

Laboratórna diagnostika akútnej myeloblastovej leukémie

Laboratory Diagnosis of Acute Myeloblastic Leukemia

Jaromír Tupý^{1,2}, Marko Navara², Miriam Tupá^{1,2}, Ivan Ondrášik¹

¹Klinika hematológie a transfúziológie, Ústredná vojenská nemocnica SNP Ružomberok – FN

²Fakulta zdravotníctva, Katolícka univerzita v Ružomberku

<https://doi.org/10.54937/zs.2024.16.2.53-63>

Abstrakt

Akútna myeloblastová leukémia je klinicky heterogénne nádorové ochorenie krvotvorby, pre ktoré je charakteristická akumulácia nezrelých elementov (blastov) myeloidnej línie v kostnej dreni, čo v konečnom dôsledku vedie k zlyhaniu krvotvorby - zastaveniu diferenciácie a neregulovanej proliferácii. Ochorenie sa najčastejšie vyskytuje v dospeljej populácii, incidencia stúpa s vekom. Priebeh je závažný - úmrtnosť je zo všetkých leukémií najvyššia. Etiológia ochorenia je neznáma, predpokladá sa výrazný podiel mutácií a podiel enviromentálnej expozície. Sekundárne vzniká po predchádzajúcej cytostatickej liečbe či rádioterapii. Príznaky sú zapríčinené zníženým počtom buniek - cytopéniou a zahŕňajú krvácanie, infekcie a anemickú symptomatológiu. Prognóza ochorenia je nepriaznivá, obzvlášť u starších pacientoch vo veku nad 60 rokov a len skoré stanovenie komplexnej diagnózy (morfológia, histológia, cytogenetická, molekulárna a imunofenotypové vyšetrenie) a začatie liečby sú podmienkou akéhokoľvek úspechu vzhľadom na potenciál rýchleho rozvoja komplikácií. Liečba však pre rezistenciu rýchlo zlyháva, čo vytvára nutnosťou pre hľadanie nových spôsobov medikácie.

Kľúčové slová: Akútna myeloblastová leukémia. Diagnostika. Morfológia. Histológia. Cytogenetická a molekulárne vyšetrenie. Imunofenotypové vyšetrenie.

Abstract

Acute myeloblastic leukemia is a clinically heterogeneous neoplastic disease of hematopoiesis characterized by the accumulation of immature elements (blasts) of the myeloid lineage in the bone marrow, which ultimately leads to failure of hematopoiesis - cessation of differentiation and unregulated proliferation. The disease most often occurs in the adult population, the incidence increases with age. The course is serious - the mortality rate is the highest of all leukemias. The etiology of the disease is unknown, a significant share of mutations and a share of environmental exposure are assumed. It occurs secondary after previous cytostatic treatment or radiotherapy. Symptoms are caused by a reduced number of cells - cytopenia and include bleeding, infections and anemic symptomatology. The prognosis of the disease is unfavorable, especially in elderly patients over 60 years of age, and only early establishment of a complex diagnosis (morphology, histology, cytogenetics, molecular and immunophenotypic examination) and initiation of treatment are a condition for any success due to the potential for rapid development of complications. However, the treatment quickly fails due to resistance, which creates the necessity to search for new methods of medication.

Key words: Acute myeloblastic leukemia. Diagnostics. Morphology. Histology. Cytogenetics and molecular examination. Immunophenotypic examination.

Úvod

Akútna myeloblastová leukémia (AML) je klinicky heterogénne nádorové ochorenie krvotvorby, pre ktoré je charakteristická akumulácia nezrelých elementov (blastov) myeloidnej línie v kostnej dreni, čo v konečnom dôsledku vedie k zlyhaniu krvotvorby - zastaveniu diferenciácie a neregulovanej proliferácii. Ochorenie sa najčastejšie vyskytuje v dospeljej populácii, incidencia stúpa s vekom. Priebeh je závažný - úmrtnosť je zo všetkých leukémií najvyššia. Etiológia ochorenia je neznáma, predpokladá sa výrazný podiel mutácií a enviromentálnej expozície. Sekundárne vzniká po predchádzajúcej cytostatickej liečbe či rádioterapii. Príznaky sú zapríčinené zníženým počtom buniek - cytopéniou a zahŕňajú krvácanie, infekcie a anemickú symptomatológiu. Prognóza ochorenia je nepriaznivá, obzvlášť u starších pacientoch vo veku nad 60.

Medzi prvotné základné vyšetrenia patrí mikroskopické diferenciálne vyšetrenie krvného obrazu a následne aspirátu kostnej drene. Odber aspirátu je väčšinou spojený s trepanobiopsiou kostnej drene. Nasleduje vyšetrenie prietokovou cytometriou, na určenie imunofenotypu AML, cytogenetické vyšetrenie analýzou karyotypu, fluorescenčná in situ hybridizácia

(FISH) a molekulárne biologické vyšetrenie alebo sekvenovanie novej generácie (NGS). ELN (European LeukemiaNet) poukazuje aj na dôležitosť detekcie minimálnych reziduálnych ochorení (MRD) prietokovou cytometriou alebo molekulárnym, NGS testovaním po počiatočnej liečbe, pri určovaní prognózy a možnosti následnej liečby vrátane transplantácií kmeňových buniek pre pacientov s AML [1,2]. Ak sú prítomné symptómy, ktoré naznačujú rozšírenie AML do miechy a mozgu vykoná sa aj lumbárna punkcia [3]. Diagnostika akútnej myeloblastovej leukémie vyžaduje, aby bolo vo vyšetrovanej vzorke excesívne množstvo myeloblastov. Vyšetrenie sa vykonáva z periférnej krvi, aspirátu a biopsie kostnej drene [4].

Primárnym diagnostickým nástrojom je prietoková cytometria, ktorou sa vyhodnocujú povrchové antigény na leukemických bunkách. Jednoduchá morfológia nie je dostatočná. Zatiaľ čo diagnóza môže byť stanovená hodnotením periférnej krvi, biopsia kostnej drene sa používa na vyhodnotenie morfológie a znakov na povrchu buniek, ako aj na poskytnutie materiálu na cytogenetickú a molekulárnu analýzu. Na stanovenie diagnózy je potrebný viac ako 20 % počet blastov v periférnej krvi alebo kostnej dreni, s výnimkou prípadov s určitými chromozomálnymi abnormalitami [5].

Pri počiatocnom vyšetrení sa vykonáva skrining mutácií génov NPM1, FLT3, CEBPA, RUNX1, TP53, ASXL1. Skrining preskupení génov PML-RARA, CBFB-MYH11, RUNX1-RUNX1T1, BCR-ABL1 a iných fúzyčných génov je potrebný v prípade, ak je cytogenetické vyšetrenie nekvalitné alebo nie je hodnotiteľné, eventuálne v prípade ak je typický morfológický obraz, ale cytogenetické abnormality nie sú prítomné a tiež v prípade, že je nevyhnutný pre určenie správneho liečebného postupu, keď cytogenetické vyšetrenie nie je dostupné [6].

Výsledky cytogenetiky analýzy a analýzy molekulárnej genetiky nemusia byť hneď dostupné, a preto morfológia s imunofenotypizáciou zohrávajú úlohu pri rýchlej indikácii pravdepodobnej diagnózy. Napríklad tento spôsob umožňuje určiť diagnózu pri akútnej promyelocytovej leukémii (APL), pri ktorej je určenie diagnózy naliehavé. Kombinácia týchto dvoch spôsobov, morfológia a imunofenotypizácia, umožňuje určiť diagnózu niektorých typov AML s vysokou určitosťou. Morfológické a imunofenotypové znaky môžu naznačovať pravdepodobnú prítomnosť cytogenetickej anomálie [7].

1 Morfológické vyšetrenie

Podľa morfológie buniek, to znamená podľa ich veľkosti, štruktúry a stupňa dozrievania, sa AML kategorizuje do rôznych podtypov. Na klasifikáciu sa používajú dva systémy WHO a FAB. Podľa morfológie buniek je možné určiť výhliadky pacienta. Morfológia sa určuje študovaním maligných buniek, zo vzoriek krvi alebo kostnej drene pod mikroskopom [8].

