

Klasyfikacja i kryteria diagnostyczne nowotworów układu krwiotwórczego

Monika Prochorec-Sobieszek

Podstawą podziału nowotworów układu krwiotwórczego jest klasyfikacja Światowej Organizacji Zdrowia (WHO, *World Health Organization*) z 2008 roku. Definiuje poszczególne jednostki histokliniczne z uwzględnieniem cech morfologicznych, immunofenotypowych, genetycznych i innych biologicznych oraz obrazu klinicznego, stanowiąc algorytm dla lekarza klinicysty i patologa/diagnosty pracujących wspólnie w celu ustalenia rozpoznania u chorych z podejrzeniem nowotworów układu krwiotwórczego.

Każda z tych cech może mieć inne znaczenie w poszczególnych jednostkach histoklinicznych. Ocena morfologicznych, cytochemicznych i immunofenotypowych cech komórek nowotworowych pozwala na ustalenie ich pochodzenia liniowego i stopnia dojrzałości. Ponadto określa, czy proliferacja komórkowa jest cytologicznie prawidłowa, czy wykazuje cechy dysplazji, co wiąże się z jej efektywnością na obwodzie.

W klasyfikacji WHO choroby układu krwiotwórczego pochodzące z różnych linii krwiotworzenia zostały podzielone na nowotwory z komórek prekursorowych (blastów) bez cech dojrzewania lub z minimalnym różnicowaniem, na przykład ostre białaczki szpikowe (AML, *acute myeloid leukemia*), oraz takie, w których występuje dojrzewanie zarówno efektywne, jak i nieefektywne — odpowiednio nowotwory mieloproliferacyjne (MPN, *myeloproliferative neoplasms*) i zespoły mielodysplastyczne (MDS, *myelodysplastic syndromes*). Odsetek komórek blastycznych we krwi obwodowej, szpiku i innych tkankach zajętych procesem chorobowym ma duże znaczenie praktyczne w klasyfikacji nowotworów układu krwiotwórczego i ocenie ich progresji. Nowotwory układu krwiotwórczego z obecnością ponad 20% komórek blastycznych klasyfikowane są jako AML. Mogą one powstawać *de novo* lub jako transformacja blastyczna wcześniej zdiagnozowanych MDS, MPN lub nowotworów mielodysplastyczno-mieloproliferacyjnych (MDS/MPN, *myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms*).

Obecnie badania dotyczące nowotworów skupiają się nad poznaniem ich cech genetycznych i nieprawidłowości molekularnych mogących stać się celami terapeutycznymi, dlatego

też nowe doniesienia dotyczące struktury genetycznej i molekularnej nowotworów są włączane do algorytmów diagnostycznych lub nazewnictwa w klasyfikacji WHO. W ciągu kilku lat poprzedzających aktualną 4. edycję klasyfikacji WHO odkryto wiele znaczących zaburzeń genetycznych w nowotworach układu krwiotwórczego, które przyczyniły się do zdefiniowania nowych jednostek histoklinicznych. Dotyczy to szczególnie podtypów AML oraz grupy nowotworów mieloidalnych i limfoidalnych z eozynofilią i rearanzacją *PDGFRA* (*platelet-derived growth factor receptor alpha*), *PDGFRB* (*platelet-derived growth factor receptor beta*) lub *FGFR1* (*fibroblast growth factor receptor 1*). Badania cytogenetyczne i molekularne wymagane są w chwili rozpoznania nie tylko w celu określenia genetycznie zdefiniowanych jednostek histoklinicznych, przyczyniają się także do oznaczenia czynników prognostycznych i ewentualnych celów terapeutycznych. Charakterystyczne zaburzenia genetyczne stanowią również punkt wyjściowy do monitorowania remisji i progresji choroby. W tabeli 6 zestawiono nowotwory układu krwiotwórczego znajdujące się w klasyfikacji WHO z 2008 roku z uwzględnieniem nazwy polskiej, angielskiej i skróconej nazwy jednostki, z zaleceniem zastosowania tego schematu w rutynowych raportach diagnostycznych. W dalszej części rozdziału przedstawiono krótką charakterystykę podgrup nowotworów układu krwiotwórczego.

Nowotwory mieloproliferacyjne

Są klonalnymi chorobami komórek macierzystych szpiku, które charakteryzują się proliferacją jednej lub więcej linii krwiotworzenia: granulocytowej, czerwokrwinkowej, megakariocytowej lub komórek tucznych. W początkowych fazach MPN szpik jest bogatokomórkowy i cechuje się efektywnym rozrostem komórek poszczególnych linii krwiotworzenia, które wykazują zachowane dojrzewanie. Powoduje to zwiększenie liczby granulocytów, krwinek czerwonych i/lub płytek krwi we krwi obwodowej. Często występuje powiększenie śledziony i wątroby. Nowotwory mieloproliferacyjne mogą ulegać stopniowej progresji, która polega na włóknieniu podścieliska szpiku, nieefektywnej hematopoezie i transformacji blastycznej. Obecność 10–19% blastów we krwi obwodowej lub szpiku oznacza fazę akceleracji MPN, a występowanie więcej niż 20% komórek blastycznych odpowiada rozpoznaniu fazy blastycznej. Przewlekłą białaczkę szpikową (CML, *chronic myelogenous leukemia*) można uznać za modelowy nowotwór, w którym w pełni zastosowano założenia klasyfikacji WHO. Jest ona rozpoznawana na podstawie obrazu klinicznego, wyników badań laboratoryjnych i cech morfologicznych oraz jest konsekwentnie związana ze specyficznym zaburzeniem genetycznym — obecnością chromosomu Filadelfia [t(9;22)(q34;q11)] — i genem fuzyjnym *BCR-ABL1*. Nowotwory mieloproliferacyjne *BCR-ABL1*-ujemne, takie jak czerwienica prawdziwa (PV, *polycythemia vera*), pierwotna mielofibroza (PMF, *primary myelofibrosis*), nadpłytkowość samoistna (ET, *essential thrombocythemia*), mastocytoza, rozpoznawane są na podstawie kryteriów obejmujących obraz kliniczny, badania laboratoryjne, cechy morfologiczne i histopatologiczne (morfologia i topografia megakariocytów, zmiany w podścielisku i identyfikacja linii komórkowych ulegających proliferacji). Mutacje genu *JAK2* V617F lub rzadziej podobne nieprawidłowości genetyczne, takie jak mutacja *JAK2* w eksonie 12., mutacje *MPL* W515L/K, potwierdzają nowotworowy charakter proliferacji i w większości przypadków PV oraz w około 50% PMF i ET znacznie ułatwiają diagnostykę. Podobne znaczenie patogenetyczne i diagnostyczne mają mutacje *KIT* w mastocytozie. Rozpoznanie przewlekłej białaczki eozynofilowej jest diagnozą z wykluczenia (brak zaburzeń *PDGFRA*, *PDGFRB*, *FGFR1* i genu *BCR-ABL1*). W tabelach 7 i 8 przedstawiono kryteria diagnostyczne MPN.

