводит к активации трансдуктора сигналов и активатора транскрипции (STAT), митогенактивированной протеинкиназы (МАРК) и фосфотидилинозитол-3-киназы (PI3K), сигнальных путей, вызывающих трансформацию и пролиферацию гемопоэтических клеток-предшественников. Мутации JAK2 V617F обнаружены практически у всех больных ИП и почти у 50% пациентов с ПМФ и ЭТ. Мутации JAK2 V617F не являются специфическими для указанных форм МПН, так как могут обнаруживаться у некоторых больных с миелодиспластическим синдромом/МПН, в редких случаях — у пациентов с острым миелолейкозом и в комбинации с другими известными аномалиями, такими как BCR-ABL1. У некоторых больных ИП при отсутствии JAK2 V617F может обнаруживаться мутация в экзоне 12 активированного JAK2. В небольшой части случаев ПМФ и ЭТ определяются мутации MPL W515L или W515K. Следует отметить, что отсутствие JAK2 V617F не позволяет исключить МПН.

В группу МПН в новой классификации ВОЗ (2008) включен также системный мастоцитоз, имеющий ряд сходных с ними признаков. Системный мастоцитоз почти всегда ассоциируется с мутациями в гене KIT, кодирующем рецептор ПТК.

Пока же остается невыясненным патогенез почти у половины больных ЭТ и ПМФ, всех случаев ХНЛ и ряда миелоидных новообразований, ассоциированных с эозинофилией.

Хронический миелолейкоз

ХМЛ — одна из наиболее частых форм МПН. На долю ХМЛ, частота которого составляет 1,0-2,0 случая на 100 тыс. населения ежегодно, приходится около 5-20% всех лейкозов. ХМЛ диагностируется в любом возрасте, в том числе и у детей, но пик заболеваемости приходится на возрастную группу 50-60 лет. Мужчины болеют несколько чаще, чем женщины. Наследственной predisположенности к развитию ХМЛ, по-видимому, не существует. Факторы, вызывающие возникновение этого заболевания, пока остаются до конца не выясненными. В анамнезе большинства пациентов нет указаний на контакт с химическими канцерогенами или токсическими соединениями. Полагают, что к увеличению частоты ХМЛ ведет воздействие ионизирующей радиации. Средняя продолжительность латентного периода при возникновении ХМЛ у лиц, переживших атомную бомбардировку в г. Хиросиме и Нагасаки, составила 11 лет. У ликвидаторов последствий аварии на ЧАЭС ХМЛ продолжает диагностироваться спустя 10-20 лет после катастрофы.

У 95% больных ХМЛ при установлении диагноза определяется характерная цитогенетическая аномалия — t(9;22)(q34;q11), ведущая к образованию Ph-хромосомы.

Ph-хромосома — первая из цитогенетических аномалий, ассоциированных с опухолями человека, — была открыта в 1960 г. Nowell и Hungerford. С помощью флуоресцентного анализа Caspersson и соавт. показали, что возникновение Ph-хромосомы обусловлено делецией длинного плеча одной из хромосом 22 пары. В 1973 г., используя флуоресцентную метку и метод бэндинга при окрашивании хромосом в метафазных пластинках, Rowley установила, что Ph-хромосома образуется в результате реципрокной транслокации (взаимного переноса генетического материала) между хромосомами 9 и 22, что ведет к укорочению длинного плеча одной из хромосом 22 пары, определяемого при цитогенетическом исследовании как t(9;22)(q34.1;q11.21). При этом протоонкоген ABL (нормальный клеточный гомолог вируса мышиной лейкемии Abelson), локализованный на длинном плече хромосомы 9(q34), переносится на длинное плечо хромосомы 22 к расположенному в участке разрыва этой хромосомы гену BCR (M-BCR-major breakpoint cluster region). Результатом слияния экзона 2 гена ABL с оставшейся на хромосоме 22 частью гена BCR (с экзонами b2 и b3 в зависимости от места разрыва гена BCR) является образование на хромосоме 22 химерного гена BCR-ABL. Ген BCR-ABL кодирует химерный белок BCR-ABL1 с молекулярной массой 210 кД — p210^{BCR-ABL}. Иногда точка разрыва находится не в наиболее типичном месте (M-BCR), а ближе к центромере хромосомы (m-BCR-minor breakpoint cluster region). При этом продуктом химерного гена является белок с молекулярной массой 190 кД — p190^{BCR-ABL}. При редкой локализации точки разрыва в m-BCR-районе, расположенном дальше от центромеры, чем M-BCR, продуктом образующегося гена является белок с молекулярной массой 230 кД — p230^{BCR-ABL}. У больных, в клетках которых определяется этот слитный белок, отмечается высокая степень созревания клеток гранулоцитарного ряда и/или тромбоцитов.