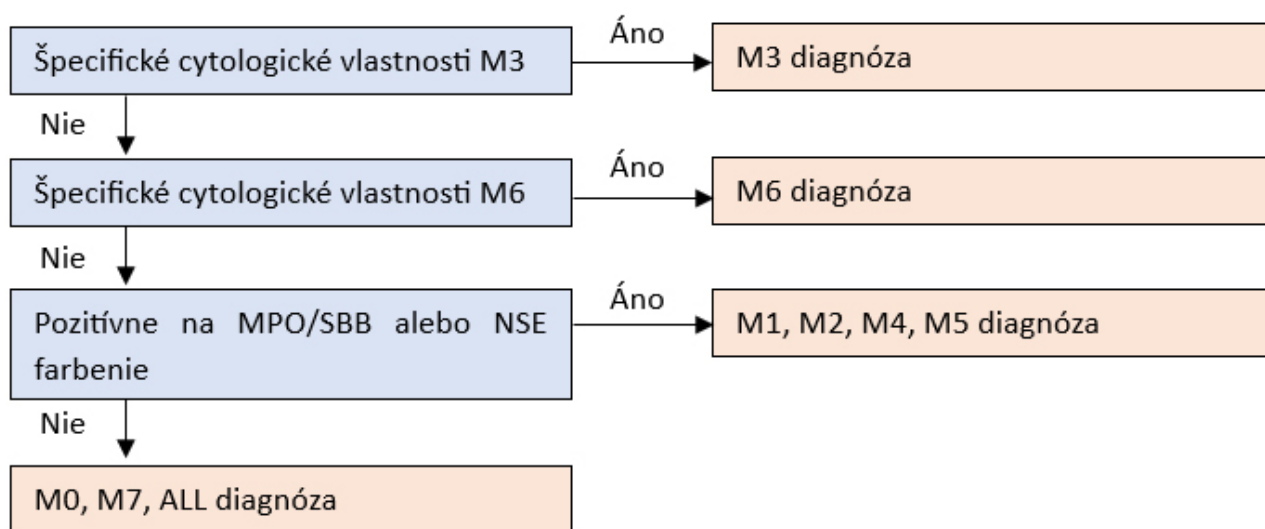
Pri morfológickom vyšetrení sa odporúča počítať aspoň 200 leukocytov v krvných náteroch a 500 jadrových buniek v náteroch kostnej drene. Do počtu blastov sú rátané myeloblasty, monoblasty a megakaryoblasty. Pri AML s monocytovou alebo myelomonocytovou diferenciáciou sa monoblasty a promonocyty rátať ako blasty, nerátajú sa však abnormálne monocyty [9].

Aspirát kostnej drene býva zvyčajne hypercelulárny s väčším množstvom myeloblastov. Myeloblasty sú bunky, ktoré majú rôznu veľkosť od malej až po väčšiu ako monocyt. Majú guľaté, obličkovité alebo oválne jadro, jadro so zárezom, lobulizované

jadro. V jadre je niekoľko alebo jeden nukleolus, chromatín je svetlý. Cytoplazma máva rôzny objem a môže obsahovať auerove tyče a azurové granule. Ako blasty sa počítajú monoblasty a megakaryoblasty. Proerytoblasty sa nezarátavajú s výnimkou čistej erytroidnej leukémie. Bunky s vyšším stupňom zrelosti sú väčšinou znížené [10].

Klasifikačný systém FAB sa stále používa vďaka jeho jednoduchosti, spoľahlivosti a tiež kvôli nízkym nákladom [11]. Určovanie diagnózy AML podľa klasifikácie FAB začína vyšetrením špecifických cytologických vlastností, na základe ktorých sa dá určiť, že sa jedná o podtyp M3. Ak sa nejedná o M3, postup pokračuje na M6, pri ktorej je v kostnej dreni aspoň 30 % blastov a ≥ 50 % erytroidných buniek. Ak sa nejedná o podtyp M6 a ak je v kostnej dreni ≥ 30 % blastov vylúči sa MDS [12].

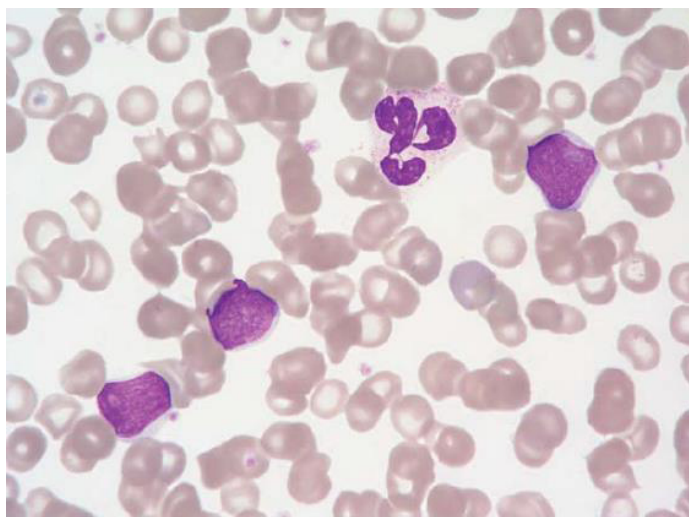
Napriek tomu, že cytochemické vyšetrenia sú už na ústupe, majú ešte stále svoj význam pri zaradovaní AML do podkategórií [13]. Výhodou je, že sú lacné a môžu byť vykonávané aj v laboratóriách, ktoré majú obmedzený prístup k pokročilejším technikám [14]. Kritériom pre ďalšiu diagnostiku je pozitívne farbenie pre enzým nachádzajúci sa v primárnych granulách granulocytov - myeloperoxidázu (MPO), pozitívne farbenie sudánskou čiernou (SBB) a dôkaz nešpecifických esteráz (NSE). MPO a SBB pozitivita naznačuje granulocytovú diferenciáciu a NSE naznačuje monocytovú diferenciáciu [12]. Silne pozitívne na MPO sú Auerove tyče, ktoré sa nachádzajú v cytoplazme leukemických blastov a promyelocytov. SBB farbí bunkové lipidy a je pravdepodobne o trochu viac citlivejšie na skoršie myeloidné bunky. Ako bunka dozrieva farbenie sa stáva intenzívnejším v dôsledku zvyšovania počtu primárnych a sekundárnych granúl. Reakcia NSE odlišuje myeloblasty a neutrofilné granulocyty od monocytových buniek [14]. Pri pozitívite MPO, SBB alebo NSE sa AML bunky radia do podtypov M1, M2, M4 a M5. Ak sú negatívne môže sa jednáť o podtypy M0 a M7 alebo ALL - lymfoidné bunky sa nezafarbia [12]. Schéma diagnostiky AML podľa klasifikácie FAB je zobrazená na obrázku 1.



Obr. 1 Určovanie diagnózy AML na základe FAB klasifikácie [12].

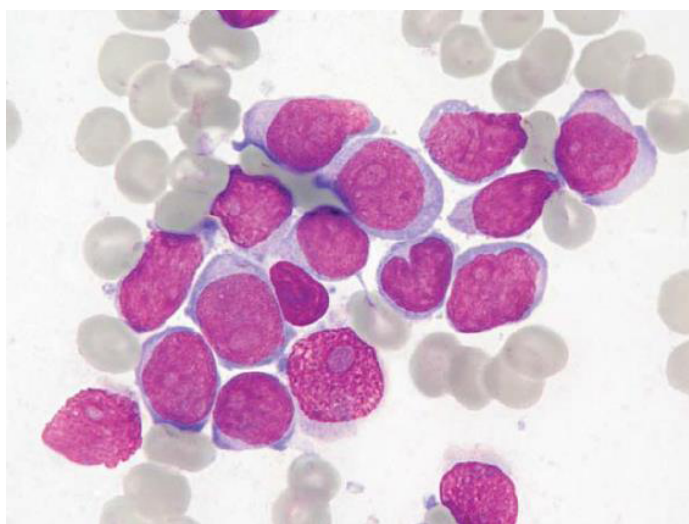
Z morfológie hľadiska sa leukemické bunky delia do niekoľkých kategórií podľa FAB klasifikácie.

M0 akútna myeloblastová leukémia je náročná na diagnostiku, kvôli minimálnej diferenciácii buniek. Blastové bunky majú znaky aj lymfoblastov aj myeloblastov - obrázok 2,3. Tento typ sa vyskytuje len u 5 % dospelých pacientov s AML [11]. Bunky sa môžu podobáť na podtyp M1 alebo niekedy aj na M5. < 3 % blastov je MPO, SBB alebo naftol-AS-D-chloroacetát-esteráza (CAE) pozitívnych a NSE negatívnych [10].



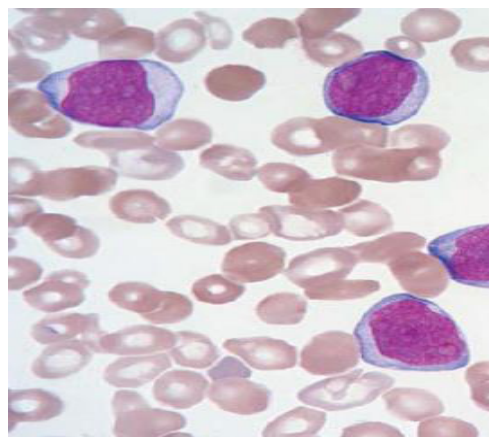
Obr. 2 AML s minimálnou diferenciáciou v periférnej krvi

3 nediferencované blasty s vysokým N/C pomerom, jasnou štruktúrou chromatinu, zle viditeľné nukleoly, cytoplazma je svetlo bazofilná bez granúl. Vedľa blastov je atypický neutrofilný segment [10].