Tabela 6. Nowotwory układu krwiotwórczego według klasyfikacji Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) z 2008 roku

Nieokreślony typ histologiczny (<i>histologic type cannot be assessed</i>)
Nowotwory mieloproliferacyjne (MPN, <i>myeloproliferative neoplasms</i>)
Przewlekła białaczka szpikowa <i>BCR-ABL1</i> -dodatnia (CML <i>BCR-ABL1+</i> , <i>chronic myelogenous leukemia, BCR-ABL1 positive</i>)
Przewlekła białaczka neutrofilowa (CNL, <i>chronic neutrophilic leukemia</i>)
Czerwienica prawdziwa (PV, <i>polycythemia vera</i>)
Pierwotna mielofibroza (PMF, <i>primary myelofibrosis</i>)
Nadpłytkowość samoistna (ET, <i>essential thrombocythemia</i>)
Przewlekła białaczka eozynofilowa bliżej nieokreślona (CEL NOS, <i>chronic eosinophilic leukemia, not otherwise specified</i>)
Mastocytoza (podtyp) [<i>Mastocytosis (type)</i>]: — mastocytoza skórna (CM, <i>cutaneous mastocytosis</i>) — indolentna układowa mastocytoza (ISM, <i>indolent systemic mastocytosis</i>) — układowa mastocytoza z towarzyszącą klonalną chorobą hematologiczną wywodzącą się z innej niż komórki tuczne linii komórkowej (SM-AHNMD, <i>systemic mastocytosis with associated clonal haematological non-mast-cell lineage disease</i>) — agresywna układowa mastocytoza (ASM, <i>aggressive systemic mastocytosis</i>) — białaczka z komórek tucznych (MCL, <i>mast cell leukemia</i>) — mięsak z komórek tucznych (MCS, <i>mast cell sarcoma</i>) — pozaskórna <i>mastocytoma</i> (<i>extracutaneous mastocytoma</i>)
Nieklasyfikowalny nowotwór mieloproliferacyjny (MPN U, <i>myeloproliferative neoplasm, unclassifiable</i>)
Nowotwory mieloidalne lub limfoidalne z eozynofilią i nieprawidłowościami <i>PDGFRA</i>, <i>PDGFRB</i> i <i>FGFR1</i> (<i>myeloid and lymphoid neoplasms with eosinophilia and abnormalities of PDGFRA, PDGFRB and FGFR1</i>)
Nowotwór mieloidalny lub limfoidalny z rearanżacją <i>PDGFRA</i> (<i>myeloid or lymphoid neoplasm with PDGFRA rearrangement</i>)
Nowotwór mieloidalny z rearanżacją <i>PDGFRB</i> (<i>myeloid neoplasm with PDGFRB rearrangement</i>)
Nowotwór mieloidalny lub limfoidalny z zaburzeniami <i>FGFR1</i> (<i>myeloid or lymphoid neoplasm with FGFR1 abnormalities</i>)
Nowotwory mielodysplastyczno-mieloproliferacyjne (MDS/MPN, <i>myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms</i>)
Przewlekła białaczka mielomonocytoza (CMML, <i>chronic myelomonocytic leukemia</i>)
Atypowa przewlekła białaczka szpikowa <i>BCR-ABL1</i> -ujemna (aCML <i>BCR-ABL1-</i> , <i>atypical chronic myeloid leukemia, BCR-ABL1 negative</i>)
Młodzieńcza postać białaczki mielomonocytozowej (JMML, <i>juvenile myelomonocytic leukemia</i>)
Nieklasyfikowalny nowotwór mielodysplastyczno-mieloproliferacyjny (MDS/MPN U, <i>myelodysplastic/myeloproliferative neoplasm, unclassifiable</i>)
Niedokrwistość oporna na leczenie z obecnością pierścieniowatych syderoblastów i nadpłytkowością (RARS-T, <i>refractory anemia with ring sideroblasts associated with marked thrombocytosis</i>)

→

Tabela 6. Nowotwory układu krwiotwórczego według klasyfikacji Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) z 2008 roku (cd.)

Zespoły mielodysplastyczne (MDS, <i>myelodysplastic syndromes</i>)
Cytopenia oporna na leczenie z jednoliniową dysplazją (RCUD, <i>refractory cytopenia with unilineage dysplasia</i>): — niedokrwistość oporna na leczenie (RA, <i>refractory anemia</i>) — neutropenia oporna na leczenie (RN, <i>refractory neutropenia</i>) — małopłytkowość oporna na leczenie (RT, <i>refractory thrombocytopenia</i>)
Niedokrwistość oporna na leczenie z obecnością pierścieniowatych syderoblastów (RARS, <i>refractory anemia with ring sideroblasts</i>)
Cytopenia oporna na leczenie z wieloliniową dysplazją (RCMD, <i>refractory cytopenia with multilineage dysplasia</i>)
Niedokrwistość oporna na leczenie z nadmiarem blastów (RAEB, <i>refractory anemia with excess blasts</i>)
Zespół mielodysplastyczny związany z izolowaną delecją chromosomu 5q (<i>myelodysplastic syndrome associated with isolated del[5q]</i>)
Niekategoryfikowalny zespół mielodysplastyczny (MDS-U, <i>myelodysplastic syndrome, unclassifiable</i>)
Cytopenia oporna na leczenie wieku dziecięcego (RCC, <i>refractory cytopenia of childhood</i>)
Ostra białaczka szpikowa z powtarzalnymi nieprawidłowościami genetycznymi [<i>acute myeloid leukemia (AML) with recurrent genetic abnormalities</i>]
AML z t(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i> (AML with t[8;21][q22;q22]; <i>RUNX1-RUNX1T1</i>)
AML z inv(16)(p13.1q22) lub t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i> (AML with inv[16][p13.1q22] or t[16;16][p13.1;q22]; <i>CBFB-MYH11</i>)
Ostra białaczka promielocytowa z t(15;17)(q22;q12); <i>PML-RARA</i> (<i>acute promyelocytic leukemia with t[15;17][q22;q12]; PML-RARA</i>)
AML z t(9;11)(p22;q23); <i>MLLT3-MLL</i> (AML with t[9;11][p22;q23]; <i>MLLT3-MLL</i>)
AML z t(6;9)(p23;q34); <i>DEK-NUP214</i> (AML with t[6;9][p23;q34]; <i>DEK-NUP214</i>)
AML z inv(3)(q21q26.2) lub t(3;3)(q21;q26.2); <i>RPN1-EVI1</i> (AML with inv[3][q21q26.2] or t[3;3][q21;q26.2]; <i>RPN1-EVI1</i>)
AML (megakarioblastyczna) z t(1;22)(p13;q13); <i>RBM15-MKL1</i> [AML (<i>megakaryoblastic</i>) with t[1;22][p13;q13]; <i>RBM15-MKL1</i>]
AML z mutacją <i>NPM1</i> (AML with mutated <i>NPM1</i>)
AML z mutacją <i>CEBPA</i> (AML with mutated <i>CEBPA</i>)
Ostra białaczka szpikowa z cechami zależnymi od mielodysplazji (<i>acute myeloid leukemia with myelodysplasia-related changes</i>)
Z wieloliniową dysplazją (<i>multilineage dysplasia</i>)
Poprzedzona zespołem mielodysplastycznym (<i>prior myelodysplastic syndrome</i>)
Współistnieją nieprawidłowości genetyczne związane z mielodysplazją (<i>myelodysplasia-related cytogenetic abnormalities</i>)
Nowotwory mieloidalne zależne od terapii (<i>therapy-related myeloid neoplasms</i>)
Ostra białaczka szpikowa zależna od terapii (t-AML, <i>therapy-related AML</i>)
Zespół mielodysplastyczny zależny od terapii (t-MDS, <i>therapy-related myelodysplastic syndrome</i>)

Tabela 6. Nowotwory układu krwiotwórczego według klasyfikacji Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) z 2008 roku (cd.)

