

© Коллектив авторов, 2003

Н. Н. Савва, С. К. Клецкий, О. Г. Сахарова, Л. Ю. Федорова,
Ю. А. Мороз, Р. И. Юцкевич, О. В. Алейникова

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КОСТНОГО МОЗГА В ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКЕ МИЕЛОДИСПЛАСТИЧЕСКОГО СИНДРОМА И ОСТРОГО МИЕЛОБЛАСТНОГО ЛЕЙКОЗА У ДЕТЕЙ

Республиканский научно-практический центр детской онкологии и гематологии (РНПЦДОГ),
г. Минск, Республика Беларусь

Миелодиспластические синдромы (МДС) у детей — группа крайне редко встречающихся клональных заболеваний, в основе классификации которой лежит цитоморфологическое исследование периферической крови (ПК) и костного мозга (КМ). Целью данного исследования была клиничко-лабораторная характеристика *de novo* рефрактерной анемии с бластозом в ПК (РАИБ) и рефрактерной анемии с бластозом в КМ (РАИБ-т) у детей и определение достаточности критериев Fab-классификации при диагностике этих типов МДС в детском возрасте. Проанализированы данные клиничко-лабораторного, в том числе цитогенетического, обследования у 8 больных с РАИБ и у 7 — с РАИБ-т, которые проходили лечение в РНПЦДОГ г. Минск с 1989 по 2000 гг., а также в РДКБ г. Москва. При данном анализе выявлены 2 случая заболевания, которые по всем критериям Fab-классификации относились к РАИБ и РАИБ-т (по одному больному соответственно), однако имели хромосомные транслокации, специфичные для острого миелобластного лейкоза ($t(9;11)(p22;q23)$ и $t(8;21)(q22;q23)$). В статье показана недостаточность цитоморфологического и актуальность цитогенетического исследования КМ при постановке диагноза МДС у детей.

Pediatric myelodysplastic syndromes (MDS) are the group of very rare clonal diseases, which are classified on the base of peripheral blood (PB) and bone marrow (BM) cytomorphologic study. The aim of this study was to characterize pediatric *de novo* refractory anemia with blastosis in peripheral blood (RAIN) and refractory anemia with blastosis in bone marrow (RAIB-t) and to estimate sufficiency of Fab-classification criteria in diagnosis of these types of MDS in children. Authors analyzed data of clinical and laboratory (including cytogenetic) examination of 8 patients with RAIB and 7 — with RAIB-t which were treated in Republic pediatric clinic of Minsk and in Republic children hospital in Moscow in 1989—2000 years. Analysis detected 2 cases of disease which was classified as RAIB (1 case) and RAIB-t (1 case) according to all criteria of Fab-classification, but these patients had chromosomal translocations specific for acute myeloblastic leukemia ($t(9;11)(p22;q23)$ and $t(8;21)(q22;q23)$). The article showed insufficiency of cytomorphologic examination and actuality of cytogenetic BM examination in diagnosis of pediatric MDS.

Миелодиспластические синдромы (МДС) у детей — группа крайне редко встречающихся и объединенных искусственно клональных заболеваний стволовой клетки: рефрактерная анемия без увеличения бластов в периферической крови (ПК) и/или костном мозге (КМ) (РА/РАКС), рефрактерная анемия с бластозом в ПК и/или КМ (РАИБ/РАИБ-т) и ювенильный миеломоноцитарный лейкоз [1]. Fab-классификация МДС, принятая в 1982 г., основана на цитологическом исследовании клеток ПК и КМ и не учитывает биологические особенности гемопоэтических клеток [2, 3]. При постановке диагноза МДС (РАИБ, РАИБ-т) встает необходимость дифференциальной диагностики этих заболеваний с острым миелобластным лейкозом (ОМЛ) с низким количеством бластов в КМ (менее 30%).

Целью нашего исследования была клиничко-лабораторная характеристика *de novo* РАИБ и РАИБ-т у детей и определение достаточности критериев Fab-классификации при диагностике этих типов МДС в детском возрасте.

