

Современная лабораторная диагностика миелопролиферативных новообразований

Продолжение. Начало в № 1/2011

При лимфоидном варианте бластного криза ХМЛ клетки имеют цитоморфологические признаки лимфобластов с высоким ядерно-цитоплазматическим соотношением, содержащих ядра с неправильными контурами (расщепленными и складчатыми) и одним ядрышком. В умеренно базофильной цитоплазме клеток отсутствует азурофильная зернистость. Активность миелопероксидазы в бластных клетках не выявляется, а при PAS-реакции в цитоплазме обнаруживается гликоген в виде крупных гранул или блоков. В большинстве случаев лимфоидного бластного криза ХМЛ лейкоэмические клетки представлены трансформированными клетками-предшественниками В-лимфоцитов. На поверхностных мембранах бластных клеток обнаруживается экспрессия антигенов CD10, CD19 и CD20, в ядрах клеток определяется терминальная дезоксирибонуклеотидилтрансфераза (TdT). Иммуноглобулины на поверхностных мембранах бластов не выявляются, и в редких случаях в цитоплазме обнаруживаются тяжелые μ -цепи (рис. 6).

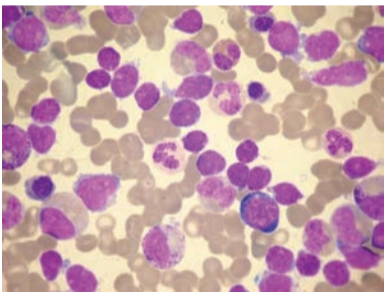


Рис. 6. Бластный криз ХМЛ по лимфоидному типу. $\times 1000$.

У некоторых больных лейкоэмический клон при бластном кризе ХМЛ представлен ранними клетками-предшественниками Т-лимфоцитов – $CD3^+cyCD3^+CD7^+TdT^+$.

У многих пациентов при лимфоидном варианте бластного криза ХМЛ на поверхностных мембранах лейкоэмических клеток определяется коэкспрессия одного или более миелоидных антигенов. В очень редких случаях в крови и костном мозге одновременно обнаруживаются бласты миелоидного и лимфоидного происхождения.

Медиана выживаемости больных с лимфоидным вариантом бластного криза ХМЛ составляет 12 мес, в то время как при наличии бластов миелоидного типа – всего 3–9 мес.

Факторы прогноза

К основным прогностическим факторам относятся возраст больных, размеры селезенки, количество тромбоцитов, процентное содержание бластов в периферической крови. При определении групп риска ХМЛ наряду с указанными критериями учитывается также содержание в крови эозино- и базофилов. В настоящее время при терапевтическом применении ингибиторов тирозинкиназы полный цитогенетический ответ на иматиниб составляет 70–90%, 5-летняя выживаемость – 80–95%.

Хронический нейтрофильный лейкоз

ХНЛ – редкое заболевание, относящееся к группе МПН. Встречается преимущественно у лиц пожилого возраста, но может диагностироваться и у подростков. Характеризуется наличием анемии, спленомегалии и в ряде случаев гепатомегалии.

Причины возникновения ХНЛ остаются до конца не выясненными. Примерно в 20% описанных в доступной литературе случаев отмечена ассоциация ХНЛ со злокачественными новообразованиями, наиболее часто – с множественной миеломой. Полагают, что в этих случаях пролиферация нейтрофилов является вторичной, связанной с аномальным синтезом цитокинов неопластическими клетками.

При исследовании периферической крови отмечается выраженный нейтрофильный лейкоцитоз ($\geq 25 \times 10^9/\text{л}$). Сегментоядерные и палочкоядерные нейтрофилы составляют более 80% всех лейкоцитов. В большинстве случаев содержание незрелых гранулоцитов (промиелоцитов, миелоцитов, юных) не превышает 5%, но иногда приближается к 10%. Миелобласты в периферической крови практически не выявляются ($< 1\%$). По цитоморфологическим признакам нейтрофилы не отличаются от подобных клеток, обнаруживаемых в периферической крови здоровых людей, но иногда в цитоплазме клеток выявляется токсическая зернистость. Признаки дисплазии в клетках гранулоцитарного ряда отсутствуют. Морфологические признаки тромбоцитов и эритроцитов в пределах нормы (рис. 7).

