

Гоголева Д.В.¹, Сычугов Г.В.^{1,2}, Шмунк И.В.³

Особенности морфологической картины в трепанобиоптатах костного мозга у пациентов с Ph-негативными миелопролиферативными заболеваниями с различным спектром драйверных мутаций

¹ГБУЗ «Челябинское областное патологоанатомическое бюро», г.Челябинск; ²ФГБОУ ВО «Южно – Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Челябинск; ³ГБУЗ «Челябинская областная клиническая больница»

Gogoleva D.V., Sychugov G.V., Shmunk I.V.

Bone marrow histology in patients with Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms with different driver mutations

Резюме

Проведен анализ морфологической картины в трепанобиоптатах костного мозга при Ph-негативных миелопролиферативных заболеваний у 62 пациентов с разными драйверными мутациями. Исследована возможная связь между мутациями и клеточностью кроветворного костного мозга, выраженностью фиброза, количеством мегакариоцитов, их кластеров, различных форм ядер, тенденции к паратрабекулярному расположению, а также наличием лимфоидных нодулей как отражения иммунной реакции микроокружения опухоли. Пациенты разделены на группы по результатам молекулярно-генетического исследования: 1) JAK2-позитивные, 2) CALR-позитивные, 3) MPL-позитивные, 4) трижды негативные. Продемонстрирована корреляция между морфологическим паттерном и молекулярным пейзажем хронических Ph-негативных миелопролиферативных заболеваний

Ключевые слова: Ph-негативные миелопролиферативные заболевания, трепанобиопсия костного мозга, JAK2 мутация, CALR мутация, MPL мутация

Summary

Analysis was performed of morphological features in bone marrow biopsies of 62 patients with Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms with different driver mutations. It was investigated the possible correlation between gene mutations and bone marrow cellularity, fibrosis, the number of megakaryocytes, clusters of megakaryocytes, shape of nuclear and paratrabecular localisation. In addition, the presence of lymphoid infiltration was investigated as an immune reaction of the tumour microenvironment. All patients were divided into groups according to the results of molecular genetic research: 1) JAK2-positive, 2) CARL-positive, 3) MPL-positive, 4) triple-negative. The morphological patterns are associated with diversity of the gene mutations of Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms

Key words: Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms, bone marrow biopsy, JAK2 mutation, CALR mutation, MPL mutation

Введение

Ключевую роль в развитии миелопролиферативных заболеваний (МПЗ) играют мутации в генах JAK2, CARL и MPL. Наличие одной из них или отсутствие всех трёх имеет прогностическую ценность, но до сих пор не установлено явной связи между мутационным спектром и особенностями морфологической картины в кроветворном костном мозге [1]. В классификации Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) опухолей гематopoэтической и лимфоидной тканей 2017 года [2] представле-

ны наиболее характерные морфологические изменения, которые применимы как критерии для дифференциальной диагностики нозологических форм миелопролиферативных заболеваний — истинной полицитемии, эссенциальной тромбоцитемии и первичного миелофиброза [3]. В представленном исследовании нами были оценены ключевые морфологические изменения кроветворного костного мозга не в связи с актуальной классификацией миелопролиферативных заболеваний, а в соответствии с мутационным статусом последних. В расчет были взяты:

клеточность кроветворного костного мозга (относительно возрастной нормы), форма ядер мегакариоцитов (гиполобулярные «облаковидные», гиперлобулярные «рога оленя», «голые» и с признаками дефекта созревания), наличие малых (более 3 клеток) и больших (более 7 клеток) кластеров мегакариоцитов, паратрабекулярное расположение мегакариоцитов, фиброз (отсутствие, усиление ретикулинового, коллагенового каркаса, остеосклероз), наличие лимфоидных нодулей. Также были рассмотрены дополнительные критерии, не представленные в классификации — клеточность вне зависимости от возрастной нормы, общее количество мегакариоцитов, наличие дисморфных форм мегакариоцитов.

