

ДИАГНОСТИЧНИ КРИТЕРИИ И МОРФОЛОГИЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА НА КОСТНИЯ МОЗЪК ПРИ КЛАСИЧЕСКИТЕ PH(-) МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНИ НЕОПЛАЗМИ СЪГЛАСНО ПОСЛЕДНАТА РЕВИЗИЯ НА СЗО ОТ 2016 Г.

Надежда Стефанова¹, Мария Цанева²

¹Катедра по обща и клинична патология, Факултет по медицина, МУ-Варна

²Катедра по предклинични и клинични науки, Факултет по фармация, МУ-Варна

DIAGNOSTIC CRITERIA AND MORPHOLOGIC CHARACTERISTICS OF BONE MARROW IN PH (-) CLASSICAL TYPE CHRONIC MYELOPROLIFERATIVE NEOPLASMS ACCORDING TO THE LAST REVISION OF WHO 2016

Nadezhda Stefanova¹, Maria Tsaneva²

¹Department of general and clinical pathology, Faculty of Medicine, Medical University of Varna

²Department of preclinical and clinical sciences, Faculty of Pharmacy, Medical University of Varna

РЕЗЮМЕ

Миелопролиферативните неоплазми (MPN) представляват хетерогенна група от хематологични моноклонални заболявания, характеризиращи се с първично нарушение на кръвотворните стволови клетки с последваща ексцесивна продукция на зрели клетки от еритроидния, гранулоцитния и мегакариоцитния ред. Честотата на MPN е сравнително ниска, средно на година заболяват около шест човека на 100 000 население. Засягат се предимно по-възрастни индивиди, като средната възраст на пациентите е между 65 и 70 години. Съгласно последната ревизия на СЗО на класификацията на тумори от хемопоеични и лимфни тъкани (2016) MPN се разделят на хронична миелогенна левкемия, носеща Philadelphia (Ph+) хромозома, която е резултат от транслокация t(9,22) с образуване на BCR-ABL1 фузионен ген, хронична неутрофилна левкемия, хронична еозинофилна левкемия от неспециален тип, миелопролиферативни неоплазми от неклассифицируем тип и класически Ph(-)

ABSTRACT

Myeloproliferative neoplasms (MPN) are a heterogeneous group of hematologic monoclonal diseases, characterized by a primary disorder of the pluripotent hematopoietic stem cell leading to overproduction of mature cells from erythroid, myeloid and megakaryocytic lineages. The incidence of MPN is relatively low, every sixth per 100 000 people gets ill annually. Affected patients are usually older individuals, with an average age between 65 and 70 years. According to the last revision of WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues (2016), MPN are divided into chronic myeloid leukemia, carrying Philadelphia (Ph+) chromosome, which is a result from translocation t(9,22) with formation of BCR-ABL1 fusion gene, chronic neutrophilic leukemia, chronic eosinophilic leukemia not otherwise specified, chronic myeloproliferative neoplasms unclassifiable, classical type Ph(-) MPN: polycythemia vera, essential thrombocytopenia, prefibrotic/early primary myelofibrosis, overt primary myelofibrosis. In the last revision of WHO (2016) some of the diagnostic criteria for MPN are revised and oth-

MPN: полицитемия вера, есенциална тромбоцитемия и първична миелофиброза в префибротичен / ранен стадий и фибротичен стадий. В последната ревизия на СЗО от 2016 г. са актуализирани някои от диагностичните критерии на Ph(-) MPN, а други са детайлизирани. Конкретизирани са случаите, при които се изисква костномозъчна биопсия.

Ключови думи: *миелопролиферативни неоплазми, полицитемия вера, есенциална тромбоцитемия, първична миелофиброза*

Миелопролиферативните заболявания или миелопролиферативните неоплазми (MPN) представляват хетерогенна група от хематологични моноклонални заболявания, характеризиращи се с първично нарушение на кръвотворните стволови клетки с последваща експресивна продукция на зрели клетки от еритроидния, гранулоцитния и мегакариоцитния ред (47).

Честотата на MPN е сравнително ниска, средно на година заболяват около шест човека на 100 000 население. Засягат се предимно по-възрастни индивиди, като средната възраст на пациентите е между 65 и 70 години (21).

Съгласно последната ревизия на СЗО от 2016 г. MPN се разделят на хронична миелогенна левкемия, носеща Philadelphia (Ph+) хромозома, която е резултат от транслокация t(9,22) с образуване на BCR-ABL1 фузионен ген, хронична неутрофилна левкемия, хронична еозинофилна левкемия от неспециален тип, миелопролиферативни неоплазми от неклассифицируем тип и класически Ph (-) MPN: полицитемия вера (PV), есенциална тромбоцитемия (ET) и първична миелофиброза (PMF) в префибротичен / ранен стадий и фибротичен стадий (7).

През последните години има значителен напредък в изучаването на патогенетичните механизми на Ph(-) MPN. През 2005 г. е установено, че приблизително 95% от случаите с PV и между 50 и 60% от пациентите с ET и PMF имат придобита мутация на Janus киназа 2 (JAK2) ($JAK2^{V617F}$), както и мутации на рецептора за тромбопоетин (MPLW515K/L) (10, 23). Тези мутации водят до активиране на JAK2-STAT интрацелуларния сигнален път, в резултат на което се увеличава както клетъчната пролиферация, така и резистентността към апоптоза. Идентифицирани са и нови мутации, асоциирани с JAK2-STAT сигнален път, и тъй като всички те се откриват предимно при пациентите с MPN, мутациите имат и

ers are slightly modified. There is a stress on the cases that require bone marrow biopsy.

