

Krónikus mieloproliferatív kórképek klinikopatológiai és molekuláris jellemzői

Horváth Emőke¹, Vizi Emőke oh.², Pávai Zoltán³, Pap Zsuzsa³, Demian Smaranda⁴,
Dorcioman Bogdana⁵, Molnár Enikő⁵

¹Marosvásárhelyi Orvosi és Gyógyszerészeti Egyetem, Morfopatológia Tanszék, ²Marosvásárhelyi Orvosi és Gyógyszerészeti Egyetem, Általános Orvosi Kar,

³Anatómia és Fejlődéstan Tanszék, ⁴1. sz. Belgyógyászati Klinika, ⁵Marosvásárhelyi Megyei Sürgősségi Kórház, Központi Laboratórium

Aspectul clinicopatologic și molecular al bolilor mieloproliferative cronice

Bolile mieloproliferative cronice (CMPD) cu cromosom Philadelphia negativ sunt caracterizate la debut prin simptomatologie și aspect morfologic asemănător, dar prezintă o evoluție diferită, cu posibilități terapeutice care contribuie la îmbunătățirea prognosticului. Diagnosticul CMPD, reprezentat prin trombocitemia esențială (ET), policitemia vera (PV) și mielofibroză cronică idiopatică, se bazează pe criterii morfologice stricte, stabilite de WHO. Material și metode. Am studiat 17 biopsii osteomendulare diagnosticate CMPD pe baza aspectului morfologic (evidențiat cu colorație standard și colorații speciale), completat cu imunofenotipizarea celulelor. În scopul susținerii diagnosticului pozitiv. Am cercetat prezența mutației tirozin-kinazei JAK2.V617 cu metoda PCR, utilizând sângele periferic al bolnavilor cu diagnostic PV. Concluzii. Aspectul histologic al măduvei interpretat în oglinda parametrilor sângelui periferic și al modificărilor genetice (mutația JAK2V617) contribuie la creșterea sensibilității și senzitivității diagnosticului bolilor CMPD, atât în stadiul inițial, cât și în stadii avansate.

Chronic myeloproliferative disorders (CMD): clinicopathologic and molecular features

The Philadelphia chromosome-negative chronic myeloproliferative disorders (CMPD), polycythemia vera (PV), essential thrombocythemia (ET) and chronic idiopathic myelofibrosis (CIMF), have overlapping clinical features but exhibit different natural histories and different therapeutic requirements. The bone marrow criteria of the World Health Organization (WHO) are defined by pathologists to explicitly define the pathological criteria for the diagnostic differentiation of ET, PV, and prefibrotic and fibrotic CIMF. Material and method. Our study was composed from 17 bone marrow trephine biopsy diagnosed with CMPD. We used special and immunohistochemical stainings for positive and differential diagnosis. In order to complement initial diagnosis we studied the tyrosin kinase mutation (JAK2 V617) with PCR method using peripheral blood samples from patients diagnosed with PV. Conclusions. The use of biological markers including JAK2 V617 PCR test and peripheral blood parameters combined with bone marrow histopathology has a high sensitivity and specificity (almost 100%) to diagnose the early and overt stages of ET, PV and CIMF in JAK2 V617F positive and negative MPDs.

Orvostudományi Értesítő, 2007, 80 (4): 287-290

www.emeogysz.ro

A Philadelphia kromoszóma negatív krónikus mieloproliferatív betegségek (chronic myeloproliferative disorders, CMPD) csoportjába az Egészségügyi Világszervezet (WHO) osztályozása szerint három kórkép tartozik: krónikus idiopathiás mielofibrosis (CIMF), polycythaemia vera (PV), essentialis thrombocythemia (ET). Ezen kórképek krónikus lefolyású, össejteredetű, klonális megbetegedések, amelyek egy vagy több csontvelői myeloid sejtvonala (granulopoeticus, erythrotoeticus, megakaryopoeticus) proliferációjával jellemezhetők. A CMPD csoportba tartozó kórképek klinikai lefolyása indolens, azonban az esetek egy részében akut myeloid leukaemiának (ritkábban akut lymphoid leukaemiának) megfelelő blastos fázisba vagy mielofibrosisba transzformálódhatnak. A transzformáció kialakulásának ideje lényegesen eltérhet az egyes CMPD altípusokban és az egyes betegek esetében, amely terápiás következményeket von maga után.