Целью исследования явилось выявление возможной связи между патоморфологическими чертами в трепанобиопсиях кроветворного костного мозга и различными генными мутациями у 62 пациентов с установленным диагнозом Ph-негативного миелопролиферативного заболевания.

Материалы и методы

Пациенты. Были изучены трепанобиопсии костного мозга 62 пациентов с установленным по критериям классификации ВОЗ 2017 г. диагнозом Ph-негативного МПЗ (истинная полицитемия, эссенциальная тромбоцитемия, первичный миелофиброз и миелопролиферативное заболевание неклассифицируемое), обследованных в ГБУЗ ЧОПАБ за период с 2014 по 2019 г. Клинические данные взяты из выписок медицинских карт, прикладываемых к направлению на гистологическое исследование, а также из медицинской информационной системы «БАРС». Обязательным критерием включения стало наличие молекулярно-генетического исследования на JAK2V617F, CARL(1,2), MPL, а также отсутствие циторедуктивной терапии. Пациенты были разделены на 3 группы в зависимости от мутационного статуса заболевания: первую группу составили пациенты с мутацией JAK2V617F (31 пациента); вторую группу составили пациенты с мутациями CALR 1,2 (17 пациентов); третью группу составили пациенты без мутаций JAK2V617F, CARL (1,2), MPL - трижды негативные (14 пациентов). Выявлено всего два пациента с MPL-позитивным статусом, поэтому данная

группа из исследования исключена.

Морфологическая картина оценена при стандартной световой микроскопии по серийным срезам трепанобиопсий костного мозга, окрашенных гематоксилин-эозином, азур-эозином и импрегнацией серебром по Гомори. Оценка клеточности, паратрабекулярного расположения мегакариоцитов, лимфоидных нодулей и выраженности фиброза произведена по всему гистологическому срезу. Общее количество мегакариоцитов, их кластеров и различных форм ядер оценено в 10 полях зрения при увеличении $\times 400$.

Статистическая обработка полученных данных произведена с использованием пакета прикладных программ «Statistica for Windows 6.0». Сравнение качественных и количественных признаков проводилось с помощью таблиц сопряженности (хи-квадрат по методу Пирсона). Статистически значимыми приняты критерии при уровне $p < 0,05$ [4].

Результаты и обсуждение

Мутация JAK2V617F выявлена в 31 из 62 случаев (50%), мутация CARL (1,2) выявлена в 17 случаях (27%), в 14 случаях (23%) выявлен трижды негативный статус. Пациенты в возрасте от 20 до 79 лет (медиана 56 лет). Сравнимые группы были сопоставимы по возрасту. По нозологиям в группах с мутацией JAK2 и мутацией CARL преобладали пациенты с первичным миелофиброзом (код МКБ-10 D47.1) [5].

При исследовании клеточной плотности кроветворного костного мозга относительно возрастной нормы (таблица 1) выявлено повышение в 26 случаях из 31 (84%) в группе с мутацией JAK2, в 14 случаях из 17 (82%) в группе с мутацией CALR (1,2) и в 11 случаях из 14 (78%) у трижды негативных пациентов. Средняя клеточная плотность составила 69,5% и была сопоставима во всех трех группах без выраженных статистических различий ($p=0,45$): 77,4% (JAK2), 70,4% (CALR), 62,5% (TN). При этом общее количество мегакариоцитов было значительно выше у пациентов с мутацией JAK2 и составляло 203,7 клетки на 10 полей зрения при увеличении $\times 400$, в сравнении с 142,1 в группе CALR-позитивных пациентов и 134,4 в группе TN-пациентов ($p_{1,2}=0,0001$;

Таблица 1. Патоморфологические изменения в кроветворном костном мозге в группах пациентов с разными мутациями

