

Morfološka dijagnostika akutnih leukemija

Literatura za rešavanje testa

Morfološka dijagnostika akutnih leukemija

Literatura za rešavanje testa

Reč autora

Poštovani polaznici kursa,

U toku izlaganja trudili smo se da predstavimo sve novine i tehnike vezane za morfološku dijagnostiku akutnih leukemija.

Citomorfolologija je osnovna dijagnostička metoda i odlučujuća je za postavljanje dijagnoze akutnih leukemija (AL). Kao prva morfološka analiza preparata koštane srži i periferne krvi daje dovoljno podataka za pouzdano postavljanje dijagnoze akutne leukemije. Morfološka dijagnoza nas upućuje na dodatne analize kao npr.: citohemiska bojenja, citogenetske analize, imunofenotipizaciju protočnom citometrijom, molekularne analize. Morfološka dijagnoza pomaže u odabiru protokola, određuje prognozu i učestvuje u proceni rezultata lečenja.

Test se sastoji od 50 pitanja koja se zasnivaju na prezentovanom materijalu.

ŽELIMO VAM PUNO USPEHA U REŠAVANJU TESTA!

prim. dr Tomislav Vukićević

It Jasmina Mladenović

UZIMANJE UZORKA KOŠTANE SRŽI

Postoje dva različita uzorka koštane srži:

- ✓ aspirat koštane srži
- ✓ bioptat koštane srži

Aspirat koštane srži se uzima iz:

- ✓ sternuma (manubrijuma i korpusa sternuma)
- ✓ karlične kosti (iz prednje i zadnje kriste iliake)
- ✓ kod male dece iz potkolenice (tibije)

Biopsija koštane srži se radi iz karlične (bedrene kosti)

Veoma često, u zavisnosti od vrste analize koja se zahteva, radi se istovremeno i aspiraciona punkcija i biopsija koštane srži. Postupak je sledeći: odredi se mesto gde će se punktirati, napravi se dezinfekcija i ubrizga lokalno anestetik (Lidokain). Nakon nekoliko minuta, specijalnom iuglom za punkciju koštane srži, probija se koža, na mestu uboda anestetika, a zatim probija i periost kosti (ima se osećaj da se nakon kratkog otpora, igla propadne u prazninu – šupljinu). Izvlači se dren iz igle, namešta veći špric (20ccm³) i snažno aspirira. Koju količinu koštane srži ćemo uzeti zavisi od toga koje analize su planirane (osnovno bojenje, citohemija, citogenetika, imunofenotipizacija protočnom citometrijom, kulture na bakterije i viruse i drugo). Kada smo dobili željenu količinu koštane srži izvlači se igla zajedno sa špricom i vršimo raspodelu materijala prema vrsti analize (prave se razmazi na staklu za osnovno bojenje - May-Grunwald-Giemsma i citohemiska bojenja, materijal za citogenetiku se stavlja u epruvetu sa medijumom, a materijal za imunofenotipizaciju u posebnu epruvetu sa antikoagulansom).



Slika broj 1: *Punkcija koštane srži*

Nakon završene punkcije toštane srži na isto mesto se radi i biopsija ukoliko je potrebno. Biopsija se radi posebnom iglom za biopsiju koštane srži slika 2.



Slika broj 2: **Igla za biopsiju koštane srži**

Biopsija se izvodi na sledeći način: na mestu uboda za punkciju se skalpelom napravi mali rez oko 5mm za prolaz igle za biopsiju koštane srži. Igla za biopsiju takodje ima mandren. Iglom se udje kroz zasek do periosta kosti. Skida se mandren, igla namesti pod pravim uglom i izvrši pritisak na držač igle. Istovremeno sa pritiskom igla se vrti u pravcu kazaljke na satu. Kada se udje do 2cm (najmanje 1,5cm) izrše se nekoliko pokreta levo, desno i vadi igla. Posebnim mandrenom se istiskuje materijal iz šupljine igle i šalje na patohistološki pregled. Nakon završene biopsije na mestu uboda se stavlja sterilna gaza koja stoji do 48 sati. Kada je postupak završen, bolesniku se savetuje da odleži 5-10 minuta, a zatim da ustane i vrati se laganim uobičajenim aktivnostima. Ukoliko je srž uzeta iz potkolenice bolesniku se savetuje da hodanje svede na minimum. Ako se pojave postanestezioni bolovi preporučuje se uzimanje analgetika. Terapija traje do tri dana od uzimanja koštane srži.

Komplikacije: krvarenje, povišena telesna temperatura, povećanje intenziteta bola ili oticanje mesta odakle je uzeta srž su uglavnom komplikacije koje se mogu javiti. Generalno gledano ozbiljne komplikacije su vrlo retke, 0, 05%. U prva 24 sata ne preporučuje se kupanje.

KONTRAINDIKACIJE ZA PUNKCIJU I BIOPSIJU KOŠTANE SRŽI

Kontraindikacije se svode na bolesnike sa poremećenom koagulacijom (hemofilije) i na bolesnike na antikoagulantnoj terapiji.

Prema staroj klasifikaciji FAB (Francusko-Američko-Britanska) iz 1976 i 1985g. akutne leukemije se svrstavaju u dve osnovne grupe: akutne mijeloidne leukemije (AML) i akutne limfoblastne leukemije (ALL). Dalje se akutne leukemije dele na podtipove: AML: M0, M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7; ALL: L1, L2, L3. Ova podela se zasniva na morfološkim i citohemiskim osobinama blasta.