Материалы и методы исследования

Мы проанализировали основные клиничко-лабораторные параметры у 8 больных РАИБ и у 7 — РАИБ-т, которые проходили лечение в РНПЦДОГ г. Минск с 1989 по 2000 гг., а также в РДКБ г. Москва (данные любезно предоставлены докт. мед. наук Масчаном А.А.).

Диагноз *de novo* МДС (РАИБ и РАИБ-т) устанавливали на основании общепринятых критериев: отсутствие данных о применении цитотоксических и иммуносупрессивных

агентов, а также лучевой терапии в анамнезе; выявление цитопении в ПК и признаков клеточной дисплазии при цитоморфологическом исследовании ПК и КМ при относительном содержании бластов в КМ менее 30%; тип МДС определяли в соответствии с рекомендациями Fab-классификации; в качестве дополнительных исследований для уточнения диагноза использовали цитогенетическое исследование ПК и КМ. Выявление транслокаций, характерных только для ОМЛ — $t(8;21)(q22;q22)$, $t(15;17)(q22;q11-12)$, $inv 16$ и варианты, реаранжировки с участием хромосомы $11q23$, — позволяло отнести заболевание не к МДС, а к ОМЛ у больных, имевших количество бластов в КМ менее 30% (EWOG, 1998).

Клеточность КМ определяли на гистологических срезах КМ визуально полуколичественно с учетом возрастной нормы. Смещение миелоидных предшественников с поверхности эндоста в центр межтрабекулярного пространства расценивали как аномальную локализацию незрелых предшественников (АНЛП). Присутствие 3 и более скопленных АНЛП в поле зрения на среднем увеличении рассматривали как ранний морфологический признак аккумуляции бластов в КМ. Фиброз КМ оценивали методом световой микроскопии с использованием следующих методик: серебрение ретикулярной стромы по Гомеру, окрашивание гематоксилином и эозином по Массону.

Для цитогенетического исследования ПК и КМ использовали общепринятый метод краткосрочного культивирования клеток КМ с последующей дифференциальной G-окраской метафазных хромосом. Хромосомные aberrации описывали по международной номенклатуре (ISCN, 1995). Аномальный клон определяли по наличию не менее двух метафазных пластин с идентичной хромосомной aberrацией при анализе не менее 20 метафаз. Идентичную хромосомную aberrацию в лимфоцитах ПК расценивали как конституциональную. Молекулярно-биологическое исследование КМ проводили методом полимеразной цепной реакции для определения химерных генов, ассоциированных с ОМЛ, — $AML1(CBF\alpha)/ETO$; $PML/RAR\alpha$; $CBF\beta/MYH11$; MLL .

Результаты и их обсуждение

В группу РАИБ мы включили 8 детей в возрасте от 1,2 до 13,6 лет (медиана 5,3 года). Соотношение полов было 1 : 1 (4 мальчика и 4 девочки). Конституциональные изменения были описаны у 3 из 8 детей с РАИБ: болезнь Дауна — у одного больного, остеохондропатия (болезнь Шойерманн – Мау) — у одного, дополнительная хорда в левом желудочке сердца — у одного. Цитогенетическое исследование КМ было проведено 5 больным. Клональные аномалии кариотипа выявлены у одного пациента: $dup(5)(p15),+21$.

В группу больных РАИБ-т мы включили 7 детей в возрасте от 3,8 до 13,6 лет (медиана 8,2 года), из них 5 были мальчики. Конституциональные изменения описаны у 2 из 7 детей: синдром Кабуки — у одного, дефект межжелудочковой перегородки — у одного. Клональные аномалии кариотипа выявлены у 3 из 7 больных: простые — у 2 (моносомия 7), комплексные — у одного ($-7, -21, +3, +mar$).

По данным литературы, МДС в детском возрасте в $1/3$ случаев развивается на фоне конституциональных изменений [4, 5]. В нашей группе исследования также у большого количества больных мы наблюдали те или иные изменения конституции. При этом мы не

выявили специфических изменений конституции и аномалий кариотипа, что также согласуется с исследованиями других авторов [4—7].