Nowotwór mielodysplastyczno-mieloproliferacyjny zależny od terapii (t-MDS/MPN, <i>therapy-related myelodysplastic/myeloproliferative neoplasm</i>)
Ostra białaczka szpikowa bliżej nieokreślona (AML NOS, acute myeloid leukemia, not otherwise specified)
AML z minimalnym różnicowaniem (<i>AML with minimal differentiation</i>)
AML bez cech dojrzewania (<i>AML without maturation</i>)
AML z cechami dojrzewania (<i>AML with maturation</i>)
Ostra białaczka mielomonocytoza (<i>acute myelomonocytic leukemia</i>)
Ostra białaczka monoblastyczna/monocytoza (<i>acute monoblastic/monocytic leukemia</i>)
Ostra białaczka erytroblastyczna (<i>acute erythroid leukemia</i>): — białaczka czystoczerwonokrwinkowa (<i>pure erythroid leukemia</i>) — erytroleukemia (<i>erythroleukemia, erythroid/myeloid</i>)
Ostra białaczka megakarioblastyczna (<i>acute megakaryocytic leukemia</i>)
Ostra białaczka bazofilowa (<i>acute basophilic leukemia</i>)
Ostra panmieloza z mielofibrozą (<i>acute panmyelosis with myelofibrosis</i>)
Mięsak mieloidalny (myeloid sarcoma)
Rozrosty mieloidalne związane z zespołem Downa (myeloid proliferations related to Down syndrome)
Przemijająca nieprawidłowa mielopojeza (<i>transient abnormal myelopoiesis</i>)
Białaczka szpikowa związana z zespołem Downa (<i>myeloid leukemia associated with Down syndrome</i>)
Nowotwór blastyczny z plazmacytoidnych komórek dendrytycznych (BPDCN, blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm)
Ostre białaczki o nieokreślonym pochodzeniu liniowym (acute leukemias of ambiguous lineage)
Ostra białaczka niezróżnicowana (<i>acute undifferentiated leukemia</i>)
Ostra białaczka o mieszanym fenotypie z t(9;22)(q34;q11.2); BCR-ABL1 (<i>mixed phenotype acute leukemia with t(9;22)(q34;q11.2); BCR-ABL1</i>)
Ostra białaczka o mieszanym fenotypie z t(v;11q23); rearanżacja MLL (<i>mixed phenotype acute leukemia with t(v;11q23); MLL rearranged</i>)
Ostra białaczka o mieszanym fenotypie, B/szpikowa, bliżej nieokreślona (<i>mixed phenotype acute leukemia, B/myeloid, NOS</i>)
Ostra białaczka o mieszanym fenotypie, T/szpikowa, bliżej nieokreślona (<i>mixed phenotype acute leukemia, T/myeloid, NOS</i>)
Ostra białaczka o mieszanym fenotypie bliżej nieokreślona, rzadkie podtypy (<i>mixed phenotype acute leukemia, NOS, rare types</i>)
Białaczka/chłoniak limfoblastyczny z komórek NK [natural killer (NK) cell lymphoblastic leukemia/lymphoma]

Jednostki tymczasowo oznaczono kolorem niebieskim

Tabela 7. Kryteria diagnostyczne nadpłytkowości samoistnej, czerwienicy prawdziwej i pierwotnej mielofibrozy według Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) z 2008 roku

Kryteria	ET*	PV*	PMF*
Większe	<p>1. Liczba płytek krwi ≥ 450 g/l</p> <p>2. Cechy proliferacji głównie linii megakariocytowej ze zwiększoną liczbą dużych, dojrzałych megakariocytów. Brak wyraźnej proliferacji lub przesunięcia w lewo w liniach granulocytowej i czerwonekrwinkowej</p> <p>3. Brak kryteriów diagnostycznych WHO dla PV, PMF, CML, MDS lub innych nowotworów mieloidalnych</p> <p>4. Wykazanie mutacji V617F JAK2 lub innych markerów klonalności, w przypadku ich braku — wykluczenie nadpłytkowości reaktywnej</p>	<p>1. Hb $> 18,5$ g/dl (mężczyźni), $> 16,5$ g/dl (kobiety) lub Hb lub Ht $> 99.$ percentyla wartości dla określonego wieku, płci i wysokości nad poziomem morza lub Hb > 17 g/dl (mężczyźni), > 15 g/dl (kobiety), jeśli stwierdza się przyrost Hb ≥ 2 g/dl do wartości wyjściowej bez związku z leczeniem niedoboru żelaza lub wzrost masy krwinek czerwonych $> 25\%$ ponad średnią przewidzianą wartość prawidłową</p> <p>2. Mutacja V617F JAK2 lub defekt o podobnym znaczeniu czynnościowym, np. mutacja JAK2 w eksonie 12.</p>	<p>1. Proliferacja i atypia megakariocytów (formy od małych do dużych z nieprawidłowym stosunkiem jądro-cytoplazmatycznym i hiperchromatycznymi, atypowymi jądrami, megakariocyty tworzą gęste skupienia), zwykle z włóknieniem retikulino-wym i/lub kolagenowym podścieliska, lub, w przypadku braku wyraźnego włóknienia retikulino-wego, zmiany w megakariocytach muszą być powiązane ze zwiększoną komórkowością szpiku, proliferacją linii granulocytarnej, często z supresją erytropoezy (np. w przedwłóknieniowej fazie PMF)</p> <p>2. Brak kryteriów WHO dla PV, CML, MDS lub innych nowotworów mieloidalnych</p> <p>3. Wykazanie obecności mutacji V617F JAK2 lub innego markera wzrostu klonalnego (np. MPL W515L/K). W przypadku braku markera klonalności wykluczenie włóknienia w szpiku z powodu choroby zapalnej lub innej nowotworowej</p>
Mniejsze		<p>1. Szpik bogatokomórkowy z cechami trójukładowej proliferacji linii czerwonekrwinkowej, granulocytowej i megakariocytów</p> <p>2. Stężenie EPO w surowicy poniżej normy</p> <p>3. Endogenny wzrost kolonii erytroidalnych <i>in vitro</i></p>	<p>1. Leukoerytroblastoza we krwi</p> <p>2. Wzrost aktywności LDH</p> <p>3. Niedokrwistość</p> <p>4. Powiększenie śledziony w badaniu przedmiotowym</p>

*Do rozpoznania ET wymagane jest spełnienie wszystkich 4 kryteriów. Do rozpoznania PV konieczne jest spełnienie dwóch większych kryteriów i jednego mniejszego lub pierwszego większego i dwóch mniejszych. Rozpoznanie PMF wymaga spełnienia 3 większych i 2 mniejszych kryteriów. We wczesnej PMF mniejsze kryteria są najczęściej graniczne
 CML — przewlekła białaczka szpikowa; EPO — erytropoetyna; ET — nadpłytkowość samoistna; Hb — hemoglobina; Ht — hematokryt; LDH — dehydrogenaza mleczanowa; MDS — zespół mielodysplastyczny; PMF — pierwotna mielofibroza; PV — czerwienica prawdziwa

