

# Bioptická diagnostika myeloproliferatívnych neoplázií

MUDr. Juraj Marcinek, PhD.<sup>1,2</sup>, prof. MUDr. Lukáš Plank, CSc.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Konzultačné centrum bioptickej diagnostiky ochorení krvotvorby v SR

<sup>2</sup>Ústav patologickej anatómie Jesseniovej lekárskej fakulty Univerzity Komenského a Univerzitnej nemocnice v Martine a Martinské bioptické centrum, s. r. o., v Martine

Myeloproliferatívne neoplázie (MPN) sú nádorové ochorenia krvotvorby vyznačujúce sa postupným rozvojom z iniciálnych štádií, cez obdobia s plne rozvinutou klinickou manifestáciou až do terminálnych fáz myelofibrózy, resp. blastovej transformácie. Transformácia MPN je sprevádzaná postupnou zmenou klinickej a laboratórnej manifestácie ochorení, ako aj morfológie kostnej drene (KD). Jednotlivé typy MPN sú za posledných 15 rokov definované medzinárodne akceptovanou a univerzálne aplikovateľnou klasifikáciou Svetovej zdravotníckej organizácie (SZO) s komplexným diagnostickým prístupom založeným na korelácii klinických a laboratórnych údajov s morfológiou nádorových buniek a výsledkami molekulárno-genetických analýz. Pre potvrdenie chronickej myeloidnej leukémie je kľúčová identifikácia *BCR-ABL1* fúzneho génu. Skupina *BCR-ABL1* negatívnych MPN je definovaná kombináciou tzv. „veľkých“ a „malých“ diagnostických kritérií, pričom najnovšia verzia SZO klasifikácie MPN zdôrazňuje úlohu bioptického vyšetrenia KD a taktiež dopĺňa recentne identifikované, pre MPN špecifické genetické abnormality (najmä mutácie kalretikulínového génu). To umožňuje nielen spoľahlivejšiu diferenciálnu diagnostiku skorých štádií MPN (odlíšenie esenciálnej trombocytémie od prefibrotickej primárnej myelofibrózy, resp. „prepolycytémického štádia“ pravej polycytémie) s podobnou klinickou manifestáciou, ale aj spoľahlivejšie odlíšenie MPN od reaktívnych, nenádorových zmien hemopoézy. Morfológia KD však môže byť ovplyvnená veľkým množstvom rôznych vonkajších aj vnútorných patologických faktorov (najmä cytoredukčná terapia MPN, pridružené ochorenia a ich liečba), čo musí patológ pri bioptickom vyšetrení KD zohľadniť. Preto znalosť relevantných klinických informácií a základných laboratórnych údajov vrátane výsledkov molekulárno-genetických analýz je nevyhnutná pre spoľahlivú bioptickú diagnostiku MPN.

**Kľúčové slová:** myeloproliferatívne neoplázie, diagnostické kritériá, biopsia kostnej drene

## Biopsy diagnosis of myeloproliferative neoplasms

Myeloproliferative neoplasms (MPN) are neoplastic diseases of haemopoiesis characterised by progressive development from initial phase to full blown stage up to final terminal phase with myelofibrosis or blastic transformation. Development of MPN is accompanied by subsequent changes in clinical and laboratory manifestation, as well as bone marrow (BM) morphology. In the last 15 years MPN categories are defined by universally accepted and widely used World Health Organisation (WHO) classification with complex diagnostic approach based on correlation of clinical and laboratory dates with morphology of neoplastic cells and results of molecular and genetic analyses. For the diagnosis of chronic myelogenous leukaemia the proof of *BCR-ABL1* fusion gene remains crucial. The group of *BCR-ABL1*-negative MPN is defined by combination of „major“ and „minor“ WHO diagnostic criteria, stressing the importance of BM biopsy and recently identified MPN specific genetic abnormalities (predominantly the calreticuline gene mutations). This improves the differential diagnostic reliability, mainly in early MPN stages (essential thrombocytemia, „prefibrotic“ primary myelofibrosis and „prepolycythemic“ polycythemia vera) showing similar clinical manifestations, as well as the possibility to separate MPN from non-neoplastic (reactive) changes of haemopoiesis. BM morphology can be affected by numerous external and internal pathologic impacts (especially MPN cytoreductive therapy, associated diseases and their treatment), what has to be respected by pathologist's BM biopsy evaluation. The knowledge of relevant clinical informations and basic laboratory dates, including results of molecular and genetic investigations is essential for reliable BM biopsy assessment of MPN patients.

