Laboratórna diagnostika akútnej myeloblastovej leukémie

Laboratory Diagnostics of Acute Myeloblastic Leukemia

Ivan Ondrášik[1], Janka Filická[1,2], Katarína Ondrášiková[2], Miriam Tupá[1,2]

[1] Klinika hematológie a transfuziológie, Ústredná vojenská nemocnica SNP Ružomberok – FN
[2] Fakulta zdravotníctva, Katolícka univerzita v Ružomberku

https://doi.org/10.54937/zs.2022.14.2.52-56

Abstrakt

Cieľom článku je priblíženie možností súčasnej laboratórmej diagnostiky akútnej myeloblastovej leukémie (AML). Diagnostika AML zahŕňa morfologické, histologické, imunofernotipizačné a molekulárno-biologické parametre. Sústredíme sa predovšetkým na morfologickú diagnostiku AML.

Kľúčové slová: Akútna myeloblastová leukémia. Morfológia. Prietoková cytomeria. Molekulárna biológia.

Abstract

The aim of the article is to approximate the possibilities of current laboratory diagnostics of acute myeloblastic leukemia (AML). AML diagnosis includes morphological, histological, immunofernotyping and molecular-biological parameters. We focus primarily on the morphological diagnostics of AML.

Key words: Acute myeloblastic leukemia. Morphology. Flow cytometry. Molecular biology.

Akútne myeloblastové leukémie (AML) sú heterogénnou skupinou malígnych ochorení krvotvorby. Vznikajú malígnou transformáciou hematopoetickej kmeňovej bunky, ktorá sa diferencuje na myeloidné, myelomonocytárne, vzácnejšie na erytroidné alebo megakaryocytárne blasty. Na úrovni blastov sa diferenciácia malígne transformovaných buniek zastaví a ich následná nekontrolovaná proliferácia a znížená schopnosť apoptózy potom vedú k akumulácii klonu týchto nádorových buniek v organizme, najviac v kostnej dreni, čím dochádza k útlaku fyziologickej krvotvorby a z toho plynúcim prejavom ochorenia [1].

Výskyt AML

AML tvorí asi 80 % všetkých akútnych leukémií u dospelých. Vyskytuje sa v každom veku, najčastejšie sú však postihuje jedincov, ktorí sú starší ako 60 rokov, ktorí tvoria viac ako polovicu chorých. Incidencia v západných krajinách sveta sa udáva 3,5 3,7/100 000 obyvateľov, vo veku nad 65 rokov narastá na 15/100 000 obyvateľov. AML tvorí u detí 15 % všetkých leukémií. Incidencia je 1 prípad na 100 000 detí a rok. Medián veku je 10 rokov [2].

Patofyziológia AML

Pre bunky akútnej leukémie je typická zástava diferenciácie na úrovni blastov. Proliferácia blastov za fyziologických podmienok podlieha autoregulačným mechanizmom. V prípade akútnej leukémie sa ich proliferácia vymyká fyziologickej autoregulácii. Dôsledkom je rýchlo sa zvyšujúci počet leukemických blastov v kostnej dreni, ktorý utlačuje fyziologickú krvotvorbu, a nastáva rýchly pokles počtu všetkých normálnych krviniek v periférnej krvi [3].

Etiológia AML

Etiológia AML nie celkom objasnená. Je známe, že radiačné žiarenie a ďalej karcinogénne chemikálie, teda aj cytostatiká, môžu indukovať vznik AML. Za rizikové chemikálie je považovaný benzén, herbicídy, pesticídy, deriváty benzénu – tricyklické uhľovodíky. Alkylačné cytostatiká zvyšujú incidenciu AML s latenciou 4 – 8 rokov od podania. Blokátory topoizomerázy II (etopozid, tenipozid) majú potenciál indukovať AML v kratšom intervale, 1 – 3 roky od ich podania.

Zvýšené riziko vzniku AML je spojené s niektorými hereditárnymi chorobami spojenými s vyššou fragilitou chromatínu (Bloomov syndróm, Fanconiho anémia, Kostmanov syndróm, Wiskottov – Aldrichtov syndróm, ataxia teleangiectasia, Downov syndróm (trizómia 21), Klinefelterov syndróm (XXY) sú spojené s vyššou incidenciou AML. [4].