Tabela 8. Kryteria diagnostyczne przewlekłej białaczki neutrofilowej, przewlekłej białaczki eozynofilowej bliżej nieokreślonej i mastocytozy według Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) z 2008 roku

CNL	CEL NOS	Mastocytoza
<ol style="list-style-type: none"> WBC \geq 25 g/l: > 80% neutrofilii segmentowanych i pałeczkowatych, < 10% niedojrzałych granulocytów (promielocytów, mielocytów i metamielocytów), < 1% mieloblastów wśród WBC Szpik bogatokomórkowy: zwiększona liczba i odsetek neutrofilii, < 5% mieloblastów, zachowane dojrzewanie neutrofilii, megakariocyty prawidłowe lub przesunięcie w lewo Powiększenie wątroby i śledziony Brak przyczyn fizjologicznej neutrofilii lub, jeśli występuje, wykazanie klonalności komórek szpikowych w badaniach genetycznych i molekularnych, brak zakażeń lub procesów zapalnych oraz nowotworów litych Brak chromosomu Ph lub genu <i>BCR-ABL1</i> Brak rearanżacji <i>PDGFRA</i>, <i>PDGFRB</i> lub <i>FGFR1</i> Brak kryteriów dla PV, ET, PMF Brak cech MDS lub MPN/ /MDS: brak dysplazji granulocytów, brak dysplazji w innych liniach krwiotworzenia, monocyty < 1 g/l 	<ol style="list-style-type: none"> Eozynofilia \geq 1,5 g/l Brak chromosomu Ph lub genu <i>BCR-ABL1</i> lub cech innych MPN (PV, ET, PMF) lub MDS/MPN (CMML lub aCML) Brak t(5;12)(q31-35;p13) lub innych rearanżacji genu <i>PDGFRB</i> Brak genu fuzyjnego <i>FIP1L1-PDGFR1</i> i innych rearanżacji genu <i>PDGFRA</i> Brak rearanżacji genu <i>FGFR1</i> < 20% blastów we krwi i szpiku oraz brak inv(16)(p31q22) lub t(16;16)(p13;q22), lub innych cech diagnostycznych AML Klonalna nieprawidłowość cytogenetyczna lub molekularna, lub > 2% blastów we krwi, lub > 5% blastów w szpiku <p>Jeśli chory ma eozynofilię i nie spełnia powyższych kryteriów, może mieć reaktywną eozynofilię, idiopatyczną hipereozynofilię lub idiopatyczny zespół hipereozynofilowy</p>	<p>Skóra</p> <p>Zmiany skórne kliniczne typowe dla UP/MPCM, rozlana skórna mastocytoza lub odosobniona <i>mastocytoma</i> i w badaniu histopatologicznym zmian skórnych wieloogniskowe lub rozlane nacieki z komórek tucznych. Wykluczenie układowej mastocytozy</p> <p>Układowa*</p> <p>Kryterium większe: wieloogniskowe, gęste nacieki z komórek tucznych (\geq 15 komórek w skupieniu) w biopsji szpiku i/lub w innych narządach (poza skórą)</p> <p>Kryteria mniejsze:</p> <ol style="list-style-type: none"> W biopsji szpiku i innych narządach (poza skórą) w obrębie nacieku > 25% komórek tucznych ma wrzecionowaty kształt lub charakteryzuje się atypową morfologią, lub > 25% komórek tucznych w aspiracie szpiku jest niedojrzałych i atypowych Obecność mutacji w kodonie 816 genu <i>KIT</i> w komórkach szpiku, krwi obwodowej i innych narządów (poza skórą) Komórki tuczne w szpiku, krwi obwodowej i innych narządach (poza skórą) wykazują poza prawidłowymi markerami komórek tucznych ekspresję CD2 i/lub CD25 Stężenie tryptazy w surowicy stale > 20 ng/ml (jeśli objaw ten nie jest związany z inną klonalną chorobą szpiku)

*Do rozpoznania układowej mastocytozy konieczne jest spełnienie większego kryterium i jednego mniejszego lub co najmniej trzech mniejszych kryteriów

aCML — atypowa przewlekła białaczka szpikowa; AML — ostra białaczka szpikowa; CEL NOS — przewlekła białaczka eozynofilowa bliżej nieokreślona; CMML — przewlekła białaczka mielomonocytoza; CNL — przewlekła białaczka neutrofilowa; ET — nadpłytkowość samoistna; MDS — zespół mielodysplastyczny; MDS/MPN — nowotwór mielodysplastyczno-mieloproliferacyjny; MPCM — *maculopapular cutaneous mastocytosis*; PMF — pierwotna mielofibroza; PV — czerwienica prawdziwa; UP — *utricaria pigmentosa*; WBC — krwinki białe

Nowotwory mieloidalne lub limfoidalne z eozynofilią i nieprawidłowościami *PDGFRA*, *PDGFRB* i *FGFR1*

Obejmują 3 bardzo rzadko występujące grupy chorób, które są wynikiem zaburzeń genetycznych prowadzących do powstania genów fuzyjnych kodujących nieprawidłowe kinazy tyrozynowe. Wydzielenie tej jednostki miało aspekt praktyczny, ponieważ chorzy z rearanżacją *PDGFRA*, *PDGFRB* (ale nie *FGFR1*) charakteryzują się wrażliwością na leczenie inhibitorami kinaz tyrozynowych. Wszystkie 3 choroby mają obraz kliniczny i cechy morfologiczne MPN, rzadziej jest to chłoniak/białaczka limfoblastyczna. Eozynofilia jest cechą charakterystyczną, ale nie występuje we wszystkich przypadkach. Obraz kliniczny i morfologiczny zależy również od typu rearanżacji. W tabeli 9 zestawiono ich kryteria diagnostyczne.

Nowotwory mielodysplastyczno-mieloproliferacyjne

Są rzadko występującymi klonalnymi rozrostami układu krwiotwórczego, które w momencie rozpoznania wykazują cechy zarówno dysplazji, jak i proliferacji, co uniemożliwia ich jednoznaczne zakwalifikowanie do MDS lub MPN. Nowotwory mielodysplastyczno-mieloproliferacyjne zwykle charakteryzują się obrazem bogatokomórkowego szpiku z proliferacją jednej lub więcej linii krwiotworzenia; jeśli proliferacja jest efektywna, stwierdza się zwiększenie liczby odpowiednich elementów morfotycznych we krwi obwodowej. Jednocześnie jedna lub więcej linii krwiotworzenia może charakteryzować się nieefektywną proliferacją i dysplazją skutkującą cytopenią. Większość jednostek w tej kategorii odznacza się leukocytozą, niedokrwistością i małopłytkowością oraz zmiennie wyrażonymi cechami morfologicznej dysplazji. Odsetek komórek blastycznych jest zawsze mniejszy niż 20%. Często występuje powiększenie śledziony i wątroby. Cechy kliniczne i wyniki badań laboratoryjnych nie są stałe i mogą przypominać zarówno MPN, jak i MDS. W niektórych przypadkach przewlekłej białaczki mielomonocytozowej (CMML, *chronic myelomonocytic leukemia*) i atypowej CML (aCML) opisano mutację *JAK2 V617F*, która jest charakterystyczna dla MPN *BCR-ABL1*-ujemnych, ale właściwości proliferacyjne większości przypadków są związane z zaburzeniami ścieżki sygnałowej RAS/MAPK. W młodzieńczej postaci białaczki mielomonocytozowej (JMML, *juvenile myelomonocytic leukemia*) niemal 75% chorych wykazuje wzajemnie wykluczające się mutacje genów *PTPN11*, *NRAS*, *KRAS* lub *NF1*, które kodują białka ścieżki sygnałowej zależnej od RAS. W 30–40% CMML i aCML występują mutacje genów *NRAS* lub *KRAS*. W tabeli 10 zestawiono kryteria diagnostyczne MDS/MPN.