Точка разрыва гена BCR и тип продуцируемого химерным геном белка ассоциируется с клинико-патогистологическими проявлениями заболевания. В подавляющем большинстве случаев ХМЛ точка разрыва находится в типичном участке (экзоны BCR 12-16, которые ранее были известны как b1-b5) и вырабатывается аномальный белок p210, обладающий увеличенной активностью тирозинкиназы.

Более редкие точки разрыва в районе m-BCR (экзоны BCR 1-2) и продукция белка p190 встречаются в немногих случаях ХМЛ с моноцитозом и диспластическими признаками и при Ph-положительном остром лимфобластном лейкозе. Небольшие количества p190 могут определяться также более чем у 90% пациентов с классическим p210 ХМЛ. Точка разрыва гена BCR в районе μ (μ -BCR, экзоны BCR 17-20, известные также как c1-c4) и выработка белка p230 более характерны для ХНЛ.

Ph-хромосома у больных ХМЛ обнаруживается в клетках гранулоцитарного, моноцитарно-макрофагального, эритробластического, мегакариоцитарного

ряда, в эозинофилах и базофилах, но отсутствует в клетках других тканей и органов, в фибробластах костного мозга, Т-лимфоцитах.

Увеличенная тирозинкиназная активность белка BCR-ABL1 ответственна за активацию ряда путей сигнальной трансдукции. При ХМЛ это ведет к приобретению клетками лейкоэмического фенотипа, сопровождающегося прекращением регуляции пролиферации, уменьшением адгезии к строме костного мозга и дефектной апоптотической реакцией на действие мутагенных факторов. Понимание аномалий передачи сигналов в клетках при ХМЛ послужило основой для синтеза небольших молекул, мишенью которых является тирозинкиназная активность BCR-ABL1. Для лечения больных ХМЛ первым был успешно использован иматиниб. Второе поколение подобных соединений представлено нилотинибом и дазатинибом.

ХМЛ в своем развитии проходит три фазы: хроническую, акселерации и бластного криза. При этом у 80% больных, помимо Ph-хромосомы, выявляются дополнительные цитогенетические аномалии, такие как трисомия 8 и 19 или i(17q). В процессе трансформации могут обнаруживаться изменения в генах TP53, RB1, MYC, p16^{INK4a} (CDKN2A), RAS, AML1 и EVL1, патологическая роль которых в развитии бластного криза пока остается невыясненной. Как показывают последние исследования с использованием ДНК-микрочипов, указанные изменения происходят в позднем периоде хронической фазы ХМЛ или в начальной стадии фазы акселерации.

Предполагаемое клеточное происхождение

Предложение о развитии ХМЛ в результате трансформации полипотентной гемопоэтической стволовой клетки (ПГСК) было выдвинуто более 30 лет назад. Но только в последнее время были получены доказательства, что клеткой, инициирующей развитие хронической фазы ХМЛ, является BCR-ABL1-положительная ПГСК. Приобретенные мутации ответственны за выживаемость и aberrантную дифференцировку ПГСК, что, в свою очередь, ведет к выработке и экспансии популяции опухолевых клеток, сохраняющих в течение определенного времени способность к дифференцировке. Благодаря этому в хронической фазе ХМЛ в периферической крови обнаруживаются незрелые клетки (бласты, промиелоциты, метамиелоциты), но преобладают зрелые элементы гранулоцитарного ряда.

Исследования последних лет также свидетельствуют о том, что в фазе миелоидного бластного криза ХМЛ свойства стволовых лейкоэмических клеток в результате активации β -катенина могут приобретать клетки с повышенной способностью к самообновлению, относящиеся к популяции гранулоцитарномикрофагальных клеток-предшественников. Вопрос о природе стволовых лейкоэмических клеток при бластном кризе ХМЛ лимфоидной природы пока остается открытым.

Клинические признаки

У большинства пациентов (80%) ХМЛ диагностируют в хронической фазе. В 20-40% случаев отмечается бессимптомное течение заболевания, выявляемого по

результатам общего анализа крови, проводимого при других патологических состояниях или диспансерном обследовании. У больных ХМЛ в начальной стадии могут наблюдаться такие симптомы, как слабость, потливость, повышенная утомляемость, субфебрильная температура, боли в левом подреберье, вызванные увеличением размеров селезенки и растяжением ее капсулы.

