

ЛАБОРАТОРНЫЕ МАРКЕРЫ ХРОНИЧЕСКОГО МИЕЛОЛЕЙКОЗА.

(Обзор литературы)

*Сяпина Т.В., *Бессмельцев С.С., Козлов А.В.*

*ГОУ ВПО Санкт-Петербургская Медицинская академия последипломного образования
Росздрава, кафедра клинической лабораторной диагностики,*

Санкт-Петербург, 191015, Кирочная ул., д. 41, тел.(812)303-50-00,

E.mail: kafedrask@mail.ru

**ФГУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и
трансфузиологии», Санкт-Петербург, 191024, 2-я Советская ул., д. 16,*

тел. (812) 7176780,

E.mail: bloodscience@mail.ru

РЕЗЮМЕ

Современный уровень диагностики гемобластозов предполагает использование комплекса различных лабораторных методов исследования. В обзоре приведен диагностический алгоритм хронического миелолейкоза, который принято считать в определенной мере стандартным для данного заболевания. Алгоритм включает исследование показателей периферической крови, миелограммы, проведение цитогенетического, молекулярно-генетического, цитохимического и иммунологического анализа, а так же в случае необходимости гистологического исследования пунктата и трепанобиоптата костного мозга. Описываются характерные особенности результатов перечисленных методов исследования в зависимости от фазы заболевания. Рассмотрены критерии определения хронической фазы, фазы акселерации и бластного криза хронического миелолейкоза, описанные в современной литературе и используемые в настоящее время врачами различных научных школ в лечебной практике, в частности: критерии ВОЗ, критерии онкологического центра M.D. Anderson (США) и критерии ELN.

В последние 10-15 лет активно исследуют новые подходы к оценке степени тяжести заболевания, скорости прогрессии и эффективности терапии препаратами ингибиторами

тирозинкиназ, используя маркеры апоптоза. Достоверно известно, что торможение апоптоза может быть тем механизмом, путем которого опухолевые клетки приобретают устойчивость к лекарственным препаратам. Факторы, вовлеченные в регуляцию процесса апоптоза, рассматриваются в качестве основных клеточных мишеней целенаправленной терапии. Изучение характера апоптотических реакций в клетках костного мозга больных хроническим миелолейкозом в условиях индукции апоптоза *in vitro* представляется перспективным направлением, поскольку наблюдение за динамикой данного процесса в ходе лечения может служить лабораторным маркером эффективности и помогать в выборе рационального лечения данного заболевания.

Ключевые слова: хронический миелолейкоз, критерии фаз, диагностический алгоритм, лабораторные маркеры, апоптоз.

LABORATORY MARKERS OF CHRONIC MYELOID LEUKEMIA.

Syasina T.V., *Bessmeltsev S.S., Kozlov A.V.,

*St-Petersburg Medical Academy of Postgraduate Studies, Russia; St-Petersburg, 191015,
Kirochnaya str., 41;*

**Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology, St-Petersburg,
191024, 2nd Sovietskaya str., 16;*

The modern diagnostic level of myeloid neoplasms expect the use of a complex various laboratory methods. In this review, we pose the diagnostic algorithm of chronic myeloid leukemia, which is usually considered the standard for this disease. Algorithm includes the study of the peripheral blood, bone marrow, holding molecular cytogenetic and immunocytochemical analysis, and, if necessary, histological study bone marrow aspirate and biopsies. In depend on the disease phase given the characteristic features of the results referred above research methods. Consider various diagnostic criteria, according in modern literature to determine the chronic phase, accelerated phase and blast phase of chronic myeloid leukemia and used at present the doctors of different scientific groups in therapeutic practice, particularly: criteria used by the

WHO classification, criteria used by The University of Texas M. D. Anderson Cancer Center and criteria used at the European Leukemia Net.

New approaches to assessment of the disease heaviness, the rate of development and effectiveness therapy with tyrosine kinase inhibitors employing markers of apoptosis actively researching in last 10-15 years. Authentically known that the inhibition of apoptosis may be the mechanism by which tumor cells become resistant to drugs. Factors involved in the regulation of apoptosis process, are regarded as the main cellular objectives targeted therapy. The study in patients with chronic myeloid leukemia apoptotic reactions in the bone marrow cells of apoptosis induction in vitro constitute to be a perspective direction, so far as monitoring dynamics of this process in during the treatment may be marker of effectiveness therapy and relieve in selection rational treatment of disease.

Key words: chronic myelogenous leukemia, criteria disease phase, diagnostic algorithm, laboratory markers, apoptosis.