Nova klasifikacija svetske zdravstvene organizacije (SZO) iz 2001. i 2008. g. objedinjuje morfološke, imunološke, citogenetske, molekularne i kliničke karakteristike i AL deli u tri grupe:

1. Akutne mijeloidne leukemije i druge neoplazme mijeloidnih nezrelih ćelija.
2. Akutne leukemije linijski neodređenih ćelija
3. Akutne leukemije limfoidnih nezrelih ćelija-akutne limfoblastne. leukemije/limfoblastni limfomi

OSNOVNI MORFOLOŠKI KRITERIJUM ZA DIJAGNOZU AL

Po novim kriterijumima SZO nalaz 20% blasta i više u kostnoj srži (veoma često i u perifernoj krvi) je kriterijum za morfološku dijagnozu AL (po ranijem FAB kriterijumu 30% blasta u koštanoj srži). Predlog SZO je da osnovni kriterijum od 20% blasta može biti i manji (po pravilu ne manje od 18%) kod pojedinih tipova AL samo kada se nadju drugi bitni dijagnostički kriterijumi za dijagnozu kao: t(8;21) i t(6;9). Predlog SZO je i da AL nastale iz MDS-a se u principu aktivno ne leče dok procenat blasta ne predje 30% pod uslovom da je bolesnik stabilan (pristup se prilagođava svakom bolesniku pojedinačno). U AML-M4 i AML-M5 u blaste se broje i promonociti, a u AML-M3 u blaste se broje atipični promielociti. U AML-M6 kada je procenat blasta neeritoidne populacije veći od 20% a eritroidne ćelije više od 50% postavlja se dijagnoza AML-M6, a ako je procenat neeritoidnih blasta manji od 20% postavlja se dijagnoza MDS-a.

CITOMORFOLOGIJA BLASTA

Prilikom pregleda koštane srži procenjujemo:

- ✓ celularnost (hipocelularna, normocelularna i hipercelularna)
- ✓ procenat blasta na ukupan broj ćelija sa jedrom
- ✓ procenat zrelih ćelija granulocitne loze
- ✓ procenat eritroidnih ćelija (normoblasta)
- ✓ procenat monocitnih ćelija
- ✓ procenat eozinofila i bazofila

- ✓ opisati citomorfologiju blasta (veličina, izgled jedra i citoplazme, broj jedaraca, organele u citoplazmi)
- ✓ opisati megakariopoezu
- ✓ opisati, ako se nalazi, disgranulopoeza, deseritropoeza i distrombopoeza
- ✓ opisati, ukoliko se nalaze, ćelije koje ne pripadaju koštanoj srži

MORFOLOŠKI BLASTI SU:

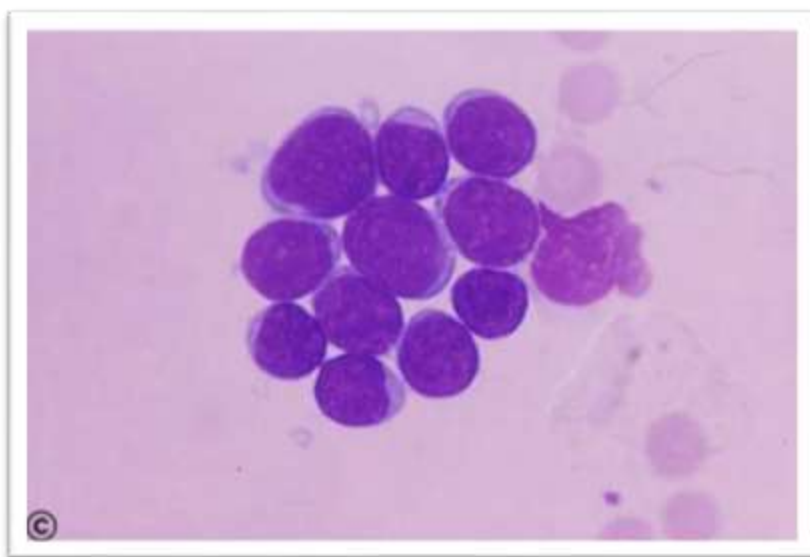
- tip I (bez azurofilnih zrnaca u citoplazmi)
- tip II (do 20 azurofilnih zrnaca u citoplazmi)
- tip III (više od 20 azurofilnih zrnaca u citoplazmi)

Nakon analize preparata koštane srži i periferne krvi bojenih osnovnom metodom May-Grunvald-Giemsa (MGG) potrebno je analizirati pozitivnost blasta na citohemiska bojenja: mijeloperoksidazu (MPO), Suda Black (SBB), per acid šif bojenje (PAS), nespecifičnu esterazu, kiselu fosfatazu, toluidin bojenje, bojenje na sideroblaste (morfološki kriterijum za deseritropoezu je 15% prstenastih sideroblasta).

Prema morfologiji i stepenu zrelosti blasta AML se dele u 9 podtipova (M0-M8)

M0 (AML MINIMALNO DIFERENTOVANA)

Morfološki se nalaze uglavnom blasti tipa I koji su POX; SBB i Esteraza negativni (pozitivno je manje od 3% blasta) te je potrebno dokazivanje mijeloidnih antigena imunohisohemiski ili protočnom citometrijom. U blastima se može naći i nezrela mijeloperoksidaza (MPO). Diferencijalna dijagnoza u M0 obuhvata i M7, mešovite AL i leukemisku fazu krupnoćelijskih limfoma.



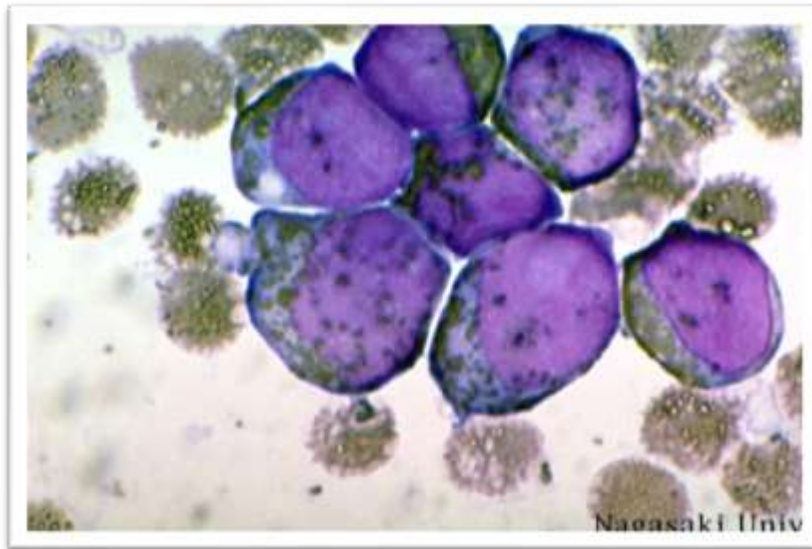
Slika broj 3: **AML-M0**

M1 (AML BEZ SAZREVANJA)

Blasti su srednje veličine, uglavnom tip I redje tip II. Auerovi štapići se nalaze izuzetno retko. Ima manje od 3% promijelocita (PoMy). MPO i SBB su pozitivni najmanje 3%, a najviše do 20%. Diferencijalno dijagnostički dolazi u obzir ALL i M2 kada je MPO i SBB na gornjoj granici.