Keywords: *myeloproliferative neoplasms, polycythemia vera, essential thrombocytemia, primary myelofibrosis*

диагностична стойност. Това налага към диагностичните критерии за ET, PV и PMF да се включи информация и за присъствието на молекулни аномалии при пациентите с Ph(-) MPN.

ET, PV и PMF показват някои общи морфологични и молекулярногенетични характеристики. Те са Ph(-) MPN, водят началото си от плурипотентни хемопоеични стволови клетки и показват ефективна клонална миелопролиферация. Имат мутация на гените за тирозин киназа и JAK2, костният мозък е хиперцелуларен с предиспозиция към формиране на фиброза и остеосклероза.

Отделните MPN показват и някои особености. От трите класически MPN заболявания най-агресивно протича PMF. Тя води до преждевременна смърт, обикновено в рамките на пет до седем години след поставяне на диагнозата. Продължителността на живота при ET и PV почти не е засегната. Най-висок е рискът за смърт от тромбоемболични усложнения. Едно от най-честите усложнения при MPN, особено при пациентите с ET и PV, са тромбозата и/или кървенето (1).

Пациентите с ET и PV клинично се различават от тези с PMF. В дългосрочен план малък процент от пациентите развиват миелофиброза, която се изявява със спленомегалия и цитопения. При пациентите с миелофиброза, настъпила след PV или ET, клиничната картина и прогноза са сходни с тези при PMF.

Въпреки че се развива рядко, при пациентите с ET и PV може да настъпи трансформация в остра миелоидна левкемия (AML), която значително скъсява продължителността на живота (49).

Откриването на $JAK2^{V617F}$ мутацията при пациенти с Ph(-) MPN постави началото на таргетната терапия при тази група заболявания. През последните пет години се разработиха редица JAK2 инхибитори, по-голямата част от кои-

то са все още в процес на клинично изпитване (58). Предварителните резултати сочат, че тази група медикаменти имат потенциал да понижават активността на болестта, за което свидетелства намаляването на спленомегалията и подобряването на системните симптоми, но лекарствата не повлияват малигнения клон и фиброзата в костния мозък. Най-много проучвания има със субстанцията, наречена INCB018424 – мощен инхибитор на JAK1 и JAK2, която е предназначена за перорален прием.

Костномозъчната биопсия е определяща за диагностициране на MPN, за идентифициране на вида и фазата на заболяването (28, 59). Морфологичното изследване на трепанобиопсията дава възможност да се разграничат MPN от реактивни процеси в костния мозък. Оценката на хемопоезата при MPN се явява важен предиктивен фактор за определяне усложненията на заболяванията (прогресия към миелодиспластичен синдром) и за проследяване резултата от проведеното лечение.

В ранната фаза PV, ET и PMF имат много общи морфологични характеристики и следователно трудно могат да се разграничат една от друга само на базата на хистологичната оценка на костния мозък. Отдиференцирането на трите вида MPN в ранната фаза е важно за лечението и предотвратяването на усложнения. При PV има риск от тромбоемболични усложнения. По-лоша преживяемост се наблюдава при пациентите с PMF в сравнение с тези с ET, които имат нормална средна преживяемост. Това налага търсене на нови характеристики за разграничаване на тези заболявания.

Критерии за ET

За първи път случай на ET е описан от д-р Emil Epstein и д-р Alftred Goedel през 1934 г. (17). Новите случаи на ET на година са около 1.5 – 2.5 на 100 000 население (24).

ET се характеризира с нормоцелуларен костен мозък и ексцесивно големи мегакариоцити (Таблица 1). Диагнозата ET се поставя при наличието на постоянна тромбоцитоза и костномозъчни промени, съвместими с ET при липса на клонален маркер и изключване на вторична тромбоцитоза. Клоналните маркери, използвани в клиничната практика, са *JAK2^{V617F}*, *CALR* и *MPL* мутациите, които са позитивни съответно в около 60% и 1-3% от пациентите (9,11,37,42). В класификацията на СЗО от 2008 г. се посочва, че присъствието на значителна ретикулинова мрежа и колаген в костния мозък изключва диагнозата ET (47). В последната ревизия на класификационна система са посочени основните морфологични черти на мегакариоцитите, които позволяват разграничаването на ET от префибротичния стадий на PMF. Към диагностичните критерии на ET освен *JAK2^{V617F}* мутационния статус са включени мутации на *CALR* и *MPL*, а стойностите на тромбоцитите са понижени от $\geq 600 \times 10^9$ на $\geq 450 \times 10^9/L$ (7,47,56).

Пациентите с ET са често асимптоматични, клиничните симптоми, ако присъстват, са умора, главоболие и симптоми от страна на микроциркулацията (19,47). Има значителен риск от артериална и венозна тромбоза, но рискът от прогресия във вторична MF и трансформация в AML/MDS е сравнително нисък.

В новата ревизирана класификация от 2016 г. диагностичните критерии за ET, отнасящи се до

Таблица 1. Критерии за ET, съгласно класификацията на СЗО от 2016 (7)

Големи критерии:	Малък критерий:
1. Повишен брой на тромбоцитите - по-голям от $450 \times 10^9/L^*$ 2. Биопсията от костния мозък показваща пролиферация главно на мегакариоцитите с преобладаване на зрели, но по-големи по размер мегакариоцити. Няма олевяване на неутрофилната гранулопоеза или еритропоеза и много рядко (фиброза 1), леко увеличаване на ретикулни фибри. 3. Да липсват критериите според СЗО за <i>BCR-ABL1+CML</i> , PV, PMF миелодиспластичен синдром или други миелоидни нарушения. 4. Да присъстват <i>JAK2</i> , <i>CALR</i> или <i>MPL</i> мутации.	1. Присъствие на клонален маркер или липса на доказателства за реактивна тромбоцитоза.

