

DIAGNOSTIKA LEVKEMIJ

Helena Podgornik

Povzetek. Akutne levkemije so model celovitega in sodobnega pristopa k diagnostiki, ki se je uveljavil tudi pri drugih malignih krvnih boleznih. Biološko so akutne levkemije tako heterogene bolezni, da postavev diagnoze zahteva širok nabor laboratorijskih preiskav: citomorfologijo, imunofenotipizacijo z večparametrično pretočno citometrijo, citogenetiko z analizo proganih kromosomov in fluorescenčno hibridizacijo *in situ* ter molekularno genetiko.

Citomorfološki pregled krvi oziroma kostnega mozga je izhodiščna preiskava za postavitev diagnoze. Nekatere specifične najdbe kažejo na nekatere imunofenotipske in genetske značilnosti. Imunofenotipizacija je ključna za opredelitev celične vrste in tako tudi za izbiro zdravljenja ter njegov čim hitrejši začetek. Kromosomske in genetske preureditve omogočajo natančno postavitev diagnoze v skladu z razvrstitvijo levkemij Svetovne zdravstvene organizacije (SZO). Hkrati so tudi močan napovedni dejavnik. Značilni imunofenotip levkemičnih celic ter molekularnogenetski označevalci kasneje služijo za spremljanje učinkovitosti zdravljenja oziroma občutljivo zaznavajo morebitne ponovitve bolezni po doseženi remisiji. Zlasti takrat, ko ne dobimo ustreznega ali zadostnega vzorca za preiskave, je potrebno opraviti tudi histopatološke preiskave. Smiselno je, da diagnostiko vodimo stopenjsko, in pri tem združujemo in primerjamo vse izsledke. Končni rezultat mora biti hitra in natančna postavitev diagnoze, celovita opredelitev napovednega pomena in določitev morebitnih označevalcev za kasnejše spremljanje učinkovitosti zdravljenja.

UVOD

Pojem levkemije obsega raznovrstne akutne in kronične maligne novotvorbe. Še zlasti akutne levkemije (AL), mieloblastne (AML) in limfoblastne (ALL) so zaradi raznolikih mehanizmov levkemogeneze izjemno heterogene bolezni, njihovo prepoznavanje pa je zahtevno (1). Če je pred tridesetimi leti diagnostika levkemij v celoti slonela na morfoloških lastnostih levkemičnih celic, danes uporabljamo razne preiskovalne načine, ki vključujejo tudi najnovejšo razpoložljivo tehnologijo. Celovitost informacij, ki jih na ta način dobimo, ni uporabna več le za natančno opredelitev bolezni in njeno razvrstitev, pač pa tudi za individualno načrtovanje zdravljenja in spremljanje njegove učinkovitosti (2). Pri vsakem bolniku, kjer obstaja sum na AL, je potrebno opraviti citomorfološki pregled kostnega mozga, določiti imunofenotip levkemičnih celic s pretočno citometrijo, analizirati kariotip z analizo proganih kromosomov in potrditi ali izključiti nekatere genetske preureditve z molekularno citogenetiko in molekularno genetiko. Govorimo o t. i. multimodalnem pristopu, saj vsaka od teh preiskav pravzaprav sodi na svoje diagnostično oziroma raziskovalno področje (2). Ker gre za zahtevne in dolgotrajne postopke, ki so obenem tudi dragi, je smiselno uporabljati jasne diagnostične algoritme, ki pripeljejo z najmanjšim številom korakov do celovite informacije v najkrajšem času (1). Ti algoritmi morajo upoštevati biološko raznolikost levkemij glede na vrsto celic (mieloična/limfatična), stopnjo

dozorevanja ob maligni transformaciji (akutna/kronična) kot tudi starost bolnika (odrasli/otroci).