Slika broj 4: *AML-M1*

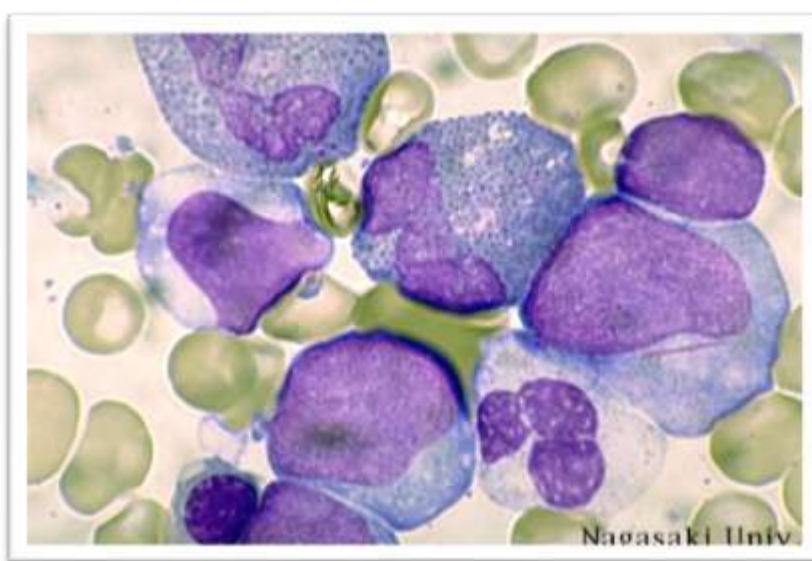


Slika broj 5: *AML-M1 MPO*

M2 (AML SA SAZREVANJEM)

Uglavnom su blasti tip II i nešto manje tip I. Često se u citoplazmi nalaze Auerovi štapići. Procenat monocita je manji od 20%. Najmanje 10% ćelija pokazuje sazrevanje u vidu PoMy i/ili zrelije ćelije od PoMy. Ponekad se nadju i znaci atipije u vidu pseudo-Pelgerova anomalija jedra i pseudo-Chediak granule u citoplazmi. Ako se nadju brojni eozinofili onda je to podtip M2eo koji nemaju citomorfološke promene kao u M4eo. U M2bazo se uz navedene morfološke karakteristike nalaze brojni bazofili. Više od 25% blasta je MPO i SBB pozitivno. Diferencijalna dijagnoza uključuje:

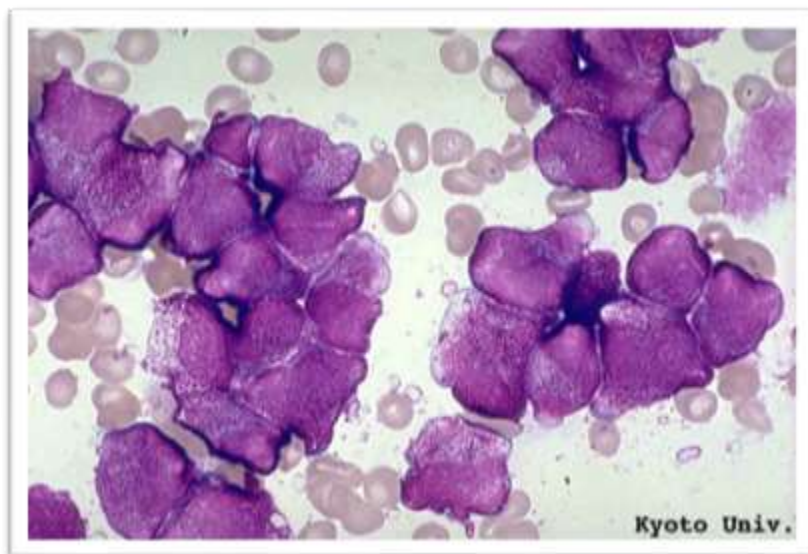
- ✓ refraktarnu anemiju s ekcesom blasta (RAEB II) kada je procenat blasta oko 20%
- ✓ M4 kod bolesnika sa većim % monocita.



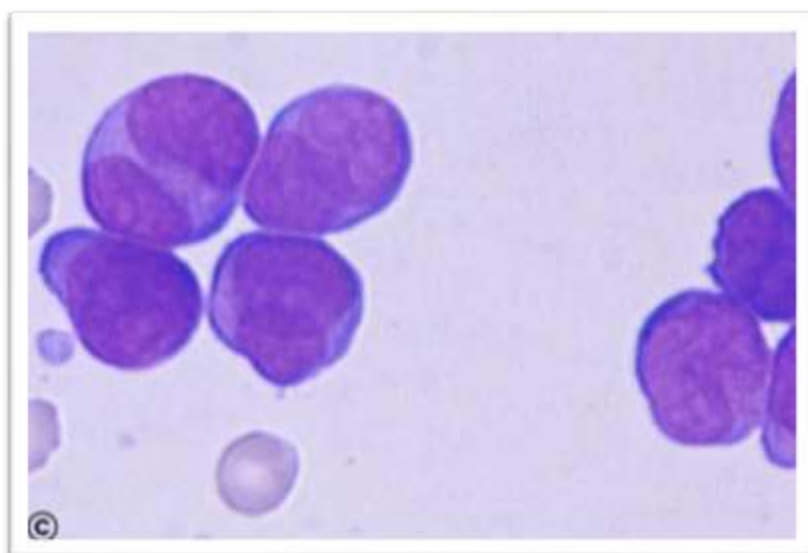
Slika broj 6: **AML-M2**

M3 (AKUTNA PROMIJELOCITNA LEUKEMIJA)