Диагнозата изисква покриване на всичките четири големи критерии или първите три големи критерии и малкия критерий

качествената оценка на мегакариоцитите, не са променени в сравнение с тези от 2008 г. По отношение на морфологичната картина на костния мозък се посочва, че макар и рядко може да се наблюдава ретикуларна фиброза 1. За разлика от класификацията от 2008 г., която изисква покриване на четирите главни критерия, в новата класификация на MPN диагнозата ET може да бъде поставена при покриване на първите три големи и на малкия критерий (7).

Морфологична характеристика на костния мозък при есенциална тромбоцитемия

Костният мозък при ET се характеризира с увеличаване броя на мегакариоцитите, които са рехаво групирани, имат гигантски размери и хиперлобулирани ядра тип „еленови рога”. В большинството от случаите липсва ретикуларна фиброза или има фиброза 1. Еритропоезата и миелопоезата обикновено не са засегнати.

Критерии за полицитемия вера

Д-р Louis Henri Vaguez през 1892 г. за първи път съобщава за пациент с полицитемия вера, която протича клинично с еритроцитоза и хепатомегалия (57). По-късно д-р William Osler описва няколко пациенти с подобна клинична картина и предлага заболяването да се нарича заболяване на Vaguez (36). Двамата лекари обръщат внимание на високата честота на мозъчни инсулти при тези болни.

Честотата на PV е 1.5-2.0/100 000 население годишно (6,24,47). PV се характеризира с ексцесивна еритропоеза, с повишен хемоглобин и хематокрит (Таблица 2). Костният мозък е хиперцелуларен,

като доминира еритропоезата, но се наблюдава и панмиелоza, дължаща се на увеличаване броя на белите кръвни клетки и тромбоцитите при много от пациентите (1). JAK2 V617F мутация се открива в повече от 95% от болните с PV, като около 3% от пациентите с PV са позитивни за мутация на екзон 12 на JAK2 гена (10,44). Наличието на мутация в екзон 12 предизвиква по-изолирана еритропоеза, без левкоцитоза и тромбоцитоза (45).

Пациентите с PV имат висок риск от тромбоемболични усложнения, докато прогресията във вторична MF и трансформация в AML/MDS се среща относително рядко. Други белези и симптоми на PV включват главоболие, замаяност, сърбеж с висока температура, умора, спленомегалия и микроваскуларни нарушения като еритромелалгия (2).

Прогнозата на пациентите с PV зависи от няколко фактора. Възраст на пациента над 60 години, предхождащи тромбози, брой на Eг > 11x10⁹/L и някои цитогенетични нарушения са рисковите фактори за влошаване на общата преживяемост (52). Средната продължителност на нелекуваните пациенти с PV е 18 месеца, докато след лечение тя е значително по-дълга (13,21).

Диагностичните критерии на PV се базират на количеството на хемоглобина или на хематокрита или на увеличената еритроцитна маса (Таблица 2) (7). За разлика от класификацията от 2008 г. тези стойности в новата класификация са занижени, а други са допълнени (7,5,9). Конкретизирани са случаите, при които се налага взема-

Таблица 2. Диагностични критерии за PV съгласно класификацията на СЗО от 2016 (7)

Големи критерии:	Малък критерий:
1. Хемоглобин – 16.5 g/dL (за мъже), 16 g/dL (за жени) или хематокрит > 49% за мъже и > 48% за жени или увеличена еритроцитна маса*	1. Серумен еритропоетин под референтните граници
2. Хиперцелуларен за възрастта костен мозък с панмиелоza с изразена пролиферация на трите реда на хемопоезата (панмиелоza), включваща явна еритроидна, гранулоцитна и мегакариоцитна пролиферация с полиморфни, зрели мегакариоцити (различни по размер). **	
3. Присъствие на JAK2 ^{V617F} или JAK2 екзон 12 мутация.	

Диагнозата изисква наличието на трите големи критерия или първите два големи критерия и малкия критерий.

* >25% над средните нормални очаквани предиктивни стойности

** критерий 2 (костномозъчна биопсия) не се изисква в случаите с постоянна абсолютна еритроцитоза: хемоглобиново ниво >18.5 g/dL за мъже (хематокрит 55.5%) или >16.5 g/dL за жени (хематокрит 49.5%), ако основният критерий 3 и малкият критерий присъстват. Първоначална миелофиброза (която се наблюдава в повече от 20% от пациентите) може да бъде установена само чрез костномозъчна биопсия. Тази находка може да бъде предиктор за по-бърза прогресия в явна миелофиброза (пост-полицитемична миелофиброза).

не на костномозъчна биопсия. Морфологичната картина на костния мозък изисква наличието на пролиферация на трите реда на хемопоезата, т.е. панмиелооза, като мегакариоцитите са полиморфни, но са от зрял тип. В новата класификация се акцентира върху миелофиброзата, която може да се наблюдава при част от пациентите с PV и която се явява важен предиктивен фактор за прогресия на заболяването. Съгласно класификацията на MPN от 2016 г. към големите критерии се отнася присъствието на една от двете мутации: JAK2V617F или JAK2 екзон 12 (7).

Морфологична характеристика на костния мозък при полицитемия вера

Хистологичните промени на костния мозък при пациенти с PV зависят от стадия на развитието на неоплазмата. Съгласно класификацията на СЗО от 2008 г. се различават три стадия на PV:

- продромална или преполицитемична фаза, която клинично се характеризира от гранична до лека еритроцитоза;
- явна полицитемична фаза, свързана със значително увеличен брой на еритроцитите;
- „изчерпана” фаза или постполицитемична миелофиброзна фаза (пост-PV MF) при която цитопенията, включваща анемия, е свързана с неефективна хемопоеза, костномозъчна фиброза, екстрамедуларна хемопоеза и хиперспленизъм.