Klinický obraz AML

Príznaky AML možno charakterizovať malátnosťou, únavou, pocitom vyčerpania, bledosťou slizníc a dlaní, nechtových lôžok i celej pokožky (anémia). U mnohých starších chorých sa anemický syndróm manifestuje typickými ischemickými bolesťami na hrudníku. Častejšie infekcie majú agresívny priebeh, typické sú zápaly v horných dýchacích cestách, stomatitídy, závažné angíny nedostatočne reagujúce na antibiotiká (defektná nešpecifická imunita – granulocytopénia). Niekedy sú zvýšené teploty až horúčky bez preukázateľnej infekcie. Prejavy hemoragickej diatézy (trombocytopénia), krvácanie z nosa, ďasien, metrorágia, petechie, ekchymózy, hyperplázia ďasien, kožné infiltráty a príznaky z poškodenia CNS u leukémií vychádzajú z monocytárnej rady (viac ako 10% všetkých akútnych myeloblastových leukémií). Prejavy leukostázy má asi 10% pacientov – počet leukocytov viac ako $100x10^9/l$ – títo pacienti sú viac ohrození postihnutím CNS a následným tumor lysis syndrómom po začatí liečby. Leukostáza sa prejavuje ako dýchavičnosť, bolesť na hrudníku, bolesť hlavy, alterácia mentálneho stavu, parézy kraniálnych nervov, priapizmus. [4].

Klasifikácia AML

FAB klasifikácia AML

- M0 - s minimálnou diferenciáciou
- M1 – bez maturácie
- M2 – s maturáciou
- M3 – promyelocytová (klasická)
  - mikrogranulárny variant (FAB M3v)
- M4 – myelomonocytová
  - M4Eo – s abnormálnymi eozinofilmi
- M5 – monocytová
  - M5a – nediferencovaná
  - M5b – diferencovaná
- M6 - erytroleukémia (veľký podiel erytroblastov)
- M7 - megakaryoblastová (prevaha nediferencovaných blastov a megakaryoblastov) [5].

WHO klasifikácia 2016 AML rozlišuje 11 jednotiek AML s rekurujúcimi genetickými abnormalitami, vrátane 8 vyvážených translokácií a inverzií, a ich varianty:

- AML s t(8;21)(q22;q22.1); RUNX1-RUNX1T1, diagnóza nevyžaduje ≥20% blastov v kostnej dreni.
- AML s inv(16)(p13.1;q22) alebo t(16;16)(p13.1;q22); CBFB-MYH11, diagnóza nevyžaduje ≥20% blastov v kostnej dreni.
- Akútna promyelocytová leukémia (APL) s PML-RARA; pretože PML-RARA fúzia môže pochádzať z komplexných cytogenetických rearanžmentov iných ako t(15;17) (q24.1;q21.2); diagnóza opäť nevyžaduje ≥20% blastov v kostnej dreni. RARA translokácie s inými partnerskými génmi sa kategorizujú primerane; napr. AML s t(11;17)(q23;q12); ZBTB16-RARA; AML s t(11;17)q13;q12); NUMA1-RARA; AML s t(15;17) (q35;q12); NPM1-RARA; AML so STAT5B-RARA (s normálnym chromozómom 17).
- AML s t(9;11)(p21.3;q23.3); MLLT3-KMT2A
- AML s t(6;9)(p23;q34.1); DEK-NUP214
- AMLs inv(3)(q21.3;q26.2) alebo t(3;3)(q21.3;q26.2); GATA2, MECOM
- AML MKL (megakaryoblastová) s t(1;22)(p13.3;q13.3); RBM15-MKL1
- Provizórna jednotka: AML s BCR-ABL1 [diagnózu podporuje delécia génov antigénových receptorov ťažkých reťazcov Ig (IGH) a T-bunkových receptorov (TCR), IKZF1, a/ alebo CDKN2A)]
- AML s mutáciou NPM1 [nucleophosmin (nucleolar phosphoprotein B23, numatrin)]
- AML s bialelickými mutáciami CEBPA
- Provizórna jednotka: AML s mutáciou RUNX1

Osobitnú jednotku tvorí AML s myelodysplastickými zmenami (AML MRC – Myelodysplasia Related Changes), ktorú charakterizuje ≥ 20 % blastov v krvi a/ alebo kostnej dreni, negatívna anamnéza cytotoxickej terapie a akýkoľvek ďalší bod (a – d):

a) anamnéza MDS aleboMDS/MPN (MyeloProliferatívna Neoplázia);
b) prítomnosť mnohoradovej dysplázie (≥50% dysplastických buniek najmenej v 2 radoch);
c) bez NPM1 alebo CEBPA;
d) cytogenetické abnormality spojené s MDS, okrem del(9q).