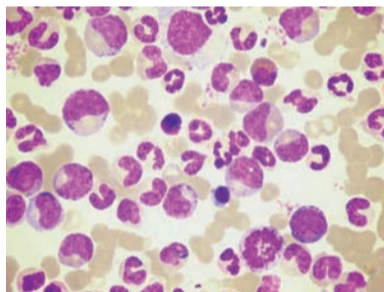


Рис. 7. Хронический нейтрофильный лейкоз. Мазок костного мозга. $\times 1000$

В костном мозге определяется гиперклеточность, обусловленная пролиферацией клеток нейтрофильного ряда. Лейкоэритроидное соотношение составляет 20:1 и выше. Содержание бластов и промиелоцитов во время установления диагноза не увеличено. Могут отмечаться также признаки пролиферации клеток эритробластического и мегакариоцитарного ряда. В клетках всех основных ростков миелоидного кроветворения признаки дисплазии не выявляются. При гистологическом изучении трепанобиоптатов костного мозга очень редко обнаруживаются признаки фиброза. В срезах селезенки инфильтрация нейтрофилами отмечается в красной пульпе, в печени – в синусах.

При цитохимическом исследовании в лейкоцитах при ХНЛ в отличие от ХМЛ определяется повышенная активность щелочной фосфатазы. Какие-либо иные цитохимические или иммунофенотипические аномалии не обнаружены. В кроветворных клетках больных ХНЛ не определяется Ph-хромосома или слитный ген BCR/ABL. У 90% пациентов какие-либо цитогенетические аномалии, в том числе реаранжировки генов PDGFRA, PDGFRB и FGFR1, не обнаруживаются. В редких случаях определяются клональные цитогенетические аномалии: +8, +9, del(20q), del(11q).

Дифференциальная диагностика

Дифференциальный диагноз ХНЛ после исключения инфекционных и воспалительных процессов, сопровождающихся нейтрофильным лейкоцитозом,

проводится с рядом других форм МПН – ИП, ПМФ, ЭТ. Отсутствие признаков дисплазии в клетках гранулоцитарного ряда и миелодиспластических изменений в клеточных элементах других линий миелопоэза, а также содержание моноцитов в крови $< 1 \times 10^9/\text{л}$ позволяет отличить ХНЛ от различных форм миелодиспластического синдрома (МДС) и МПН.

ХНЛ относится к категории медленно прогрессирующих патологических процессов, при которых выживаемость больных колеблется в пределах от 6 мес до 20 и более лет. Появление миелодиспластических признаков может указывать на начало трансформации в острый миелоидный лейкоз (ОМЛ).

Истинная полицитемия

ИП (эритремия, синдром Вакеза-Ослера) – хроническое миелопролиферативное заболевание, характеризующееся избыточным образованием эритроцитов, не зависящим от механизмов, регулирующих эритропоэз в норме. ИП – относительно редко встречающееся заболевание (частота заболеваемости – 0,5–1,0 на 100 тыс. населения в год). Соотношение мужчин и женщин составляет 1,2:1. Средний возраст больных – 60–70 лет. В то же время ИП иногда диагностируется в юношеском и даже детском возрасте.

Этиология заболевания пока остается не выясненной. Значение генетической предрасположенности подтверждают случаи семейной ИП. В развитии заболевания у отдельных категорий больных не исключена роль воздействия ионизирующей радиации, токсических факторов окружающей среды и вирусов.

Практически все больные ИП являются носителями мутаций в гене янус-киназы-2 (JAKV617F) или другой функционально подобной мутации JAK2, приводящей к пролиферации не только клеток эритробластического ряда, но и гранулоцитов, а также мегакариоцитов.

Предполагают, что в основе возникновения ИП лежит трансформация ГСК.

В развитии ИП выделяют три последовательные стадии: продромальную, предполициитемическую фазу, основным признаком которой является увеличение массы эритроцитов; фазу стабильного течения заболевания, ассоциированную со значительным увеличением массы эритроцитов; постполициитемическую миелофиброзу, при которой развитие цитопении, включая анемию, обусловлено неэффективным гемопоэзом, гиперспленизмом и появлением очагов экстрамедуллярного кроветворения.