**Key words:** myeloproliferative neoplasms, diagnostic criteria, bone marrow biopsy

Onkológia (Bratisl.), 2018;13(2):108-113

## Úvod

Myeloproliferatívne neoplázie (MPN) sú nádorové ochorenia krvotvorby vznikajúce na úrovni nezrelej kmeňovej bunky hemopoézy vedúce k zvýšenej proliferácii buniek kostnej drene (KD) pri ich zachovanej maturácii. Výsledným efektom je zmnoženie zreých a často aj plne funkčných bunkových elementov v periférnej krvi spôsobujúcich široké spektrum klinických príznakov a kom-

plikácií (1). Napriek limitovanému počtu konkrétnych nozologických jednotiek (tabuľka 1) sú MPN široká a pestrá skupina onkologických ochorení hemopoézy vyznačujúca sa vysokou variabilitou klinickej a laboratórnej manifestácie spôsobenej postupnou transformáciou morfológického obrazu nádoru v KD. Základnú definíciu, klasifikáciu a princípy diagnostiky MPN sú za uplynulých 15 rokov definované Svetovou zdravot-

níckou organizáciou (SZO) v medzinárodne akceptovanej a široko aplikovanej klasifikácii, ktorej posledná, tretia verzia bola zverejnená koncom minulého roka (2). Cieľom práce je v zjednodušenej forme oboznámiť širokú lekársku verejnosť a najmä hematológov a onkológov s úlohou patológa v multidisciplinárnej spolupráci vedúcej k diagnostike MPN a s problémami, ktoré bioptická diagnostika MPN v praxi prináša.

Aktuálne princípy klasifikácie, základné nozologické jednotky a ich diagnostické kritériá ostávajú v porovnaní s predchádzajúcou SZO klasifikáciou z roku 2008 (3) identické, resp. podobné, a preto dnes hovoríme skôr o revízii predchádzajúcej, ako o vytvorení novej SZO klasifikácie. Potreba „obnoviť“, resp. vylepšiť predchádzajúcu klasifikáciu vychádza z niekoľkých základných skutočností. Jednak došlo celkovo k výraznému rozvoju poznatkov o hematologických neopláziách, najmä o ich genetickom pozadí a identifikácii nových mutácií kľúčových pre potvrdenie, resp. prognózu MPN (4), ktoré boli následne implementované do diagnostických kritérií týchto ochorení. Taktiež boli štandardizované a presnejšie definované morfológické kritériá MPN s cieľom zvýšenia ich efektívnosti a interpersonálnej reprodukovateľnosti medzi hodnotiacimi patológmi (5). Dôležitú úlohu zohrali aj klinické štúdie opakovane potvrdzujúce nevyhnutnosť komplexného diagnostického prístupu k hematologickým neopláziám, v zmysle vzájomnej korelácie klinických a laboratórných údajov s morfológiou nádorových buniek a výsledkami cytogenetických, resp. molekulárno-genetických vyšetrení (5, 6). Spomedzi klinických údajov základom ostáva klinická manifestácia, údaje o dĺžke trvania a vývoji ochorenia, použitá liečba a jej následný efekt, ako aj iné pridrúžené ochorenia pacienta, ktoré môžu ovplyvňovať hemopoézu, resp. krvný obraz (KO). Z laboratórných vyšetrení je nevyhnutnosťou znalosť základného a diferenciálneho KO, zobrazovacie metódy zamerané na slezinu, pečeň, resp. lymfatické uzliny a prietoková cytometria (FC), najmä pri podozrení na blastovú transformáciu ochorení. Základnou metódou morfológického hodnotenia MPN je trepanobiopsia KD umožňujúca nielen hodnotenie cytológie a množstva nádorových buniek, ale aj opis topografického usporiadania nádorovej hemopoézy a detailné zhodnotenie dostatočného množstva (aspoň 50) nádorových megakaryocytov (MGK), ktorých morfológia je kľúčová pre diferenciálnu diagnostiku MPN (7). Trepanobiopsia umožňuje aj stanovenie prítomnosti a rozsahu myelofibrózy (MF) v KD, čo slúži nielen

pre diferenciálnu diagnostiku ochorení, ale najmä pre stanovenie prognózy pacientov, čo cytologické vyšetrenie neumožňuje. Cytologické vyšetrenie náteru z periférnej krvi, resp. KD realizované hematológmi je, naopak, nevyhnutné v prípadoch podozrenia na zmnoženie blastov či výskytu dysplázií. To umožňuje v súčinnosti s FC analýzou spoľahlivejšiu kvantifikáciu a typizáciu blastov či stanovenie dysplázií granulopoézy, v čom má bioptické vyšetrenie KD len obmedzené možnosti. Znalosť všetkých uvedených informácií umožňuje vyšetrujúcemu patológovi spoľahlivo stanoviť výslednú diagnózu, aj keď v tomto smere konečné slovo má ošetrojúci lekár, hematológ, ktorý je zodpovedný za následný manažment a liečbu pacienta.