A betegségcsoportba tartozó kórképek klinikai, laboratóriumi és morfológiai megjelenése gyakran átfedést mutat. A leukocytosis, thrombocytosis, megakaryocytaproliferáció, mielofibrosis, hepatosplenomegalia szinte mindegyik kórkép velejárája lehet. Mivel az egyes altípusok elkülönítése gyakran csak molekuláris biológiai módszerek alkalmazásával lehetséges, dolgozatunkban összefoglaltuk mindazon diagnosztikai és differenciáldiagnosztikai morfológiai kritériumokat, amelyek a klinikai tünetek és laboratóriumi paraméterek együttes értékelésével a helyes kórszövettani diagnózis felállítását segítik.

Anyag és módszer

A Marosvásárhelyi Megyei Sürgősségi Kórház Kórszövettani Laboratóriumának egy éves anyagát (137 biopszia) követtük a méasztelenített és paraffinba ágyazott csontvelői biopsziás minták vizsgálatával, együtt értékelve a különböző festési eljárások és immunhisztokémiai jelölések eredményeit a klinikai, biológiai és laboratóriumi paraméterekkel (perifériás vércső, hemogramm, csontvelői-aspirációs minta, áramlásos cytometria).

A csontvelői fibrózis kimutatására a Gömöri-féle ezüstimpregnációt használtuk, amely lehetővé teszi a fibrózis mértékének szemikvantitatív értékelését (1-4-es fokozat). A kollagénrost szaporulat (myelosclerosis) van Gieson-festéssel jól illusztrálható. A Perls-féle vasfestési eljárás a tárolt vas jelenlétét vagy hiányát mutatja ezekben a kórképekben. Immunfenotipizálásra a DAKO, LabVision és Novocastra CD61, MPO (myeloperoxidáz) és Glycophorin-A, CD34, CD117 antitesteket használtunk En Vision módszer segítségével. A reakciót DAB (diaminobenzidin) kromogénnel vizualizáltuk.

A Jak2 (V617F) mutációt a Baxter E.J. és társai által leírt módszer segítségével vizsgáltuk [3] négy PV-ben, differenciáldiagnosztikai kritériumként alkalmazva PV versus CIMF.

A DNS-t Quiagen Blood DNA Mini kittel EDTA-ra levett perifériás vérből izoláltuk.

A reakcióelegyet 20 μl végső térfogatban mértük össze az alábbiak szerint: 1× GeneAmp (Abi) PCR puffer, 1 μM közös reverse primert, 0,5 μM forward primert a mutált és



nem mutált variánsból valamint 0,5U AmpliTaq Gold DNA Polymerase (Applied Biosystems). A reakciót PCR GENE AMP 9700 készüléken végeztük.

A PCR terméket etidium bromid tartalmú 2% agaróz gélen futtattuk 1 órán át.

Molsúlylétrának pUC19 DNA/*MspI* Marker (Fermentas) használtunk.

Az eredményeket BioDocIt2 Uv System segítségével olvastuk le.

Eredmények

CMPD-t 17 esetben diagnosztizáltunk, 70,58%-ban egybehangozóan a klinikai kórismével. A legnagyobb arányban (58,82%) a krónikus idiopathias myelofibrosis fordult elő (2 esetben prefibrotikus stádium, 8 esetben fibrotikus stádium), a polycythaemia vera az esetek 35,29 %-át képviselte (6 eset), míg essentialis thrombocythaemia egy esetben fordult elő. A betegek átlagéletkora CIMF-ben $65,50 \pm 9,69$ év, PV-ben $61,66 \pm 12,25$ év volt. A CIMF a férfiakat és nőket közel egyformán érinti, míg a PV-s betegek 66,66%-a volt nő.

Összevetve a szövettani eredményeket a betegek laboratóriumi és klinikai adataival a következőket találtuk:

- a CIMF-es betegek vérképe az esetek 30%-ban thrombocytosist ($>400000/\text{mm}^3$), leukocytosist ($>9000/\text{mm}^3$) mutatott, ezen esetek megfelelnek a prefibrotikus stádiumnak, a fibrotikus stádiumban a vérképet pancytopenia jellemezte,
- leucoerythroblastos perifériás vérkép a CIMF fibrotikus stádiumát az esetek 37,5%-ában jellemezte (3 esetben).
- a CIMF-es esetek 20%-ában merült fel a postpolycythaemiás myelofibrosis lehetősége,
- a reaktív limfo-plasmocytás beszűrődés gyakori jelenség CMPD-ben,
- egy esetben a PV talaján krónikus limfoid leukémia (LLC) fejlődött ki,
- JAK2V617 mutációt 3 esetben azonosítottunk a mutáns allél 203 bp, a normál allél 364 bp hosszú.