Наличие спленомегалии является наиболее характерным клиническим признаком ХМЛ. Размеры печени варьируют: у одних больных край печени выступает незначительно из-под реберной дуги, у других вследствие нарастающей лейкомицетической инфильтрации орган достигает значительных размеров. В ранней стадии болезни лимфатические узлы, как правило, не увеличены. При дальнейшем прогрессировании заболевания в гиперплазированных лимфатических узлах при пункционной биопсии удается обнаружить клеточные элементы миелопоэза на различных стадиях созревания. Продолжительность хронической фазы заболевания, начало которого не всегда легко определить, составляет 35-36 мес.

Хроническая фаза ХМЛ

В периферической крови нейтрофильный лейкоцитоз ($12-100 \times 10^9/\text{л}$). Важным гематологическим признаком при наличии сдвига влево в лейкограмме является увеличение до 3-4% содержания базофилов, нередко при одновременном повышении количества эозинофилов (базофильно-эозинофильная ассоциация). При подсчете лейкограммы палочкоядерные и сегментоядерные нейтрофилы составляют от 35 до 70%, содержание метамиелоцитов и миелоцитов (последних, как правило, больше) колеблется между 5 и 40%, промиелоцитов – 10 и 15%. Признаков дисплазии не отмечается. В большинстве случаев в момент установления диагноза ХМЛ количество бластов не превышает 1-2%. Среднее содержание моноцитов обычно менее 3%, за исключением редких случаев, ассоциированных с изоформой p190^{BCR-ABL1}. Количество тромбоцитов в пределах нормы или выше $1000 \times 10^9/\text{л}$. Тромбоцитопения выявляется крайне редко (рис. 1, 2).

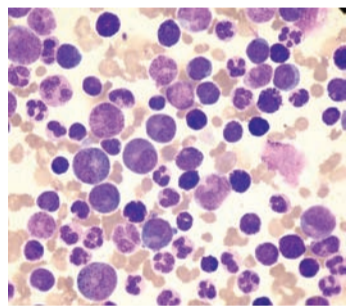


Рис. 1. Хронический миелолейкоз, хроническая фаза. Морфология клеток костного мозга. Окраска по Паппенгейму. $\times 1000$

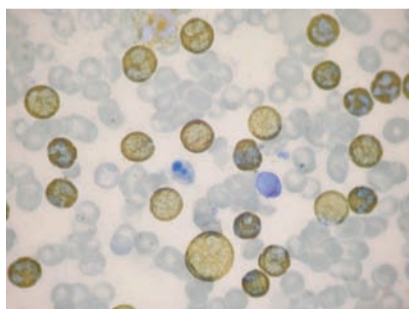


Рис. 2. Хронический миелолейкоз. Активность пероксидазы в клетках нейтрофильного роста. $\times 1000$

У большинства пациентов с ХМЛ отмечается нормохромная/нормоцитарная анемия, в некоторых случаях содержание гемоглобина может быть в пределах нормы и даже повышенным. Эритроциты и обнаруживающиеся в мазках крови ядро-содержащие клетки эритробластического ряда имеют обычные морфологические признаки.

Для повышения качества диагностики ХМЛ и других форм МПН важное значение

имеет внедрение метода трепанобиопсии. В хронической фазе ХМЛ в гистологических срезах трепанобиоптатов костного мозга определяется гиперклеточность за счет увеличения клеточных элементов гранулоцитарного ряда. В количественном отношении преобладают клетки – от миелоцитов до палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов. Содержание бластов в начальной стадии не превышает 5%, а суммарное количество бластных клеток и промиелоцитов – не более 10%. У 40-50% больных отмечается умеренная или выраженная пролиферация мегакариоцитов. Последние, как правило, меньших размеров, чем в норме, имеют гиподольчатые ядра, располагаются изолированно или образуют группы из 3-4 клеток в центральных межтрабекулярных зонах вблизи синусов костного мозга. Скопления незрелых клеток гранулоцитарного ряда более выражены в перистальных и периваскулярных зонах. Среди них выделяются эозинофильные миелоциты и зрелые эозинофилы. Повышенное количество ретикулиновых волокон, выявляемых методом серебрения, в момент установления диагноза определяется у 40% больных. Увеличение количества ретикулиновых волокон в костном мозге коррелирует с увеличением количества мегакариоцитов, выраженностью спленомегалии и анемии. Почти у трети больных ХМЛ в костном мозге выявляются клеточные элементы, напоминающие клетки Гоше и sea-blue гистиоциты, которые возникают, как полагают, из клеток неопластического клона.