V prípade MPN, ako aj pri iných myeloidných neopláziách platí, že ide o dynamické ochorenia, ktorých morfológický obraz sa počas niekoľkoročného, resp. niekoľko desaťročí trvajúceho ochorenia postupne mení. S tým súvisí aj zmena klinickej manifestácie, sprievodných komplikácií a najmä zmena manažmentu a liečby pacienta (1, 8). Existujú dva základné princípy priebehu MPN. Prvým je fibrotická transformácia MPN (9), kedy skoré („prefibrotické“) štádiá ochorenia sú bez sprievodnej myelofibrózy (MF0), resp. sprevádzané len nízkym, počínajúcim stupňom myelofibrózy (MF1), ktorý neovplyvňuje klinickú manifestáciu ochorenia. Následkom rastových faktorov uvoľnených z nádorových buniek (najmä z MGK) dochádza k stimulácii retikulocytov KD a následnej progresii MF do rozvinutého („fibrotického“) štádia (MF2) a následne až do tzv. terminálneho štádia (MF3), často sprevádzaného osteosklerotickým zhrubnutím kostných trabekúl. V tejto fáze dochádza aj k zásadnej zmene klinickej manifestácie ochorenia (1, 8). Hodnotenie stupňa fibróznych či osteosklerotických zmien KD prešlo zložitým historickým vývojom s množstvom rôznych klasifikačných prístupov a schém. Preto SZO klasifikácia uprednostnila jednoduchý a praktický, najčastejšie používaný, štvorstupňový gradovací systém, ktorého definitívne upravená verzia bola predstavená v recentnej verzii SZO klasifikácie (10). Druhou možnosťou vývoja je blastová

transformácia MPN, kedy v dôsledku no-vo získaných genetických abnormalít dochádza k poškodeniu až blokade maturácie nádorových buniek so zmnožením najmenej zreých elementov (blastov). Počas dlhoročného, stabilného priebehu MPN zvyčajne celkové množstvo myeloblastov nepresahuje normálne hodnoty (do 5 % buniek KD, resp. menej ako 1 % buniek PK), čo nazývame „chronickou fázou“ MPN (CF). Zmnoženie myeloblastov nad tieto hodnoty (5 – 19 % buniek KD, 1 – 19 % buniek PK) predznamená rôzne dynamický progres MPN do agresívnejších štádií s potrebou zvýšeného sledovania pacientov nazývaného „akcelerovaná fáza“ MPN (AF). Po dosiahnutí, resp. prekročení arbitrárne stanovenej hranice 20 % myeloblastov v KD, resp. PK vstupuje ochorenie do „blastovej fázy“ (BF), čo je analógom blastovej transformácie myelodysplastických syndrémov (MDS) a v zásade predstavuje prechod ochorenia do akútnej leukémie aj s potrebou zmeny manažmentu a terapie pacienta (11). V závislosti od štádia klinického záchytu pacientov sa preto patológ stretáva s variabilným obrazom jednotlivých MPN, pričom najmä po dlhoročnom priebehu často dochádza v pokročilých štádiách ku kombinácii fibrotickej aj blastovej transformácie bez možnosti morfológickej typizácie týchto ochorení (12).

Úloha patológa bioptika je pri diagnostike BCR-ABL1-pozitívnej chronickej myeloidnej leukémie (CML) zásadne odlišná od úlohy pri diagnostike ochorení v skupine BCR-ABL1-negatívnych myeloproliferácií zahrňajúcich najmä pravú polycytémiu (PV), esenciálnu trombocytémiu (ET) a primárnu myelofibrózu (PMF), ako aj iné, zriedkavejšie typy MPN (tabuľka 1). Základom potvrdenia CML sú molekulárno-genetické analýzy zamerané na potvrdenie špecifickej translokácie t(9;22) vedúcej k vzniku kauzálneho, BCR-ABL1 fúzneho génu, ktorý je kľúčový pre následnú terapiu a prognózu pacientov. Preto biopsia KD nie je za bežných okolností potrebná pre potvrdenie CML (2, 3). Napriek tomu má ochorenie v zásade charakteristický morfológický obraz spočívajúci v ťažko hypercelulárnej KD pri dominujúcej proliferácii vyzrievajúcej granulopoézy,