В начальный период у больных ИП отмечаются слабость, повышенная утомляемость, головная боль. В развернутой, эритремической фазе болезни симптоматика нарастает. Головная боль, встречающаяся у 90% больных, носит характер мучительной мигрени. У больных отмечают эритроцианотическую окраску кожи и видимых слизистых оболочек (90%), боли в области сердца, в костях и нижних конечностях. Почти у половины больных основной жалобой является кожный зуд. Часты тромбозы сосудов (почти у 30% больных), являющиеся одним из основных осложнений при ИП, и геморрагии (у 25% пациентов). Наблюдаются нарушения со стороны центральной нервной системы – от легких функциональных (на основе стазов без тромбообразования) до тяжелых необратимых, обусловленных тромбозом крупных сосудов.

Одним из основных по значимости и частоте клинических признаков является спленомегалия (у 80% больных). Причиной ее служит повышенное кровенаполнение и участие в системном миелопролиферативном процессе. Почти у 70% пациентов одновременно обнаруживаются признаки гепатомегалии, обусловленные усилением кровенаполнения органа, миелоидной метаплазией, разрастанием фиброзной ткани (в поздних стадиях заболевания).

Из данных лабораторных исследований основным для установления диагноза ИП является увеличение массы клеток красной крови. Присущее ИП увеличение количества эритроцитов ($6-7 \times 10^{12}/\text{л}$) и уровня гемоглобина (180–220 г/л) сопровождается возрастанием показателей гематокрита. В первой, предполициитемической, стадии заболевания на нормобластическую эритроидную гиперплазию костного мозга указывает обнаружение в периферической крови нормохромных и нормоцитарных эритроцитов. При дефиците железа, обусловленном повышенной кровоточивостью или частыми кровотечениями, в мазках крови могут выявляться гипохромные и микроцитарные эритроциты. В периферической крови более чем у 80% больных ИП отмечается нейтрофильный лейкоцитоз с небольшим сдвигом влево. Количество лейкоцитов обычно колеблется в пределах от 10 до $20 \times 10^9/\text{л}$. Умеренная базофилия наблюдается у 60–70% пациентов; часто отмечается эозинофилия. Бласты в циркулирующей крови не обнаруживаются.

Количество тромбоцитов повышено у 50–80% больных, у 10% из них оно превышает $1000 \times 10^9/\text{л}$. В периферической крови при ИП могут обнаруживаться крупные тромбоциты и фрагменты ядер мегакариоцитов.

В мазках из стерильного пунктата костного мозга определяется гиперплазия, обусловленная увеличением числа клеточных элементов не только нормобластического эритропоэза, но и клеток других ростков миелопоэза (гранулоцитарного, мегакариоцитарного).

Наличие гиперпластических процессов при ИП подтверждается и результатами гистологического изучения трепанобиоптатов костного мозга. По данным исследователей, входящих в группу по изучению ИП (PVSG), кроветворные клетки различного происхождения и разной степени зрелости занимают от 37 до 100% (в среднем 80%) всей площади срезов костного мозга. Наиболее выражена гиперплазия клеток эритробластического ряда. Значительным является и увеличение количества мегакариоцитов, размер которых широко варьирует – от малых до очень крупных с дольчатыми ядрами. Мегакариоциты в костном мозге распределяются в виде кластеров. В 25% случаев уже в начальной стадии ИП в костном мозге обнаруживается увеличенное количество ретикулярных волокон. В дальнейшем признаки фиброза прогрессируют, что сочетается с увеличением клеточности костного мозга.

ИП диагностируют, руководствуясь следующими критериями (А, В), предложенными экспертами ВОЗ:

• А1. Увеличение массы циркулирующих эритроцитов на $> 25\%$ (≥ 36 мл/кг у мужчин, 32 мл/кг у женщин) или содержания гемоглобина (> 185 г/л у мужчин, 165 г/л у женщин).

- А2. Мутации гена JAK2 V617F или в 12-м экзоне активированного JAK2.
- А3. Исключение причин, вызывающих вторичный эритроцитоз, включая:
 - отсутствие семейного эритроцитоза;
 - отсутствие повышенного уровня эритропоэтина (ЭПО), вызванного гипоксией;
 - насыщение артериальной крови кислородом (pO_2) $\leq 92\%$, гемоглобином с повышенным сродством к кислороду, несоответствующая выработка ЭПО опухолью.
- А4. Спленомегалия.
- А5. Образование эндогенных эритроидных колоний *in vitro*.
- В1. Тромбоцитоз $>400 \times 10^9/\text{л}$.
- В2. Количество лейкоцитов $>12 \times 10^9/\text{л}$.
- В3. При трепанобиопсии костного мозга обнаруживается панмиелоз с выраженной пролиферацией клеток эритробластического и мегакариоцитарного ряда.
- В4. Низкие уровни ЭПО в сыворотке крови.