Cytogenetické abnormality dostatočné pre dg AML s MDS zmenami:

- Komplexný karyotyp (3 alebo viac abnormalít)
- Nevyvážené abnormality: −7/del(7q); del(5q)/t(5q); i(17q)/t(17p); −13/del(13q); del(11q); del(12p)/t(12p); idic(X)(q13)
- Vyvážené abnormality: t(11;16)(q23.3;p13.3); t(3;21) (q26.2;q22.1); t(1;3)(p36.3;q21.2); t(2;11)(p21;q23.3); t(5;12)(q32;p13.2); t(5;7)(q32;q11.2); t(5;17) (q32;p13.2); t(5;10)(q32;q21.2); t(3;5)(q25.3;q35.1);

Zvyšujúci sa počet dlhodobo prežívajúcich chorých s malignitami vedie k narastajúcemu významu podjednotky „AML v súvislosti s liečbou (t-AML)“, kde je kľúčová anamnéza cytotoxickej terapie a prípadne anamnéza rodinnej predispozície pre malignity.

Podskupina AML nezaraditeľných do vyššie uvedených kategórií sa označuje ako „AML ináč nešpecifikovaná“ (AML NOS - Not Otherwise Specified), ktorá sa podrozdeľuje na:

- AML s minimálnou diferenciáciou
- AML bez maturácie
- AML s maturáciou
- Akútna myelomonocytová leukémia
- Akútna monoblastová/ monocytová leukémia
- Pravá erytroleukémia (>80 % erytroblastov s ≥30 % proerytroblastov)
- Akútna megakaryoblastová leukémia
- Akútna bazofilná leukémia
- Akútna panmyelóza s myelofibrózou
- Myelosarkóm, myeloidné proliferácie pri Downovom syndróme (Transientná abnormálna myelopoéza – TAM a Myeloidná leukémia spojená s Downovým syndrómom), Neoplázia blastických plazmocytoidných dendritických buniek rozširujú paletu príbuzných malignít.

Výzvu predstavujú „Akútne leukémie neurčitého radu“:

- Akútna nediferencovaná leukémia
- Akútna leukémia zmiešaného fenotypu (MPAL)s t(9;22)(q34.1;q11.2); BCR-ABL1
- MPAL s t(v;11q23); KMT2A rearanžment
- MPAL, B/myeloidná, NOS
- MPAL, T/myeloidná, NOS [6].

AML – krvný obraz a náter periférnej krvi

Typickým nálezom u väčšiny chorých je v krvnom obraze nález leukocytózy, anémie a trombocytopénie, prípadne ich kombinácie. Vyšetrením diferenciálneho rozpočtu bielych krviniek v periférnej krvi nachádzame obvykle zmnoženie leukemických buniek (blastov), v prípade AML myeloblastov, a prítomnosť redukovaného počtu zrelých neutrofilných elementov (segmentov, prípadne tyčiek) s chýbaním stredných vývojových štádií granulocytov (metamyelocyty, myelocyty)- ide o tzv. hiatus leucaemicus.

Morfologicky pri diagnóze AML nachádzame v nátere periférnej krvi myeloblasty, ktoré sú väčšie ako zrelé lymfocyty. Veľkosť myeloblastov však môže byť porovnateľná s veľkosťou monocytov, ba niekedy myeloblasty svojou veľkosťou presahujú i veľkosť monocytov. Myeloblast má bazofilnú alebo šedomodrú cytoplazmu, úzky lem, guľaté alebo oválne jadro

s jemným jadrovým chromatínom. Obvykle v jadre myeloblastu nachádzame ešte malé jadierka (nukleoly). Myeloblast obsahuje azurofilné granulá alebo môže byť bez granúl (negranulované myeloblasty). V myeloidnej línii nachádzame i Auerove tyče [7]. Pri hodnotení náteru pacienta s MDS, je potrebné myslieť i na transformáciu do AML[8].