В клинической картине заболевания у детей с РАИБ ведущими были анемический и геморрагический синдромы. На момент постановки диагноза 2 больных РАИБ имели инфекционные осложнения — пневмония у одного, ангина у одного ребенка. Частота основных клинических синдромов у больных РАИБ представлена в табл. 1. При клиническом осмотре анемический синдром зарегистрирован у всех больных РАИБ-т, геморрагический — у большинства. Инфекционные осложнения на момент поступления отмечены у 2 из 7 больных — воспаление придаточных пазух носа у одного, *herpes labialis* у одного ребенка.

Таблица 1

Клиническая характеристика больных РАИБ и РАИБ-т

Клинические синдромы		РАИБ	РАИБ-т
		(n=8)	(n=7)
Анемический		7	7
Геморрагический		5	5
Гиперпластический	лимфоаденопатия	5	3
	гепатомегалия	2	1
	спленомегалия	1	—
	гепатоспленомегалия	2	3
Инфекционные осложнения		2	2

При лабораторном обследовании (табл. 2) у всех больных РАИБ выявили анемию I—II степени тяжести. У большинства больных РАИБ количество лейкоцитов было нормальным или сниженным. Тромбоцитопения различной степени тяжести на фоне снижения или отсутствия мегакариоцитов отмечена у большей части детей с РАИБ. У $1/4$ пациентов признаки дисплазии отмечены только в миелоидной линии гемопоэза, примерно у $1/3$ — в миелоидной и эритроидной. При исследовании лабораторных показателей у всех больных РАИБ-т выявлена анемия I—III степени тяжести и тромбоцитопения. Лейкоцитоза не было ни у одного больного. Мегакариоциты были снижены или отсутствовали у большинства больных. Дисплазия миелоидной и эритроидной наблюдалась у половины пациентов, у остальных диспластические изменения клеток ПК и КМ найдены во всех трех линиях.

У половины больных РАИБ клеточность КМ была в пределах возрастной нормы, у всех пациентов (из тех, кому проводилась трепанобиопсия) найдена АНЛП в КМ (табл. 3). При цитоморфологическом исследовании КМ у больных РАИБ-т нами установлено, что в этой группе одинаково часто встречались больные

Таблица 2

Лабораторная характеристика больных РАИБ и РАИБ-т

Показатели		РАИБ (n=8)	РАИБ-т (n=7)
Гемоглобин, г/л	> 110	—	—
	110—90	4	3
	89—70	4	2
	< 70	—	2
	M ± m	90 ± 4,4	80,6 ± 6,0
Лейкоциты, · 10 ⁹ /л	> 11	2	—
	3,5—11	4	4
	< 3,5	2	3
	M ± m	7,2 ± 1,8	5,1 ± 1,2
Нейтрофилы, мм ³	> 1500	4	4
	500—1500	2	2
	200—499	2	1
	< 200	—	—
	M ± m	2310,5 ± 986,4	1155,7 ± 476,1
Тромбоциты, · 10 ⁹ /л	> 150	2	—
	31—150	4	3
	10—30	1	2
	< 10	1	2
	M ± m	123,9 ± 69,5	54,7 ± 21,6
Мегакариоциты в костном мозге	нормальное количество	1	1
	снижены/отсутствуют	7	6
Дисплазия клеток костного мозга	однолинейная	2	—
	двухлинейная	3	4
	трехлинейная	3	3

Таблица 3

Цитоморфологические особенности костного мозга у больных РАИБИ РАИБ-т

Группы больных	Клеточность			Фиброз			АНЛП		
	повышена	норма	снижена	есть	нет	норма	есть	нет	норма
РАИБ	2	4	2	1	6	1	7	н/д	1
РАИБ-т	3	1	3	2	5	н/д	7	н/д	н/д

н/д — трепанобиопсию не проводили.

с гипоклеточным и гиперклеточным КМ. У большинства пациентов зафиксировано отсутствие фиброза, у всех больных визуально выявлена АНЛП в КМ.

При анализе клинико-лабораторных параметров *de novo* МДС у детей мы выявили два случая заболевания, которые по всем критериям Fab-классификации относились к РАИБ и РАИБ-т (по одному больному соответственно), однако имели хромосомные транслокации, специфичные для ОМЛ. Этим больным был выставлен диагноз ОМЛ, мы не включили их в группу исследования и, ввиду крайне редкой встречаемости ОМЛ с низким количеством бластов, ниже приводим клинические примеры обоих случаев этого заболевания.