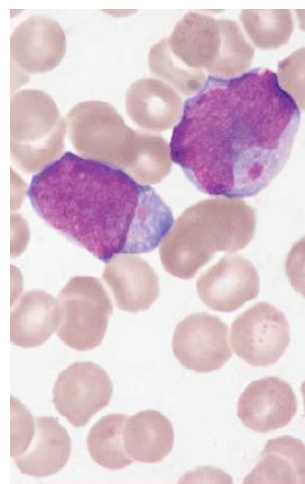
Obr. 3 AML s minimálnou diferenciáciou, aspirát kostnej dreve. Skupina blastov [10].

M1 AML je akútna myeloblastová leukémia bez vyzrievania. Vyskytujú sa pri nej myeloblasty v periférnej krvi, ale nevyskytujú sa bunky za myeloblastovým štádiom dozrievania [11]. Sú stredne veľké až veľké, môžu mať Auerove tyče – obrázky 4-7. Minimálne 3 % blastov sú MPO alebo SBB pozitívne. Môžu byť aj CAE pozitívne. NSE sú negatívne [10].



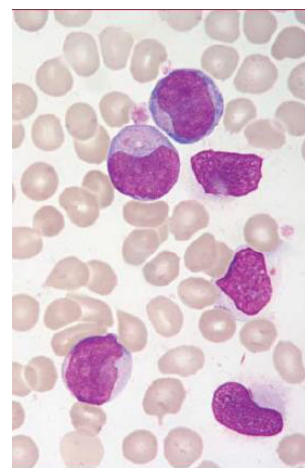
Obr. 4 AML bez vyzrievania v periférnej krvi.

Veľmi ťažko zaraditeľné, nediferencované blasty. Ľahko nepravidelné oválne jadro s jemným chromatinom a niekoľkými nukleolami. Cytoplazma je agranulárna a stredne bazofilná [10].



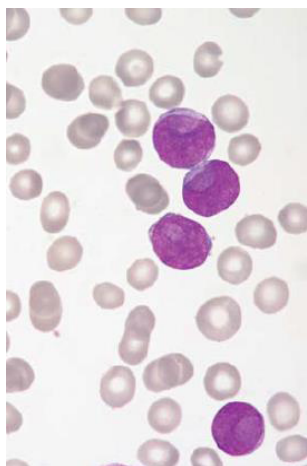
Obr. 5 AML bez vyzrievania v periférnej krvi.

Myeloidné diferencované blasty. Obličkovité jadro s jemným chromatinom a niekoľkými nukleolami. Miestami jemná granulácia cytoplazmy, pri niektorých blastoch sú viditeľné krátke jemné Auerove tyče [10].



Obr. 6 AML bez vyzrievania v periférnej krvi.

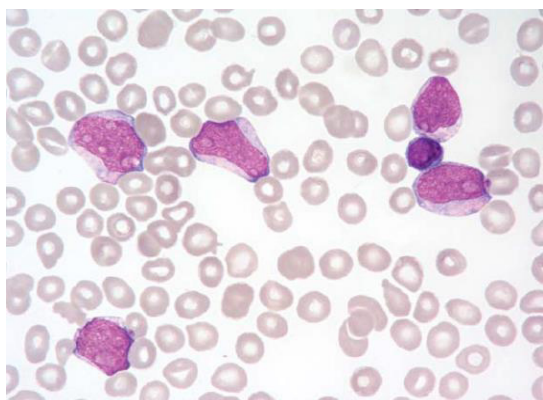
Blasty s pseudo-Chédiakovou-Higashiho inklúziou v cytoplazme, vzniknutou fúziou primárnych granúl [10].



Obr. 7 AML bez vyzrievania v periférnej krvi.

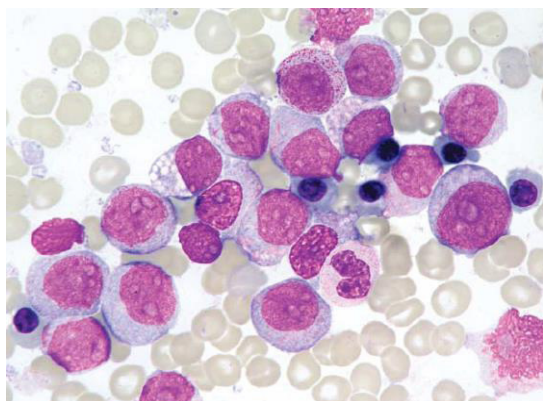
Malé myeloblasty s vysokým N/C pomerom. V jadre je pseudo-nukleolus - miskovité jadro [10].

Pri M2 AML s maturáciou sa vyskytuje viac ako 10 % buniek, ktoré sú za myeloblastovým štádiom dozrievania, sú to promyelocyty, myelocyty a neutrofily – obrázok 8, 9. Tento typ tvorí zhruba 30 % všetkých prípadov AML a tretina prípadov je spájaná s $t(8;21)$ translokáciou [11]. Často sa vyskytujú Auerove tyče v cytoplazme, hypo alebo hypergranularita a abnormálne jadrá. Cytochemické reakcie sú rovnaké ako pri M1, ale často intenzívnejšie [10].



Obr. 8 AML s vyzrievaním v periférnej krvi.

Blasty majú oválne, mierne nepravidelné až hranaté jadro so zreteľnými nukleolami. Cytoplazma je svetlo bazofilná, miestami ružová prítomnosťou jemných granúl [10].



Obr. 9 AML s vyzrievaním, aspirát kostnej drene.

Blasty so zreteľne myeloidnou diferenciáciou s jemne ružovofialovou granuláciou, Auerovými tyčami. Niektoré majú v cytoplazme vakuolizáciu [10].

Podtyp M3 AML je zvyčajne sprevádzaný nízkou hladinou leukocytov v periférnej krvi. Preto je diagnóza sťažaná. Väčšina buniek má veľmi charakteristickú morfológiu nazývanú ako atypické promyelocyty – obrázok 10 [11]. Majú nízky nukleo cytoplazmatický pomer (N/C) pomer, slabo bazofilnú cytoplazmu, v ktorej je mnoho hrubých ružovočervených až purpurových granúl. Jadro je oválne a obličkovité, bilobárne, nepravidelné. Má silnejšie Auerove tyče v porovnaní s ostatnými podtypmi. Podtyp M3 obsahuje bunky, ktoré majú v cytoplazme mnoho Auerových tyčí. Tieto bunky sa nazývajú „faggot cells“. Bunky sú MPO, CAE a SBB silno pozitívne [10].



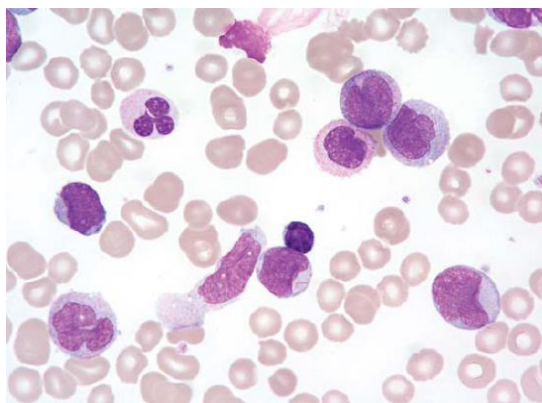
Obr. 10 Akútna promyelocytová leukémia v periférnej krvi.

Štyri atypické promyelocyty s granulárnou cytoplazmou. V strede je promyelocyt s veľkým množstvom Auerových tyčí preložených cez seba, ide o „faggot cell“ [10].

Mikrogranulárny variant AML-M3 tvorí 15 až 20 % všetkých prípadov M3 AML. Prognóza je horšia ako pri normálnom M3. Pri tomto type sa vyskytuje leukocytóza. Morfológicky je charakterizovaná riedko granulovanými leukemickými bunkami. Cytoplazma je viac bazofilná ako pri normálnom M3 v dôsledku nižšej koncentrácie azurofilných granúl [11].