В преполицитемичната фаза се наблюдава леко хиперцелуларен костен мозък с преобладаване на големи до гигантски форми на мегакариоцитите, показващи обширна зряла цитоплазма с дълбоко лобулирани и хиперлобулирани (подобни на еленови рога) ядра. Много големите и гигантски хиперлобулирани мегакариоцити (ЕТ-подобни мегакариоцити) наподобяват на ЕТ в тази фаза. В този стадий има леко увеличаване на грануло- и еритропоезата, което добре се демонстрира с прилагането на нафтол-ASD-хлорацетат. Той маркира в червено гранулоцитните клетки и не оцветява еритроидния ред, което позволява да се оцени относителната част на двете костномозъчни линии (т.е. еритроидна и гранулоцитна).

В полицитемичната фаза в костния мозък се наблюдава панмиелооза, т.е. пролиферация на трите реда на хемопоезата с преобладаване на еритроидните прекурсори и мегакариоцитите (32). Между 45 и 100% от случаите с PV, средно около 90% от пациентите имат повишена за възрастта клетъчност, предимно наблюдавана в субкортикалните костномозъчни пространства,

които нормално са хипоцелуларни (32). Мегакариоцитите са увеличени по брой и показват характерни морфологични нарушения като хиперлобулирани ядра (46). В тази фаза най-характерната черта е изразеният полиморфизъм, представящ се със значителни разлики в мегакариоцитния размер, който лесно може да бъде оценен чрез използване на ПАС реакция или чрез имунохистохимично изследване със антиялото - CD 61, който ги маркира специфично (32). Мегакариоцитите образуват рехави групи или са разположени плътно до костните трабекули (46).

В „изчерпаната” фаза или постполицитемична миелофиброзна фаза (пост-PV MF) се наблюдава прогресивно редуциране на еритропоезата и развитието на миелоидна метаплазия. Най-характерната морфологична черта на този стадий е явната ретикуларна и колагенна фиброза (46). Костният мозък най-често е хипоцелуларен. Мегакариоцити, често с хиперхромни ядра, се откриват на групи и се намират обикновено в дилатирани костномозъчни синусоиди. През този стадий може да се наблюдава увеличаване броя на незрелите клетки и увеличаване на бластите >10% в костния мозък, което показва прогресия в миелодисплазия. Случаите, при които има увеличаване на бластите $\geq 20\%$, се приемат за ОМЛ. Прогресия на PV в миелодисплазия или ОМЛ се наблюдава в повече от 20% от случаите.

Критерии за първична миелофиброза

Първичната миелофиброза (PMF) е описана през 1879 г. от д-р Gustav Heuck при двама млади пациенти с масивна спленомегалия и увеличен брой абнормални левкоцити. Първоначално PMF е била наречена агногенна миелоидна метаплазия, хронична идиопатична миелофиброза и миелофиброза с миелоидна метаплазия. През 2006 г. е постигнат консенсус и вече е прието заболяването да се нарича първична миелофиброза (34).

Случаите с PMF са около 0.3-1.5/100 000 индивиди на година (24,33,47). Около шестдесет процента от пациентите са JAK2^{V617F} позитивни (8) и 5% до 10% от пациентите имат мутации в MPL (11,37,42,51). PMF се характеризира със свръхпродукция на ретикуларни и/или колагенни влакна в костния мозък (Таблица 3 и 4). През ранните стадии на заболяването може да има хиперпролиферативна фаза, която се характеризира с повишени стойности на белите кръвни клетки и тромбоцитите и често нормално хемоглобиново ниво. Когато заболяването прогресира, костномозъчната фиброза може да измести хемопоезата и това води до цитопения на

Таблица 3. Диагностични критерии за префибротична/ранна първична миелофиброза съгласно класификацията на СЗО от 2016 г. (7)

Големи критерии:	Малки критерии:
<p>Мегакариоцитна пролиферация и атипия без ретикуларна фиброза > степен 1,* увеличен за възрастта костномозъчен цеуларитет, гранулоцитна пролиферация и често редуцирана еритропоеза.</p> <p>Да липсват критерии според СЗО за BCR-ABL1+CML, PV, ET, миелодиспластични синдроми или други миелоидни неоплазми.</p> <p>Присъствие на JAK2, CALR и MPL мутации или при липса на тези мутации, присъствие на друг клонален маркер** или липса на незначителна реактивна костномозъчна ретикуларна фиброза***</p>	<p>Присъствие поне на един от следните показатели, потвърдени в две последователни изследвания:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Анемия, която не се дължи на съпътстващи състояния. 2. Левкоцитоза $\geq 11 \times 10^9/L$. 3. Палпаторна спленомегалия 4. Увеличена лактат дехидрогеназа над нормалните институционални референтни граници

Диагнозата на префибротичната PMF изисква всичките три главни и поне един от малките критерии
* Виж таблицата за фиброза (Таблица 5)

** при липса на някой от 3 главни клонални мутации, изследване за най-честите придружаващи мутации (т.е. ASXL1, EZH2, TET2, IDH1/IDH2, SRSF2, SF3B1) са от полза при определяне на клоналния произход на заболяването

*** нискостепенна (степен 1) ретикуларна фиброза, вторична инфекция, автоимунни нарушения или други хронични възпалителни състояния, косматоклетъчна левкемия или други лимфоидни неоплазми, метастатични неоплазми или токсични (хронични) миелопатии

Таблица 4. Диагностични критерии на фибротичната фаза на първична миелофиброза съгласно класификацията на СЗО от 2016 г. (7)