Blasti su uglavnom tip III i II (dominiraju atipični PoMy). U citoplazmi se nalaze brojni Auerovi štapići koji mogu formirati konglomerate „faggot cells“ (engl „faggots“). U mikrogranularnoj varijanti M3mikro u citoplazmi blasta se nalaze sitna prašinstva zrnca, a jedra su često bubrežasta. U M3 i M3mikro MPO i SBB su pozitivni u skoro 100% blasta. U M3bazo varijanti blasti i atipični PoMy u citoplazmi sardže brojna azurofilna i tamnoljubičasta zrnca a deo leukemijskih ćelija sazreva prema bazofilima koji su toluidin +. Blasti u M3bazo mogu biti MPO i SABB negativni ili slabo +.



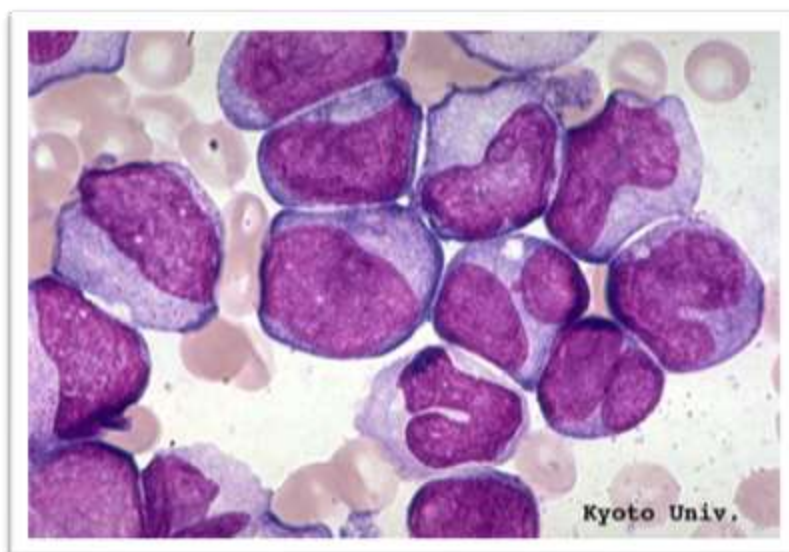
Slika broj 7: *AML-M3*



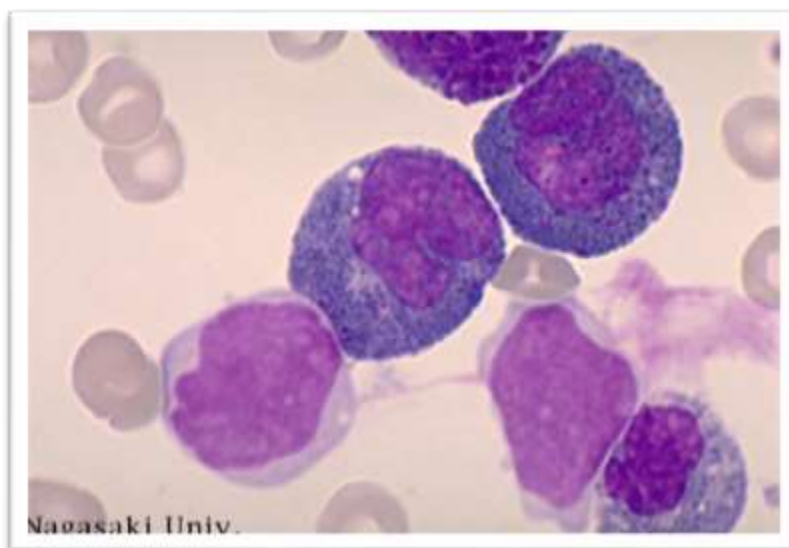
Slika broj 8: *AML-M3 - mikro*

M4 (AKUTNA MIJELOMONOCITNA LEUKEMIJA)

Nalaze se dve populacije blasta, mijeloblasti (MPO+) i monoblasti (nespecifična esteraza +), a svaka populacija prelazi 20% svih ćelija sa jedrom. Ponekad je samo mali procenat blasta MPO+, ali najmanje 3%. Katkad se u citoplazmi nalaze Auerovi štapići. U perifernoj krvi se često nalazi veći broj monocita ($\geq 5 \times 10^9$). U M4 eozinofilnoj varijanti (M4eo) nalaze se brojni eozinofili (više od 3%), a ako su udruženi sa inv(16) izražavaju i dodatne morfološke promene) veća jedra, pseudo-Pelgerova hiposegmentacija jedra, veće eozinofilne granule koje su ponekad tamnoljubičaste i tako brojne da prekrivaju jedro. Diferencijalna dijagnoza: M2, M5, hronična mijelomonocitna leukemija.