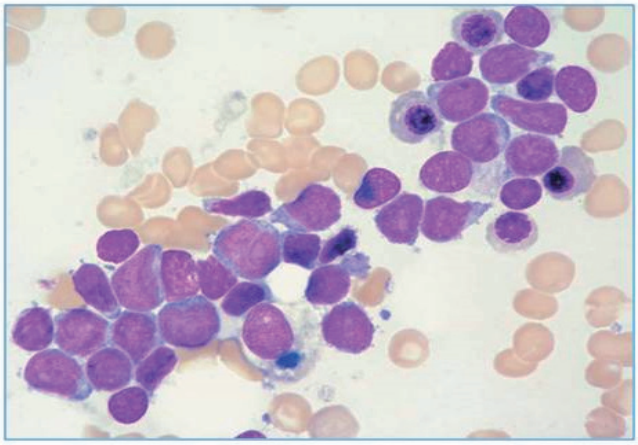
Morfologické a cytochemické vyšetrenie kostnej drene pri AML

Kostná dreň býva pri diagnóze AML hypercelulárna, s prítomnosťou nad 20% myeloblastov. Myeloblasty bývajú vo veľkosti od o niečo väčších ako malý lymfocyt až po veľkosť zodpovedajúcu dvojnásobku monocytu. Jadro býva guľaté, oválne či obličkovité, so zárezom či lobulizované, chromatín je jemný a väčšinou je rozpoznateľných niekoľko alebo jeden veľký nukleolus. Cytoplazma myeloblastu je šedomodrá až silno bazofilná. V cytoplazme môže, ale i nemusia byť prítomné azurofilné granulá či Auerove tyče. Monoblasty v prípade akútnej monocytárnej leukémie a megakaryoblasty v prípade megakaryoblastovej leukémie sú ekvivalentom pre diagnózu AML. Proerytroblasty sa do kategórie blastov nezapočítavajú s výnimkou čistej erytroblastovej leukémie [7].

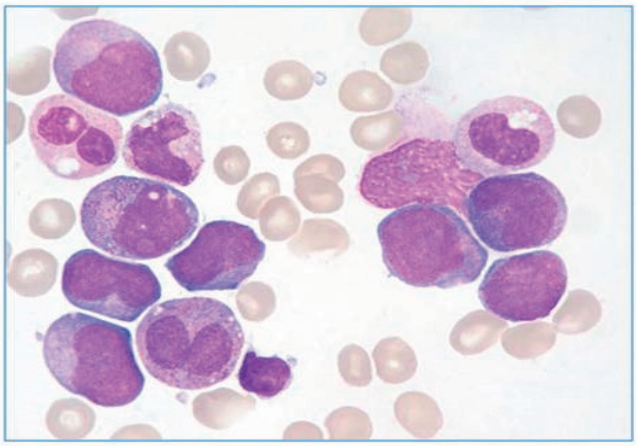
Napriek faktu, že cytochemické vyšetrenia ustupujú pri diagnostike hematologických malignít do úzadia, ešte stále majú svoj význam. Pri vyšetrovaní AML má stále význam cytochemické vyšetrenie myeloperoxidázy. Dôkaz myeloperoxidázy (peroxidázová reakcia MPOX, POX): peroxidázy obsiahnuté v granulocytoch katalyzujú reakciu, pri ktorej sa z peroxidu vodíka uvoľní kyslík. Kyslík oxiduje dodaný substrát (väčšinou diaminobenzidín) na farebný produkt. Hodnotíme pozitivitu (tmavo-modré sfarbenie) v 100 blastických bunkách. Ak vo vyšetrovanej vzorke nájdeme najmenej 3% POX pozitívnych blastických buniek, môžeme ich zaradiť do myeloidnej línie. Ide o myeloblastovú leukémiu. Množstvo POX sa v myeloidných bunklách zvyšuje postupne s vyzrievaním buniek. V monocytoch býva jemná granulárna pozitivita. Silu pozitivity môžeme hodnotiť na 1-3 krížiky. Dôkaz POX nám pomáha rozlíšiť myeloblastovú alebo monoblastovú leukémiu od lymfoblastovej leukémie [1]. AML M1, M2, M3, M4 sú pozítívne na myeloperoxidázovú reakciu. ALL je POX negatívna.