Zespoły mielodysplastyczne

Stanowią heterogenną grupę klonalnych chorób nowotworowych z komórek macierzystych szpiku, które charakteryzują się cytopeniami obwodowymi (niedokrwistość, małopłytkowość lub granulopenia), dysplazją w jednej lub więcej linii krwiotworzenia, nieefektywną hematopoezą i skłonnością do transformacji w AML. W MDS obserwuje się jednocześnie nieefektywną proliferację i apoptozę komórek układu krwiotwórczego, czego wynikiem jest bogatokomórkowy lub o prawidłowej komórkowości szpik i obwodowe cytopenie. Rozpoznanie MDS można w większości przypadków ustalić na podstawie charakterystycznych cech klinicznych i morfologicznych, takich jak występowanie cytopenii, której towarzyszy morfo-

Tabela 9. Kryteria diagnostyczne nowotworów mieloidalnych lub limfoidalnych z eozynofilią i nieprawidłowościami *PDGFRA*, *PDGFRB* i *FGFR1* według Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) z 2008 roku

Choroba	MPN* z eozynofilią i genem fuzyjnym <i>FIP1L1-PDGFRA</i>	MPN z genem fuzyjnym <i>ETV6-PDGFRB</i> lub innymi rearanżacjami <i>PDGFRB</i>	MPN lub ostra białaczka związana z rearanżacją <i>FGFR1</i>
Kryteria	MPN ze znaczną eozynofilią i obecność genu fuzyjnego <i>FIP1L1-PDGFRA</i> **	MPN często ze znaczną eozynofilią, a czasami z neutrofilią i monocytosą + obecność t(5;12) (q31~q33;p12) lub translokacji wariantowej*, lub wykazanie obecności genu fuzyjnego <i>ETV6-PDGFRB</i> , lub rearanżacji <i>PDGFRB</i>	MPN ze znaczną eozynofilią i czasami z neutrofilią i monocytosą lub AML, lub chłoniak/białaczka limfoblastyczna z komórek B lub T (zwykle związana z eozynofilią we krwi obwodowej lub szpiku) + obecność t(8;13)(p11;q12) lub translokacji wariantowej prowadzącej do rearanżacji <i>FGFR1</i> w komórkach szpikowych lub limfoblastach, lub w obu typach komórek
Uwagi	*Chorzy z ostrą białaczką szpikową lub limfoblastyczną z eozynofilią i genem fuzyjnym <i>FIP1L1-PDGFRA</i> są również klasyfikowani w tej kategorii **Jeśli badania molekularne nie są dostępne, rozpoznanie powinno być rozważane w przypadkach MPN bez chromosomu Ph z cechami hematologicznymi CEL z powiększeniem śledziony, znacznie podwyższonym stężeniem witaminy B12 i wzrostem aktywności tryptazy w surowicy oraz zwiększoną liczbą komórek tucznych w szpiku	*Ponieważ t(5;12) (q31~q33;p12) nie zawsze prowadzi do powstania genu fuzyjnego <i>ETV6-PDGFRB</i> , wskazane jest molekularne potwierdzenie występowania tego genu. Jeśli badania molekularne nie są dostępne, rozpoznanie powinno być rozważane w przypadkach MPN Ph-ujemnych związanych z eozynofilią i translokacją w obrębie chromosomu 5q31-33	

AML — ostra białaczka szpikowa; CEL — przewlekła białaczka eozynofilowa; MPN — nowotwór mieloproliferacyjny

logiczna dysplazja komórek układu krwiotwórczego oraz w części przypadków zwiększona liczba blastów we krwi obwodowej i szpiku. U około 50% chorych obserwuje się zmiany cytogenetyczne, które charakteryzują się najczęściej utratą materiału genetycznego. Niemniej jednak rozpoznanie MDS jest trudne i stanowi największe wyzwanie w diagnostyce nowotworów układu krwiotwórczego, głównie ze względu na możliwość występowania morfologicznie podobnych do MDS nienowotworowych wtórnych dysplazji. Na uwagę zasługują odrębności MDS u dzieci. W tabeli 11 zestawiono kryteria diagnostyczne MDS.

Tabela 10. Kryteria diagnostyczne przewlekłej białaczki mielomonocytovej, atypowej przewlekłej białaczki szpikowej *BCR-ABL1*-ujemnej, młodzieńczej postaci białaczki mielomonocytovej i nieklasyfikowalnego nowotworu mielodysplastyczno-mieloproliferacyjnego według Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) z 2008 roku

CMML	aCML	JMML	MDS/MPN U
<ol style="list-style-type: none"> 1. Monocytoza > 1 g/l 2. Brak chromosomu Ph i genu <i>BCR/ABL1</i> oraz rearanżacji <i>PDGFRA</i> i <i>PDGFRB</i> (szczególnie w przypadkach z towarzyszącą eozynofilią) 3. < 20% blastów we krwi obwodowej i szpiku (mieloblastów, monoblastów i promonocytów) 4. Spełnienie co najmniej 1 z następujących kryteriów: <ul style="list-style-type: none"> — dysplazja jednej lub więcej linii krwiotworzenia — klonalne nieprawidłowości cytogenetyczne i molekularne w komórkach krwiotwórczych — monocytoza utrzymująca się co najmniej 3 miesiące po wykluczeniu innych jej przyczyn 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Liczba WBC \geq 13 g/l spowodowana zwiększoną liczbą neutrofilii i ich prekursorów z wyraźną dysgranulopoezą 2. Brak chromosomu Ph i genu <i>BCR/ABL1</i> oraz rearanżacji <i>PDGFRA</i> i <i>PDGFRB</i> 3. Prekursory neutrofilii (promielocyty, mielocyty, metamielocyty) \geq 10%, bazofile < 2%, monocyty < 10% wśród WBC 4. Bogatokomórkowy szpik z proliferacją i dysplazją granulocytów oraz z dysplazją lub bez cech zaburzeń dojrzewania linii czerwonokrwinkowej i megakariocytów 5. < 20% blastów we krwi obwodowej i szpiku 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Monocytoza > 1 g/l 2. < 20% blastów (mieloblastów, monoblastów i promonocytów) we krwi i szpiku 3. Brak chromosomu Ph i genu <i>BCR/ABL1</i> 4. Spełnienie co najmniej 2 kryteriów: <ul style="list-style-type: none"> — zwiększone wartości Hb płodowej w stosunku do wieku — niedojrzałe granulocyty we krwi obwodowej — WBC > 10 g/l — klonalne nieprawidłowości chromosomalne — nadwrażliwość komórek prekursorowych szpiku na GM-CSF <i>in vitro</i> 	<p>Kliniczne, laboratoryjne i morfologiczne cechy jednego z podtypów MDS (RCUD, RARS, RCMD, RAEB) i < 20% blastów we krwi i szpiku + wyraźne cechy mieloproliferacji: PTL \geq 450 g/l związane z proliferacją megakariocytów lub WBC \geq 13 g/l z lub bez wyraźnej splenomegalii + brak wcześniejszego i aktualnego rozpoznania MPN albo MDS oraz leczenia cytotoksycznego lub czynnikami wzrostu, brak chromosomu Ph i genu <i>BCR-ABL1</i>, brak rearanżacji <i>PDGFRA</i> i <i>PDGFRB</i> lub <i>FGFR1</i>, brak izolowanej del(5q), t(3;3)(q21;q26) lub inv(3)(q21q26), lub <i>de novo</i> rozpoznana choroba z mieszanymi cechami mieloproliferacji i mielodysplazji, bez cech kwalifikujących do jakiegokolwiek kategorii MDS, MPN lub MDS/MPN</p>