VZORCI ZA PREISKAVE

Punkcija kostnega mozga je poseg, s katerim dostopamo do ključnega vzorca za vse nadaljnje preiskave, ki jih opravimo pri bolnikih, kjer sumimo na levkemijo. Če je punkcija suha, lahko ob levkocitozi in večjem deležu nezrelih celic opravimo nadaljnje preiskave tudi na vzorcu venske krvi. Lahko pa celice osamimo iz biopsijskega stebrička, ki se sicer odvzame za histološke preiskave. Pri izbiri ustreznega antikoagulanta upoštevamo, da na morfologijo celic nesprejemljivo vpliva heparin, za rast celic v gojišču, ki je potrebna za citogenetske preiskave, pa je toksičen EDTA (1). Za to, da preiskave lahko dobro napravimo, potrebujemo 5–10 mL kostnega mozga, odvzetega z EDTA in 2–5 mL vzorca, vzetega z Na-heparinom. Vzorec mora dospeti v laboratorij najkasneje v 24 urah.

Citomorfološki pregled kostnega mozga

Citomorfološki pregled kostnega mozga je temeljna preiskava pri krvnih boleznih. Priprava tehnično brezhibnih preparatov stisnjencev kostnega mozga je prvi pogoj za uspešno oceno morfoloških značilnosti krvnih celic. Za vsakega bolnika pripravimo vsaj pet stisnjencev in razmaz kostnega mozga, ki jih posušimo na zraku. Dobro sušenje zagotavlja ustrezno obarvanje celičnih struktur po Papenheimu ali Mayu, Grünwaldu in Giemsi. Preparate mikroskopsko pregledamo najprej pri majhni (100-kratni) in nato pri imerzijski (1.000-kratni) povečavi. Pri levkemijah je kostni mozeg praviloma hipercelularen, pri AL tlakovan z blastnimi celicami. Da lahko postavimo diagnozo AL, mora doseči delež infiltracije z blastnimi celicami v kostnem mozgu vsaj 20 %, diferencirali naj bi najmanj 500 celic z jedri v dveh preparatih (3). Ocenjujemo predvsem morfološke lastnosti nezrelih celic. Izvid citološkega pregleda kostnega mozga mora vsebovati opis celularnosti, eritropoeze in mielopoeze, razmerje med mieloično in eritrocitno vrsto (G : E), število megakariocitov, limfocitov in plazmatk ter podrobnejši opis morebitnih patoloških celic (blasti). Če je mogoče, pa tudi diagnozo (3). Citomorfološki pregled kostnega mozga je hiter in poceni, zato tudi nujno potreben pred nadaljnjimi časovno zahtevnimi in dragimi postopki, predvsem v izogib nepotrebnim preiskavam (4).

Pretočna citometrija

Pretočna citometrija je z velikim napredkom v razvoju pretočnih citometrov z večjim številom laserjev ter z razširitvijo nabora protiteles in fluorokromov

doživela v zadnjem desetletju pravo renesanso (5). Imunofenotipizacija je pri AL in kronični limfatični levkemiji (KLL) ključna preiskava za postavitev diagnoze. Izrazito pa pridobiva na pomenu pri določanju minimalne preostale bolezni (*minimal residual disease*, MRD) po zdravljenju.

Izbira protiteles, ki jih bomo določali v posameznem vzorcu, je odvisna od razpoložljivih podatkov: napotne diagnoze, izsledkov poprejšnjih imunofenotipizacij, drugih laboratorijskih rezultatov, še najbolj pa od morfoloških najdb in značilnosti (5). Nabori protiteles, ki jih uporabljamo, so iz t. i. primarnega in sekundarnega panela. Iz primarnega so namenjeni opredelitvi celičnih populacij v vzorcu in identifikaciji morebitne patološke populacije ter njene velikosti. Poleg splošnega označevalca krvnih celic CD45 in najznačilnejšega označevalca krvotvornih matičnih celic CD34, primarni paneli vsebujejo t. i. linijske označevalce, s pomočjo katerih hitro lahko ugotovimo vrsto akutne levkemije. V Tabeli 1 so navedeni označevalci, ki jih najpogosteje uporabljamo pri sestavi primarnih panelov. S sekundarnimi paneli opredeljujemo označevalce, ki so specifični za poprej določeno vrsto (limfatično ali mieloično). Za pozitivnost posameznega označevalca uporabljamo različne izključitvene vrednosti, vendar večinoma 20 % (6). Obširen nabor protiteles za zaznavanje dozorevanja, diferenciacije in morebitnega aberantnega izražanja v sekundarnih panelih je namenjen celoviti opredelitvi levkemičnega imunofenotipa. Izbira protiteles in fluorokromov pri sestavi panelov je prepuščena laboratorijem, vendar so osnovni nabori protiteles, ki jih pri posamezni skupini levkemij določamo, mednarodno dogovorjeni (5). Tehnični razvoj na tem področju pa spodbuja tudi poskuse standardizacije imunofenotipizacije levkemij in limfomov.