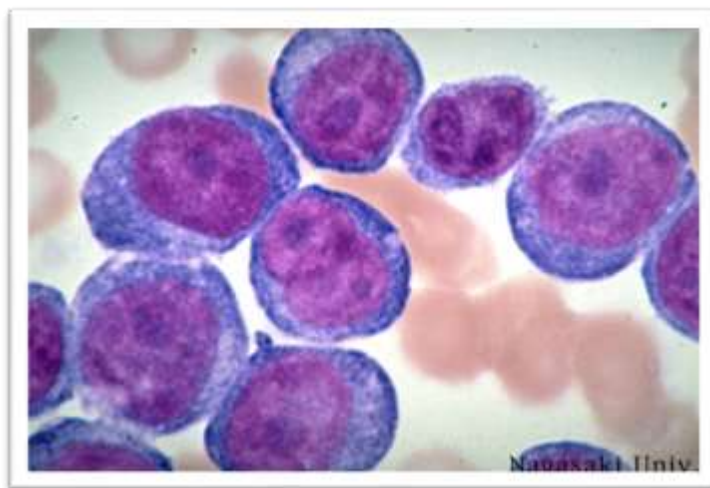
Slika broj 9: **AML-M4**



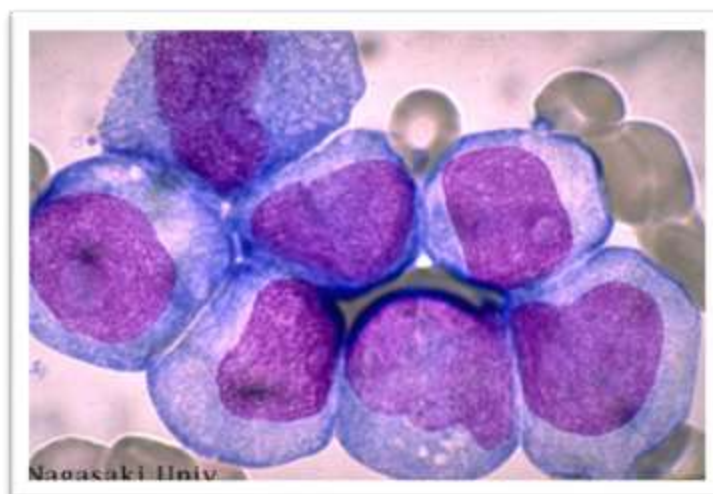
Slika broj 10: **AML-M4 - eo**

M5 (AKUTNA MONOBLASTNA I AKUTNA MONOCITNA LEUKEMIJA)

U M5a akutnoj monoblastnoj i M5b akutnoj monocitnoj leukemiji se nalazi više od 80% ćelija monocitnog porekla (monoblasti, promonociti i monociti) i manje od 20% mlađjih ćelija granulocitne loze. U M5a više od 80% blasta su monoblasti, a u M5b većinu leukemijskih ćelija čine promonociti. Monoblasti su velike ćelije s okruglim jedrom i obilnom bazofilnom citoplazmom, retkim azurofilnom zrcima u citoplazmi i često prisutnim vakuolama. Ponekad se mogu naći malobrojni Auerovi štapići. Promonociti imaju nepravilno jedro, obilnu i umereno bazofilnu citoplazmu sa izraženim azurofilnim zrcima i retkim vakuolama. Monoblasti, promonociti i monociti su nespecifična esteraza +. Kod M5a u 10 do 20% blasta nespecifična esteraza je negativna ili slabo pozitivna, pa se dijagnoza postavlja imunofenotipizacijom. Diferencijalno dijagnostički M5a treba razlikovati od M0, M1 i M7, prolimfocitne leukemije, a kada monoblasti imaju izrazito bazofilnu citoplazmu i brojne vakuole od ALL. L3 leukemije. Diferencijalno dijagnostički M5b razlikovati od M4, M3 mikro i od hronične mijelomonocitne leukemije.



Slika broj 11: **AML-M5a**

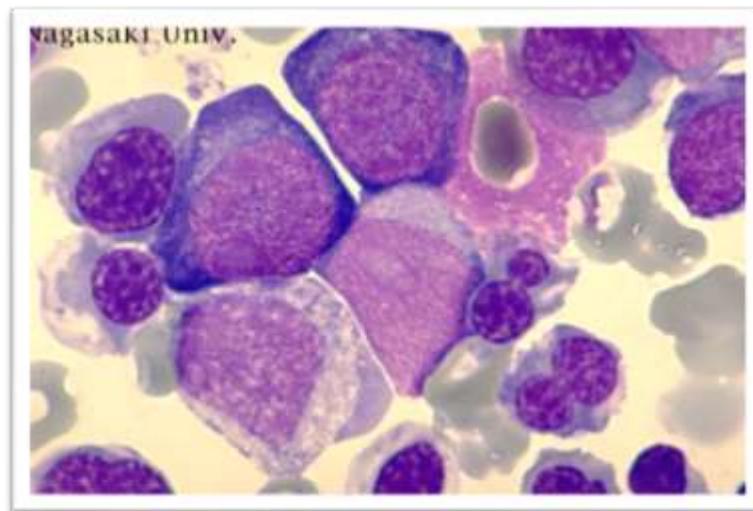


Slika broj 12: **AML-M5b**

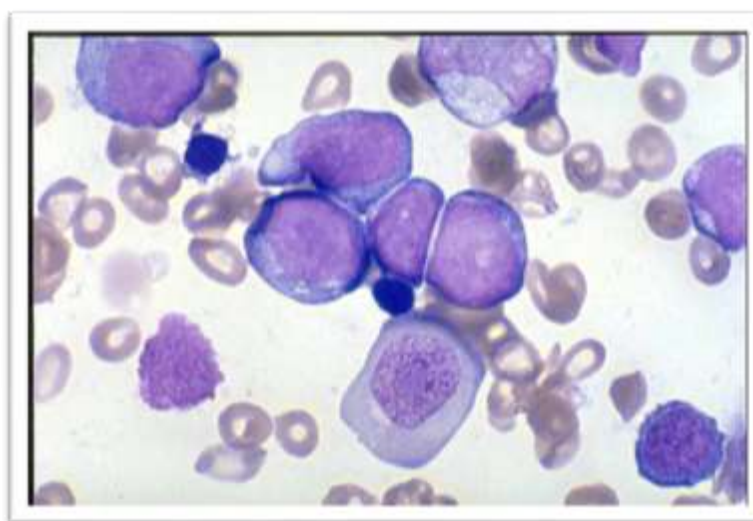
M6 (AKUTNA ERITROIDNA LEUKEMIJA)

Postoje dva podtipa: eritroidna/mijeloidna i čista eritroidna AML-M6. U eritroidnoj/mijeloidnoj leukemiji nalazi se više od 50% eritroidnih ćelija i više od 20% blasta neeritroidne populacije. Većina eritroblasta su atipični-nalaze se gigantski eritroblasti, često sa binuklearnim i multinuklearnim jedrima. Citoplazma je često vakuolizovana. Mijeloblasti mogu imati Auerove štapiće. Po pravilu je prisutna diseritropoeza i distrombopoeza. Blasti su MPO i SBB pozitivni dok su eritroblasti PAS pozitivni. U sklopu diseritropoeze mogu se naći prstenasti sideroblasti. U eritroidnom tipu M6 nalaze se nezreli eritroblasti s okruglim jedrima i sa izrazito bazofilnom citoplazmom.