Големи критерии	Малки критерии
<ol style="list-style-type: none"> 1. Присъствие на мегакариоцитна пролиферация и атипия, съчетана с ретикуларна и/или колагенна фиброза степен 2 или 3* . 2. Да липсват критерии според СЗО за ET, PV, BCR-ABL1+CML, миелодиспластични синдроми или други миелоидни неоплазми. 3. Присъствие на JAK2, CALR и MPL мутации или при липса на тези мутации, присъствие на друг клонален маркер** или липса на реактивна костномозъчна ретикуларна фиброза***. 	<p>Присъствие поне на един от следните показатели, потвърдени в две последователни изследвания:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Анемия, която не се дължи на съпътстващи състояния 2. Левкоцитоза $\geq 11 \times 10^9/L$. 3. Палпаторна спленомегалия 4. Увеличена лактат дехидрогеназа над нормалните институционални референтни граници 5. Левкоеритробластоза.

Диагнозата на фибротичната фаза на PMF изисква всичките три главни и поне един от малките критерии

* Виж таблицата за фиброза (Таблица 5).

** при липса на някой от 3 главни клонални мутации, изследване за най-честите придружаващи мутации (т.е. ASXL1, EZH2, TET2, IDH1/IDH2, SRSF2, SF3B1) са от полза при определяне на клоналния произход на заболяването.

*** костномозъчна фиброза, вторична инфекция, автоимунни нарушения или други хронични възпалителни състояния, косматоклетъчна левкемия или други лимфоидни неоплазми, метастатични неоплазми или токсични (хронични) миелопатии.

една или повече клетъчни линии. При този стадий пациентите с PMF често имат екстремедуларна хемопоеза, водеща до спленомегалия и поява на циркулиращи незрели клетки в периферната кръв – левкоеритробластна кръвна картина (47). Пациентите често изпитват ранно чувство

за ситост и абдоминален дискомфорт, дължащи се на спленомегалията (19, 51). Секрецията на цитокини и възпалителната реакция води до постоянни симптоми, които включват треска, нощно изпотяване, кахексия и сърбеж (20,50).

Таблица 5. Полуколичествена оценка на костномозъчната фиброза (MF) съгласно класификацията на СЗО от 2016 г. (7)

MF-0	Разпръснати линейарни ретикулни влакна, без да се пресичат, съответстващи на нормален костен мозък
MF-1	Рехава мрежа от ретикулни влакна, често пресичащи се, главно в периваскуларните зони
MF-2	Дифузно и плътно увеличаване на ретикулните влакна с обширни пресичания, понякога фокални снопове от дебели фибри, главно състоящи се колаген и/или фокална остеосклероза**
MF-3	Дифузно и плътно увеличаване на ретикулните влакна с обширни пресичания груби снопове от дебели фибри от колаген, обикновено свързани с остеосклероза**

Плътноста на влакната трябва да бъде оценявана само в полетата с хемопоеза

** При степен MF-2 и MF-3 се препоръчва трихромно оцветяване

Ранната или префибротична фаза на рРМФ (рРМФ) е въведена като нова единица през 2001 г. от СЗО (22,55). Тази единица може да наподобява ЕТ с изявена тромбоцитоза, но пациентите с рРМФ често имат по-високо ниво на лактат дехидрогеназа и имат значителни различия в хистологичната картина на костния мозък в сравнение с пациентите с ЕТ. Хистологично ЕТ се характеризира с големи и многобройни мегакариоцити, докато мегакариоцитите при рРМФ показват атипичия, плътни хроматинни структури и образуват плътни групи, които не се наблюдават при ЕТ (47,56). Пациентите с рРМФ често имат по-изразена гранулоцитна пролиферация и намалена еритропоеза в сравнение с ЕТ (47,56). Повечето патолози са съгласни с разделянето на РМФ на префибротична и фибротична фаза, но все още съществува спор относно диференциално диагностичните морфологични критерии между рРМФ и фибротичната фаза (60).

След въвеждане на рРМФ голям брой пациенти, преди диагностицирани като ЕТ, например с тромбоцитоза и слабо изразена фиброза, са рекласифицирани като рРМФ (9,16,53). Пациентите с рРМФ имат висок риск от прогресия на заболяването, трансформация в АМЛ и лоша обща преживяемост в сравнение с пациенти с ЕТ (9). Пациентите с рРМФ също имат по-висок риск от кървене, но рискът от тромботични усложнения изглежда подобен на другите две неоплазми (9,26).

За разлика от класификацията от 2008 г. диагностичните критерии за първичната миелофиброза в новата класификация от 2016 г. са разделени на критерии, характерни за префибротична и на критерии за явна първична миелофиброза (Таблица 3 и Таблица 4). Съгласно класификацията от 2008 г. диагнозата РМФ се базира на всичките три главни и два второстепенни критерия, докато в новата класификация се изисква присъствие поне на един от малките критерии.

Морфологична характеристика на костния мозък при първична миелофиброза

В префибротичния стадий костният мозък е хиперцелуларен с големи, диспластични, групирани (рехава или плътно) мегакариоцити и с ексцесивно образуване на гранулоцити. Олевяването е съпроводено с редуциране на еритроидната редица. Ретикуларната мрежа е увеличена, главно около групирани мегакариоцити. Мегакариоцитите имат нарушено съотношение ядро / цитоплазма и хиперхромни, луковицоподобни или неправилно нагънати ядра. Често се откриват хиперхромни облаковидни ядра, които не са характерни за РМФ и ЕТ. Нерядко се наблюдават само ядра на мегакариоцити без цитоплазма.