На протяжении хронической фазы ХМЛ лейкозные клетки обладают минимальной способностью к инвазии, их пролиферация происходит почти исключительно в гемопоэтических органах (включая и селезенку) и в синусах печени. При гистологическом исследовании селезенки определяется инфильтрация мягкотных шнуров гранулоцитами, находящимися на разных стадиях созревания. Белая пульпа сдавлена. В синусах выявляются немногочисленные мегакариоциты и клетки эритробластического ряда.

Важное значение для установления прогноза и проведения терапии имеет распознавание прогрессирования заболевания из хронической фазы в фазу акселерации и бластного криза. Клинические и морфологические границы между этими стадиями часто перекрываются, а параметры для их разграничения, предлагаемые разными авторами, разнятся. Этот вопрос приобретает особо важное значение в современную эру лечебного применения ингибиторов ПТК. Проведенные в процессе подобной кратковременной или длительной терапии исследования костного мозга позволили установить уменьшение количества клеток гранулоцитарного ряда, нормализацию мегакариоцитопоэза, регрессию фиброза и усиление апоптоза в сочетании с уменьшением пролиферативной активности клеток – предшественников миелопоэза.

Фаза акселерации

В ряде случаев у больных ХМЛ прогрессирующее ухудшение клинического состояния сочетается с дальнейшим развитием взаимосвязанных качественных и количественных гематологических аномалий. Эта стадия заболевания определяется как фаза акселерации, или подострая фаза ХМЛ. Средняя продолжительность ее составляет 12-24 мес.

Для верификации фазы акселерации ХМЛ используются следующие клинико-лабораторные критерии: 1) содержание миелобластов в периферической крови или в костном мозге в пределах 10-19%; 2) количество базофилов в периферической крови $\geq 20\%$; 3) не связанная с терапией устойчивая тромбоцитопения ($< 100 \times 10^9/\text{л}$); 4) устойчивый, несмотря на

проводимую терапию, тромбоцитоз ($> 1000 \times 10^9/\text{л}$); 5) нечувствительное к терапии продолжающееся увеличение количества лейкоцитов в крови ($> 10 \times 10^9/\text{л}$) и размеров селезенки; 6) и/или цитогенетические доказательства клональной эволюции.

При этом если признаки 3-6 ассоциируются в большей степени с переходом из хронической фазы в фазу акселерации, то критерии 1-2 чаще указывают на переход из фазы акселерации в стадию бластного криза.

В фазе акселерации отмечаются выраженные признаки дисгранулоцитопоэза, появление в мазках из пунктата костного мозга гипергранулярных промиелоцитов и миелоцитов. Наблюдаются и другие проявления дисмиелопоэза, включая обнаружение кольцевых сидеробластов, приобретенной пельгеровской аномалии нейтрофилов или эозинофилов, мегакариоцитов с малыми округлыми ядрами. При гистологическом исследовании трепанобиоптатов встречаются небольшие кластеры, состоящие из клеток гранулоцитарного ряда, в которых преобладают не палочкоядерные и сегментоядерные нейтрофилы, а клетки типа миелоцитов и промиелоцитов. В фазе акселерации отмечаются также выраженные признаки дисэритропоэза, включая появление мегалобластоидных элементов, нередко окруженных фиброзной тканью. Определяются крупные кластеры из малых мегакариоцитов, которые у 50% больных сочетаются с очаговым фиброзом костного мозга или диффузным распределением увеличенного количества ретикулиновых волокон (рис. 3).

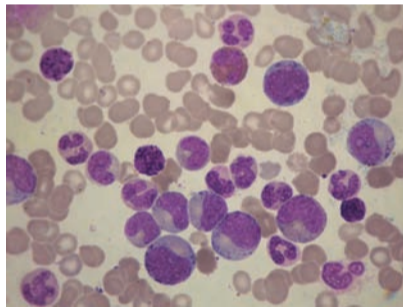


Рис. 3. Хронический миелолейкоз, фаза акселерации. $\times 1000$

Для выявления увеличенного содержания бластных клеток в гистологических срезах трепанобиоптатов костного мозга используется иммуногистохимическое выявление антигена CD34.