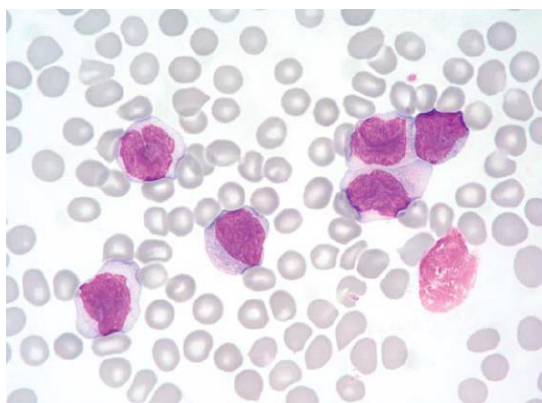
M4 AML predstavuje 20 % všetkých prípadov AML. Tento typ leukémie má zložku granulocytovú a monocytovú v rôznych pomeroch a rôznych stupňoch dozrievania. Cytochemicky sú pozitívne na esterázu chlóracetátu a monocyty sú pozitívne na naftol-AS-d-acetát esterázu alebo α -naftylbutyrát esterázu (ANBE). Variant M4Eo sa vyskytuje, keď aspoň 5 % buniek tvoria abnormálne eozinofily, ktoré prezentujú monocytoidné jadrá a atypické granule [11]. Promonocyty majú obvykle veľmi veľa granúl a môže byť ťažké odlišiť ich od promyelocytov [10].

M5 AML predstavuje približne 15 % všetkých prípadov AML. Leukemické bunky sú monocytovej línie (monoblasty a promonocyty) - obrázok 11-13. Monoblasty sú veľké bunky majú niekedy vakuolizovanú mierne bazofilnú cytoplazmu v ktorej sa niekedy vyskytujú azurofilné granule. Nález Auerových tyčí je neobvyklý. Jadro je guľaté. V periférnej krvi sú zrelšie bunky ako v kostnej dreni. Sú MPO, SBB negatívne a NSE výrazne pozitívne [10].



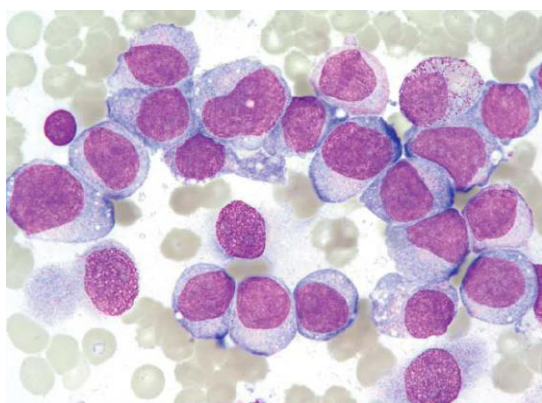
Obr. 11 Akútna myelomonocytová leukémia v periférnej krvi.

Leukocytóza so zmoženými myeloblastami a monocytárnou komponentou. V ľavo hore je neutrofilný segment, pod ním je blast a v ľavo na spodku monocyt. V strede je monocyt a myeloblast s Auerovou tyčou. Na pravo hore je dysplastický neutrofil a dva promonocyty [10].



Obr. 12 Akútna monoblastová leukémia v periférnej krvi.

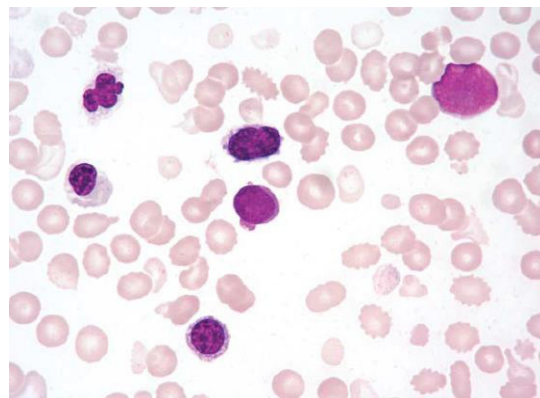
Naľavo od stredu sa nachádza monoblast. Okolo neho sú štyri promonocyty – veľké, lobulované jadro, jemnejšia štruktúra chromatinu v svetlo bazofilnej cytoplazme, malé množstvo jemných granúl. Monocytárna rada (promonocyty, monocyty) je viac zrelá v PK ako v KD. V KD prevažujú monoblasty – veľké bunky s guľatým jadrom, jemným chromatinom a mierne bazofilnou agranulárnou cytoplazmou [10].



Obr. 13 Akútna monoblastová leukémia, aspirát kostnej drene.

Infiltrácia monoblastami s nízkym N/C pomerom, stredne bazofilnou cytoplazmou s akcentáciou bazofilie na periférii. Mále množstvo jemných granúl. Vpravo hore je monocyt a neutrofilný myelocyt [10].

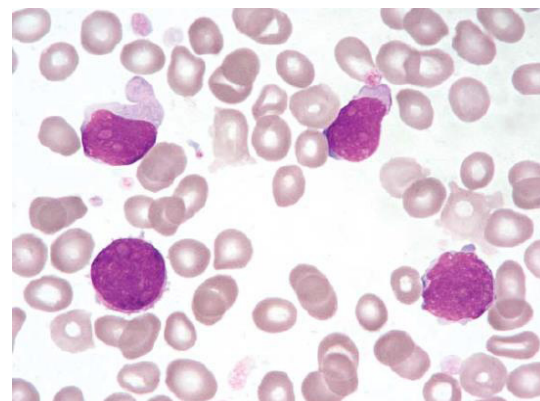
M6 podtyp AML je definovaný podľa FAB ako proliferácia dysplastických erytroidných prvkov s proliferáciou blastov myeloidného pôvodu (obrázok 14). Klasifikácia WHO charakterizuje 2 podtypy: erytrolekémia (M6a), ktorá je opísaná ako zmiešaná proliferácia myeloidných a erytroidných blastov a môže byť sekundárna k predchádzajúcemu myelodysplastickému syndrómu. M6a predstavuje 5 – 6 % všetkých AML. Druhým podtypom je čistý erytroidný variant (M6b), ktorý sa vyskytuje, keď je prominentná dyserytropoéza [11]. V myeloblastoch môžu byť prítomné Auerove tyče. Má rovnaké cytochemické reakcie ako iné podtypy AML. Erytroblasty sú jemne alebo difúzne granulárne [10].



Obr. 14 Akútna erytroleukémia v periférnej krvi.

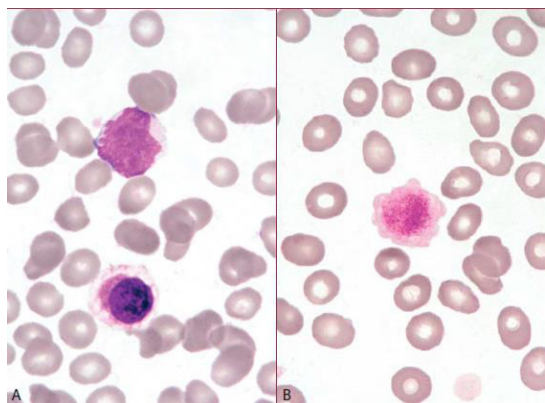
Štyri dysplastické polychromatofilné erytroblasty. Vľavo hore je neskorý erytroblast – lobulácia jadra, zle ohraničená cytoplazma [10].

Podtyp M7 AML predstavuje 3 až 5 % všetkých AML[11]. Pri tomto podtype môžeme nájsť dysplastické hypo alebo hypergranulárne trombocyty rôznej veľkosti. V PK môžu byť prítomné blasty. Megakaryoblasty môžu byť veľké s guľatým jadrom a jemnou štruktúrou chromatinu. Môžu mať nepravidelne ohraničenú, objemnú, bazofilnú cytoplazmu. Megakaryoblasty môžu byť aj malé s hustým chromatinom, bez jasne viditeľného nukleolu. Niekedy majú MPO pozitívne azurofilné granule. Často sa vyskytujú megakaryocytové holé jadrá - obrázky 15, 16. Megakaryocyty sú MPO, SBB a CAE negatívne [10].



Obr. 15 Akútna megakaryoblastová leukémia v periférnej krvi.

Tri morfológicky nezaraditeľné blasty. V ľavo dole je dysplastický mladší megakaryocytovej rady s guľatým jadrom a kondenzovaným chromatinom a s dvoma nukleolami. Má redukovanú, otrhanú cytoplazmu [10].



Obr. 16 Akútna megakaryoblastová leukémia v periférnej krvi.

V ľavo dole je mikromegakaryocyt so značnou vakuolizáciou cytoplazmy, najviac na periférii. Na pravo je obrovský trombocyt [10].

2 Histologické vyšetrenie

Kostná dreň je hypercelulárna, nádorová infiltrácia nahrádza pôvodnú krvotvorbu [13]. Pri biopsiách sa bunečnosť často blíži až ku 100 %. Vyskytujú sa aj prípady so strednou alebo nízkou bunečnosťou - hypocelulárny typ AML. Pri nižšej bunečnosti treba AML odlišiť od hypocelulárneho MDS a aplastickej anémie [10].