Хронический миелолейкоз (ХМЛ) – клональное миелопролиферативное заболевание поражающее в основном плюропотентную стволовую клетку [1]. Согласно последней классификации миелоидных опухолей, предложенной Всемирной Организацией Здравоохранения (ВОЗ) в четвертом издании в 2008 г. ХМЛ включен в группу миелопролиферативных опухолей как хронический миелолейкоз, *BCR-ABL1*- позитивный [2]. Впервые ХМЛ был описан в 1845г. английским врачом Джоном Беннетом [3]. Это первое распознанное злокачественное заболевание, имеющее специфическую хромосомную аномалию. После открытия в 1960 году хромосомы, теперь известной как Филадельфийская (Ph) хромосома, было определено, что она является результатом реципрокной транслокации t(9;22) между хромосомами 9 и 22 [4]. Важное значение имеет тот факт, что в эту транслокацию, вовлечены *ABL1* (Abelson) прото-онкоген 9-й хромосомы и *BCR* (breakpoint cluster region – точка перелома кластера региона) ген 22-й хромосомы [5]. В итоге на 22-й хромосоме (Ph-хромосома) образуется химерный ген *BCR/ABL*, который кодирует белок, обладающий высокой тирозинкиназной активностью – p210 BCR-ABL [6].

В начальной стадии ХМЛ стволовая клетка полностью управляется геном *BCR-ABL*, но сохраняет способность к дифференцировке. Её зрелая клеточная популяция полноценно функционирует. В дальнейшем, происходит необратимая трансформация

клетки в более агрессивную вследствие нестабильности генома, вызванной самим геном *BCR-ABL* [7]. По мере прогрессии заболевания в организме больного накапливаются незрелые предшественники гранулопоэза, образуются экстрамедуллярные очаги гемопоэза в различных органах и тканях, а так же подавляется эритропоэз и мегакариоцитопоэз.

Перечисленные характерные нарушения являются результатом усиления пролиферативной активности клеток, блокирования процессов апоптоза, прогрессирующего нарушения дифференцировки и нарушения процессов миграции клеток костного мозга, которые спровоцированы клональной эволюцией [8].

Клинически ХМЛ в своем развитии проходит три фазы: хроническую фазу (ХФ), которая легко контролируется стандартной химиотерапией (иматиниб, нилотиниб), затем нестабильную фазу акселерации (ФА), которая приводит к фазе бластного криза (БК) [9]. У большинства больных заболевание выявляют в хронической фазе. Приблизительно у 80%, 15% и 5% больных с вновь выявленным ХМЛ заболевание диагностируют, соответственно, в хронической фазе, фазах акселерации и бластного криза [10].

В ХФ течение заболевания сравнительно доброкачественное. Самочувствие больных, как правило, удовлетворительное. Клиническая картина болезни по мере прогрессии ХМЛ резко ухудшается и в ФА и БК характеризуется глубокой тромбоцитопенией с геморрагическими осложнениями, анемией, опухолевой интоксикацией с лихорадкой, потливостью, выраженной слабостью и болями в костях и/или в брюшной полости вследствие органомегалии. В БК ХМЛ больные погибают в основном от геморрагических или инфекционных осложнений, а также полиорганной недостаточности вследствие опухолевой интоксикации и появления экстрамедуллярных очагов гемопоэза [11]. Фаза БК напоминает острый лейкоз и обладает высокой рефрактерностью к химиотерапии – процент ответа на терапию составляет менее 20%, а медиана выживаемости не превышает 3-6 месяцев [12].

Диагностический алгоритм.

Заподозрить и предположить с большой долей вероятности, что у пациента имеется ХМЛ возможно при рутинном исследовании периферической крови (высокий лейкоцитоз, сдвиг формулы влево, базофильно-эозинофильная ассоциация). Для установления диагноза ХМЛ и верификации фазы заболевания обязательно должны быть выполнены следующие лабораторные исследования [13]:

- 1) определение показателей периферической крови с подсчетом лейкоцитарной формулы и тромбоцитов;
- 2) изучение пунктата костного мозга с подсчетом миелограммы;
- 3) проведение цитогенетического анализа клеток костного мозга с рассмотрением не менее 20 метафазных пластинок. В том случае, когда результаты цитогенетического анализа вызывают сомнения по причине невозможности получения качественных метафазных пластинок или проанализировано менее 20 клеток, а также при получении отрицательного ответа – отсутствует $t(9;22)(q34;11)$, и вероятность диагноза ХМЛ достаточно высока, следует выполнить молекулярно-генетическое тестирование для обнаружения гена BCR-ABL методом флуоресцентной гибридизации in situ – FISH (Fluorescence in situ hybridization) и/или качественной полимеразной цепной реакцией (ПЦР) [14];
- 4) Для идентификации бластных клеток и суждения о гетеро- или гомогенности клеточной популяции используются дополнительные цитохимические методы и иммунофенотипирование опухолевых клеток [15].

Определение варианта БК необходимо для проведения целенаправленной терапии.

Дополнительное значение для диагностики заболевания и определения клинической фазы имеет гистологическое исследование костного мозга. Гистологическое исследование костного мозга у больных ХМЛ проводится с целью оценки степени выраженности фиброзной ткани и возможного определения скоплений бластных клеток, что может быть ранним проявлением прогрессирующей фазы заболевания и БК [16].