aCML — atypowa przewlekła białaczka szpikowa *BCR-ABL1*-ujemna; CMML — przewlekła białaczka mielomonocytovej; GM-CSF — czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów; JMML — młodzieńcza postać białaczki mielomonocytovej; MDS — zespół mielodysplastyczny; MDS/MPN — nowotwór mielodysplastyczno-mieloproliferacyjny; MDS/MPN-U — nieklasyfikowalny nowotwór mielodysplastyczno-mieloproliferacyjny; MPN — nowotwór mieloproliferacyjny; PTL — płytki krwi; RAEB — niedokrwistość oporna na leczenie z nadmiarem blastów; RARS — niedokrwistość oporna na leczenie z obecnością pierścieniowatych syderoblastów; RCMD — cytopenia oporna na leczenie z wieloliniową dysplazją; RCUD — cytopenia oporna na leczenie z jednoliniową dysplazją; WBC — krwinki białe

Ostre białaczki szpikowe

Są grupą nowotworów polegających na klonalnej proliferacji i kumulacji morfologicznie i czynnościowo niedojrzałych mieloidalnych komórek blastycznych we krwi obwodowej, szpiku i innych tkankach. Choroby te są heterogenne klinicznie, morfologicznie i genetycznie, a rozrost może dotyczyć jednej lub wszystkich linii krwiotworzenia. Podstawą rozpoznania

Tabela 11. Kryteria diagnostyczne zespołów mielodysplastycznych według Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) z 2008 roku

Podtyp MDS	Krew obwodowa	Szpik
RCUD: RA, RN, RT	Monocytopenia lub duocytopenia* Blasty < 1%	Jednoliniowa dysplazja ($\geq 10\%$ komórek danej linii) < 5% blastów < 15% pierścieniowatych syderoblastów
RARS	Niedokrwistość Brak blastów	Dysplazja tylko linii czerwonekrwinkowej < 5% blastów > 15% pierścieniowatych syderoblastów
RCMD	Cytopenia (e)**, *** Blasty < 1% Brak pałeczek <i>Auera</i> < 1 g/l monocytów	Dysplazja ≥ 2 linii komórkowych (> 10% komórek) < 5% blastów Brak pałeczek <i>Auera</i> $\pm 15\%$ pierścieniowatych syderoblastów
RAEB-1	Cytopenia (e) Blasty < 5%** Brak pałeczek <i>Auera</i> < 1 g/l monocytów	Jedno- lub wieloliniowa dysplazja 5–9% blastów Brak pałeczek <i>Auera</i>
RAEB-2	Cytopenia (e) 5–19% blastów Pałeczki <i>Auera</i> (\pm) < 1 g/l monocytów	Jedno- lub wieloliniowa dysplazja 10–19% blastów Pałeczki <i>Auera</i> (\pm)
MDS-U	Cytopenia (e) $\leq 1\%$ blastów***	Dysplazja < 10% komórek jednej lub więcej linii krwiotworzenia Obecność zmian cytogenetycznych potwierdzających rozpoznanie MDS < 5% blastów
MDS 5q(-)	Niedokrwistość Prawidłowa lub zwiększona liczba płytek krwi Blasty < 1%	Prawidłowa lub zwiększona liczba megakariocytów z hipolobulacją jąder < 5% blastów Izolowana delecja 5q Brak pałeczek <i>Auera</i>

*Chorzy z pancytopenią i jednoliniową dysplazją powinni być klasyfikowani jako MDS-U; **chorzy z odsetkiem blastów w szpiku < 5% i odsetkiem blastów we krwi 2–4% powinni być klasyfikowani jako RAEB-1. Chorzy z RCUD lub RCMD i odsetkiem blastów we krwi 1% powinni być klasyfikowani jako MDS-U; ***chorzy z pałeczkami *Auera*, liczbą blastów we krwi < 5% oraz blastów w szpiku < 10% powinni być klasyfikowani jako RAEB-2

MDS — zespół mielodysplastyczny; MDS-U — nieklasyfikowalny zespół mielodysplastyczny; MDS 5q(-) — zespół mielodysplastyczny związany z izolowaną delecją chromosomu 5q; RA — niedokrwistość oporna na leczenie; RAEB — niedokrwistość oporna na leczenie z nadmiarem blastów; RARS — niedokrwistość oporna na leczenie z obecnością pierścieniowatych syderoblastów; RCMD — cytopenia oporna na leczenie z wieloliniową dysplazją; RCUD — cytopenia oporna na leczenie z jednoliniową dysplazją; RN — neutropenia oporna na leczenie; RT — małopłytkowość oporna na leczenie

AML jest obecność co najmniej 20% blastów (mieloblastów i/lub monoblastów/promonocytów, i/lub megakarioblastów) we krwi obwodowej lub szpiku. Rozpoznanie mięsaka mieloidalnego, pozaszpikowego guza zbudowanego z mieloidalnych komórek blastycznych, jest równoznaczne z rozpoznaniem AML, niezależnie od liczby blastów we krwi obwodowej lub szpiku. Ostrą białaczkę szpikową można również rozpoznać, jeśli odsetek blastów we krwi i/lub szpiku jest mniejszy niż 20%, ale występują następujące nieprawidłowości chromosomalne: t(8;21)(q22;q22), inv(16)(p13.1;q22), t(16;16)(p13.1;q22) lub t(15;17)(q22;q12).