Диагноз ИП устанавливается при А1+А2 и наличии любого другого признака из категории А или при А1+А2 и любых двух признаков из категории В.

Длительность начальной и стабильной фаз ИП составляет от 5 до 20 лет. Примерно у 10-20% больных наблюдается переход в фазу постполицитемического миелофиброза, для которой характерно уменьшение массы клеток красной крови, выявляемое при радиоизотопном исследовании, увеличение степени спленомегалии, усиление фиброза костного мозга с увеличением количества ретикулярных и коллагеновых волокон, развитие цитопении, пойкилоцитоз и анизоцитоз. В этой терминальной стадии клеточность костного мозга может варьировать, но чаще наблюдаются признаки гипоплазии. Могут отмечаться диспластические изменения в клетках эритробластического и гранулоцитарного ряда, не выявлявшиеся ранее. Обнаруживаются кластеры мегакариоцитов с гиперхромными ядрами. Выраженными могут быть признаки остеосклероза. Развитие очагов экстрамедуллярного гемопоэза сочетается с увеличением размеров селезенки. При гистологическом изучении в синусах селезенки и шнурах Бильбота определяются клеточные элементы эритробластического, гранулоцитарного и мегакариоцитарного ряда. На этой стадии заболевания наблюдается заметное увеличение количества незрелых кровяных клеток. В то же время содержание бластов в крови и костном мозге, как правило, не достигает 10%. Острый лейкоз, чаще всего миелоидного происхождения, возникает у 1-2% больных ИП, не лечившихся цитотоксическими препаратами, и у 10-15% пациентов после миелосупрессивной терапии. В постполицитемической фазе риск развития острого лейкоза у больных значительно выше (23%), чем в начальной и стабильной фазе заболевания (7%).

Данные цитогенетического и молекулярно-генетического анализа

Помимо указанных выше специфических аномалий, встречающиеся в момент установления диагноза у 10-20% больных нарушения включают +8, +9, del(20q), del(13q), del(1p). По мере прогрессирования заболевания частота их увеличивается, достигая 80-90% в постполицитемической фазе.

Иммуноцитохимия

Результаты иммунофенотипирования клеток эритробластического, гранулоцитарного и мегакариоцитарного ряда при ИП не имеют важного диагностического значения. Количество лимфоцитов у больных ИП в течение заболевания не претерпевает существенных изменений. Отмечается лишь снижение соотношения

CD4⁺/CD8⁺ субпопуляций лимфоцитов, обусловленное уменьшением количества CD8⁺-клеток.

Дифференциальная диагностика

Дифференциальная диагностика ИП проводится с рядом заболеваний и состояний, сопровождающихся вторичным (симптоматическим) эритроцитозом. Различают вторичные абсолютные эритроцитозы, для которых характерно раздражение эритробластического роста костномозгового кроветворения и увеличение массы циркулирующих в крови эритроцитов, и относительные эритроцитозы, в основе которых лежит сгущение крови, обусловленное действием различных факторов. В онкогематологической клинике особую важность приобретает дифференциальная диагностика ИП в стабильной фазе заболевания и вторичных абсолютных эритроцитозов, встречающихся у больных с гипернефромой, опухолями почек и эндокринных органов.

Прогноз

При применении современных методов терапии медиана выживаемости больных ИП превышает 10 лет. Основной причиной смерти пациентов являются тромбозы и кровотечения, развитие МДС или ОМЛ. Частота МДС и острых лейкозов составляет 2-3% у больных, не лечившихся цитостатическими препаратами, и более 10% у лиц, подвергавшихся химиотерапии.