Megbeszélés

Egy éves anyagunkban a 17 CMPD új és követett esetekből tevődött össze. A leggyakrabban előforduló kórkép a CIMF volt, amely egyforma arányban érintette a két nemet, a betegek átlagéletkora is megfelelt az irodalmi adatoknak. A fibrotikus stádium dominanciája (8 versus 2) azzal magyarázható, hogy az esetek egy része a fibrotikus stádiumban kerül kórismére. Myeloid metapláziát egy esetben találtunk.

A betegek laboreredményeit jól tükrözte a szöveti kép is: a prefibrotikus stádiumra jellemző csontvelő hyperplasiát az érett granulopoeticus elemek és az atípusos megakaryocyták felszaporodása okozta (CD61 pozitivitással, kizárva egyéb malignus tumorok csontvelői áttétének a lehetőségét), míg az eritropoézis minden esetben enyhén

csökkent. A betegek egyharmadánál a csontvelőben reaktív lymphoid aggregátumok fordultak elő, mely jelenség a többi krónikus myeloproliferatív kórképben ritka. Ezen sejtek immunfenotipizálása bizonyítja megakaryocytá eredetüket. A főként perivascularisan felszaporodott reticulín fibrosis nem indokolja a fibrotikus stádiumba való sorolást (2. fokozat). Patológiás rostsaporulatról a 3. fokozattól kezdődően beszélhetünk. Csontvelői fibrosist számos más, tumoros és nem tumoros állapot is előidézhethet, ami differenciáldiagnosztikai problémát jelent [5].

A myelofibrosis kialakulásának időpontja, sebessége nagyon eltérő az egyes betegeknél. Thiele és munkatársai 134 korai stádiumú CIMF-es beteget több éven át követték és azt tapasztalták, hogy az első három évben az esetek 50,74%-a alakult át fibrotikus stádiumba [4]. Mások szerint az átalakulás valószínűsége meghaladja a 65%-t is. A fibrosis kialakulását befolyásoló tényezők nem ismertek teljes mértékben. Újabb tanulmányok azt is kimutatták, hogy a fibrosis annál gyorsabban bekövetkezik, minél kifejezettebb a csontvelői megakaryocyták atípiája, viszont nem függ a trombocitaszámtól [3].

A csontvelő fibrotikus átalakulása számos klinikai elváltozást von maga után. A kezdetben tünetmentes vagy nem specifikus tünetekkel rendelkező betegeknél megjelenik a splenomegalia, a progresszív, terápia rezisztens anémia és a leucoerythroblastos perifériás vérkép.

A splenomegalia nem tekinthető a fibrotikus stádium specifikus tüneteinek, Thiele a prefibrotikus stádiumú betegek 15%-nál is leírta [9].

Az esetek 40%-nál jelenlevő anémiát több tényező magyarázhatja: a progresszív pancytopenia, az ineffektív haemopoiesis valamint a hypersplenismus. Habár a CIMF prognosztikai faktorait illetően többféle álláspont létezik, az mindenki által elfogadott, hogy az anémia foka a kórkép legfontosabb prognosztikai tényezője. Három esetben a 10 g/dl alatti hemoglobin értékek 70 évnél idősebb betegeknél fordultak elő, ami rossz kórlefolást jelez [2].

A CIMF-es betegek kisebb hányadánál a fehérvérsejtszám kifejezetten magas értékei ($>30000/\text{mm}^3$) vagy ellenkezőleg leukopenia ($<4000/\text{mm}^3$) is előfordult. Előbbi a kóros klón túlműködése magyarázhatja, a fehérvérsejtszám csökkenése pedig a thrombocytopeniával együtt a fibrotikus stádiumra jellemző pancytopenia részjelensége. Ezek prognosztikai értékéről a vélemények eltérőek: egyesek a túl magas értékeket társítják kedvezőtlen kórlefolással, míg mások éppen a leukopeniával magyarázzák a rosszabb prognózist [7].

A Dupriez által javasolt rizikó felosztás (Lille scoring system) a Hb-érték és a fehérvérsejtszám alapján a CIMF-es betegeket három csoportba osztja, a score növekedése a túléléssel fordítottan arányos [1].