Ребенок Сергей Ш., 26.07.1997 г.р., болен с апреля 2000 г., когда появилась фебрильная температура (до 39°C), припухлость в околоушной области. 21.04.00 ребенок госпитализирован в инфекционное отделение Петриковской ЦРБ с диагнозом: «Эпидемический паротит, лимфоаденопатия». 24.04.00 появились носовые кровотечения, в общем анализе крови — глубокая анемия и тромбоцитопения, в связи с чем ребенок переведен в гематологическое отделение Гомельской областной клинической больницы, где был выставлен диагноз: «Миелодиспластический синдром с избыточным количеством бластов». 16.05.00 ребенок госпитализирован в РНПЦДОГ для дальнейшего обследования и лечения.

Состояние при поступлении тяжелое. Кожные покровы бледные, сыпи нет. Периферические лимфатические узлы не увеличены, эластичные, безболезненные. Тоны сердца ритмичные, легка приглушены, ЧСС 130 ударов в мин. Легкие без особенностей, ЧД 30 в мин. Живот мягкий, безболезненный. Печень выступает из-под края реберной дуги на 3 см, селезенка — на 5 см. Функциональные отправления не нарушены.

Общий анализ крови при поступлении: Нб 72 г/л, эр. $2,91 \cdot 10^{12}/л$, тр. $179 \cdot 10^9/л$, л. $6,0 \cdot 10^9/л$, н. 1%, сегм. 9%, лимф. 89%, мон. 1%, СОЭ 56 мм/ч.

Костно-мозговая пункция от 29.05.00: миелобласты 19,5%, нейтрофильный росток 26%, лимфоциты 23,5%, моноциты 0,5%, эритроидный росток 30,5%, миелокариоциты $50 \cdot 10^9/л$, мегакариоциты 0. Заключение: КМ умеренно богат клеточными элементами, много разрушенных клеток; единичные мегакариоциты, не функционируют; мало свободно лежащих тромбоцитов; выражен дизгранулопоэз — диссоциация созревания ядра и цитоплазмы, гипогрануляция нейтрофилов, дегенеративные изменения нейтрофилов; выражен дизэритропоэз — вакуолизация цитоплазмы эритрокариоцитов, карioreкис и пикноз ядра.

Трепанобиопсия от 19.05.00: гиперплазия кроветворных клеток (клеточность КМ 100%) за счет гранулоцитарного ряда, в котором преобладают молодые клетки, отмечается аномальная локализация незрелых предшественников, количество эритроидных островков уменьшено; популяция мегакариоцитов представлена как зрелыми формами, так и микромегакариоцитами; сосуды расширены; перитрабекулярный миелофиброз. Заключение: морфологическая картина соответствует МДС с АНЛП в КМ и очаговым миелофиброзом.

На основании цитогенетического исследования КМ от 29.05.00 (результаты получены 18.06.00), показавшего наличие хромосомной транслокации, специфичной только для ОМЛ (46, XY, t(9;11)(p22;q23) [9] /46, XY [1]), ребенку был выставлен окончательный диагноз: острый миелобластный лейкоз (M1 морфология по Fab-классифи-

кации), период разгара. С 29.06.00 по 20.05.01 получал лечение по протоколу ММ — ОМЛ-2000. Гематологическая ремиссия достигнута после первого блока полихимиотерапии. В настоящее время больной находится в первой полной ремиссии.

Ребенок Таисия П., 14.04.1991 г.р., больна с сентября 1999 г., когда появились вялость, слабость, боли в животе, периодические подъемы температуры тела до субфебрильных цифр. 29.02.00 амбулаторно был сделан общий анализ крови, в котором обнаружены анемия, тромбоцитопения и «атипичные» клетки. 01.03.00 поступила в РНПЦДОГ для обследования и лечения.