Одновременно больным ХМЛ рекомендовано HLA-типирование потенциальных кандидатов на проведение аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток

(аллоТГСК) и их сиблингов, при отсутствии последних или их несовместимости – поиск HLA-совместимого неродственного донора в регистрах стволовых клеток. Данное исследование выполняется при условии отсутствия противопоказаний к использованию этого метода лечения: возраст старше 55–60 лет, наличие тяжелых и неконтролируемых соматических заболеваний.

В настоящее время препаратом первой линии терапии для большинства больных ХМЛ является иматиниб мезилат (гливек) – ингибитор c-abl-тирозинкиназы. Препарат эффективен при терапии больных ХМЛ, резистентных к препаратам ИФН- α (интерферон альфа), и способствует получению полного цитогенетического ответа у 70% ранее не леченых больных. Внедрение иматиниба в клиническую практику привело к быстрому и значительному прогрессу в лечении ХМЛ, а также к важным изменениям в тактике ведения больных. Разработаны и другие препараты, также относящиеся к группе ингибиторов тирозинкиназы (нилотиниб и дазатиниб), которые используются в случаях резистентности к иматинибу или его непереносимости. Больным в ХФ ХМЛ рекомендуется выполнение HLA-типирования только в случае развития резистентности или непереносимости иматиниба и ингибиторов тирозинкиназы 2-го поколения [13].

Деление на фазы заболевания несколько условно и зависит не только от клинических и лабораторных данных, а так же от прогностических факторов выживаемости, зависящих от вида и успеха лечения.

Критерии фаз ХМЛ.

В современной литературе предлагаются различные критерии для определения ФА и фазы БК. Так, например, в четвертом издании от 2008 г. ВОЗ продолжает использовать критерии, которые были введены в третьем издании от 2002 г [17]. Согласно данным критериям ХФ устанавливается при наличии:

- лейкоцитоза за счет зрелых форм нейтрофилов;
- числа бластных клеток в периферической крови и костном мозге менее 10%;
- базофилов крови в количестве менее 20%;
- тромбоцитоза, превышающего или равного $100 \times 10^9/\text{л}$.

Фаза акселерации устанавливается при:

- персистирующем лейкоцитозе более $10 \times 10^9/\text{л}$, не поддающимся терапии;
- наличии бластных клеток в периферической крови и костном мозге в пределах 10-19%;
- числе базофилов крови более 20%;
- персистирующей тромбоцитопении ($< 100 \times 10^9/\text{л}$), или персистирующем тромбоцитозе ($> 1000 \times 10^9/\text{л}$), не поддающимся терапии;
- нарастающей спленомегалии;
- выявлении клональной эволюции (дополнительные к Ph-хромосоме нарушения кариотипа) при цитогенетическом исследовании.

Фаза бластного криза устанавливается при:

- количестве бластных клеток в периферической крови и/или костном мозге превышающем или равном 20%;
- появлении экстрамедуллярных бластных пролифератов в разных органах и тканях.

- наличии крупных скоплений бластных клеток в биоптатах костного мозга [18].

Тем не менее, в мировой практике наиболее часто применяются критерии онкологического центра M.D. Anderson (США), разработанные Н. Kantarjian и соавт. [19]. В последнее время нередко используются критерии ELN (European Leukemia Net), предложенные М. Вассарани и соавт. [20]. Согласно этим критериям ХФ ХМЛ устанавливается при отсутствии признаков ФА и БК.

Фаза акселерации устанавливается при обнаружении:

- количества бластных клеток в периферической крови и костном мозге в пределах 15-29%;
- суммы бластных клеток и промиелоцитов большей или равной 30% (Н. Kantarjian и соавт.) и превышающей 30% при условии, что количество бластных клеток менее 30% (М. Вассарани и соавт.);
- количества базофилов крови большего или равного 20% (Н. Kantarjian и соавт.) или превышающего 20% (М. Вассарани и соавт.);
- тромбоцитопении менее $100 \times 10^9/\text{л}$, не связанной с терапией.

Необходимо отметить, что Н. Kantarjian и соавт. считают клональную эволюцию признаком фазы акселерации, в то время как М. Вассарани и соавт. ее исключают. Очевидно, это связано с наличием неоднозначных данных о влиянии предшествующей клональной эволюции на эффективность терапии иматинибом [19, 21].

Фаза бластного криза устанавливается при:

-количестве бластных клеток в периферической крови и/или костном мозге превышающем или равном 30%;

- появлении экстрамедуллярных очагов гемопоэза в разных органах и тканях (кроме селезенки и печени).

Однако и Н. Kantarjian, и М. Vascargani указывают, что спленомегалия и гепатомегалия любых размеров не являются признаками ФА или БК ХМЛ.

Характерные лабораторные данные.