Във фибротичната фаза костният мозък е хипоцелуларен и дифузно фибротичен с атипични мегакариоцити, подредени в една посока. При остеосклерозата костните трабекули са неправилни и широки, синусоидите са подчертано дилатирани.

Прогресия на Ph(-) миелопротрофиеративни заболявания

При пациенти с РМФ за период от 15 г. прогресията в пост-РМФ миелофиброза (PPV-MF) е от 6 до 34% (5,18,39). При ЕТ рискът от прогресия във вторична MF е по-нисък в сравнение с РМФ за същия период и е между 4 и 9% (9,39).

Пациентите с МРМФ и трансформация в АМЛ/МДС имат лоша прогноза (3,14,31,48). При РМФ трансформацията в АМЛ или МДС е от 5 до 10%, но има съобщения, че честотата варира от 2% до 20% за 10-годишен период от време (12,25,30,35,38). След диагностициране на заболяването рискът от трансформация в АМЛ/МДС с времето се увеличава (25). Левкемична трансформация при ЕТ настъпва от 0.65% до 3.3% от пациентите, което в сравнение с другите форми на МРМФ е по-ниска (29,40,41). РМФ притежава по-висок риск от подобна трансформация от около 20% (14,15,51).

Диагностично и прогностично значение на костномозъчната фиброза при Ph(-) миелопрролиферативни заболявания

Костномозъчната фиброза е един от основните патоморфологични белези на Ph(-) MPN, но патогенетичните ѝ механизми все още не са напълно изяснени (4). Известно е, че JAK2 инхибиторите не водят до обратно развитие на фиброзата и по-детайлното разбиране на биологията на фиброзния процес е необходимо с цел бъдещо терапевтично повлияване. Трансформиращият растежен фактор β (TGF- β) е един от най-важните цитокини, участващи в патогенезата на костномозъчна фиброза (4). Разработени са различни миши модели и експериментално е доказана ролята на TGF- β в патогенезата на фиброзата. Установено е, че TGF- β се секретира от мегакариоцитите и повишената му секреция корелира с увеличаване броя на ретикуларните влакна. При пациенти с PV и ET е доказано, че присъствието на ретикуларни влакна по време на диагностициране на заболяването повишава риска от прогресия и трансформацията им съответно в пост-PV и пост-ET миелофиброза.

За първи път през 1892 М. Siegfried използва термина „ретикулин“, за да опише прахообразния остатък, който остава след извличане на колагенните „ретикулни“ фибри (43). По-късно ретикулинът се определя хистохимично като аргирофилни влакна, които се доказват чрез сребърна импрегнация (Гомори). Той се състои от колаген тип I, който е разположен централно и е заобиколен от фибрили от колаген тип III сред матрикс от глюкопротеини и глюкозаминогликани (27,28,54). Връзката между количеството на ретикуларните влакна и прогнозата е все още обект на дискусия. Нови данни показват, че количеството на ретикуларните влакна в костния мозък не корелира с тежестта на протичане на Ph(-) MPN, докато наличието на колаген тип I е асоциирано с по-тежко протичане и по-лоша прогноза (1).

В последната ревизията от 2016 г. има минимални промени, отнасящи се до оценката на колагена и необходимостта от използване на трихромно оцветяване при оценка на фиброзата от степен 2 и 3.

Патогенезата на MPNs все още не е напълно изяснена. Независимо от установените мутации в JAK2, MPL и CALR обект на задълбочени проучвания са механизмите, чрез които едни и същи генетични нарушения водят до три различни фенотипни изяви на заболяването. По-детайлното изследване на морфологията на мегакариоцитите при Ph(-) MPNs би допринесло за по-отчет-

ливо отдиференциране на неоплазмите една от друга, особено в началните фази на развитие.

ЛИТЕРАТУРА

1. Герчева-Кючукова, Л. Хронични миелопрролиферативни неоплазми. Първо издание. Плевен, ET "Пейчински – Г. Илиев", 2016.
2. Abellsson J, Andreasson B, Samuelsson J, Johansson P. Patients with polycythemia vera have the worst impairment of quality of life among patients with newly diagnosed myeloproliferative neoplasms. *Leukemia & lymphoma* 2013;54(10) · February. doi: 10.3109/10428194.2013.766732 · Source: PubMed
3. Abdulkarim K, Girodon F, Johansson P, Maynadié M, Kutti J, Carli PM et al. AML transformation in 56 patients with Ph-MPD in two well defined population. *Eur J Haematol* 2009;82:106-111.
4. Agarwai A, Morrone K, Bartenstein M, Zhao ZJ, Verma A, Goel S. Bone marrow fibrosis in primary myelofibrosis: pathogenic mechanisms and the role of TGF- β . *Stem Cell Investig.* 2016;3:5. Published online 2016 Feb 26. doi: 10.3978/j.issn.2306-9759.2016.02.03 eCollection 2016.
5. Alvarez-Larrán A, Bellosillo B, Martínez-Avilés L, Saumell S, Salar A, Abella E et al. Postpolycythaemic myelofibrosis: frequency and risk factors for this complication in 116 patients. *Br J Haematol* 2009;146:504-509
6. Ania BJ, Suman VJ, Sobell JL, Codd MB, Silverstein MN, Melton LJ. Trends in the incidence of polycythemia vera among Olmsted Country, Minnesota residents, 1935-1989. *Am J Hematol.* 1994;47:89-93.
7. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM et al. The 2016 revision to the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood.* 2016 May 19;127(20):2391-405. doi: 10.1182/blood-2016-03-643544. Epub 2016 Apr 11.
8. Barbui T, Carobbio A, Cervantes F, Vannucchi AM, Guglielmelli P, Antonioli E et al. Thrombosis in primary myelofibrosis: incidence and risk factors. *Blood.* 2010;115:778-782.