Изменения/ мутация	всего (n=62)	JAK2 (n=31)	CALR (n=17)	TN (n=14)	P
	abc/%	abc/%	abc/%	abc/%	
Повышение клеточности относительно возрастной нормы	51/82	26/84	14/82	11/78	
Паратрабекулярное расположение мегакариоцитов	38/61	18/58	14/82	6/43	$p_{1,2}=0,02$ $p_{2,3}=0,0004$
Лимфоидные нодули	16/26	8/26	3/18	5/36	

$p_{1,3}=0,0001$) (таблица 2). Несмотря на большее общее количество мегакариоцитов у JAK2-положительных пациентов, их паратрабекулярное расположение чаще встречалось у CALR-положительных пациентов в 14 случаях из 17

(82%) в сравнении с 58% JAK2-положительных ($p_{1,2}=0,02$) и 43% трижды негативных ($p_{2,3}=0,0004$) пациентов. Среди форм ядер мегакариоцитов статистически значимые различия получены при подсчете гипобулярных «об-

Таблица 2. Количественные характеристики в кроветворном костном мозге в группах пациентов с разными мутациями

Характеристика/ мутация	Всего (n=62) ± σ	JAK2 (n= 31) ± σ	CALR (n=17) ± σ	TN (n=14) ± σ	P
Клеточность, % ¹	69,5 ± 16,9	77,4 ± 14,4	70,4 ± 15,9	62,5 ± 18,3	
Мегакарициты ²	160,2 ± 67,2	203,7 ± 79,1	142,1 ± 52,9	134,4 ± 48	$p_{1,2}=0,0001$ $p_{1,3}=0,0001$
«Облаковидные» ядра ³	16 ± 20,2	29,8 ± 26,3	12,6 ± 12,5	3,2 ± 2,9	$p_{1,2}=0,001$ $p_{1,3}=0,0001$ $p_{2,3}=0,001$
Ядра «оленьи рога» ³	9,5 ± 9,8	8,25 ± 14,8	10,8 ± 8,5	10,3 ± 5,6	
Голоядерные формы ³	8,3 ± 7,9	6,5 ± 5,8	9,7 ± 8,8	7,3 ± 8,2	
Дисморфные ядра ³	7,8 ± 13,6	3,2 ± 5	14,5 ± 20,5	5,2 ± 6,8	$p_{1,2}=0,009$ $p_{2,3}=0,009$
Ядра с дефицитом созревания ³	4 ± 4,2	4,75 ± 5,5	4,7 ± 4	3,7 ± 3,4	
Кластеры > 3 клеток (мелкие)	9,4 ± 6,2	14,4 ± 5,7	8 ± 5,3	6,8 ± 5,7	
Кластеры >7 клеток (крупные)	3 ± 5,3	4,4 ± 6,3	3,7 ± 6,5	0,7 ± 1,6	
Всего кластеров	12,4 ± 5,5	18,8 ± 6	11,7 ± 5,8	7,5 ± 4	$p_{1,3}=0,02$

Примечание: ¹ оценка в процентах относительно жирового костного мозга, вне зависимости от возрастной нормы

² количество мегакариоцитов на 10 полей зрения при ув.х400

³ количество мегакариоцитов с измененными ядрами на 10 полей зрения при ув. Х400

Таблица 3. Выраженность фиброза в костном мозге в группах пациентов с разными мутациями

Фиброз/ мутация	Всего (n=62)	JAK2 (n= 31)	CALR (n=17)	TN (n=14)	P
	abc/%	abc/%	abc/%	abc/%	
Фиброз не выражен, MF0	16/26	8/26	3/18	5/36	$p_{2,3}=0,01$
Усиление ретикулинового каркаса, MF1	24/39	13/42	6/35	5/36	
Усиление коллагенового каркаса, MF2-3	21/34	10/32	8/47	3/21	$p_{1,2}=0,02$ $p_{2,3}=0,02$
Остеосклероз, MF3, Coll1-3	9/15	3/10	5/29	1/7	$p_{1,2}=0,02$ $p_{2,3}=0,0001$