Na osnovi morfoloških lastnosti in imunofenotipa celic razvrščamo AL v skladu s t. i. klasifikacijo FAB (AML M0-M7 in ALL L1-L3), kar večinoma tudi zadošča za začetek zdravljenja (4). Hitrost in precejšnja natančnost diagnoze praviloma že na sam dan punkcije kostnega mozga sta izraziti odliki pretočne citometrije (7). Celovita opredelitev imunofenotipa z zaznavanjem specifičnih antigenov pa omogoča kasnejše spremljanje uspešnosti zdravljenja in določitev MRD. Trenutno je metoda standardizirana in uveljavljena pri spremljanju uspešnosti zdravljenja ALL pri otrocih ter pri KLL.

Izvid, ki ga izdamo, mora vsebovati opis vseh celičnih populacij, predvsem pa značilnosti morebitne patološke populacije z njeno številsko določitvijo. Najdbe opredelimo diagnostično, zapišemo pa tudi tisto, kar je še treba določiti za končno postavitev diagnoze (npr. določitev t(15;17) pri akutni promielocitni levkemiji (APL)).

Tabela 1. Antigeni, ki jih najpogosteje uvrščamo v primarni nabor protiteles pri diagnostiki akutnih levkemij.

B-limfatični	T-limfatični	Mieloični	Linjsko nespecifični
CD10	CD2	CD13	CD34
CD19	CD3	CD117	CD45
CiCD79a	CD7	CiMPO	TdT
	CiCD3		

Citogenetske preiskave

Zadnja izdaja klasifikacije hematoloških novotvorb Svetovne zdravstvene organizacije (SZO) navaja devet podskupin AML in sedem podskupin ALL s ponavljajočimi se genetskimi preureditvami (8). Za natančno opredelitev bolezni moramo torej s citogenetskimi in molekularnogenetskimi preiskavami nujno potrditi ali izključiti najmanj teh 16-ih genetskih sprememb. Natančna opredelitev je še zlasti pomembna takrat, ko narekuje izbiro zdravljenja. Tako je ne glede na morfološke posebnosti in specifični imunofenotip bistveno, da dokažemo translokacije t(15;17) pri APL in translokacije t(9;22) pri kronični mieloični levkemiji (KML) oziroma ALL.

Za analizo proganih kromosomov potrebujemo deleče se celice. Zato je potrebno praviloma kratkotrajno (24–72 ur) gojenje celic z dodatki ustreznih citokinov, da jih privedemo v metafazo celične delitve, v kateri kromosome lahko analiziramo. Pri vsakem vzorcu pregledamo vsaj 20 metafaz. Preiskava proganih kromosomov omogoča navkljub majhni ločljivosti širok vpogled v genom in maligne spremembe. Ta relativno stara in delovno intenzivna preiskava zato ostaja zlati standard diagnostične obravnave bolnika z levkemijo.

Fluorescenčna hibridizacija *in situ* (FISH) je molekularno citogenetska preiskava, ki je v nasprotju s standardno citogenetsko preiskavo tarčna. Z njo potrjujemo oziroma izključujemo tiste preureditve, ki so bodisi diagnostično bodisi napovedno pomembne. Pred standardno citogenetsko preiskavo ima dve izraziti prednosti. Ne potrebujemo delečih se celic, torej jo lahko izvajamo na interfaznih jedrih neposredno brez gojenja, zato je hitrejša. Omogoča pa tudi natančnejšo oceno velikosti klona, saj lahko ovrednotimo bistveno večje število celic. Zato je uporabna tudi za sledenje velikosti klona in nekoliko tudi za določitev MRD. Za preiskavo FISH potrebujemo DNA-sonde, s katerimi zaznavamo tarčne preureditve. Nabor DNA-sond, ki jih posamezni laboratorij uporablja v diagnostiki levkemij, je prepuščen njegovi presoji in finančnim zmožnostim. Citogenetske smernice pri AL predpisujejo le testiranje navzočnosti translokacije t(12: 21) pri otroških ALL (9), večina laboratorijev pa vključuje v rutinsko testiranje še preureditve gena *MLL* zaradi njihove številnosti in pogoste kriptičnosti. Bolje usklajeni so nabori sond za

opredelitev napovednega pomena pri KLL, kjer je zaznavanje delecije gena *TP53* ključno tudi za ustrezno izbiro zdravljenja.