В ХФ заболевания у больных ХМЛ при исследовании периферической крови выявляется нейтрофильный лейкоцитоз со сдвигом лейкоцитарной формулы влево до бластов с присутствием всех переходных форм. При этом отсутствует «лейкемический провал» и количество бластных клеток должно быть менее 10%. Количество лейкоцитов обычно превышает $25 \times 10^9/\text{л}$, но часто составляет более $100\text{-}300 \times 10^9/\text{л}$. 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-ABL. Характерно увеличение базофилов до 3-4% и значительно реже – эозинофилов, т.е. наличие базофильно-эозинофильной ассоциации. Может иметь место умеренная анемия, чаще нормохромная, в некоторых случаях содержание гемоглобина может быть в пределах нормы и даже повышенным. Эритроциты и обнаруживающиеся в мазках крови ядродержащие клетки эритробластического ряда имеют обычные морфологические признаки. Количество тромбоцитов в пределах нормы или выше $1000 \times 10^9/\text{л}$. Тромбоцитопения выявляется крайне редко. Однако, допускается наличие тромбоцитопении (число тромбоцитов менее $100 \times 10^9/\text{л}$), если она связана с получаемой терапией [22].

В ФА ХМЛ наряду с нейтрофильным лейкоцитозом имеет место увеличение числа бластов крови более 10%, сумма бластов и промиелоцитов составляет более 30%, количество базофилов в периферической крови превышает 20% [17, 19]. У большинства

пациентов выявляется анемия.

Для фазы БК в периферической крови характерно увеличение бластов, анемия, тромбоцитопения, однако в редких случаях встречается тромбоцитоз [19]. В мазке крови при морфологическом исследовании часто обнаруживается увеличение числа нормобластов, выраженная базофилия и/или эозинофилия, редко моноцитоз.

При анализе миелограммы в хронической фазе заболевания у больных ХМЛ выявляется повышенная клеточность костного мозга за счет преимущественной гиперплазии гранулоцитарного ростка. Содержание бластов в начальной стадии не превышает 5%, а суммарное количество бластных клеток и промиелоцитов – не более 10%. Миелодиспластические изменения в клетках отсутствуют. В ряде случаев может иметь место увеличение количества мегакарицитов.

В ФА отмечаются выраженные признаки дисгранулоцитопоза, появление в мазках из пунктата костного мозга гипергранулярных промиелоцитов и миелоцитов. Наблюдаются и другие проявления дисмиелопоза, включая обнаружение кольцевых сидеробластов, приобретенной пельгеровской аномалии нейтрофилов или эозинофилов, мегакарицитов с малыми округлыми ядрами. Обращает на себя внимание увеличение числа бластов, промиелоцитов, базофильных и эозинофильных гранулоцитов.

Для фазы БК характерно увеличение числа бластов до уровня 20% и более [17], может иметь место сужение гранулоцитарного, эритроидного, мегакариоцитарного ростков, определяются миелодиспластические изменения в клетках костного мозга. Установлено, что при БК ХМЛ у 70% больных бластные клетки имеют миелоидную природу, представлены трансформированными клетками-предшественниками гранулоцитарного или эритробластического и мегакариоцитарного ряда, либо клетками этих ростков миелопоза в различном сочетании. Приблизительно у 20-30% пациентов выявляющиеся в периферической крови и костном мозге бласты имеют лимфоидную природу. В редких случаях выявляются одновременно отдельные популяции миелоидных и лимфоидных бластов [23].

Кариотип клеток оценивается в соответствии с Международной номенклатурой дифференциально окрашенных хромосом ISCN (1995) [24]. При стандартном цитогенетическом исследовании Ph-хромосому обнаруживают более чем у 95% больных ХМЛ. С появлением молекулярных методов (FISH и ПЦР) появилась возможность

выявлять химерный *BCR-ABL* ген, который определяется у всех пациентов ХМЛ, в связи с чем, в настоящее время исчезло понятие “Ph-негативный ХМЛ” [25].

Кроме стандартной Ph-хромосомы у 3-8% пациентов с ХМЛ определяются варианты $t(9;22)$ с вовлечением в перестройку одного и более дополнительных участков 9 и 22 хромосом. Различают простые и сложные варианты транслокации $t(9;22)$. В случае простых вариантов транслокаций, цитогенетически вовлекаются две хромосомы: 22 и любая другая, кроме 9. Несмотря на различные комбинации хромосом, определяемые при цитогенетическом исследовании, на молекулярном уровне варианты $t(9;22)$ приводят к образованию химерного *BCR-ABL* гена, как в случае со стандартной Ph-хромосомой.

У больных ХМЛ в 20-40% случаев наблюдаются дополнительные хромосомные аномалии. Из них чаще всего встречаются: трисомия 8-й хромосомы – 30–40% случаев, дополнительная 22-я хромосома – 20 - 30% случаев и изохромосома 17 – 15 - 20% [26].

Течение болезни и клиническая картина почти не отличаются у больных Ph-позитивным/*BCR-ABL*-позитивным и Ph-негативным/*BCR-ABL*-позитивным ХМЛ. При некоторых видах вариантов транслокаций, когда в патологический процесс наряду с 9-й и 22-й вовлечены другие хромосомы может иметь место маскировка Ph-хромосомы.