Обнаружение лимфобластов в крови или костном мозге является необычным для ХМЛ в фазе акселерации и может указывать на развитие бластного криза лимфоидного типа. В фазе акселерации от различных осложнений умирают 20-25% больных.

Бластный криз

У многих больных ХМЛ в среднем через 4 года после начала заболевания в результате прогрессирования происходит переход в острую фазу с развитием бластного криза. У 20-25% пациентов с ХМЛ бластный криз развивается без промежуточной фазы акселерации.

В клинической картине у пациентов при развитии бластного криза отмечаются лихорадка, слабость, потливость, снижение массы тела, боли в области селезенки и в костях, наличие выраженной гепатоспленомегалии.

Решающим для диагностики бластного криза ХМЛ считается: обнаружение $\geq 20\%$ бластов в периферической крови и костном мозге; или наличие экстрамедуллярных очагов лейкомицетической инфильтрации, состоящих исключительно из бластных клеток, обнаруживающихся в коже, лимфатических узлах, ЦНС и других тканях и органах; или обнаружение при гистологическом изучении трепанобиоптатов костного мозга крупных агрегатов и кластеров бластных клеток. В этой фазе заболевания и другие ростки миелопоэза,

как правило, представлены менее дифференцированными клетками, не отвечающими на действие обычных регуляторных факторов.

Реакция на проводимую терапию при бластном кризе ХМЛ во многом обусловлена природой преобладающего клона бластных клеток. Установлено, что при бластном кризе ХМЛ у 70% больных субстратные клетки имеют миелоидную природу, представлены трансформированными клетками-предшественниками гранулоцитарного или эритробластического и мегакариоцитарного ряда либо клетками этих ростков миелопоэза в различном сочетании. Приблизительно у 20-30% пациентов выявляющиеся в периферической крови и костном мозге бластные клетки имеют лимфоидную природу. В редких случаях выявляются одновременно отдельные популяции миелоидных и лимфоидных бластов.

В гистологических срезах бласты определяются в виде очаговых инфильтратов, располагающихся преимущественно в межтрабекулярных зонах, охватывающих значительное пространство костного мозга.

Применение цитохимических методов наряду с обычными способами паноптической окраски мазков крови и костного мозга позволяет достаточно надежно установить природу лейкомицетических клеток при бластном кризе в каждом конкретном случае ХМЛ. При наиболее распространенном миелоидном подварианте бластного криза в лейкомицетических клетках определяются положительная реакция при выявлении активности миелопероксидазы и нафтол-AS-D-хлор-ацетатэстеразы, слабое диффузное окрашивание цитоплазмы клеток при определении активности кислой фосфатазы и отрицательная реакция при выявлении активности кислой неспецифической эстеразы. Однако в ряде случаев в наименее дифференцированных бластах, подобно клеткам при ОМЛ М0, при цитохимическом исследовании активности миелопероксидазы не обнаруживается. В этих случаях для подтверждения миелоидной природы бластов проводится иммуноцитохимическое исследование с использованием моноклональных антител (мкАТ) к миелопероксидазе. Установление миелоидной или моноцитарной направленности дифференцировки бластных клеток возможно также на основе выявления экспрессии антигенов CD13, CD14, CD15, CD33 и других. Взаимодействие с мкАТ к антигенам CD41 и CD61, к гликофорину и гемоглобину А позволяет идентифицировать соответственно бластные клетки, имеющие признаки клеток мегакариоцитарного и эритробластического ряда (рис. 4, 5).

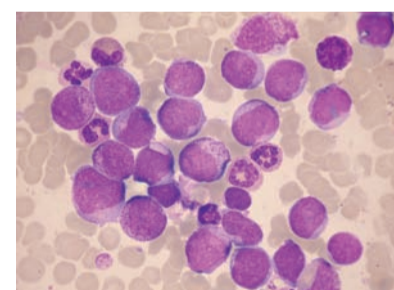


Рис. 4. Бластный криз ХМЛ по миелоидному типу. $\times 1000$

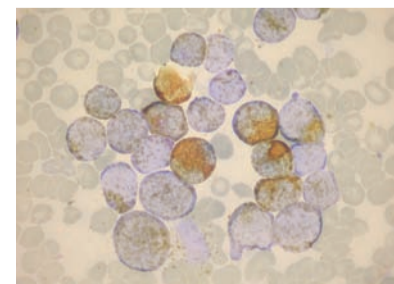


Рис. 5. Активность пероксидазы в бластных клетках. $\times 1000$

Продолжение следует.