W ostatniej klasyfikacji WHO zmiany genetyczne obejmujące głównie translokacje chromosomalne skorelowano z charakterystycznymi cechami morfologicznymi i obrazem klinicznym, tworząc jednostki kliniczno-patologiczno-genetyczne. Rearanżacje lub mutacje genów, które w warunkach prawidłowych kodują czynniki transkrypcyjne ważne dla różnicowania i dojrzewania komórek szpikowych, takie jak *RUNX1*, *RARA*, *CBFB* lub *NPM1*, mogą zaburzać dojrzewanie i różnicowanie komórek białaczkowych, podczas gdy mutacje genów związanych ze szlakami przekazywania sygnału, takie jak *FLT3*, *JAK2*, *RAS* lub *KIT*, mogą być odpowiedzialne za nieprawidłową proliferację lub przeżycie komórek nowotworowych. Często kombinacje tych nieprawidłowości prowadzą do rozwoju AML z odrębnymi cechami klinicznymi i morfologicznymi oraz z określonym czasem przeżycia. Odkrycie roli mutacji genetycznych będzie miało szczególne znaczenie w największej podgrupie chorych na AML, charakteryzujących się prawidłowym kariotypem. Zaburzenia genetyczne w AML są podstawą ich klasyfikacji, dostarczają informacji dotyczących rokowania i sposobu leczenia oraz najprawdopodobniej będą prowadzić do rozwoju nowych, bardziej skutecznych terapii celowanych (patrz rozdział *Patogeneza nowotworów układu krwiotwórczego*).

W klasyfikacji AML według WHO różne cechy mogą mieć znaczenie przy definiowaniu jednostek w jednej podgrupie chorób. W AML z powtarzalnymi nieprawidłowościami genetycznymi kluczem są morfologia i zaburzenia genetyczne. W AML z cechami zależnymi od mielodysplazji — morfologia, historia choroby i cytogenetyka mają równorzędne znaczenie w definiowaniu jednostek. W AML zależnej od terapii najważniejszym czynnikiem kwalifikującym do tej grupy nowotworów jest wywiad wskazujący na wcześniejsze leczenie cytotoksyczne. Ostra białaczka szpikowa bliżej nieokreślona (AML NOS, *acute myeloid leukemia, not otherwise specified*) obejmuje heterogenną grupę chorób i jest klasyfikowana głównie na podstawie morfologii; nie ma tu jednostek diagnozowanych na podstawie odrębnych cech klinicznych, immunofenotypowych lub genetycznych. Najprawdopodobniej grupa ta będzie coraz mniejsza wraz z rozwojem wiedzy i definiowaniem nowych specyficznych genetycznie podtypów AML.

Ostre białaczki o nieokreślonym pochodzeniu liniowym

Do grupy tej należą białaczki, których nie można zaliczyć ani do nowotworów wywodzących się z mielopoety, ani z limfopoety. Klasyfikacja WHO określa nowe kryteria diagnostyczne dla ostrej białaczki o mieszanym fenotypie (MPAL, *mixed phenotype acute leukemia*). Aktualnie definiowane są genetyczne pogrupy MPAL z podkreśleniem biologicznego i klinicznego znaczenia rearanżacji *BCR-ABL1* i *MLL* w tych chorobach.

Zalecenia diagnostyczne w nowotworach układu krwiotwórczego

Rozpoznanie nowotworów układu krwiotwórczego wymaga przeanalizowania danych klinicznych, morfologicznych, immunofenotypowych oraz genetycznych przez klinicystę i patologa. Mimo dużego znaczenia w diagnostyce nowoczesnych badań immunofenotypowych i genetycznych, morfologia komórek nowotworowych jest nadal kluczowym elementem rozpoznania. Jeśli badana próbka jest nieadekwatna do oceny morfologicznej, powinna być pobrana powtórnie. Ważne jest również prawidłowe zabezpieczenie i odpo-

wiednie przygotowanie techniczne materiału z krwi/szpiku do badań morfologicznych, histopatologicznych, cytogenetycznych i molekularnych. Rozpoznanie nowotworów układu krwiotwórczego powinno być ustalone przed włączeniem leczenia (w tym czynnikami wzrostu). Poniżej przedstawiono zalecenia dotyczące oceny materiału pobranego od chorych na nowotwory układu krwiotwórczego.

Material

Ocena zmian w szpiku w chorobach nowotworowych układu krwiotwórczego wymaga integracji wielu informacji uwzględniających pełne dane kliniczne i wyniki badań laboratoryjnych, takich jak morfologia krwi obwodowej oraz prawidłowo wykonane rozmazy krwi obwodowej i szpiku. W większości przypadków wymagane są równoległe badania: rozmazów krwi obwodowej i aspiratu szpiku oraz trepanobiopsji. Badania krwi obwodowej i szpiku powinny być wykonane przed włączeniem leczenia. Klasyfikacja WHO zaleca ocenę minimum 200 i 500 komórek odpowiednio w rozmazach z krwi obwodowej i biopsji aspiracyjnej szpiku, co zapewnia możliwość właściwej oceny zawartych w rozmazach elementów morfotycznych. Często konieczne jest przekazanie materiału uzyskanego drogą biopsji aspiracyjnej szpiku do immunofenotypowania metodą cytometrii przepływowej oraz badań genetycznych metodami cytogenetyki klasycznej (kariotyp), fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH, *fluorescent in situ hybridization*) oraz genetyki molekularnej (RT-PCR, *reverse transcriptase polymerase chain reaction*). Materiał do badań cytogenetycznych powinien być pobrany do próbki z heparyną litową, natomiast do badań molekularnych i immunofenotypowych metodą cytometrii przepływowej — do próbki z antykoagulantem EDTA (*ethylenediaminetetraacetic acid*). Trepanobiopsja szpiku powinna mieć co najmniej 1,5 cm długości i, jeśli to możliwe, powinna być pobrana pod kątem prostym w stosunku do kości korowej. Trepanobiopsyaty wymagają odwapnienia, ze szczególnym zwróceniem uwagi na zapewnienie optymalnego czasu, ponieważ zarówno zbyt długi, jak i zbyt krótki czas odwapnienia mogą niekorzystnie wpłynąć na jakość otrzymanych preparatów i możliwość uzyskania wiarygodnych barwień immunohistochemicznych.

Barwienia cytochemiczne

W ocenie rozmazów krwi i szpiku w przypadku nowotworów układu krwiotwórczego używane są barwienia cytochemiczne. Podstawowe jest barwienie May-Grumwald-Giemsa lub podobne barwienia. W diagnostyce MDS i niektórych MPN w rozmazach krwi/szpiku wykorzystuje się barwienie błękitem pruskim na obecność żelaza. W rozpoznawaniu nowotworów układu krwiotwórczego w celu określenia przynależności liniowej komórek nowotworowych stosowane są barwienia cytochemiczne mające na celu oznaczenie aktywności mieloperoksydazy (POX), oznaczenie aktywności nieswoistej esterazy (NE) z użyciem octanu alfa-naftyli oraz oznaczenie zawartości glikogenu (reakcja PAS). Obecnie w większości tych nowotworów wykorzystanie barwień cytochemicznych nie jest konieczne ze względu na stosowanie immunofenotypowania metodą cytometrii przepływowej i immunohistochemii w ocenie przynależności liniowej komórek. Barwienie włókien retikuliny metodą Gomoriego w trepanobiopsji w celu oceny włóknienia podścieliska szpiku jest niezbędne w różnicowaniu MPN.