Точка разрыва на 9-й хромосоме при транслокации $t(9;22)(q34;11)$ строго фиксирована и возникает на 3' участке гена *ABL* (экзон a2). Разрыв на 22-й хромосоме у преобладающего большинства больных ХМЛ происходит в большой M-bcr зоне в области экзонов e13 и e14, известных также как b2 и b3. Оба транскрипта (e13a2 = b2a2 и e14a2 = b3a2) слитного гена *BCR-ABL* кодируют образование белка размером 210 kDa – p210 BCR-ABL. Редко у больных ХМЛ выявляются и другие транскрипты гена *BCR-ABL* такие как e1a2, e19a2, e1a3. Тем не менее, у 10–15% пациентов с ХМЛ одновременно с транскриптами b2a2 или b3a2 может определяться слабая коэкспрессия e1a2 транскрипта гена *BCR-ABL* [27].

Однозначных данных о прогностическом значении разных транскриптов гена *BCR-ABL* не получено. У больных с экспрессией белка p190 BCR-ABL (транскрипт e1a2) заболевание протекает более агрессивно [28]. Вариант транскрипта гена *BCR-ABL* определяют с помощью качественного анализа ПЦР, а его уровень – методом

количественного анализа. Качественный анализ ПЦР в повседневной клинической практике применяют довольно редко, в связи с тем, что тактика ведения пациента не зависит от вида транскрипта гена *BCR-ABL*, однако, он может быть полезным на этапе диагностики ХМЛ, в случае, когда стандартный цитогенетический анализ оказался неполноценным (не получены митозы или их анализ затруднен из-за плохого качества, варианты транслокации с маскировкой Ph-хромосомы и др.) и отсутствует возможность проведения FISH-анализа. При определении экспрессии гена *BCR-ABL* с помощью метода количественной ПЦР, как правило, используют праймеры к стандартным вариантам гена *BCR-ABL* [29]. Тем не менее, данный количественный анализ не способен выявить редкие варианты транскрипта гена *BCR-ABL*. Показанием для исследования качественной ПЦР и поиска редких транскриптов данного гена является ложно-отрицательный результат определения транскрипции гена *BCR-ABL* при достоверной количественной ПЦР (РНК не разрушена, достаточно копий контрольного гена). При сомнительных результатах стандартного цитогенетического и ПЦР исследования (редкие транскрипты гена) для уточнения диагноза ХМЛ необходимо использовать метод FISH, при котором флуоресценция в зоне химерного гена *BCR-ABL* возникает независимо от вида транскрипта. Кроме того, только данный анализ позволяет выявить делецию 9-й хромосомы. Тем не менее, прогностическая значимость этой аберрации при терапии иманитиб мезилатом и другими ингибиторами тирозинкиназы не установлена, следовательно, применение FISH только для ее обнаружения в рутинной клинической практике излишне.

Применение цитохимических методов наряду с обычными способами окраски мазков крови и костного мозга позволяет достаточно надежно установить природу лейкемических клеток при БК в каждом конкретном случае ХМЛ. При наиболее распространенном миелоидном подварианте БК в лейкемических клетках определяются положительная реакция при выявлении активности миелопероксидазы и нафтол-AS-D-хлорацетатэстеразы, 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 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 так же на основе выявления экспрессии антигенов CD13, CD14, CD15, CD33 и других. Взаимодействие бластов с мкАТ, реагирующих с антигенами CD41 и CD61, а так же с гликофорином и гемоглобином А позволяет идентифицировать, соответственно, бластные клетки, имеющие признаки клеток мегакариоцитарного и эритробластического ряда [30].

При лимфоидном варианте БК 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 бластах не выявляется, а при PAS-реакции в цитоплазме обнаруживается гликоген в виде крупных гранул или блоков. В большинстве случаев лимфоидного БК ХМЛ лейкемические 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 [31].

У некоторых больных лейкемический клон при БК ХМЛ представлен ранними клетками-предшественниками Т-лимфоцитов – CD3+cyCD3+ CD7+TdT+ [32]. У многих пациентов при лимфоидном варианте БК ХМЛ на поверхностных мембранах лейкемических клеток определяется коэкспрессия одного или более миелоидных антигенов. В очень редких случаях в крови и костном мозге одновременно обнаруживаются бласты миелоидного и лимфоидного происхождения.

По иммунологическому фенотипу бластов выделяют семь вариантов бластного криза: миелоидный, лимфоидный, моноцитарный, эритроидный, мегакариоцитарный, недифференцированный и смешанный [1].

Наиболее часто (у 60% больных) опухолевые клетки имеют миелоидную природу, у 20% – лимфоидную, у 5% – экспрессируют антигены эритроидных и мегакариоцитарных клеток, у 15% фенотип клеток свойственен острому недифференцированному лейкозу. У некоторых больных обнаруживают смешанный вариант бластного криза ХМЛ. Причина гетерогенности маркеров бластных клеток при

ХМЛ заключается в поражении стволовой кроветворной клетки [15]. На момент диагностики ХМЛ лейкоэмическая популяция клеток достигает нескольких триллионов и составляет почти 90% всех гемопоэтических клеток. Несмотря на то, что два клона клеток – здоровые и мутировавшие, длительное время сосуществуют, постепенно лейкоэмические клетки почти полностью вытесняют нормальные.