3 Cytogenetické a molekulárne vyšetrenia

Cytogeneticky je AML veľmi heterogénne ochorenie s viac ako 160 opakujúcimi sa štrukturálnymi chromozomálnymi abnormalitami. Identifikácia cytogenetických abnormalít môže pomôcť predpovedať, ako bude rakovina reagovať na liečbu a umožní naplánovať účinnejšiu liečbu [15].

Genetické zmeny, ako sú chromozomálne aberácie, pôsobia ako jedna z hlavných hnacích síl AML. Chromozomálne aberácie, translokácie, inverzie, delécie, monozómie a trizómie boli hlásené u takmer 55 % dospelých pacientov s AML.

Typické translokácie pozorované pri AML sú t(8;21), t(15;17) a t(9;11). Najčastejšie pozorovanou chromozomálnou inverziou pri akútnej myeloidnej leukémii je inverzia chromozómu 16 a chromozómu 3. Medzi chromozomálne delécie pri AML patria chromozomálne delécie 9q, 5q a 20q. Medzi ďalšie chromozómové zmeny patrí monozómia 7, trizómia 8 a trizómia 21.

Detekcia chromozomálnych aberácií je mimoriadne dôležitá, pretože slúži na určenie prognózy a voľbu liečby pacientov s AML. WHO integrovala chromozomálne odchýlky do svojho klasifikačného systému AML, aby sa mohli vykonávať presnejšie diagnózy [16]. Okrem toho je dôvodom testovania aj rozhodnutie o potrebe indikácie transplantácie krvotvorných buniek a diagnostika hereditárnej predispozície k myeloidným malignitám [17].

Na cytogenetické vyšetrenie sa používa aspirát kostnej drene. Bunky sa kultivujú a ich delenie sa zastaví v mitóze. Detekcia somatických mutácií, ktoré sú známymi hnacími silami AML môže pomôcť pri počiatkovej klasifikácii rizika pacientov.

Odporúčané je testovanie štyroch génov a to KIT, FLT3, NPM1 a CEBPA, pre ich uznaný prognostický význam. Odporúčané je tiež testovanie RUNX1 klasifikačným systémom WHO [4].

Cytogenetické testovanie využíva niekoľko techník a to sú chromozomálna analýza karyotypizáciou a fluorescenčná in situ hybridizácia [18].

Konvenčná karyotypizácia je najstaršia z týchto techník. Bunky sú najskôr kultivované, sú stimulované s mitogénmi aby nastala chromozomálna replikácia. Následne sú bunky zastavené v metafáze inhibítormi bunkového cyklu ako napríklad kolchicín. Chromozomálny materiál je organizovaný v chromatídach a farbením dochádza k vizualizácii jednotlivých chromozómov. Každý chromozóm má svoje unikátne pásikovanie, husto a voľne usporiadanej DNA. Touto technikou sú detegované translokácie, duplikácie a delécie vďaka abnormalitám vo vzore pásikovania. Vyšetrenie sa zvyčajne vykonáva z 20 alebo 30 buniek z jednej vzorky [19]. Štandardne sa na detekciu chromozómových aberácií používa G-prúžkovanie, čo je prúžkovanie pomocou Giemsovho roztoku. Vzorka kostnej drene sa kultivuje 24 až 48 hodín. Ak je nízka kvalita, alebo nedostatok vzorky a za predpokladu ak je prítomných viac ako 10 % cirkulujúcich blastov možno na dodiferencovanie použiť aj vzorky 24-hodinovej kultivácie periférnej krvi [17].

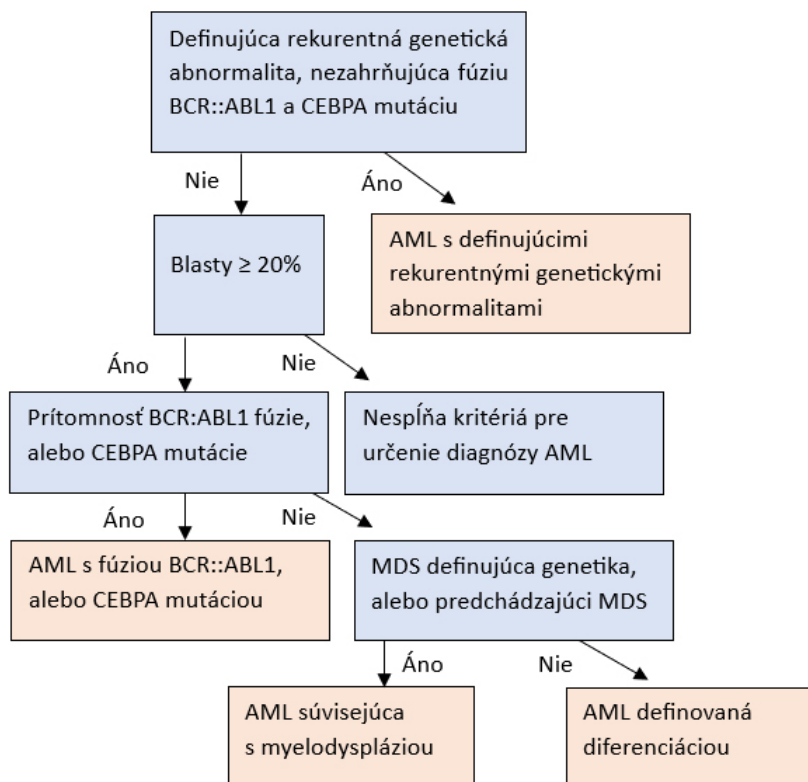
Nedostatky karyotypizácie sú, že musí dôjsť k proliferácii buniek aby boli dostupné metafázové chromozómy na vyšetrenie. Niekedy sa vyskytnú translokácie v malom úseku chromozómu, ktoré nie sú rozlíšiteľné mikroskopom. Tieto zmeny sa nazývajú kryptické chromozómové zmeny a na ich detekciu sa môže využiť napríklad vyšetrenie FISH [20].

Fluorescenčná in situ hybridizácia je ďalšou cytogenetickou technikou. Táto metóda sa uskutočňuje hybridizáciou medzi cieľnou DNA a segmentom DNA, sondy, označenej s fluorofórom. Sekvencia sondovej DNA dopĺňa segment genómovej DNA, ktorý sa má skúmať. Sondová DNA sa viaže na segment cieľovej genómovej DNA. Fluorescencia je zobrazená fluorescenčným mikroskopom [20]. Týmto testom sú tiež detegované chromozómové straty, chromozómový nadbytok, translokácie alebo ďalšie narušenia chromozómu špecificky cieľných segmentov DNA. Tieto zmeny sú pozorované vďaka rozdielnej fluorescencii. V porovnaní s karyotypizáciou vyšetrenie FISH môže posudzovať 200 až 500 buniek z jednej vzorky, preto je senzitivita testu vyššia ako pri karyotypizácii. Na rozdiel od karyotypizácie sa FISH test môže realizovať aj na archívnom materiáli, pretože nepotrebuje deliace sa bunky [19]. Na vykonanie testu sa používajú komerčne dostupné, certifikované sondy, ktoré sa volia podľa charakteru chromozómovej aberácie. Testom sa detegujú fúzne gény a bližšie sa identifikujú nálezy z konvenčného cytogenetického vyšetrenia. Vzorka je štandardne ako pri karyotypizácii kostná dreň [17]. Nevýhoda FISH testu je, že deteguje iba abnormality v oblastiach cieľovej sekvencie zatiaľ čo detekcia karyotypizáciou pokrýva širokú škálu abnormalít. FISH test teda nie je vhodný na detekciu nešpecifického karyotypu.