Immunofenotypowanie metodą cytometrii przepływowej i immunohistochemii

Immunofenotypowanie można wykonywać metodą cytometrii przepływowej lub immunohistochemii, a każda z nich ma swoje zalety i wady, opisane w rozdziale poświęconym nowotworom układu chłonnego. W diagnostyce AML rekomendowane jest użycie co najmniej 3-kolorowej cytometrii przepływowej. Panel przeciwciał powinien być wystarczający do określenia pochodzenia liniowego rozrostu, jak również nieprawidłowego profilu antygenowego komórek nowotworowych, który potem wykorzystywany jest w ocenie choroby resztkowej. Immunohistochemia wykonywana w trepanobiopsji szpiku może być pomocna w diagnostyce nowotworów układu krwiotwórczego, ponieważ aktualnie dostępnych jest wiele przeciwciał do rozpoznawania antygenów mieloidalnych i limfoidalnych. Niemniej jednak cytometria przepływowa, ze względu na to, że jest metodą szybką (pozwala na uzyskanie wyniku w ciągu kilku godzin), ilościową i jakościową oraz pozwala na ocenę wielu antygenów równocześnie, jest metodą z wyboru w diagnostyce ostrych białaczek. Szczegółowe immunofenotypy dla poszczególnych nowotworów układu krwiotwórczego są łatwo dostępne w wielu publikacjach hematopatologicznych, w tym w aktualnej klasyfikacji WHO z 2008 roku (*Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*).

Ocena komórek blastycznych

Badania rozmazów krwi i szpiku mają decydujące znaczenie w ocenie liczby blastów. Liczba blastów, takich jak mieloblasty, monoblasty, promonocyty i megakarioblasty (ale nie dysplastyczne megakariocyty), decyduje o rozpoznaniu AML lub transformacji blastycznej. Ekwivalentem blastów w ostrej białaczce promielocytowej jest liczba nieprawidłowych promielocytów. Proerytoblasty nie są liczone jako blasty, z wyjątkiem rzadkich przypadków ostrej białaczki czystoczerwonokrwińkowej.

Ocena komórek blastycznych CD34+ metodą cytometrii przepływowej nie jest rekomendowana i nie powinna zastępować oceny liczby blastów w rozmazach krwi i szpiku. Nie wszystkie blasty wykazują ekspresję CD34, a domieszka krwi obwodowej i artefakty związane z obróbką materiału mogą być przyczyną złej interpretacji właściwej liczby tych komórek. Jeśli jednak liczba blastów CD34+ w badaniu cytometrii przepływowej jest większa niż w rozmazach krwi i szpiku, wymagana jest powtórna ocena obu badań w celu wyjaśnienia przyczyn różnicy. Jeżeli aspiraty są niediagnostyczne z powodu włóknienia lub wybitnie bogatokomórkowego szpiku, pomocne w ocenie liczby blastów może być immunohistochemiczne barwienie trepanobiopsji antygenem CD34 (jeśli blasty są CD34+).

Badania cytogenetyczne i molekularne

W klasyfikacji WHO z 2008 roku nowotworów układu krwiotwórczego szczególnie zaakcentowano wartość badań cytogenetycznych i molekularnych. Bardziej niż kiedykolwiek przedtem wyniki analiz cytogenetycznych są przydatne w rozpoznawaniu poszczególnych nowotworów. Ponadto w niektórych jednostkach nieprawidłowości molekularne stanowią cel terapeutyczny. W praktyce większość AML definiuje się na podstawie cytogenetycznych nieprawidłowości. Świadomość znaczenia badań cytogenetycznych i molekularnych oraz znajomość techniki tych badań (kariotyp, FISH, PCR) pozwalają na zabezpieczenie możliwości ich wykonania równoległe z pobieraniem materiału biopsyjnego szpiku. Badania metodą

FISH można również wykonywać z materiału pochodzącego z wysuszonych na powietrzu, nieutralonych rozmazów, natomiast do odzyskania DNA należy zeszkrobać część takiego preparatu. Ocena kariotypu wymaga założenia hodowli komórek, dlatego materiał do tego badania musi być świeży. Ocenia się co najmniej 20 metafaz z hodowli komórek szpiku. Wskazana jest ocena kariotypu z komórek szpiku przy pierwszym rozpoznaniu. Ponowne badania kariotypu pozwalają na ocenę odpowiedzi na leczenie lub obserwację ewolucji genetycznej. Dodatkowe badania genetyczne, takie jak FISH, RT-PCR, należy wykonywać, kierując się wynikami kariotypu i przy podejrzeniu określonego rozpoznania na podstawie danych klinicznych, wyników badań morfologicznych i immunofenotypowych. Rekomendowane jest badanie duplikacji *FLT3-ITD*, genów fuzyjnych charakteryzujących podtypy AML, jak również analiza mutacji w genach *NPM1* i *CEBPA* we wszystkich AML bez zaburzeń cytogenetycznych. Obecność mutacji *JAK2 V617F* oraz *MPL W515L* (przy braku mutacji *JAK2 V617F*) powinna być oceniona we wszystkich MPN *BCR-ABL1*-ujemnych. Ocena stanu mutacji genów *KIT*, *NRAS*, *PTNP11* i innych powinna mieć kliniczne uzasadnienie.

Korelacja danych i raport diagnostyczny

Ze względu na konieczność wielodyscyplinarnego rozpoznawania i klasyfikacji nowotworów układu krwiotwórczego zaleca się, aby różne badania diagnostyczne skorelowane były z wynikami badań klinicznych i odnotowane w jednym, zintegrowanym raporcie. Jeśli nie można rozpoznać danej jednostki chorobowej, raport powinien wskazywać przyczyny i sugerować dalsze badania dodatkowe, które doprowadzą do prawidłowej diagnozy. W celu zapewnienia wysokiej jakości diagnostyki nowotworów układu krwiotwórczego konieczna jest współpraca doświadczonego patomorfologa specjalizującego się w hematopatologii z hematologiem prowadzącym danego pacjenta.

Zalecane piśmiennictwo

- Hsi E. Hematopathology. Saunders/Elsevier, Philadelphia 2012.
- Hussong J.W., Arber D.A., Bradley K.T. i wsp. Protocol for the Examination of Specimens From Patients With Hematopoietic Neoplasms Involving the Bone Marrow. W: Reporting on Cancer Specimens: Case Summaries and Background Documentation. College of American Pathologists, Northfield, IL 2012.
- Jaffe E.S., Harris N.L., Vardiman J.W., Campo E., Arber D. (red.). Hematopathology. Saunders/Elsevier, Philadelphia 2011.
- Lewandowski K. Diagnostyka różnicowa przewlekłych nowotworów mieloproliferacyjnych Philadelphia-ujemnych. *Hematologia* 2010; 1: 59–70.
- Lewandowski K. Znaczenie prognostyczne zaburzeń molekularnych u chorych na ostrą białaczkę szpikową z prawidłowym kariotypem. *Hematologia* 2012; 3: 231–242.
- Porwitt A., McCullough J., Erber W.N. (red.). Blood and bone marrow pathology. Churchill Livingstone/Elsevier, Oxford 2011.
- Prochorec-Sobieszek M. Nowotwory mielodysplastyczno-mieloproliferacyjne — nowości i problemy diagnostyczne. *Hematologia* 2010; 3: 185–194.
- Swerdlow S., Campo E., Harris N. i wsp. (red.). WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC Press, Lyon 2008.
- Vardiman J.W., Thiele J., Arber D.A. i wsp. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 2009; 114: 937–951.