Pojedine ćelije mogu imati vakuole. Eritroblasti su MPO i SBB negativni, a PAS reakcija je pozitivna. Diferencijalna dijagnoza M6 eritroidno/mijeloidna leukemija obuhvata RAEB, AML smijelodisplastičnim promenama, M2 s eritroidnom hiperplazijom, reaktivne hiperplazije posle terapije npr eritropoetinom. M6 eritroidni tip je sličan megaloplastnoj anemiji, AML-M7 i krupnoćelijskih limfoma.



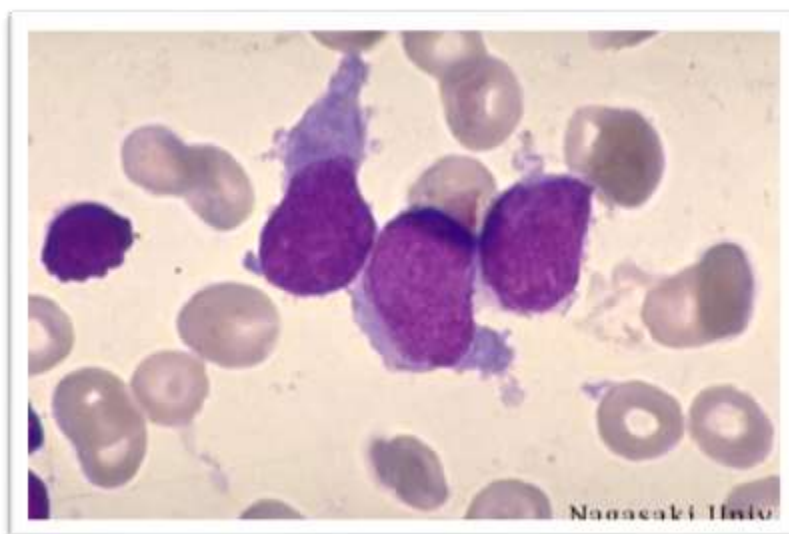
Slika broj 13: **AML-M6 čista eritroleukemija (sl2)**



Slika broj 14: **AML-M6 mielo/eritroleukemija (sl1)**

M7 (AKUTNA MEGAKARIOBLASTNA LEUKEMIJA)

U ovom tipu leukoze u koštanoj srži se nalazi najmanje 20% blasta i najmanje 50% leukemojskih ćelija megakariocitne loze (megakarioblasta). Megakarioblasti su srednje veliki i veliki sa nepravilnim i zarezanim jedrom. Citoplazma je bazofilna sa pseudopodijama. Često se nalaze mikromegakariociti. Prisutna je i diseritropoeza i disgranulopoeza. Kod pojedinih bolesnika se može naći izrazita fibroza koštane srži te se punkcijom ne može aspirirati kostna srž (suva punkcija). Blasti su MPO, SBB i esteraza negativni, a PAS postoji difuzna pozitivnost. Diferencijalno dijagnostički M7 je slična AML-M0, AML s mijelodisplastičnim promenama, mijelofibrozi.



Slika broj 15: **AML-M7**

M8 (AKUTNA BAZOFILNA LEUKEMIJA)

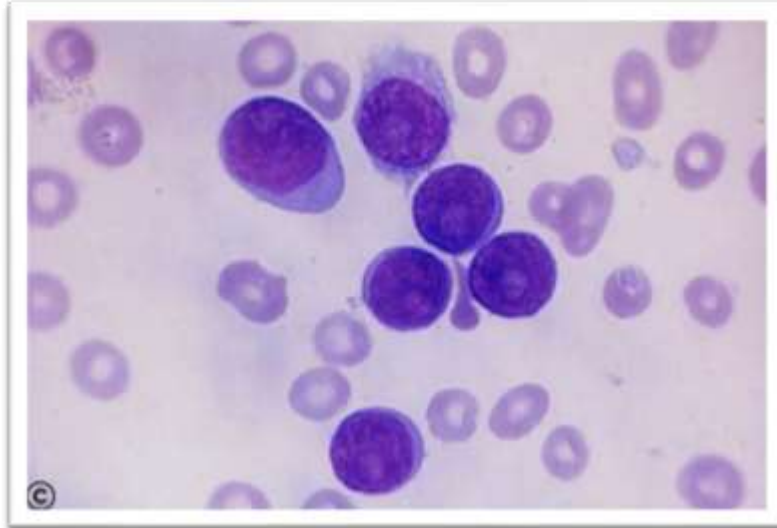
Blasti su srednje veličine sa velikim ponekad s bilobularnim jedrom u kome su do tri jedarca i oskudom bazofilnom citoplazmom sa velikim bazofilnim granulama koja se boje na toluidin. MPO i SBB i esteraza su negativni, a blasti su po pravilu toluidin pozitivni. Diferencijalno dijagnostički M8 treba razlikovati od leukoza u blastnoj transformaciji hroničnih mijeloproliferativnih bolesti, od AML s t (6;9) koja po pravilu ima višak bazofila.