лаковидных» ядер, такие клетки значительно преобладают в JAK2-позитивной группе - 29,8 клетки на 10 полей зрения при увеличении 400х в сравнении с 12,6 в CALR-позитивной группе и 3,2 в группе пациентов без драйверных мутаций ($p_{1,2}=0,001$; $p_{1,3}=0,0001$; $p_{2,3}=0,001$). В свою очередь дисморфные ядра (мегакариоциты с явными признаками атипии) чаще встречались у пациентов с мутацией CALR (1,2), среднее значение составило 14,5 клеток в сравнении с 3,2 в JAK2-позитивной группе и 5,2 в TN-группе ($p_{1,2}=0,009$, $p_{2,3}=0,009$). Статистически значимых различий между группами не получено при подсчете гиперлобулярных (так называемые «оленьи рога») ядер - среднее значение в трех группах составило 9,5 клеток на 10 полей зрения при ув.400х - 8,25 (JAK2), 10,8 (CALR), 10,3 (TN); «голаядерных» форм - среднее значение в трех группах составило 8,3 клетки на 10 полей зрения при ув.400х - 6,5 (JAK2), 9,7 (CALR), 7,3 (TN); мегакариоцитов с дефицитом созревания (мелкие клетки с би- и монолобулярными ядрами) - среднее значение в трех группах составило 4 клетки на 10 полей зрения при ув.400х - 4,75 (JAK2), 4,7 (CALR), 3,7 (TN). При оценке тенденции к кластеризации мегакариоцитов (рис. 1) (Примечание редактора: этот и последующие рисунки находятся на цветной вставке) с помощью подсчета малых (более 3 клеток) и больших (более 7 клеток) кластеров различий по группам выявлено не было, однако при суммарной оценке кластеров очевидно, что их наименьшее количество (7,5 кластеров) определяется в группе без драйверных мутаций в сравнении с 18,8 у JAK2-позитивных пациентов ($p_{1,3}=0,02$) (таблица 2).

При характеристике стромы в поле зрения попали лимфоидные нодулы, которые встречались во всех трех группах, но при подсчете их количества не было выявлено статистически значимых различий - 26% случаев (JAK2), 18% случаев (CALR), 36% случаев (TN). Наиболее важной характеристикой стромы является выраженность фиброза. Отсутствие фиброза стромы было характерно для группы с негативными драйверными мутациями - 36% случаев, в сравнении всего 18% в CALR-позитивной группе ($p_{2,3}=0,01$). Пациенты с усилением ретикулинового каркаса до MF1 (оценка с использованием полуколичественной системы градации фиброза костного мозга, предложенной Thiele J. с соавторами в модификации 2015 г.) встречались во всех группах без статистически значимых различий - 42% случаев (JAK2), 32% случаев (CALR), 36% случаев (TN). Максимально выраженный фиброз с появлением коллагеновых волокон был выявлен у пациентов с мутациями CALR (1,2) - 47% случаев при 32% в группе JAK2 и 21% в группе TN ($p_{1,2}=0,02$; $p_{2,3}=0,02$) и остеосклероза - 29% случаев при 10% в

группе JAK2 и 7% в группе TN ($p_{1,2}=0,02$; $p_{2,3}=0,0001$) (таблица 3) (рис. 2).

Заключение

Таким образом, МПЗ с различным мутационным пейзажем различались по патоморфологическим чертам в кроветворном костном мозге. В первую очередь выявлено значительное преобладание абсолютного количества мегакариоцитов в трепанобиоптатах пациентов с мутацией JAK2, при этом больше кластеров образуют мегакариоциты у пациентов с мутациями CALR (1,2). Сопоставимые результаты получены Pich с соавторами (2018 г.) и Alvarez-Loran A. (2018 г.) при изучении морфологии костного мозга у пациентов с различными генетическим профилем эссенциальной тромбоцитомии [1, 6]. Также в группе CALR-позитивных пациентов выявлена тенденция к паратрабекулярному расположению мегакариоцитов в сравнении с JAK2-позитивной и трижды негативной группами. При оценке морфологии ядер мегакариоцитов выявлено преобладание гиполобулярных «облаковидных» форм у пациентов с мутацией JAK2 и дисморфных форм у пациентов с мутацией CALR, остальные варианты формы ядра («голаядерные», гиперлобулярные «оленьи рога», ядра с дефицитом созревания) не имели статистически значимых различий при подсчете.