Más szerzők a keringő blastok felszaporodásának nagyobb prognosztikai szerepet tulajdonítanak, mint a fehérvérsejtszám módosulásainak és a betegeket az anémia és a perifériás blastok aránya alapján sorolják a különböző rizikócsoportokba [7].

Azt is kimutatták, hogy azok az esetek, ahol a keringő CD34+ sejtek száma meghaladta a 300×10^6 értéket,

50%-os valószínűséggel alakultak át blasztos fázisba az első 11 hónapban [8]. Leucoerythroblastos vérképet mi a CIMF-es betegek 37,5%-nál találtunk, mely jelenséget a csontvelői intrasinusoidális hematopoiesis és a lépben történő extramedullaris vérképzés magyarázza.

Megbízható klinikai és laboratóriumi tünetek hiányában a csontvelővizsgálat az a módszer, amellyel a CIMF diagnózisa felállítható. A csontvelői reticularis- és a kollagénrost-szaporulat, a hypoplasias erythro- és granulopoesis, valamint az atípusos megakaryocyták dominanciája alátámasztja a kórismét.

Az általunk vizsgált PV esetek (6 eset) klinikai adatai a nemek közötti eloszlást leszámítva (a betegek kétharmada nő volt) az irodalmi adatokkal megegyeznek. Egy 78 éves nő betegnél a klinikai és szövettani diagnózis közötti eltérést a $3000000/\text{mm}^3$ -t meghaladó trombocytaszám okozta, de a csontvelőbiopszia hisztológiai vizsgálata kizárta az ET-t. Egy másik esetben a PV talaján krónikus limfoid leukémia (LLC) fejlődött ki. Hasonló eseteket az irodalomban is találni, nagyrészt olyan CMPD-s betegeknél írták le CLL kifejlődését, akik a folyamat evolúciójának fékezésére citosztatikus kezelést kaptak [8], más tanulmányok a CLL kialakulása után a 18-as kromoszóma anomáliáját (18p+) mutatták ki citogenetikai vizsgálattal a csontvelőből és a keringő limfocitákból [6].

Differenciáldiagnosztikai problémát a postpolycythaemiás myelofibrosis okoz, mivel morfológiai kritériumok alapján nem lehet elkülöníteni a CIMF fibrotikus stádiumától. A csontvelőben a blastok aránya általában 10% alatti, ha ez a csontvelőben vagy a periférián 10% fölé nő, akkor blastos transzformációt jelezhet [4]. A blastos átalakulás egyaránt megjelenhet CIMF, illetve PV késői stádiumában.

Bizonyos határesetekben, amikor a megakaryocyták morfológiai megjelenése nem diagnosztikus értékű, valamint a perifériás vérkép sem megbízható, segítséget adhat a csontbiopsziás minták berlini-kék reakciója, amely PV-ben mindig üres vasraktárakat mutat, míg a hemosziderinszemcsék jelenléte CIMF vagy ET mellett szól.

A PV-ben szenvedő betegek mintegy 70-90%-ában mutatható ki a JAK2 tirozinkináz V617F mutációja, mely a JAK2 fokozott és folyamatos tirozinkináz aktivitásához és ebből adódóan mindhárom haemopoeticus sejtvonal proliferációjához vezet [3]. Ez a mutáció azonban jelen van a másik két kórkép közel 50%-ában is, így önmagában ez a módszer sem tekinthető diagnosztikusnak PV-re [8]. Az általunk vizsgált kis számú eset pozitív eredményei megerősítették a PV diagnózist a differenciáldiagnosztikai problémát jelentő esetekben, de a módszer költséges volta nem teszi lehetővé a CMPD-ben való rutin alkalmazását.

Az ET ritkán előforduló kórkép, az irodalmi adatok szerint évi 1-2 új eset jut megközelítőleg egy millió lakosra. A klinikai és laboratóriumi tünetek alapján ET-nek diagnosztizált esetekből (4 eset) csak egy bizonyult ennek a kórképnek. A klinikai gyanút a CIMF-es betegek 30%-ánál jelenlevő thrombocytosis ($>600000/\text{mm}^3$) igazolta.

A két kórkép elkülönítése viszont mind a kezelés, mind a prognózis szempontjából fontos, mivel CIMF esetén a bete-

gek átlagos túlélése a diagnózis időpontjától számítva 3-5 év, míg az ET-ben szenvedők várható élettartama 10-15 év [5].