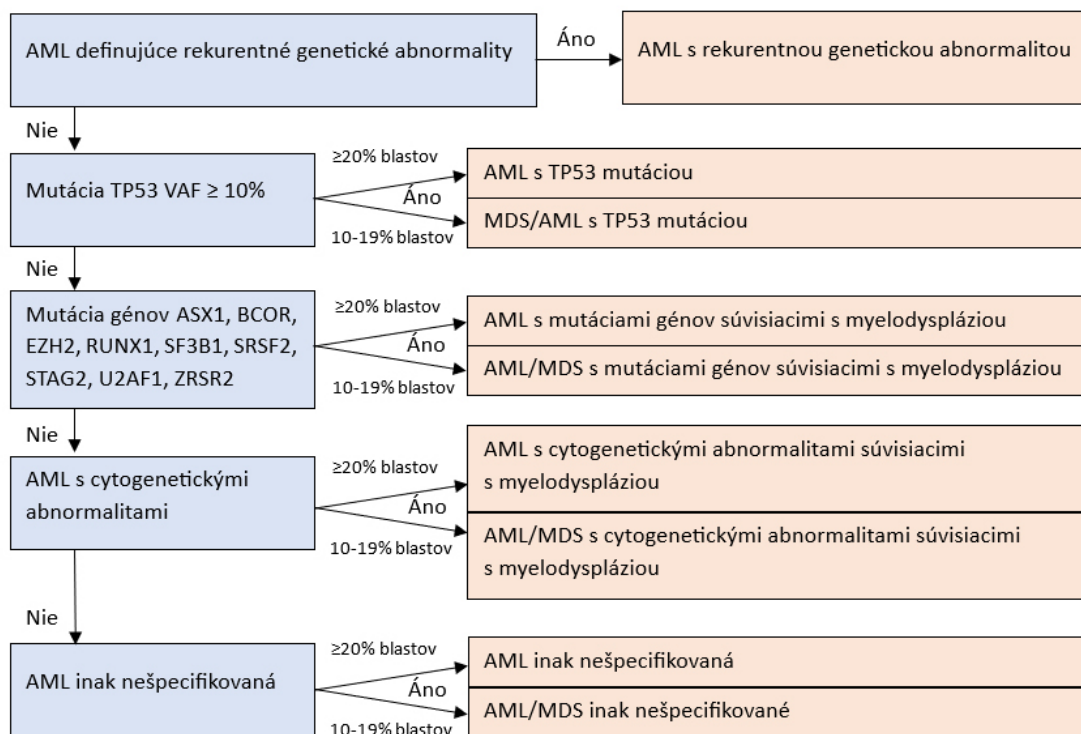
Zatiaľ čo cytogenetika je obmedzená na rozsiahle chromozómové zmeny, genetické zmeny, ktoré sa vyskytujú na úrovni jedného alebo pár bazových párov ako bodové mutácie, malé inzercie alebo delécie a podobne sa skúmajú nástrojmi molekulovej genetiky. Sú to vyšetrenia založené na sekvenčne špecifickej amplifikácii, Sangerovo sekvenovanie a sekvenovanie novej generácie.

Vyšetrenia založené na amplifikácii úsekov DNA alebo RNA na tento účel využívajú polymerázovú reťazovú reakciu (PCR) alebo podobné techniky [19]. Vytvárajú sa ďalšie kópie cieľovej DNA alebo RNA. Preto sú testy spojené s PCR zvyčajne

citlivejšie. V porovnaní s testom FISH môžu testy spojené s PCR skúmať špecifickejšie zmeny genómovej DNA s vyšším rozlíšením [20]. Mnoho cyklov amplifikácie vzorky umožňuje citlivé a spoľahlivé meranie abnormalít, ktoré sú prítomné vo vzorke len na veľmi malej úrovni. Negatívum je podobne ako pri FISH metóde možnosť testovania len určitých abnormalít, pre ktoré boli navrhnuté sondy. Sú to napríklad mutácie FLT3, NPM1, IDH1, IDH2 [19]. Na diagnostiku sa uprednostňuje vzorka kostnej drene, ale pri nedostatku možno použiť aj vzorku periférnej krvi. Vstupné vyšetrenie slúži ako skrining molekulárných markerov. Vyšetrujú sa prestavby fúzných génov RUNX1-RUNX1T1, BCR-ABL1, CFBF-MYH11, PML-RARA a KMT2A prestavby metódou PCR, analýza mutácie FLT3 génu a NPM1, RUNX1, TP53, ASXL1, CEBPA a KIT génov. Diagnostika molekulovej genetiky slúži aj na monitorovanie MRD, ako markery sa sledujú fúzne gény a gény vybraných mutácií metódou RT-PCR [17].



Obr. 17 Klasifikačná schéma AML podľa klasifikácie WHO 2022 - upravené podľa Chang a kol., 2023 [1].



Obr. 18 Klasifikačná schéma AML podľa klasifikácie ICC 2022 - upravené podľa Chang a kol., 2023 [1].

Sekvenčné vyšetrenia predchádzajúcej generácie sa spoliehali na Sangerovu techniku. Sangerovo sekvenovanie bolo veľmi pracné a zväčšenie rozsahu techniky na úroveň pokrytia celého veľkého génu bolo finančne náročné [19].

Sekvenovanie novej generácie je revolučná technológia sekvenovania schopná skúmať stovky až tisíce génov alebo dokonca celý genóm v jednom teste [20]. Umožňuje vykonávať veľké multigénové panely a aj celogenómové sekvenovanie. Táto technika je založená na sekvenovaní veľkého množstva malých DNA sekvencií paralelne. Umožňuje hodnotenie veľkého množstva cieľov súčasne. NGS môže mať široké pokrytie, alebo vysokú klinickú senzitivitu keď je potrebné vyšetriť menej genetických regiónov [19].

S rastúcim počtom analyzovaných génov ponúkajú metódy sekvenovania novej generácie výhody v citlivosti, cene a účinnosti [4]. Klasifikačné schéma AML na základe klasifikácie WHO je zobrazená na obrázku 17 a na základe klasifikácie ICC je zobrazená na obrázku 18.

4 Imunofenotypové vyšetrenie

Imunofenotypizácia je vyšetrenie slúžiace na klasifikáciu buniek na základe ich povrchových antigénov. Každý typ leukemických buniek, takisto ako každý stupeň vyzrievania bunky má iné povrchové antigény. Informácie z vyšetrenia napomáhajú pri klasifikácii AML [21]. Antigény vyskytujúce sa na povrchu leukemických buniek sa označujú ako diferenciačné klastre a tvoria s leukémiou asociovaný imunofenotyp (LAIP). Často sa stáva že sa vyskytuje niekoľko rôznych LAIP pri jednom pacientovi [22].

Vyšetrenie sa vykonáva prietokovou cytometriou. Je to efektívna technika, ktorá dokáže posúdiť niekoľko vlastností buniek naraz. Posudzuje veľkosť, vnútornú komplexnosť a antigény bunky. Vyšetrenie sa vykonáva aj z periférnej krvi, aj z kostnej drene. Používa sa pri počiatočnej diagnostike a pri monitorovaní MRD počas a po liečbe [23]. V prípade lumbárnej punkcie sa vyšetruje aj mozgovomiešny mok [24]. Na stanovenie MRD je potrebné vyšetrenie až 500 000 CD45 pozitívnych buniek a aspoň 100 buniek viabilnej blastovej zložky [2]. Prietoková cytometria môže zachytiť aj malé populácie leukemických buniek, ktoré nie sú zachytelné morfológickým vyšetrením. Prietokovou cytometriou sú rozpoznávané nezrelé myeloidné bunky a blasty sú zachytené pomocou charakteristických antigénov CD34+ a CD117+ [4].

Vzorky z PK a KD musia byť nekoagulované. Červené krvinky z periférnej krvi sú odstránené lýzou. Bunky sú označené protilátkami s naviazaným fluorochrómom [24].

Krv by nemala byť skladovaná po dlhšiu dobu, pretože dochádza k stratám neutrofilov a eozinofilov kvôli krátkej životnosti [25].

Princíp prietokovej cytometrie spočíva v tom, že bunky z vyšetrovaného materiálu sú zoradené za sebou a v prúde nosnej kvapaliny jednotlivito prechádzajú laserovým lúčom alebo viacerými lúčmi. Tým vznikajú dva druhy signálov. Jedným je rozptyl svetla a druhý signál je fluorescencia.

Keď bunka prechádza lúčom, dochádza k rozptylu svetla, ktoré následne dopadá na detektory a tie menia signál na elektrické impulzy a digitálnu informáciu. Rozptyl svetla vytvára dva typy signálov. Typ signálu nazývaný predný rozptyl (FSC, forward scatter) je zachytávaný detektorom, ktorý je situovaný oproti laserovému lúču. Tento typ signálu

sa nazýva predný rozptyl (FSC, forward scatter) a je úmerný veľkosti bunky. Bočný rozptyl (SCC, side scatter) sa odráža od organel a jadra bunky a je zachytávaný bočným detektorom. Tento signál je úmerný granularite cytoplazmy a vnútornej komplexite bunky. Vďaka týmto signálom je možné od seba rozoznať granulocyty, lymfocyty a monocyty. Na označenie buniek sa využívajú fluorescenčné zlúčeniny, ktoré sú spojené so špecifickými protilátkami proti povrchovým, cytoplazmatickým a jadrovým antigénom vyšetrovaných buniek. Bunka označená fluorochrómom je laserovým lúčom excitovaná a vyžaruje svetlo – fluorescenciu. Fluorescenčný signál je úmerný expresii antigénu na bunke [24].