При оценке стромы в трепанобиоптатах пациентов с мутацией CALR чаще выявлялись продвинутые стадии фиброза - усиление коллагенового каркаса и остеосклероз, как в сравнении с JAK2-позитивными, так и с трижды негативными пациентами. Описанный факт подтверждается данными Tefferi с соавторами (2014 г.) о более частой фибротической прогрессии МПЗ у CALR-позитивных пациентов [7,8].

Оценка патоморфологических черт, характерных для МПЗ с разным мутационным статусом, имеет важное значение в совокупности с широко изученными клиническими и прогностическими различиями данных групп. Выявленные различия подтверждают гетерогенность Ph-негативных МПЗ вплоть до возможного разделения всей когорты пациентов на молекулярные подтипы. ■

Гоголева Д.В. - зав. патологоанатомическим отделением №5, врач-патологоанатом ГБУЗ ЧОПАБ, г.Челябинск. **Сычугов Г.В.** - к.м.н., доцент кафедры патологической анатомии и судебной медицины ФГОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России г.Челябинск, главный врач ГБУЗ ЧОПАБ, г.Челябинск. **Шмунк И.В.** - к.б.н., биолог. Автор, ответственный за переписку: Гоголева Д.В., 454003, г.Челябинск, ул.Татищева, д.249, стр.3, ГБУЗ ЧОПАБ, e-mail: kazarcevadariya@mail.ru, тел: +7912-313-69-05

Литература:

1. Pich A., Riera L., Francia di Celle P., Beggiato E., Benevolo G., Godio L. JAK2V617F, CALR and MPL mutations and bone marrow histology in patients with essential thrombocythaemia. *Acta Haematol.* 2018;140(4):234-239.
2. Swerdlow S.H., Campo E., Harris N.L., Jaffe E.S. et al., editors. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. IARC: Lyon,

- France; 2017.
3. Barbui T., Thiele J., Gisslinger H. The 2016 WHO classification and diagnostic criteria for myeloproliferative neoplasms: document summary and indepth discussion. *Blood Cancer Journal* (2018) 8:15
 4. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. М: МедиаСфера; 2000.
 5. Гоголева Д.В., Сычуглов Г.В. Особенности клинических проявлений у пациентов с Rh-негативными миелопролиферативными заболеваниями с различным спектром драйверных мутаций. *Уральский мед. журнал* 2019; 178 (19): 90-93.
 6. Alvarez-Larran A., Martínez D., Arenillas L., Rubio A. Essential thrombocythaemia with mutation in MPL: clinicopathological correlation and comparison with JAK2V617F-mutated and CALR-mutated genotypes. *J Clin Pathol.* 2018 Nov;71(11):975-980.
 7. Tefferi A., Guglielmelli P., Larson D.R. Long-term survival and blast transformation in molecularly annotated essential thrombocythemia, polycythemia vera, and myelofibrosis. *Blood.* 2014; 124(16): 2507–13.
 8. Tefferi A, Lasho TL, Finke CM, et al. CALR vs JAK2 vs MPL-mutated or triple-negative myelofibrosis: clinical, cytogenetic and molecular comparisons. *Leukemia.* 2014;28(7):1472-1477.
 9. Гоголева Д.В., Сычуглов Г.В. Особенности клинических проявлений у пациентов с rh-негативными миелопролиферативными заболеваниями с различным спектром драйверных мутаций. *Уральский медицинский журнал.* 2019. № 10 (178). С. 90-93.