Первичный миелофиброз

ПМФ (синонимы: хронический идиопатический миелофиброз, агногенная миелоидная метаплазия, идиопатический миелофиброз, миелофиброз/склероз с миелоидной метаплазией) – клональное МПН, в основе развития которого лежит трансформация стволовых кроветворных клеток костного мозга. Характерные признаки заболевания – преимущественная пролиферация клеток мегакариоцитарного и гранулоцитарного ряда в костном мозге, сопровождающаяся развитием фиброза и остеосклероза; спленомегалия; появление очагов экстрамедуллярного гемопоэза; анемия; изменения в лейкоцитарной формуле крови.

Ежегодная заболеваемость ПМФ в разных странах составляет 0,5-1,5 на 100 тыс. населения. Встречается преимущественно у лиц пожилого возраста (60-70 лет), но изредка и у детей. В анамнезе у некоторых больных – воздействие бензола и ионизирующей радиации. Полагают, что существует семейная предрасположенность к развитию ПМФ. Описаны редкие семейные случаи фиброза костного мозга у маленьких детей, относимые к аутосомальным рецессивным нарушениям.

При развитии ПМФ отмечается эволюция – от начальной предфибротической стадии заболевания, характеризующейся гиперклеточностью костного мозга и отсутствием минимальных признаков ретикулярного фиброза, до стадии выраженного коллагенового фиброза и остеосклероза.

Основные жалобы пациентов при поступлении в клинику – слабость, уменьшение массы тела, лихорадка, боли в костях, иногда геморрагические проявления. К числу наиболее важных клинических признаков относят наличие спленомегалии (у 90% пациентов) и гепатомегалии (в 50% случаев). У 30% больных первоначально отсутствуют какие-либо симптомы, и заболевание выявляется случайно (на основе обнаружения увеличенной в размерах селезенки и результатов анализа крови).

При рутинном анализе периферической крови определяется анемия, лейкоцитоз и/или тромбоцитоз, наличие ядеросодержащих клеток эритробластического ряда. У большинства больных анемия

нормохромная. У 50% пациентов уровень гемоглобина не превышает 100 г/л, а у 20% – <80 г/л. Постоянными признаками являются анизоцитоз и пойкилоцитоз, наличие пойкилоцитов в форме слезинки. Количество ретикулоцитов умеренно увеличено и может колебаться в зависимости от стадии заболевания. При наличии аутоиммунного гемолиза количество ретикулоцитов увеличивается до 5-20%.

Количество лейкоцитов у 40% больных колеблется в пределах $10-25 \times 10^9/\text{л}$, у некоторых превышает $40 \times 10^9/\text{л}$. В крови пациентов с ПМФ встречаются гипер- и гипосегментированные лейкоциты, небольшой процент незрелых клеток гранулоцитарного ряда (миелоцитов и промиелоцитов). Уровень клеток CD34⁺, выявляемых в периферической крови у 40% больных, обычно не превышает 1-5%. Увеличение их содержания даже до 10% еще не служит показателем перехода заболевания в более агрессивную фазу или трансформации в острый лейкоз. Заметим, что подобные клетки, как правило, не обнаруживаются в крови больных ИП и ЭТ. Показатели активности щелочной фосфатазы в нейтрофилах, выявляемой при цитохимическом исследовании, как правило, повышены, но в ряде случаев может наблюдаться нормальный уровень и даже снижение ферментативной активности. При исследовании мазков периферической крови больных ПМФ отмечается умеренная базофилия; количество моноцитов, как правило, не изменено; нередко наблюдается относительная лимфопения.

У многих пациентов с ПМФ может определяться увеличенное количество тромбоцитов (до $500 \times 10^9/\text{л}$). В мазках периферической крови выявляются атипичные, крупные и гипогранулярные тромбоциты, аномальные мегакарициты, в том числе микро-, промегакарициты и голые ядра мегакариоцитов.