Každý podtyp AML vyšetrený prietokovou cytometriou má inú charakteristiku. Imunofenotypové znaky AML vykazujú nižšiu diferenciáciu, alebo maturáciu k jednej alebo viacerým bunkovým líniam [26]. Myeloidné blasty skoro vždy exprimujú antigén CD45, čo je nezrelý myeloidný imunofenotyp, ktorý sa v zdravej kostnej dreni nachádza len v malom množstve [2]. (Keohane a kol., 2020). Na stanovenie LAIP sa odporúča vyšetriť aspoň CD34, CD117, čo sú znaky nezrelých blastov, ďalej CD45, CD33, CD13, CD56, CD7, HLA-DR a CD38. Ak je prítomná monocytová zložka, tak sa môžu vyšetriť ďalšie znaky a to napríklad CD64, CD11b, CD4 [2].

Hematopoetické kmeňové bunky sú charakteristické výrazným znakom CD34 nízkymi CD38 a pozitívnym HLA-DR (Means a kol., 2023). Na bunkách AML podtypu M0 a M1 sa nachádzajú aj antigény CD13, CD33, CD117. M0 má väčšiu expresiu CD34 ako M1 [27].

AML s vyzrievaním do granulocytovej línie, M2, má znaky CD34 a CD117. Sú to prekursorové znaky spojené s nezrelými myeloidnými bunkami sú v kombinácii s ďalšími myeloidnými znakmi CD13 a CD33. Tiež musí byť zistená pozitivita znakov spojených s granulocytovým vyzrievaním ako CD15 alebo CD65 [26].

Antigény CD13 a CD33, slabé pretrvávanie CD117, MPA a absencia HLA-DR sú charakteristické pre AML M3 s abnormálnymi hypergranulárnymi promyelocytmi [27].

M4 AML s myelomonocytovou diferenciáciou je charakterizovaná znakmi CD14 so súčasťou výraznou expresiou CD36 a CD64 alebo CD33, CD4, CD11b a CD11c.

M5 Akútne monoblastová a monocytová leukémia sa zvyčajne prejavuje jednou populáciou buniek s monocytovou diferenciáciou s vysokou úrovňou expresie CD36, CD64 a expresiou CD14, CD4.

Pri megakaryocytových CD41a, CD42b a CD61 a erytroidných znakov glykoforín A, CD36, CD71 môže dôjsť k chybné klasifikácii, pretože na blastové bunky môžu adhezovať trombocyty alebo fragmenty červených krviniek.

Ojedinelé prípady akútnej bazofilnej leukémie vykazujú expresiu CD13, CD33 a CD9, CD11b, CD11, CD123 [26].

Imunofenotypové profily prezentujú tabuľky 1 a 2.

Tab. 1 Imunofenotypové profily pre AML nie inak špecifikovanú podľa WHO klasifikácie - podľa: Lucas a kol., 2023 [28].

AML s minimálnou diferenciáciou (FAB M0)	Expresia skorých hematopoetických antigénov: CD34, CD38, HLA-DR a ≥ 2 Myeloidné antigény: CD13, CD117, CD33 Chýba myeloidná a monocytová maturácia: CD11b, CD15, CD14, CD64, CD36, CD65 Možná pozitivita: MPO, CD7, TdT
AML bez vyzrievania (FAB M1)	MPO pozitivita a ≥ 1 Myeloidný antigén: CD13, CD117, CD33 Častá pozitivita: CD34, HLA-DR Zriedkavá pozitivita: CD11b Bez granulocytovej maturácie: CD15, CD65 Bez monocytovej maturácie: CD14, CD64 Aberantná expresia: CD7, CD2, CD4, CD19, CD56
AML s vyzrievaním (FAB M2)	Expresia HLA-DR, CD34, CD117, ≥ 1 Myeloidný antigén: CD13, CD33, CD65, CD11b, CD15 Zvyčajne bez monocytových znakov: CD15, CD36, CD64 Občasná aberantná expresia: CD7 Zriedkavé aberantné expresie: CD56, CD2, CD19, CD4 (najmenej zrelé blasty)
Akútna myelomonocytová leukémia (FAB M4)	Variabilná expresia: HLA-DR, myeloidných antigénov (CD13, CD33, CD65 a CD15), monocytových antigénov (CD14, CD64, CD11b, CD11c, CD4, CD36, CD68, CD163 a lyzozým) Monocytová diferenciacia: koexpresia CD15, CD36, výrazný CD64 Nezrelé blasty: CD34, CD117 Občasná aberantná expresia CD7
Akútna monoblastová a monocytová leukémia (FAB M5)	Variabilná expresia myeloidných antigénov: CD13, často výrazné CD33, CD15, CD65 Občasne: CD34+ Často: HLA-DR+ ≥ 2 znaky monocytovej diferencie: CD14, CD4, CD11b, CD11c, výrazný CD64, CD68, výrazný CD36 a lyzozým MPO pozitivita častejšie pri monocytovej leukémii ako monoblastovej Občasne aberantná expresia: CD7, CD56
Akútna erytroidná leukémia (FAB M6)	Pozitivita: CD71, E-kadherín, CD36, glykoforín, hemoglobín A, CD117 Možná expresia megakaryocytových znakov: CD41, CD61 Zvyčajne negatívne: HLA-DR, CD34
Akútna megakaryoblastová leukémia (FAB M7)	Expresia ≥ 1 doštičkový znakov: CD41, CD61 Pozitivita: CD36 Možná expresia: CD13, CD33 Negatívne: MPO, znaky granulocytovej diferencie Často negatívne: CD45, CD34, HLA-DR Občasná aberantná expresia: CD7
Akútna bazofilná leukémia	Pozitivita: CD13, CD33, CD123, CD203c, CD11b, CD9 Možná expresia: CD34, HLA-DR Negatívne: CD117, pre ďalšie monocytové znaky Občasná aberantná expresia: CD7

Určovanie imunofenotypov má aj prognostický význam pretože odrzkadľujú genetické aberácie v bunkách – tabuľka 2 [26].

Tab. 2 AML Imunofenotypové profily a genetické abnormality AML podľa WHO 2016 diagnostických kategórií - upravené podľa: Lucas a kol., 2023 [28].

AML s fúziou RUNX1::RUNX1T1	Výrazná expresia: CD34, HLA-DR, MPO, CD13 Slabá expresia: CD33 Ko-expresia: CD34 a CD15 Aberantná expresia: CD19, cCD79a Občasná expresia: TdT (slabá)
AML s fúziou CBFβ::MYH11	Komplexný imunofenotyp: Granulocytový: CD34, CD117, CD13, CD33, CD15, CD65, MPO Monocytový: CD34, CD117, CD11b, CD11c, CD4, CD64, CD36, lyzozým Expresia: CD2
APL s fúziou PML::RARA	Výrazné: CD33, CD64, MPO Často: CD117+ Znížená expresia: CD13 Nízke, absentné: CD15 Absencia: CD34, HLA-DR, CD11a, CD11b, CD18, CD65 Mikrogranulárny variant: CD34, CD2, CD13, CD64

Pokračovanie Tab. 2 AML Imunofenotypové profily a genetické abnormality AML podľa WHO 2016 diagnostických kategórií - upravené podľa: Lucas a kol., 2023 [28].

AML s fúziou KMT2A::MLLT3	Dospelí znaky monocytovej diferenciácie: Pozitívne: CD14, CD4, CD11b, CD11c, CD64, CD36, lyzozým Variabilné: CD34, Cd117, CD56 Deti: Výrazná expresia: CD33, HLA-DR, CD65, CD4 Nízka expresia: CD34, CD13, CD14
AML s fúziou DEK::NUP214	Nešpecifický myeloidný imunofenotyp: Pozitívne: MPO, CD117, CD34, HLA-DR, CD9, CD13, CD33, CD15, CD38, CD123 Občasná pozitivita: CD64, TdT Bazofilné znaky: Pozitívne: CD123, CD33, CD38 Negatívne: HLA-DR
AML s fúziou GATA2::MECOM	Pozitívne: CD34, CD33, CD13, CD117, HLA-DR Často pozitívne: CD38 Aberantná expresia: CD7 Občasná expresia megakaryocytových znakov: CD41, CD61 Vysoká expresia: CD34
AML s fúziou RBM15::MKL1	Expresia ≥1 doštičkového znaku: CD41, CD61 Pozitívny: CD36 Možná expresia: CD13, CD33 Často negatívne: CD45, CD34, HLA-DR Negatívne: MPO, TdT, lymfoidné znaky
AML s fúziou BCR::ABL1	Expresia: CD34, CD13, CD33 Aberantná expresia: CD19, CD7, TdT
AML s mutáciou NPM1	Častá pozitivita: CD117, CD123 Podtyp s monocytovým imunofenotypom: CD36+, CD64+, CD14+ Podtyp s nezrelým myeloidným imunofenotypom „APL-like“: Výrazná expresia: CD33, MPO+ Často nízke-chýbajúce: HLA-DR, CD34 Variabilné často nízke: CD13
AML s bialelickou mutáciou CEBPA	Vysoká expresia: CD34, CD117, HLA-DR Možná expresia: CD7, CD56 Asynchrónna maturácia-vysoká expresia: CD15, CD65, CD64, cMPO

Záver

Akútna myeloblastová leukémia je klinicky heterogénne nádorové ochorenie krvotvorby, pre ktoré je charakteristická akumulácia nezrelých elementov (blastov) myeloidnej línie v kostnej dreni, čo v konečnom dôsledku vedie k zlyhaniu krvotvorby - zastaveniu diferenciácie a neregulovanej proliferácii. Ochorenie sa najčastejšie vyskytuje v dospeljej populácii, incidencia stúpa s vekom. Priebeh je závažný - úmrtnosť je zo všetkých leukémií najvyššia.