9. Barbui T, Thiele J, Passamonti F, Rumi E, Boveri E, Ruggeri M et al. Survival and disease progression in essential thrombocythemia are significantly influenced by accurate morphologic diagnosis: an international study. *J Clin Oncol* 2011;29:3179-3184.
10. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ East C, Fourouclas N, Swanton S et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 2005;365:1054-1061.
11. Beer PA, Campbell PJ, Scott LM, Bench AJ, Erber WN, Bareford D et al. MPL mutations in myeloproliferative disorders: analysis of the PT-1 cohort. *Blood* 2008;112:141-149.
12. Berk PD, Goldberg JD, Silverstein MN, Weinfeld A, Donovan PB, Ellis JT et al. Increased incidence of acute leukemia in polycythemia vera associated with chlorambucil therapy. *N Engl J Med* 1981;304:441-447.
13. Berk PD, Goldberg JD, Donovan PB, Fruchtman SM, Berlin NI, Wasserman LR et al. Therapeutic recommendation in polycythemia vera based on Polycythemia Vera Study Group protocols. *Semin Hematol* 1986;23:132-143.
14. Cervantes F, Tassies D, Salgado C, Rovira M, Pereira A, Rozman C. Acute transformation in nonleukemic chronic myeloproliferative disorders: actuarial probability and main characteristics in a series of 218 patients. *Acta Haematol* 1991;85:124-127.
15. Cervantes F, Dupriez B, Pereira A, Passamonti F, Reilly JT, Morra E et al. New prognostic scoring system for primary myelofibrosis based on a study of the International Working Group for Myelofibrosis research and Treatment. *Blood* 2009;113:2895-2901.
16. Ejerblad E, Kvasnicka HM, Thiele J, Andreasson T, Bjorkholm M, Lofvenberg E et al. Diagnosis according to World Health Organization determines the long-term prognosis in patients with myeloproliferative neoplasms treated with anagrelide: results of a prospective long-term follow-up. *Hematology* 2013;18:8-13.
17. Epstein E, Goedel A. Hamorrhagische thrombocythämie bei vascularer schrumpfmilz. *Virchows Arch f path Anat Physiol Klin Med* 1934;292:233-248.
18. Ellis JT, Peterson P, Geller SA Rappaport H. Studies of the bone marrow in polycythemia vera and the evolution of myelofibrosis and second hematologic malignancies. *Semin Hematol* 1986;23:144-155.
19. Emanuel RM, Dueck AC, Geyer HL, Kiladjan JJ, Slot S, Zweegman S et al. Myeloproliferative neoplasms (MPN) symptom assessment from total symptom score: prospective international assessment of an abbreviated symptom burden scoring system among patients with MPNs. *J Clin Oncol* 2012;30:4098-4103.
20. Gercheva L, Zhelyazkova A, Micheva I, Zgurova N, Tzaneva M, Balatzenko G. Correlation between JAK2V617F mutational burden and the degree of angiogenesis in the bone marrow of bcr-abl negative myeloproliferative neoplasms. *Journal of IMAB—Annual Proceeding Scientific Papers*. 2014;20:526-530.
21. Hultcrantz M. Clinical and Epidemiological studies in Myeloproliferative Neoplasms. Karolinska Institutet PhD, 2013, pp 59.
22. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW. World Health Organization Classification of Tumours of Hematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC Press: Lyon, France, 2001, 1-351.
23. James C, Ugo V, Le Couédic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* 2005;434:1144-1148.
24. Johansson P, Kutti J, Andreasson B, Safai-Kutti S, Vilén L, Wedel H et al.: Trends in the incidence of chronic Philadelphia chromosome negative (Ph) myeloproliferative disorders in the city of Goteborg, Sweden, during 1983-99. *J Intern Med* 2004;256:161-165.
25. Finazzi G., Barbui T. Evidence and expertise in the management of polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Leukemia*. 2008;22:1494-1502.
26. Finazzi G, Carobbio A, Thiele J, Passamonti F, Rumi E, Ruggeri M et al. Incidence and risk factors for bleeding in 1104 patients with