ALL se prema morfoloiji (FAB kriterijumi) deli na:

- ✓ ALL-L1,
- ✓ ALL-L2,
- ✓ ALL-L3

ALL-L1 (ALL/NHL LIMFOBLASTNI TIP – SZO)

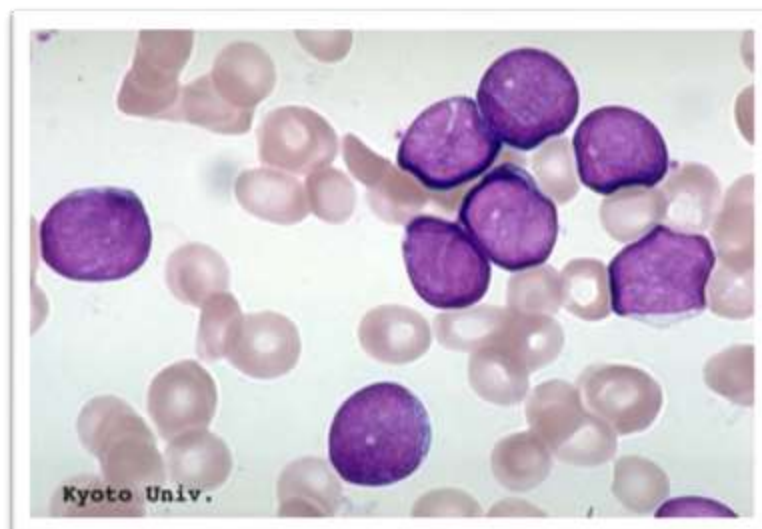
Blasti su većinom mali, pretežno jednake veličine. Jedro je okruglo i u jedru se uglavnom ne uočavaju jedarca. Citoplazma je bazofilna, oskudna sa veoma retkim vakuolama.



Slika broj 16: *ALL-L1*

ALL-L2

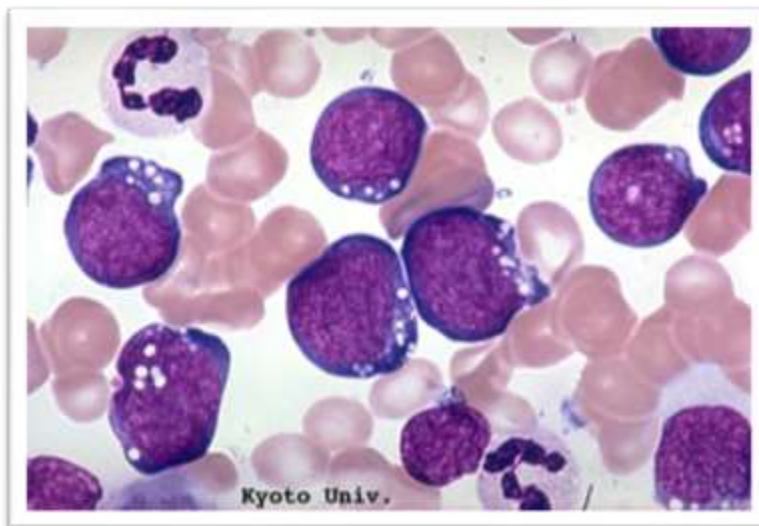
Limfoblasti su različite veličine i oblika. U jedru su vidljiva jedarca. Blasti imaju različitu količinu citoplazme koja je različitog intenziteta prebojenosti. Mogu se naći retke vakuole.



Slika broj 17: *ALL-L2*

ALL-L3

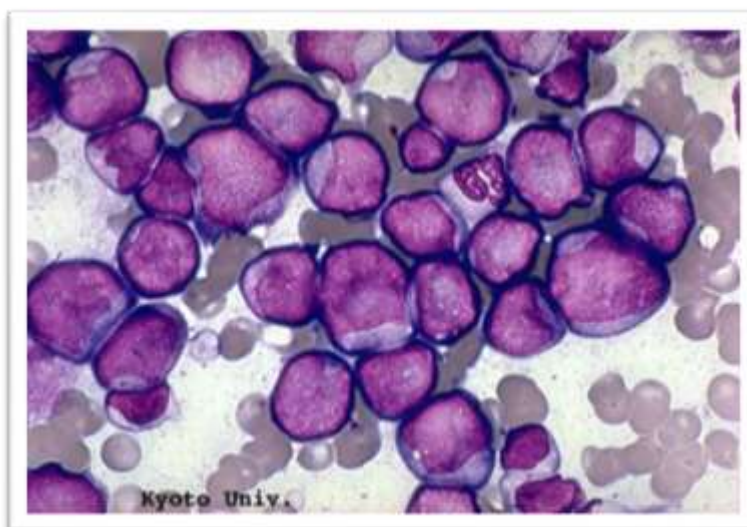
Nalaze se veliki limfoblasti sa okruglim jedrom sa vidljivim jedarcima. Citoplazma je izrazito bazofilna sa brojnim vakuolama. Citomorfologija u ALL-L3 je slična ćelijama u Burkitt-ovom limfomu.



Slika broj 18: *ALL-L3*

AKUTNE MEŠOVITE-LINIJSKI NEODREDJENE LEUKEMIJE

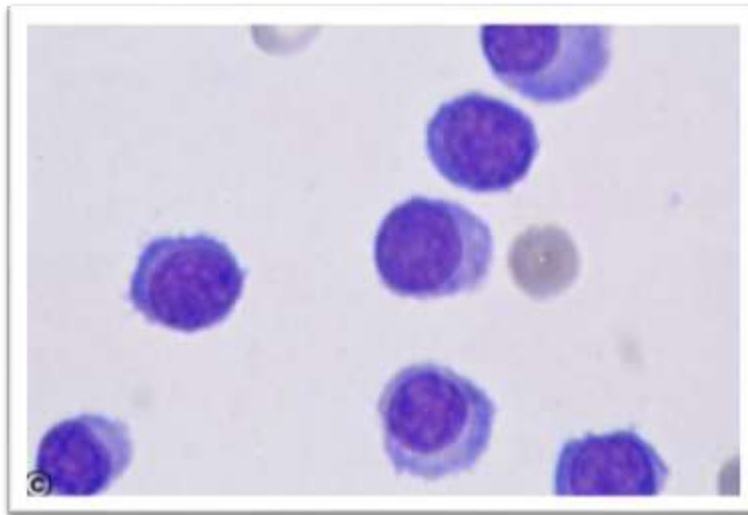
U kostnoj srži se zapažaju dve, morfološki i citihemiski, različite populacije blasta koje treba obavezno identifikovati imunofenotipski. U NK/mijeloidnoj (Natural Kiler/mijeloidnoj) leukemiji se mogu morfološki naći: limfoblasti, nediferencirani blasti ili blasti kao u M1. U NK/mijeloidnoj leukemiji se opisuju blasti kao u M3 akutnoj promijelocitnoj leukemiji i morfološki sličnoj leukemiji u M8.