Základom pre možnosti liečby je komplexná diagnostika uplatnená v klasifikácii, ktorá v sebe zahŕňa súbor jednoduchých histologických techník, cez imunofenotypizáciu až po moderné cytogenetické a molekulové vyšetrenia.

Zoznam bibliografických odkazov

- [1] Chang Ch-Ch, Kuzu A. What's new in AML Classification (WHO 2022 vs International Consensus. [online]. <https://www.cap.org/member-resources/articles/whats-new-in-aml-classification-who-2022-vs-international-consensus-classification>. [Accessed July 25, 2024].
- [2] Mrkvová Z, Horňák T, Jindra P, a kol. Doporučení pro diagnostiku a léčbu akutní myeloidní leukemie (AML) (mimo APL). [online]. https://www.hematology.cz/wp-content/uploads/2024/01/03-Akutni_myeloidni_leukemie-verze-01-2024.pdf. [Accessed September 25, 2024].
- [3] Assaad M, Kumar V, Carmack A, et al. 022. Acute Myeloid Leukemia With Central Nervous System Involvement Following Routine Surgical Procedures: A Bridge Between Surgical, Medical, and Neurological Critical Care. *Cureus*. 2022; 14; (1):e21245. <https://doi.org/10.7759/cureus.21245>.
- [4] Hoffman R, Benz JE, Silberstein EL, et al. *Hematology basic principles*. seventh edition. Philadelphia: ELSEVIER; 2018.

- [5] Gerds A, Seifter EJ, Berman R, et al, Acute Myeloid Leukemia Treatment - Health Professional Version [online]. https://www.cancer.gov/types/leukemia/hp/adult-aml-treatment-pdq#_451_toc. [Accessed July 28, 2024].
- [6] Adam Z, Belada D, Belohlavková P, a kol. *Léčebné postupyv hematologii- aktualizace 2022. Doporučení České hematologické společnosti České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně*. Česká hematologická společnost ČLS JEP; 2022.
- [7] Bain BJ, Béné MC. Morphological and Immunophenotypic Clues to the WHO Categories of Acute Myeloid Leukaemia. *Acta Haematologica*, 2019; 141(4), 232–244. <https://doi.org/10.1159/000496097>.
- [8] Tee-Melegrito R, Ranchod Y. *Acute myeloid leukemia (AML) morphology*. [online]. <https://www.medicalnewstoday.com/articles/acute-myeloid-leukemia-morphology>. [Accessed September 25, 2024]
- [9] Döhner H, W AH, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN. *Blood*. 2022; 140 (12): 1345–1377. <https://doi.org/10.1182/blood.2022016867>.
- [10] Kačírková P, Campr V a kol. *Hematoonkologický atlas krve a kostní dřeně*. Praha: Grada; 2007.
- [11] Castro L, Ibañeza B, Pérez L, et al. . 2016. Morphology of leukaemias. *Revista Médica del Hospital General de México*. 2016; 79 (2): 107-113. <https://doi.org/10.1016/j.hgmx.2015.06.007>.
- [12] Skopek R, Palusińska M, Kaczor-keller K, et al. Choosing the Right Cell Line for Acute Myeloid Leukemia (AML) *Research. Int J Mol Sci*. 2023; 24(6): 5377. <https://doi.org/10.1016/j.hgmx.2015.06.007>.
- [13] Ondrášik I, Filická J, Ondrášiková K. a kol. Laboratórna diagnostika akútnej myeloblastovej leukémie. *Zdravotnícke štúdie*. 2022; 14 (2): 52-56. <https://doi.org/10.54937/zs.2022.14.2.52-56>.
- [14] Keohane ME, Otto NC, Walenga MJ. *Rodak's Hematology Clinical Principles and Applications*. Sixth Edition. ELSEVIER. 2020.
- [15] Gupta M, Mahapatra M, Saxena R. Cytogenetics' impact on the prognosis of acute myeloid leukemia. *Journal of Laboratory Physicians*. 2019;11(2), 133–137. https://doi.org/10.4103/JLP.JLP_164_18.
- [16] Rosli A, Azlan A, Rajasegaran Y, et al. Cytogenetics analysis as the central point of genetic testing in acute myeloid leukemia (AML): A laboratory perspective for clinical applications. *Clinical and Experimental Medicine*. 2022; 23: 1137–1159. <https://doi.org/10.1007/s10238-022-00913-1>.
- [17] Čermák M, Hikkel I, Rotiková L, Urbán V. *Štandardný diagnosticko-laboratórny postup pre genetickú diagnostiku akútnej myeloidnej leukémie u dospelých (AML)*. 2020. [online]. https://health.gov.sk/Zdroje?Sources/dokumenty/SDTP/standardy/17-03-2021/SDLP-pre-geneticku-diagnostiku-akutnej-myeloidnej-leukemie-u-dospelych_AML.pdf [Accessed September 28, 2024].
- [18] Snaith O, Poveda-Rogers C, Laczko Dorotyya, et al. Cytogenetics and genomics of acute myeloid leukemia. *Best Practice & Research Clinical Haematology*. 2024;37(1): 101533. <https://doi.org/10.1016/j.beha.2023.101533>
- [19] Estey E, Kantarjian MH, Faderl HS. *Acute Leukemias*. Second Edition. Springer International Publishing. 2020.
- [20] Qin D. Molecular testing for acute myeloid leukemia. *Cancer Biology & Medicine*. 2022; 19(1): 4-13. <https://doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2020.0734>.
- [21] The american cancer society medical and editorial content team. 2023. *Tests for Acute Myeloid Leukemia (AML)*. [online]. <https://www.cancer.org/cancer/types/acute-myeloid-leukemia/detection-diagnosis-staging/how-diagnosed.html> [Accessed September 28, 2024].
- [22] Tiso F, Koorenhof-Scheele T, Huys U, et al. Genetic diversity within leukemia-associated immunophenotype-defined subclones in AML. *Annals of Hematology*. 2022;101(3), 571-579. <https://doi.org/10.1007/s00277-021-04747-x>.
- [23] McCoy PJ. *Immunophenotyping Methods and Protocols*. New York: Humana Press. 2019 <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9650-6>.
- [24] LI W. *Flow Cytometry in the Diagnosis of Leukemias*. In: Li W. editor. *Leukemia*. Brisbane (AU): Exon Publications. 2022. <https://doi.org/10.36255/exon-publications-leukemia-flow-cytometry>.
- [25] Herold CN, Mitra P. *Immunophenotyping*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. 2024. [online]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK558927/>. [Accessed September 24, 2024].
- [26] Means RT Jr, Rodgers GG, Glader B, et al. *Wintrobe's Clinical Hematology*. 15th Edition. Spojené štáty americké: Wolters Kluwer Health. 2023.
- [27] Gill H, Kwong Y-L. *Pathogenesis and Treatment of Leukemia*. Nemecko: Springer Nature Singapore. 2023. <https://doi.org/10.1007/978-981-99-3810-0>.
- [28] Fabienne L, Hergott BCh. Advances in Acute Myeloid Leukemia Classification, Prognostication and Monitoring by Flow Cytometry. *Clinics in Laboratory Medicine*. 2023; 43 (3): 377-398. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2023.04.005>.

Kontakt:

MUDr. Jaromír TUPÝ, PhD, MBA
Klinika hematológie a transfuziológie
ÚVN SNP-FN Ružomberok
ul. gen. M. Vesela 1
034 26 Ružomberok
e-mail: tupyj@uvn.sk