- essential thrombocythemia or prefibrotic myelofibrosis diagnosed according to the 2008 WHO criteria. *Leukemia* 2012;26:716-719
27. Fleischmajer R, Jacobs L, Perlish JS, Katchen B, Schwartz E, Timp R. Immunochemical analysis of human kidney reticulin. *Am J Pathol.* 1992;140: 1225–1235.
 28. Frisch B, Lewis SM, Burkhardt R, Bartl R. *Biopsy Pathology of Bone and Bone Marrow.* 1985. New York: Raven Press.
 29. Gangat N, Wolanskyj AP, McClure RF, Li CY, Schwager S, Wu W et al. Risk stratification for survival and leukemic transformation in essential thrombocythemia: a single institutional study of 605 patients. *Leukemia* 2007;21:270-276.
 30. Kiladjian JJ, Chevret S, Dosquet C, Chomienne C, Rain JD. Treatment of polycythemia vera with hydroxyurea and pipobroman: final results of a randomized trial initiated in 1980. *J Clin Oncol* 2011;29:3907-3913.
 31. Kennedy JA, Atenafu EG, Messner HA, Craddock KJ, Brandwein JM, Lipton JH et al. Treatment outcomes following leukemic transformation in Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2013;121:2725-2733.
 32. Meredith A, Lakey MA, Pardanani A, James D, Hoyer JD, Nguyen PL et al. Bone marrow morphologic features in polycythemia vera with JAK2 Exon 12 mutations. *Am J Clin Pathol.* 2010;133:942-948.
 33. Mesa R, Silverstein M, Jacobsen S, Wollan P, Tefferi A. Population-based incidence and survival figures in essential thrombocythemia and agnogenic myeloid metaplasia: an Olmsted County Study, 1976-1995. *Am J Hematol.* 1999;61:10-15.
 34. Mesa RA, Verstovsek S, Cervantes F, Barosi G, Reilly JT, Dupriez B et al. Primary myelofibrosis (PMF), post polycythemia vera myelofibrosis (post-PV MF), post essential thrombocythemia myelofibrosis (post-ET MF), blast phase PMF(PMF-BP): Consensus on terminology by the international working group for myelofibrosis research and treatment (IWG-MRT). *Leuk Res* 2007;31:737-740.
 35. Nejean Y, Rain JD. Treatment of polycythemia vera: use of 32P alone or combination with maintenance therapy using hydroxyurea in 461 patients greater than 65 years of age. The French Polycythemia Study Group. *Blood* 1997;89:2319-2327.
 36. Osler W. Chronic cyanosis with polycythaemia and enlarged spleen: a new entity. *Am J Med Sci.* 1903;126:187-192.
 37. Pardanani AD, Levine RL, Lasho T, Pikman Y, Mesa RA, Wadleigh M et al. MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. *Blood* 2006;108:3472-3476.
 38. Passamonti F, Brusamolino E, Lazzarino M, Baraté C, Klersy C, Orlandi E et al. Efficacy of pirobroman in the treatment of polycythemia vera: long-term results in 163 patients. *Naematologica* 2000;85:1011-1118.
 39. Passamonti F, Rumi E, Pungolino E, Malabarba L, Bertazzoni P, Valentini M et al. Life expectancy and prognostic factors for survival in patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Am J Med.* 2004;117:755-761.
 40. Passamonti F, Rumi E, Arcani L, Boveri E, Elena C, Pietra D et al. Prognostic factors for thrombosis, myelofibrosis, and leukemia in essential thrombocythemia: a study of 605 patients. *Haematologica.* 2008;93:1645-1651.
 41. Passamonti F, Thiele J, Girodon F, Rumi E, Carobbio A, Gisslinger H et al. A prognostic model to predict survival in 867 World Health Organization-defined essential thrombocythemia at diagnosis: a study by the International Working Group on Myelofibrosis Research and Treatment. *Blood* 2012;120:1197-1201.
 42. Pikman Y, Lee BH, Mercher T, McDowell E, Ebert BL, Gozo M et al. MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS Med* 2006;3:e270. Published online 2006 Jul 18. doi: 10.1371/journal.pmed.0030270
 43. Puchtler H, Waldrop FS. „Silver impregnation methods for reticulum fibers and reticulin: A re-investigation of their origins and specificity“. *Histochemistry.* 1978; 57:177–187.

44. Scott LM, Tong W, Levine RL, Scott MA, Beer PA, Stratton MR et al. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N Engl J Med.* 2007;356:459-468.
45. Scott LM. The JAK2 exon 12 mutations: a comprehensive review. *Am J Hematol* 2011;86:668-676.
46. Silver PT, Chow W, Orazi A, Stephen P, Arles SP, Stanley J et al. Evaluation of WHO criteria for diagnosis of polycythemia vera: a prospective analysis. *Blood.* 2013;122:1881-1886.
47. Swerdlow SH, Jaffe ES, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H et al. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon, International Agency for Research on Cancer, 2008.
48. Tam CS, Nussenzweig RM, Popat U, Bueso-Ramos CE, Thomas DA, Cortes JA et al. The natural history and treatment outcome of blast phase BCR-ABL- myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2008;112:1628-1637.
49. Tefferi A., Vardiman J. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Leukemia.* 2008;22:14-22.
50. Tefferi A, Vaidya R, Caramazza D, Finke C, Lasho T, Pardanani A et al. Circulating interleukin (IL)-8, IL-2R, IL-12 and IL-15 levels are independently prognostic in primary myelofibrosis: a comprehensive cytokine profiling study. *J Clin Oncol* 2011;29:1356-1363.
51. Tefferi A, Lasho TL, Jimma T, Finke CM, Gangat N, Vaidya R et al. One thousand patients with primary myelofibrosis the mayo clinic experience. *Mayo Clin Proc* 2012;87:25-33.
52. Tefferi H, Rumi E, Finazzi G, Gisslinger H, Vannucchi AM, Rodeghiero F et al. Survival and Prognosis Among 1 263 Patients with Polycythemia Vera: An International study. *Leukemia.* 2013 Sep;27(9):1874-1881.
53. Thiele J, Kvasnicka HM. Chronic myeloproliferative disorders with thrombocythemia: a comparative study of two classification system (PVSG, WHO) on 839 patients. *Ann Hematol* 2003;82:148-152.
54. Ushiki T. Collagen fibers, reticular fibers and elastic fibers. A comprehensive understanding from a morphological viewpoint. *Arch Histol Cytol.* 2002;109-126.
55. Vardiman JW, Harris NL, Brunning R. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood.* 2002;100:2292-2302.
56. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 2009 114:937-951
57. Vaquez H. Su rune Forme Speciale De Cyanose S'Accompagnant D' hyperglobulie Excessive Et Peristante. *C R Soc Biol* 1892;44:384-388.
58. Vannucchi A., Guglielmelli P., Tefferi A. Advances in understanding and management of myeloproliferative neoplasms. *CA Cancer J Clin* 2009;59:171-191.
59. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 2009;114:937-951.
60. Vilkins BS, Erber WN, Bareford D et al. Bone marrow pathology in essential thrombocythemia: interobserver reliability and utility for identifying disease subtypes. *Blood* 2008;111:60-70