При гистологическом исследовании трепанобиоптатов костного мозга в ХФ ХМЛ определяется гиперклеточность за счет увеличения клеточных элементов гранулоцитарного ряда. В количественном отношении преобладают клетки – от миелоцитов до палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов. 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 периостальных и периваскулярных зонах. Среди них выделяются 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 ХФ ХМЛ лейкоэмические 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 [30, 31].

В ФА ХМЛ в гистологических срезах трепанобиоптатов костного мозга встречаются небольшие кластеры, состоящие из клеток гранулоцитарного ряда, в которых преобладают не палочкоядерные и сегментоядерные нейтрофилы, а клетки типа миелоцитов и промиелоцитов. Имеются также выраженные признаки дисэритропоэза, включая проявление мегалобластических 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. Для выявления увеличенного содержания бластных клеток в гистологических срезах трепанобиоптатов костного мозга используется иммуногистохимическое выявление антигена CD34 [32].

При развитии БК ХМЛ в гистологических срезах бластные клетки определяются в виде очаговых инфильтратов, располагающихся преимущественно в межтрабекулярных зонах, охватывающих значительное пространство костного мозга [33].

В последние 10-15 лет активно изучают новые подходы к оценке степени тяжести заболевания, скорости прогрессии и результативности терапии препаратами ингибиторами тирозинкиназ, используя маркеры апоптоза.

Начиная с 90 гг. XX века большое внимание уделяется изучению особенностей процессов апоптоза в опухолевых клетках. Изучение процессов апоптоза на клеточных культурах с помощью набора классических биохимических, микроскопических и более современных методов – проточной цитометрии и полимеразной цепной реакции, способствовало выявлению значимых принципиальных аспектов, касающихся вовлечения апоптоза в процессы гибели опухолевых клеток [34]. Получены достоверные сведения, что торможение апоптоза может быть тем механизмом, путем которого опухолевые клетки приобретают устойчивость к лекарственным препаратам [35]. Факторы, вовлеченные в регуляцию процесса апоптоза, в настоящее время рассматриваются в качестве основных клеточных мишеней целенаправленной терапии, а изучение характера апоптотических реакций под ее воздействием может служить лабораторным маркером эффективности и помогать в выборе рациональной химиотерапии [36]. В частности, нами проведено исследование интенсивности апоптотических реакций в клетках костного мозга у больных ХМЛ с помощью показателя прироста клеток, вступивших в процесс апоптоза в условиях его индукции [37]. Использовали методы флуоресцентной микроскопии с применением специфического красителя акридин оранж и проточной цитометрии с применением аннексина V и витального красителя пропидий йодида. К апоптотическим клеткам относили клетки, связавшие акридин оранж при микроскопии и клетки, связавшие аннексин V при цитометрии. Было выявлено, что прирост клеток в состоянии апоптоза у больных в ХФ с впервые установленным диагнозом и не получавших лечение составил в среднем $2,9 \pm 0,8\%$. У больных начавших лечение гливеком и достигших

полного гематологического ответа прирост был равен $5,6 \pm 0,7\%$. У больных, достигших на фоне лечения иматинибом, полного цитогенетического ответа прирост апоптотических клеток определялся на максимальном уровне и достигал $10,1 \pm 0,8\%$. Между тем у больных находящихся в ФА и фазе БК были получены минимальные показатели прироста – $2,3 \pm 1,0\%$ и $0,7 \pm 0,5\%$ соответственно. Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что определение у больных ХМЛ количества клеток костного мозга, вступивших в апоптоз, имеет прогностическое значение для оценки эффективности противоопухолевой терапии и может быть использовано в качестве одного из дополнительных критериев при мониторинге течения заболевания [38].

Заключение.

Таким образом, диагноз хронического миелолейкоза в настоящее время устанавливают после выполнения стандартного набора лабораторных методов. Активное развитие молекулярно-генетических методов диагностики, начавшееся во второй половине двадцатого века и продолжающееся в настоящее время, не уменьшило значимость морфологической оценки клеточного состава периферической крови и костного мозга, позволяющей определить фазу заболевания. Стандартные цитохимические методики, наряду с широким распространением иммунофенотипирования бластных клеток методом проточного цитометрического анализа, сохраняют свою актуальность в определении вида бластного криза.

Вопрос оценки способности клеток к апоптозу при различных заболеваниях остается актуальным для решения многих проблем теоретической и практической медицины, в том числе онкогематологии [39]. Изучение характера апоптотических реакций в клетках костного мозга больных ХМЛ в условиях индукции апоптоза *in vitro* представляется многообещающим направлением, поскольку наблюдение за динамикой данного процесса в ходе лечения может служить лабораторным маркером эффективности и помогать в выборе рационального лечения данного заболевания.