Histologické vyšetrenie pri AML

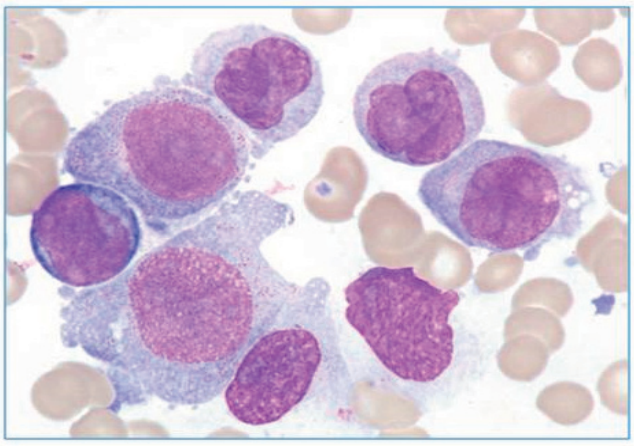
Vyšetrenie je indikované spravidla vtedy, keď sa nedarí získať reprezentatívny aspirát kostnej drene. Indikáciou je i sledovanie priebehu choroby, liečby a jej ukončenia. Býva vysoká bunečnosť, pôvodná krvotvorba býva nahradená nádorovou infiltráciou [9].



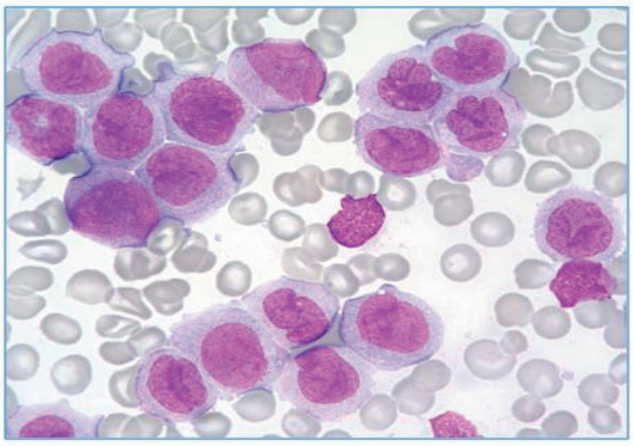
Obr. 1 *AML bez vyzrievania KD* [9]



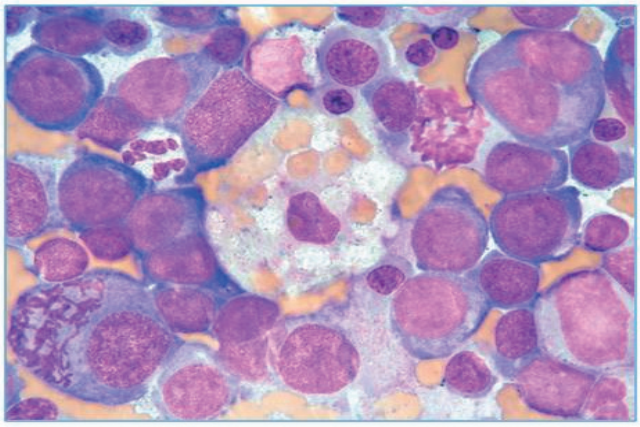
Obr. 2 *AML s vyzrievania KD* [9]



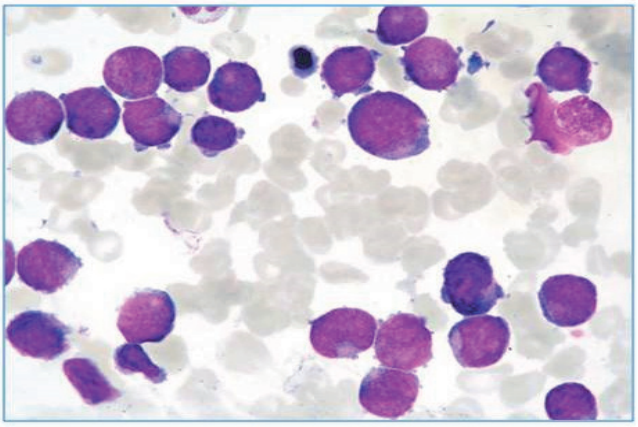
Obr. 3 *AML myelomonocytárna KD* [9]