Izvid citogenetske preiskave mora vsebovati kariotip v skladu z ISCN (*International System of Human Cytogenetic Nomenclature*). Poleg tega pa še mnenje, v katerem na razumljiv način opišemo najdene preureditve, ki jih diagnostično in napovedno umestimo (9). Pri večini bolezni razlikujemo tri napovedne skupine: ugodno, vmesno in neugodno (10). Napovedni pomen je opredeljen le pri ponavljajočih se kromosomskih preureditvah, tistih torej, ki se pojavljajo pri večjem številu bolnikov z enako boleznijo. Te najdemo pri približno tretjini bolnikov z AML in polovici bolnikov z ALL ter pri 80 % bolnikov s KLL. Poleg njih standardna citogenetska preiskava lahko razkrije še kompleksne preureditve, ki so napovedno praviloma neugodne, med katerimi je še posebej neugoden t. i. monosomni kariotip. Nekatere najpogostejše in klasifikacijsko pomembne preureditve z možnimi načini določanja so predstavljene v Tabeli 2.

Tabela 2. Napovedni pomen nekaterih pogostejših in klasifikacijsko pomembnih ponavljajočih se genetskih preureditev pri akutnih levkemijah ter načini njihovega določanja.

Vrsta levkemije		Preureditev	Napovedni pomen	Načini določanja
AML	APL	t(15;17) (q22;q21)	ugoden	kariotipizacija FISH PCR
	levkemije CBF	t(8;21) (q22;q22)	ugoden [#]	
		inv (16) (p13;q22)		
		t(9;11) (q34;q23)	vmesen	
		t(6;9) (p22;q34)	neugoden	
		inv (3) (q21;q26)		
	normalni kariotip	mutacija v genu <i>NPM1</i>	ugoden*	PCR
	mutacija v genu <i>CEBPA</i>	ugoden*		
	duplikacija v genu <i>FLT3</i>	neugoden*		
ALL		t(9;22) (q34;q11)	neugoden	kariotipizacija FISH PCR
		t(4;11) (q21;q23)	neugoden	
		t(12,21) (p13;q21)	ugoden	FISH PCR
		hiperdiploidni kariotip	ugoden	kariotipizacija FISH
		hipodiploidni kariotip	neugoden	
Vse		kompleksno preurejeni kariotip	neugoden	kariotipizacija

[#] vmesen pri potrjeni mutaciji *c-KIT*; *odvisen od sopojavljanja vseh treh mutacij

Molekularnogenetske preiskave

Pri približno polovici bolnikov z AL ne najdemo nobenih kromosomskih preureditev, govorimo o normalnem kariotipu. Pri teh bolnikih je za opredelitev napovednega pomena nujno potrebno opraviti vsaj določitev mutacij v genih *NPM1* in *CEBPA* oziroma tandemsko duplikacijo v genu *FLT3*. To izvedemo z metodami molekularne genetike.

Verižna reakcija s polimerazo (PCR), kvantitativna PCR in sekveniranje zahtevajo poprejšnjo izolacijo nukleinskih kislin. Najprej s pomočjo centrifugiranja na gostotnem gradientu z uporabo fikola osamimo mononuklearne celice kostnega mozga ali venske krvi. Nato iz njih izoliramo DNA in RNA, ki sta osnova za nadaljnje analize. V hematologiji raje preiskujemo RNA, ki jo tudi prednostno izoliramo takrat, ko je materiala (pre)malo (10).