Список литературы:

1. Абдулкадыров К.М., Бессмельцев С.С., Рукавицын О.А. Хронический миелолейкоз. – СПб: “Специальная Литература”, 1998.- 464 с.
2. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, Harris NL, Le Beau MM, Hellström-Lindberg E, Tefferi A, Bloomfield CD. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes// *Blood*. – 2009. – vol.114, №5. – P.937 – 951.
3. J. D. Rowley. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining// *Nature*. – 1973. – vol. 243, № 5405. – P. 290–293.
4. Ried T. Cytogenetics – In color and digitalized// *N Engl JMed*. – 2004. – vol.350(16). – P.1597-1600.
5. G. Q. Daley., R. A. Van Etten., D. Baltimore. Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210(bcr/abl) gene of the Philadelphia chromosome// *Science*. – 1990. – vol. 247, № 4944. – P.824–830.
6. Hochhaus A, La Roshe P. Imatinib therapy in chronic myelogenous leukemia: strategies to avoid and overcome resistance// *Leukemia*. – 2004. – Vol.18, № 8. – P.1321-1331.
7. Cortes J., O'Dwyer M.E. Clonal evolution in chronic myelogenous leukemia// *Hematol Oncol Clin North Am*. – 2004. – Vol.8(3). – P.671–684.
8. Savage D.G., Szydlo R.M., Goldman J.M. Clinical features at diagnosis in 430 patients with chronic myeloid leukemia seen at a referral centre over a 16-year period// *Br J Haematol*. – 1997. – Vol.96. – P.111–116.
9. Koffi KG, Nanho DC, N'dathz E, Kouehion P, Dissieka R, Attia A, Mozard K, Tolo A, Boidy K, Meitï N, Ayemou R, Sekongo M, Tea N, Sanogo I. The Effect of Imatinib Mesylate for Newly Diagnosed Philadelphia Chromosome-Positive, Chronic-Phase Myeloid Leukemia in Sub-Saharan African Patients: The Experience of Côte d'Ivoire // *Adv Hematol*. – 2010. – Vol.2010. – Article ID 268921, 6 pages. doi:10.1155/2010/268921 114.

10. Hehlmann R, Berger U, Pffirmann M, et al. Randomized comparison of interferon alpha and hydroxyurea with hydroxyurea monotherapy in chronic myeloid leukemia (CML-study II): prolongation of survival by the combination of interferon alpha and hydroxyurea.// *Leukemia*. - 2003. - Vol.17. - P. 1529-1537.
11. Fausel C. Targeted chronic myeloid leukemia therapy: seeking a cure// *J Manag Care Pharm*. – 2007. – Vol.13, № 8. – P.8-12.
12. M. E. O’Dwyer., M. J. Mauro., B. J. Druker. Recent advancements in the treatment of chronic myelogenous leukemia// *Annual Review of Medicine*. – 2002. – vol. 53. – P.369–381.
13. Ломаиа Е.Г., Моторин Д.В., Романова Е.Г., Зарицкий А.Ю. Хронический миелолейкоз – до и после применения иматиниба// *Онкогематология*. – 2009. – №2. – С.4-17.
14. Siu L.L., Ma E.S., Wong W.S., Chan M.H., Wong K.F. Application of tri-colour, dual fusion fluorescence in situ hybridization (FISH) system for the characterization of BCR-ABL1 fusion in chronic myelogenous leukaemia (CML) and residual disease monitoring// *BMC Blood Disord*. – 2009. – Vol.9, № 4 – doi:10.1186/1471-2326-9-4 URL: <http://www.biomedcentral.com/1471-2326/9/4> (дата обращения 22.10.2011).
15. Луговская С. А., Морозова В. Т., Почтарь М. Е. Лабораторная диагностика лейкозов. Тверь: "Губернская медицина". – 1999. – С.29-34.
16. Пособие: Моисеев С.И., Зарицкий А.Ю., Салогуб Г.Н., под ред. А.А.Ганапиев. Хронические миелопролиферативные заболевания. Классификация, диагностика и лечение. С-Петербург, 2005. – С.10-11.
17. Yin C.C., Medeiros L.J., Bueso-Ramos C.E. Recent advances in the diagnosis and classification of myeloid neoplasms – comments on the 2008 WHO classification// *Int J Lab Hematol*. – 2010. – Vol. 32, №5. – P.461-476.
18. Vardiman J.W., Harris N.L., Brunning R.D. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms// *Blood*. – 2002. – Vol.100. – P.2292–2302.