Következtetések

A Philadelphia kromoszóma negatív krónikus myeloproliferatív kórképek csoportjába tartozó betegségek gyakorisága egyéb hematopatológiai tumorokhoz viszonyítva csökkent, de jelentőségük azokkal egyenértékű.

A CMPD kórképek tünettana és laboratóriumi megjelenése sok esetben átfedést mutat, emiatt a csontvelő szövettani vizsgálata elengedhetetlen a kórisme szempontjából.

A különböző sejtvonalak morfológiai megjelenése mellett elengedhetetlen ezen sejtek immunfenotípusának vizsgálata, amely lehetővé teszi az egymáshoz viszonyított mennyiségi eltérések kimutatását, az atípusos morfológiával rendelkező sejtek eredetének tisztázását.

A specialis festési eljárások mellett a minimális immunhisztokémiai panel magában foglalja a Glycophorin-A, MPO és CD61 antitesteket, a blastok kimutatására pedig CD34, illetve CD117 szolgál.

Differenciáldiagnosztikai problémát az esetek 20%-ban a fibrosis jelenléte okozott (postpolycythaemiás myelofibrosis versus CIMF fibrotikus stádium), amelynek diagnózisa kizárólag csak biopsziás mintavétel révén történik.

A csontvelő reaktív lymphoplasmocytás beszűrődése sok esetben a folyamat klonalitásának vizsgálatát vonta maga után. Egy esetben a PV talaján krónikus limfoid leukémia fejlődött ki, ami az intermittens cytosztatikus kezelésnek tulajdonítható.

Mivel ezek a kórképek az esetek többségében AML-nek megfelelő blastos fázisba vagy myelofibrosisba transzformálódhatnak, fontos a korai és helyes diagnózis felállítása.

Jelen pillanatban a molekuláris vizsgálatok a JAK2 tirozinkináz V617F mutáció kimutatására irányulnak ezen kórképekben, amelynek jelenléte megerősíti a Ph kromoszóma negatív CMPD diagnózisát.

A CMPD diagnózisa komplex, feltételezi a klinikai tünetek, laboratóriumi paraméterek és a szövettani kép együttes értékelését. Ez azonban csak a megfelelő interdiszciplináris együttműködés mellett lehetséges.

Irodalom

1. Arsalan A., Chung-Che Jeff Chang. - *Chronic Idiopathic Myelofibrosis: Clinicopathologic features, pathogenesis and prognosis*, Archives of Pathology and Laboratory Medicine, 2006, 130:1133-1143.
2. Ayalew T. - *Myelofibrosis with Myeloid Metaplasia*, The New England Journal of Medicine, 2000, 342:1255-1265.
3. Baxter E.J., Scott L.M., Campbell E.J. et al. - *Cancer Genome Project. Acquired mutation of the tyrosin kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders*, Lancet, 2005, 365:1054-1061.
4. Kvasnicka H.M., Thiele J. - *Early stages of Philadelphia-chromosome negative chronic myeloproliferative disorders, a diagnostic challenge*, 7th Internal Course on Bone Marrow Biopsy Pathology, Krakow, 2005, Lectures:19-27.

5. Matolcsy A., Udvardy M., Kopper L., - *Krónikus myeloproliferatív betegségek*, Hematológiai betegségek atlasza, Medicina Könyvkiadó RT, Budapest, 2006.
6. Michiels J.J., Bernema Z., Van Bockstaele D. et al. - *Current diagnostic criteria for the chronic myeloproliferative disorders (MPD) essential thrombocythemia (ET), polycythemia vera (PV) and chronic idiopathic myelofibrosis (CIMF)*, Pathol Biol (Paris), 2006, PMID: 16919893.
7. Michiels J.J., Fischer R. - *Prognostic factors in idiopathic (primary) osteomyelofibrosis*, Cancer, 1997, 80:706-719.
8. Pierre R., Imbert M., Thiele J. et al. - *Polycythaemia vera*. In: Jaffe Es., Harris NL., Stein H., Vardiman JW. (eds) WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, IARC press, Lyon 2001, 32-38.
9. Thiele J., Kvasnicka H.M., Zankovich R. et al. - *The value of bone marrow histology in differentiating between early stage polycythemia vera and secondary (reactive) polycythemia*, Haematologica, 2001, 86:368-374.
10. Thiele J., Imbert M., Pierre R. et al. - *Chronic idiopathic myelofibrosis*. In: Jaffe Es., Harris NL., Stein H., Vardiman JW. (eds) WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, IARC press, Lyon 2001, 35-38.