Tako kot FISH so tudi metode molekularne genetike (z izjemo sekveniranja naslednje generacije, ki mora še najti prostor v rutinski uporabi), tarčne. Z njimi torej potrjujemo ali izključujemo ponavljajoče se genetske spremembe, ki so posledica translokacij oziroma mutacij v posameznih genih. Z nekaterimi izvedbami preiskave PCR, kakršni sta MLPA (*Multiplex ligation-dependent probe amplification*) ali multipleks PCR, lahko istočasno določamo širok nabor fuzijskih genov. Te preiskave so v pomoč predvsem takrat, ko standardna citogenetska preiskava ne uspe, oziroma ko so translokacije nezaznavne na citogenetski ravni (t. i. kriptične). Določanje mutacij v genih pa je potrebno predvsem pri normalnem kariotipu. Izjema je določanje mutacije c-KIT, ki pri levkemijah s translokacijo t(8;21) in inv (16) (CBF levkemije) spremeni sicer ugoden napovedni pomen v vmesnega (10).

Največja odlika molekularnogenetskih metod je njihova velika občutljivost. Ta dosega vrednosti 1×10^{-5} do 1×10^{-6} , kar omogoča tako ugotavljanje odziva na zdravljenje kot zaznavanje MRD, in posledično zgodnje terapevtsko posredovanje. Zaenkrat je določanje MRD s kvantitativno PCR-preiskavo standardizirano pri APL, ALL in KML, pričakuje pa se tudi pri levkemijah CBF. Pri ostalih genetskih spremembah povezava med bolezenskim bremenom in ponovitvijo bolezni ni nedvoumno potrjena (11). Prav spremljanje bolnikov s KML z molekularnogenetskimi preiskavami med zdravljenjem s tirozin kinaznimi inhibitorji, s harmonizacijo določanja fuzijskega transkripta in uvedbo pretvorbenega faktorja ter referenčnega materiala uvaja visoke standarde za sledenje zdravljenja tudi širše v medicini (12).

ZAKLJUČEK

Uporaba vseh naštetih diagnostičnih postopkov omogoča razvrstitev levkemij v skladu s klasifikacijo SZO, ustrezno izbiro zdravljenja in sledenje njegove

učinkovitosti oziroma zgodnje zaznavanje morebitne ponovitve bolezni. S povezovanjem informacij, ki jih dajo izsledki časovno, finančno in kadrovsko zahtevnih preiskav, smo na področju diagnostike levkemij že odločno zakorakali v obdobje naosebljene (personalizirane) medicine, kjer terapevtske odločitve temeljijo na individualni oceni tveganja za vsakega bolnika posebej. Te pa lahko izvajajo le vrhunsko izobraženi kadri v izvrstno opremljenih laboratorijih.

LITERATURA

1. Haferlach T, Kern W, Schnittger S, Schoch C. Modern diagnostics in acute leukemias. *Crit Rev Oncol Hematol* 2005; 56: 223–34.
2. Haferlach T, Bacher U, Kern W, Schnittger S, Haferlach C. Diagnostic pathways in acute leukemias: a proposal for a multimodal approach. *Ann Hematol* 2007; 86: 311–27.
3. Lee SH, Erber WN, Porwit A, Tomonaga M, Peterson LC. ICSH guidelines for the standardization of bone marrow specimens and reports. *Int J Lab Hematol* 2008; 30: 349–64.
4. Andoljšek D. Bolezni krvi in krvotvornih organov. In: Košnik M, Mravje F, Štajer D, Černelč P, Koželj M. *Interna medicina*. 2nd ed. Ljubljana; Littera picta, 2011, 1243–93.
5. Craig FE, Foon KA. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. *Blood* 2008; 111: 3941–67.
6. Dohner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Buchner T, Burnett AK, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* 2010; 115: 453–74.
7. Peters JM, Ansari MQ. Multiparameter flow cytometry in the diagnosis and management of acute leukemia. *Arch Pathol Lab Med* 2011; 135: 44–54.
8. Swerdlov S. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2008.
9. Hastings R, Howell R, Betts D, Porter S, Haferlach C, Dastugue N, et al. Guidelines and quality assurance for acquired cytogenetics. *E.C.A. Newsletter* 2013; 31: 7–21.
10. Betz BL, Hess JL. Acute myeloid leukemia diagnosis in the 21st century. *Arch Pathol Lab Med* 2010; 134: 1427–33.
11. Hourigan CS, Karp JE. Minimal residual disease in acute myeloid leukaemia. *Nat Rev Clin Oncol* 2013; 10: 460–71.
12. Doseženo 28. 7. 2014 na http://www.leukemia-net.org/content/diagnostics/index_eng.html