Obr. 4 *AML monocytárna KD* [9]



Obr.5 *Čistá erytroleukémia KD [9]*



Obr.6 *Akútna megakaryoblastová KD [9]*

Imunologická klasifikácia AML

- Myelo-monocytárna rada (M4-M5): anti-MPO+, CD13+, CD33+, CD14+, CD11c+, CDw65+ a/alebo CD117 (≥ 2 pozitívne markery);
- Erytroidná rada (M6): nezrelá forma s negatívnymi imunologickými markermi a zrelá forma, anti-GlyA+
- Megakaryocytárna rada (M7): mCD41+ (cCD41), mCD61+(cCD61)
- Nezrelá myeloidná rada (M0): pozitívne myeloidné markery, negatívne lymfoidné markery, negatívna cytochémia
- TdT+AML
- AML s koexpresiou lymfoidných markerov [10,11].

Cytogenetická a molekulárno – biologická diagnostika a prognóza AML

Priaznivé (nízke riziko)
– t(15;17), t(8;21)(q22;q22.1);RUNX1-RUNX1T1
inv(16)(p13.1q22)alebo t(16;16)(p13.1;q22);CBFB-MYH11
mutácia NPM1 bez FLT3-ITD alebo FLT3-ITDlow
bialelická mutácia CEBPA

Intermediárne (stredné riziko)
– Mutácia NPM1 a FLT3-ITDhigh
Wild-type NPM1 bez FLT3-ITD alebo s FLT-ITDlow (bez rizikových genetických lézií)
t(9;11)(p21.3;q23.3);MLLT3-KMT2A
Cytogenetické abnormality neklasifikové ako priaznivé alebo nepriaznivé

Nepriaznivé (vysoké riziko)
– t(6;9)(p23;q34.1);DEK-NUP214
t(v;11q23.3);KMT2A prestavba
t(9;22)(q34.1;q11.2);BCR-ABL1
inv(3)(q21.3q26.2) or t(3;3)(q21.3;q26.2);GATA2, MECOM(EV11)
-5alebo del(5q);-7;-17/abn(17p)
Komplexný karyotyp, monozomálny karyotyp
Wild-type NPM1 a FLT3-ITD high
mutácia RUNX1
mutácia ASXL1
mutácia TP53 [12].

Liečba AML

Pri hyperleukocytóze a prejavoch leukostázy sa vykonáva leukaferéza a podáva sa hydroxyurea. Indukčná chemoterapia je založená na schéme 3+7, 3 dni sa podáva antracyklín (daunorubicín alebo idarubicín) a 7 dní sa podáva cytozínarabinozid, s cieľom dosiahnutia kompletnej remisie. Ak po podaní chemoterapie dôjde k ťažkej pancytopénii, je nutné podávať trombocytové koncentráty, erytrocytové koncetráty, antimikrobiálnu liečbu – agresívne liečenie infekcií. Na 15 deň sa znova sa vyšetruje kostná dreň a zvažuje sa podanie reindukčnej liečby. Ak sa nedosiahne kompletná remisia ochorenia používa sa záchranná chemoterapeutická liečba. Po dosiahnutí odpovede sa zvažuje alogénna transplantácia periférnych kmeňových buniek. Po dosiahnutí kompletnej remisie nasleduje postremisná terapia: pri priaznivom riziku 4 cykly konsolidačnej chemoterapie vysokodávkovým cytozínarabinozidom (HDAraC). Pri strednom riziku 1-2 cykly HDAraC, pri dostupnosti príbuzného či nepríbuzného HLA – zhodného darcu alogénna transplantácia periférnych krvotvorných buniek. Pri vysokom riziku 1-2 cykly HDAraC a alogénna transplantácia krvotvorby. U starších pacientov sa využíva paliatívna terapia nízkodávkovým cytozínarabinozidom, 5-azacytidínom, hydroxyureou. Neustále sa monitoruje odpoveď pacienta na liečbu. V rámci podpornej liečby je potrebná prevencia infekcií – antimikrobiálna liečba, hydratácia, suplementácia minerálov, transfúzie ožiarených deleukotizovaných erytrocytov a trombocytov z aferézy, korekcia koagulopatie [13]. V liečbe AML sa rôznych štúdiách objavujú i nové lieky: cytostatiká Cladrion, CPX-351, Vosaroxin, hypometylačné látky – Decitabin, monoklonálne protilátky Gentuzumab, ozagocamin, Vadastuximab talirinem, inhibítory FLT3 Midostaurin, Sorafenib, Quizatinib, IDH inhibítory - AG-221, inhibítory farnesyltransferázy – Tipifarnib, kinázy bunkového cyklu Volasertib, Barasertib, inhibítory histónovej deacatylázy – Pracinostat [14].