Анализ миелограммы при изучении мазков костного мозга, полученных при стерильной пункции, не является показателем. Результаты во многом зависят от того, попала ли игла в очаг миелоидной гиперплазии или в участок с выраженным фиброзом и остеосклерозом. Более информативным при установлении диагноза ПМФ является гистологическое изучение трепанобиоптатов костного мозга. При этом практически во всех случаях определяется гиперклеточность костного мозга, как правило, диффузная и реже очаговая. Синусы костного мозга расширены и заполнены пролиферирующими кровяными клетками. Представлены клеточные элементы всех трех основных линий миелопоэза, хотя в отдельных участках срезов может обнаруживаться преобладание клеток того или иного типа. У 90% больных отмечается значительное количество аномальных мегакариоцитов с измененным ядерно-цитоплазматическим отношением, конденсированным хроматином ядра, образующих кластеры из 3-10 клеток. Эти кластеры часто прилегают к костным trabeculae. Их идентификация облегчается при иммуногистохимическом исследовании с использованием моноклональных антител, реагирующих с антигенами мегакариоцитов (CD41, CD61). Увеличено также количество гранулоцитов с умеренным сдвигом влево и преобладанием метамиелоцитов и палочкоядерных нейтрофилов. Количество миелобластов существенно не увеличено, кластеры из CD34⁺ клеток не обнаруживаются. У большинства больных отмечается редукция клеток эритробластического ряда, но в отдельных случаях выявляются ранние клетки-предшественники эритропоэза.

Степень выраженности фиброза колеблется. В ранней стадии заболевания у большинства больных методом серебряния определяется увеличенное количество ретикулярных волокон, располагающихся

преимущественно вокруг сосудов. Коллагеновых волокон немного. При развитии интенсивного фиброза и возникновения очагов склероза клеточность костного мозга в отдельных участках снижается. Небольшие очаги сохранившихся клеточных элементов мегакариоцитарного и гранулоцитарного ряда разделены волокнами соединительной ткани. В некоторых участках костного мозга кровяные клетки почти полностью отсутствуют, фиброзная ткань целиком заполняет межтрабекулярные пространства. В остеосклеротической фазе в костном мозге образуются широкие неправильной формы trabeculae, занимающие более 50% пространства костного мозга.

Наиболее часто очаги экстрамедуллярного гемопоэза у больных ПМФ развиваются в селезенке и печени. В селезенке отмечается инфильтрация красной пульпы клетками эритробластического, гранулоцитарного и мегакариоцитарного ряда. Наблюдаются признаки неоангиогенеза.

Появление у больных ПМФ 10-19% бластов в периферической крови и/или костном мозге и определение на основе иммуноцитохимического исследования увеличенного количества CD34⁺ клеток, образующих кластеры вблизи эндоста, указывает на переход заболевания в фазу акселерации. Наличие $\geq 20\%$ бластов свидетельствует о трансформации в острый лейкоз.

Данные генетического и молекулярно-генетического анализа

Генетические дефекты, специфические только для ПМФ, не идентифицированы. Приблизительно у 50% больных ПМФ обнаруживаются мутации JAK2 V617F. Наличие данной мутации, обнаруженной также при ИП и ЭТ, подтверждает клональную природу процесса пролиферации, но не позволяет отличить ПМФ от указанных форм МПН. У 30% пациентов с ПМФ выявляются цитогенетические аномалии, такие как del(13)(q12-22) или del(6)t(1;6)(q21-23;p21.3). К числу наиболее частых повторяющихся аномалий относятся del(20q), парциальная трисомия 1q. Описаны также такие аномалии, как +9 и/или +8. Кариотипические аномалии, которые выявляются в момент установления диагноза, относятся к числу неблагоприятных прогностических признаков. В ряде случаев эволюция кариотипа ассоциируется с трансформацией в острый лейкоз.

Факторы прогноза

Выживаемость больных ПМФ колеблется от нескольких месяцев до десятилетий. В основном прогноз зависит от стадии, в которой заболевание было диагностировано. У больных, у которых ПМФ был распознан в стадии фиброза, медиана выживаемости составляет от 3 до 7 лет. У пациентов, у которых диагноз ПМФ был установлен в ранней предфибротической стадии, показатели 10-летней выживаемости составляют 72%, а 15-летней – 59%. К числу неблагоприятных факторов, определяемых в момент установления диагноза, относятся возраст больных (более 70 лет), уровень гемоглобина <100 г/л, количество тромбоцитов $<100 \times 10^9/\text{л}$, обнаружение в мазках периферической крови незрелых клеток гранулоцитарного ряда ($>10\%$ миелоцитов, промиелоцитов и бластов), наличие аномалий кариотипа.

Основными причинами смерти больных являются инфекционные осложнения, кровоизлияния, тромбоэмболии. Трансформация в острый лейкоз, как правило, миелоидного происхождения, отмечается у 5-30% больных – как подвергавшихся, так и не подвергавшихся действию цитотоксической терапии.

Продолжение следует.