19. Cortes J.E., Talpaz M., O'Brien S., Faderl S., Garcia-Manero G., Ferrajoli A., Verstovsek S., Rios M.B., Shan J., Kantarjian H.M. Staging of chronic myeloid leukemia in the imatinib era. An evaluation of the World Health Organization proposal// *Cancer*. – 2006. – Vol.106. – P.1306–1315.
20. Baccarani M., Saglio G., Goldman J. et al. Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of European Leukemia Net// *Blood*. – 2006. – Vol.108. – P.1809–20.
21. Schoch C., Haferlach T., Kern W. et al. Occurrence of additional chromosome aberrations in chronic myeloid leukemia patients treated with imatinib mesylate// *Leukemia*. – 2003. – Vol.17. – P.461–463.
22. Kantarjian H., Sawyers C., Hochhaus A., et al. Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia// *N Engl J Med*. – 2002. – Vol.346. – P.645–652.
23. Глузман Д.Ф., Склярченко Л.М., Надгорная В.А., Ивановская Т.С. Современная лабораторная диагностика миелопролиферативных новообразований/ *Мед. газ. Здоровье украины*. – 2011 – № 1(14) - С. 26-27.
24. ISCN (1995): An International System for Human Cytogenetic Nomenclature, Mitelman, F (ed); S. Karger, Basel, 1995
25. Vardiman J.W., Thiele J., Arber D.A., Brunning R.D., Borowitz M.J., Porwit A., Harris N.L., Le Beau M.M., Hellström-Lindberg E., Tefferi A., Bloomfield C.D. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes// *Blood*. – 2009. – Vol.114, №5. – P.937-951.
26. Kantarjian H.M., Dixon D., Keating M.J. et al. Characteristic of accelerated disease in chronic myelogenous leukemia// *Cancer*. – 1988. – Vol.61. – P.1441–1446.
27. Yaghmaie M., Ghaffari S.H., Ghavamzadeh A., Alimoghaddam K., Jahani M., Mousavi S.A., Irvani M., Bahar B., Bibordi I. Frequency of BCR-ABL fusion transcripts in Iranian patients with chronic myeloid leukemia//*Arch Iran Med*. – 2008. – Vol.11, № 3. – P.247-251.

28. Jones D., Luthra R., Cortes J. et al. BCR-ABL fusion transcript types and levels and their interaction with secondary genetic changes in determining the phenotype of Philadelphia chromosome-positive leukemias// *Blood*. – 2008. – Vol.15(112). – P.5190–5192.
29. Lee W.I., Kantarjian H., Glassman A., Talpaz M., Lee M.S. Quantitative measurement of BCR/abl transcripts using real-time polymerase chain reaction// *Ann Oncol*. – 2002. – Vol.13(5). – P.781-788.
30. Глузман Д.Ф., Скляренко Л.М., Надгорная В.А. Опухоли кроветворной и лимфоидной тканей (цитоморфология, иммуноцитохимия, алгоритмы диагностики). — К.: ДИА, 2008.—196с.
31. Луговская С.А., Почтарь М.Е. Гематологический атлас. 2004. – изд.«Триада» . – С.83-99.
32. Глузман Д.Ф., Скляренко Л.М., Надгорная В.А., Ивановская Т.С. Современная лабораторная диагностика миелопролиферативных новообразований/ *Мед. газ. Здоровье украины*. – 2011 – № 2(15) - С. 30-31.
33. Thelml H., Diem H., Haferlach T. Color atlas of hematology. – 2004. – P.114-121.
34. Осипова Е.Ю. Клеточные модели для оценки уровня и характера апоптоза клеток крови человека. Автореф. дис. канд. биол. наук. – М., 2003 – 45 С.
35. Поспелова Т.И., Лосева М.И., Ковынев И.Б. и др. Основы опухолевой прогрессии гемобластозов // *Бюл. СО РАМН*. – 2004. – Т. 112, № 2. – С. 73—76.
36. Ballard K.S., Homesley H.D., Hodson C., Presant C.A., Rutledge J., Hallquist A., Perree M. Endometrial carcinoma in vitro chemosensitivity testing of single and combination chemotherapy regimens using the novel microculture kinetic apoptosis assay: implications for endometrial cancer treatment // *J. Gynecol. Oncol*. – 2010. – Vol.21, № 1. – P.45 – 49.
37. Бессмельцев С.С., Козлов А.В., Сяпина Т.В., Удальева В.Ю. Сравнительная оценка методов определения апоптотической активности клеток костного мозга у больных хроническим миелолейкозом (флуоресцентная микроскопия и проточная цитометрия) // *Фундаментальные исследования* – 2011. – №10. – С. 33-36.

38. Козлов А.В., Сяпина Т.В., Бессмельцев С.С., Удальева В.Ю., Зарицкий А.Ю. Апоптотическая активность клеток костного мозга у больных хроническим миелолейкозом на фоне лечения иматинибом (гливекком)// MEDLINE.RU: сетевой журнал. 2010. том 11, С. 268-283. URL: <http://www.medline.ru/public/art/tom11/art21.html>.
39. Bellisola G., Della Peruta M., Vezzalini M., Moratti E., Vaccari L., Birarda G., Piccinini M., Cinque G., Sorio C. Tracking infrared signatures of drugs in cancer cells by Fourier transform microspectroscopy // *Analyst*. – 2010. – Vol.135, № 12. – P. 3077 – 3086.