Záver

Akútna myeloblastová leukémia je heterogénne, závažné život ohrozujúce, nádorové ochorenie. Včasná a kvalitná laboratórna diagnostika AML má nesmierne veľký význam pre terapiu a následný život pacienta. Preto treba byť pozorný už pri hodnotení krvného obrazu s diferenciálnym počtom leukocytov a následne i pri hodnotení náteru periférnej krvi. Na spresnenie definitívnej diagnózy AML ďalej prichádzajú na rad oveľa citlivejšie laboratórne vyšetrenia pomocou prietokovej cytometrie a molekulárno – biologických metód.

Zoznam bibliografických odkazov

1. Faber E. et al. *Základy hematologické diagnostiky*. Praha: Mladá fronta; 2015.
2. Indrák K. et al. *Hematologie a transfúzní lékařství*. Praha: Triton; 2014.
3. Doubek M, Adam Z. et al. *Hematologie. Pomocník ke stážím na hematologických pracovištích*. Brno: Masarykova univerzita; 2017.
4. Adam Z, Krejčí M, Vorlíček J. et al. *Hematologie. Přehled malígnich hematologických nemocí.* Praha: Grada Publishing; 2008.
5. Sakalová A, Bátorová A, Mistrík M, Hrubiško M. et al. *Klinická hematológia.* Martin: Osveta; 2010.
6. Arber DA, Orazi A. Hasserjian R. et al. 2016. The 2016 revision to the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*, 2016; 127:2391-2405. https://doi.org/10.1182/blood-2016-03-643544
7. Penka M, Tesařová E. et al. *Hematologie a transfuzní lékařství I*. Praha: Grada Publishing; 2011.
8. Tupý J et al. Klasifikácia a laboratórna diagnostika myelodysplastického syndrómu. *Zdravotnícke štúdie.* 2017; 9(2):55-62.
9. Kačírková P, Campr V. et al. *Hematoonkologický atlas krve a kostní dřeně*. Praha: Grada Publishing; 2007.
10. Marinov I. *Průtoková cytometrie v klinické hematologii*. Praha: Triton; 2003.
11. Tupý J et al. Akútna erytroblastová leukémia - historické aspekty a prvky patogenézy. In: Babečka J, Bereta M. *Ružomberské zdravotnícke dni 2022 - XVI. ročník - Zborník z medzinárodnej konferencie. Ružomberok*: Verbum ; 2022: 45-56.
12. Mistrík M. *Akútna myeloblastová leukémia* (AML v 1.2017) [online] http://www.hematology.sk/ docs/ AML%20v1.2017.pdf. Citované dňa 17.8. 2022
13. Vydra J, Novák J, Lauermannová M. et al. *Hematologie v kostce*. Praha: Mladá fronta; 2019.
14. Čerňan M, Szotkowsky T. Moderní léčba akútní myeloidní leukemie. *Transfuze a hematologie dnes*. 2017;23 (1):16-28.

Kontakt:

PhDr. Ivan ONDRÁŠIK, PhD.
Klinika hematológie a transfuziológie
ÚVN SNP-FN Ružomberok
ul.gen. M. Vesela 21
034 26 Ružomberok
e-mail: ivan.ondrasik@gmail.com