Slika broj 19: *Akutna leukemija linijski neopredeljenih ćelija (nediferentovana)*

BLASTNI PLAZMOCITOIDNI TUMOR DENDRITIČNIH ĆELIJA (PLAZMA LEUKEMIJA)

Morfološki kriterijum za ovu leukemiju je više od 20% plazmocitoidnih ćelija (plazmoblasta) i u koštanoj srži i perifernoj krvi. Ćelije su sa intenzivnom plavom citoplazmom, sa ekscentrično postavljenim jedrom. U jedru se ne zapažaju jedarca kao ni organewle u citoplazmi.



Slika broj 20: *Plazma leukemija*

Cilj inicijalnog lečenja (uvodne terapije) je postizanje remisije bolesti. Kriterijum za remisiju bolesti je: manje od 5% blasta u koštanoj srži, bez blasta u perifernoj krvi, broj neutrofila veći od $1,0 \times 10^9$, trombociti veći od 100×10^9 . Remisija se određuje prevažno pregledom punktata koštane srži.

Samo na osnovu morfolologije ne može se sa sigurnošću zaključiti dali se radi o regeneraciji zdrave hematopoeze i dali su u koštanoj srži zaostale malodbojne maligne ćelije (MRD – minimal residual disease). Samo u dva morfološka tipa AL, AML-M3 i ALL-L3 se može na osnovu morfolologije zaključiti da postoji MRD.

MORFOLOŠKA DIJAGNOSTIKA AKUTNIH LEUKEMIJA

Morfologija je osnovna metoda i dijagnostici akutnih leukemija. Morfologija je zasnovana na karakterističnom izgledu leukemijskih ćelija u pojedinim tipovima akutnih leukemija. Kao prva analiza u dijagnostici akutnih leukemija daje dovoljno podataka za pouzdanu dijagnozu. Na osnovu morfološke dijagnoze određuju se dodatni dijagnostički postupci (citogenetika, imunofenotipizacija, molekularne analize), vrši se klasifikacija, opredeljuje terapija, određuje prognoza. Materijal za morfološku analizu je razmaz periferne krvi i razmaz aspirata koštane srži bojeni osnovnom bojom Mej-Grinvald-Gimza.

Na osnovu morfologije blasta napravljena je FAB klasifikacija (1976, 1985g.), a danas je važeća klasifikacija Svetske Zdravstvene Organizacije (SZO) iz 2001 i 2008g. koja objedinjuje morfološke, imunološke, citogenetske i molekularne karakteristike. Po kriterijumima SZO iz 2008g. nalaz više od 20% blasta u koštanoj srži je kriterijum za dijagnozu akutne leukemije (ranije važio kriterijum više od 30% blasta u koštanoj srži – FAB kriterijum). Morfološka analiza punktata koštane srži podrazumeva određivanje: celularnosti (normocelularna, hipocelularna, hiperocelularna), određivanje procenta blasta na ukupan broj ćelija sa jedrom, procenat zrelih ćelija granulocitne loze, procenat eritroidnih ćelija (normoblasta), procenat monocitnih ćelija, procenat eozinofila, bazofila, limfatičnih ćelija i procenat plazma ćelija. Opisati morfologiju ćelija koje ne pripadaju koštanoj srži (meta) ukoliko se nadju. Opisati megakariocitopoezu. Veoma je važno opisati morfologiju blasta. Opisuje se jedro, jedarca u jedru, citoplazma i organele u citoplazmi. U akutnoj mijeloidnoj leukemiji (AML) veoma je važno odrediti kako procenat blasta tako i tip blasta (tip I, II, III) jer to veoma često određuje kom tipu AML-a pripada leukoza koja se analizira. U akutnoj limfoblastnoj leukemiji (ALL) morfološki postoje tri tipa blasta: mali limfoblasti prisutni u ALL-L1 (po FAB-u), limfoblasti različite veličine u ALL-L2 i veliki limfoblasti s vakuolizovanom citoplazmom u ALL-L3.

Nakon postavljanja dijagnoze pristupa se terapiji. Hemoterapija ima za cilj eradikaciju malignog klona tj postizanje kompletne remisije (KR). Glavni kriterijum za kompletnu remisiju je manje od 5% blasta u koštanoj srži.

LITERATURA NEOPHODNA ZA PRIPREMU KANDIDATA ZA REŠAVANJE TESTA

- ✓ **Williams**
 - *Hematology*
- ✓ **Benett JM, Catovsky D Daniel MT, Flandrin G, Galtan DA Gralnick HR, et al**
 - *Proposed criteria for the classification of acute myeloid leukemia. Ann inter Med 1985; 103: 626-629*
- ✓ **Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW,**
 - *WHO clasification of tumors of hematopoetic and lymphoid tissues. Lyon: International agency for research on cancer; 2008; 110-178*
- ✓ **Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwita, et al.**
 - *The 2008 revision of the World Health Orgatization (WHO) Classification of myeloid neopšlasms and acute leukemia: Blood 2009;114. 5937-951*
- ✓ **Dohner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Thomas Buchner, Burnett AK, et ol.**
 - *Diagnosis and managment of acute myeloid leukemia in adults: Blood 2010; 453-474.*