Состояние при поступлении тяжелое, температура тела 37,1°C. Кожные покровы бледные, на коже нижних конечностей экхимозы, геморрагическая сыпь. Периферические лимфатические узлы не увеличены, эластичные, безболезненные. Слизистая оболочка полости рта чистая, зев гиперемирован. Отмечается слизисто-гнойное отделяемое из носа. Множественный кариес зубов. Тоны сердца ритмичные, громкие, ЧСС 106 ударов в мин. В легких разнокалиберные влажные хрипы в нижних отделах, в нижней доле слева мелкопузырчатые хрипы на вдохе, ЧД 24 в мин. Живот мягкий, безболезненный. Пальпируется край печени, селезенка не пальпируется. Функциональные отправления без особенностей.

Рентгенограмма придаточных пазух носа: двусторонний острый гайморит. Рентгенограмма легких: данных за пневмонию нет.

Общий анализ крови при поступлении: Нб 71 г/л, эр. $2,18 \cdot 10^{12}/л$, тр. $18 \cdot 10^9/л$, л. $3,2 \cdot 10^9/л$, сегм. 7%, лимф. 86%, мон. 2%, бласты 5%.

Костно-мозговая пункция от 02.03.00: миелобласты 18% (M2 морфология по Fab-классификации), нейтрофильный росток 62,25%, эозинофилы 4%, лимфоциты 7,5%, моноциты 4%, плазматические клетки 0,25%, эритроидный росток 4%, миелокариоциты $198 \cdot 10^9/л$, мегакариоциты 0. Заключение: КМ очень богат клеточными элементами, свернулся; мегакариоциты единичные, функционирующие не найдены; мало свободно лежащих тромбоцитов; в бластах имеется зернистость и палочки Ауэра; выражены явления дизгранулоцитопоза в виде гипогрануляции нейтрофилов, их макроцитоза, диссоциации созревания ядра и цитоплазмы.

Иммунофенотипирование КМ от 02.03.00: представлена фенотипическая характеристика всей популяции мононуклеаров.

02.03.00 девочке выставлен предварительный диагноз: миелодиспластический синдром, рефрактерная анемия с избытком бластов в трансформации; ОРВИ, двусторонний острый гайморит, острый бронхит. Однако на основании результата цитогенетического исследования КМ от 02.03.00 (результаты получены 15.03.00), показавшего наличие специфичной для ОМЛ транслокации (45,X — X, t(8;21)(q22;q23) [19]) был выставлен окончательный диагноз: острый миелобластный лейкоз (M2 морфология по Fab-классификации), период разгара. Лечение начато 17.03.00 по протоколу ММ — ОМЛ — 2000. Гематологическая ремиссия была достигнута после первого блока полихимиотерапии.

Несмотря на то что Fab-классификация стала единым языком общения между клиницистами, морфологами и исследователями, открытие биологических особенностей гемопоэтических клеток при МДС диктовали необходимость использования для постановки диагноза не только цитологических, но и цитогенетических параметров [2]. В нашей работе мы так-

же показали, что у детей в некоторых случаях невозможно выставить правильный диагноз, ориентируясь только на критерии Fab-классификации, на что указывают и другие авторы [3].

Таким образом, Fab-классификация МДС не учитывает такую патологию, как ОМЛ с низким количеством бластов, которая по цитологическим показателям сходна с МДС (РАИБ или РАИБ-т), но имеет клональные аномалии кариотипа — t(8;21) и t(9;11), — специфичные для ОМЛ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bennett J. // *Br. J. Haematol.* — 1982. — Vol. 51, № 2. — P. 189—199.
2. Harris N. L., Jaffe E. S., Diebold J. et al. // *The Hematology Journal.* — 2000. — № 1. — P. 53—66.
3. Чан Г., Ванг В., Раймонди С. и др. // *Гематология и трансфузиология.* — 1998. — Т. 43, № 3. — С. 33—34.
4. Forty-four cases of childhood myelodysplasia with cytogenetics, documented by the Group Francais de Cytogenetique Hematoloque // *Leukemia.* — 1997. — Vol. 11, № 9. — P. 1278—1285.
5. Luna-Fineman S., Shannon K., Atwater S. et al. // *Blood.* — 1999. — Vol. 93, № 2. — P. 459—466.
6. Novitzky N., Prindul G. // *Am. J. Hematol.* — 2000. — № 63. — P. 212—222.
7. Hasle H., Arico M., Basso G. et al. // *Leukemia.* — 1999. — № 13. — P. 376—385.