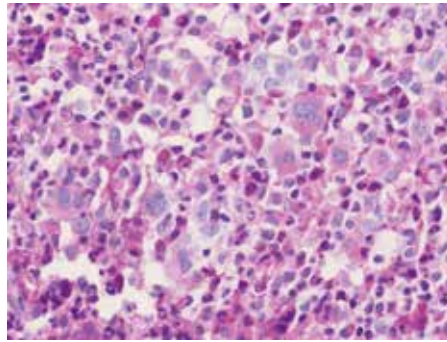
**Tabuľka 1.** Myeloproliferatívne neoplázie

<i>BCR-ABL1</i> -pozitívna chronická myeloidná leukémia
Chronická neutrofilná leukémia
Pravá polycytémia
Primárna myelofibróza
Esenciálna trombocytémia
Chronická eozinofilná leukémia
Bližšie neklasifikovateľná myeloproliferatívna neoplázia

**Tabuľka 2.** Diagnostické kritériá pravej polycytémie

Veľké kritériá
1. Hemoglobín > 16,5 g/dl alebo hematokrit > 49 % u mužov
Hemoglobín > 16,0 g/dl alebo hematokrit > 48 % u žien
alebo
Zvýšený celkový objem erytrocytov v PK (> 25 % normálnej hodnoty)
2. Biopsia KD s obrazom hypercelulárnej hemopoézy vzhľadom na vek s trilineárnou proliferáciou granulopoézy, erytropoézy a zreých pleomorfných megakaryocytov (rôznej veľkosti)
3. Prítomnosť mutácie <i>JAK2V617F</i> , resp. mutácie <i>JAK2</i> v exóne 12
Malé kritériá
Znížená hladina erytropoetínu v sére
Diagnóza PV vyžaduje všetky tri veľké kritériá alebo prvé dve veľké kritériá a malé kritérium

často so zreteľným posunom k menej zreým formám vrátane zrnitosti myeloblastov (tzv. „posun doľava“). Erytropoéza býva výrazne redukovaná, bez dysplázií. Množstvo MGK býva variabilné, na základe čoho sme v minulosti rozlišovali tzv. „granulocytový“ (normálne množstvo MGK, bez výraznejšej MF) a „granulocyto-megakaryocytový“ podtyp (zvýšené množstvo MGK, často asociované s MF) (7, 12). V špecifickej terapii inhibítormi tyrozínových kináz (TKI) však v súčasnosti táto typizácia nemá praktický význam. V oboch podtypoch sú MGK malé, hypobulizované, tzv. „trpasličie“ (obrázok 1), čo umožňuje patológovi potvrdiť CML, resp. odlíšiť ochorenie od reaktívnych hyperplázií hemopoézy aj pri neznalosti výsledkov mol-genetických analýz. To je dôležité najmä pre potvrdenie tzv. atypickej CML (*BCR-ABL1*-negatívnej), ktorej morfológické črty sú v biopsii KD veľmi podobné klasickej, *BCR-ABL1*-pozitívnej CML (13). Zásadnejšou úlohou patológa pri bioptickom vyšetrení CML je stano-

**Obrázok 1.** Malé, hypobulizované až nelobulizované, „trpasličie“ MGK typické pre CML (PAS, 200-krát)

venie množstva myeloblastov v KD, ktoré bývajú pri CML často zreteľne zrnité (AF, resp. BF). Treba však zdôrazniť, že nová SZO klasifikácia výrazne prepracovala a rozšírila kritériá AF ochorenia. Tie dnes spočívajú najmä v kombinácii hematologických a cytogenetických kritérií, pričom množstvo blastov v KD je len jedným z viacerých hodnotených faktorov (14). Zavedené boli aj „provizórne“ kritériá AF v zmysle odpovede ochorenia na liečbu TKI, pričom efektívnosť týchto kritérií preveria nasledujúce klinické štúdie. Definícia BF CML ostáva nezmenená ( $\geq 20$  % blastov v PK, resp. KD alebo extramedulárna akumulácia blastov), aj keď percentuálna hranica BF CML bola a stále ostáva v ére modernej liečby diskutovaná.

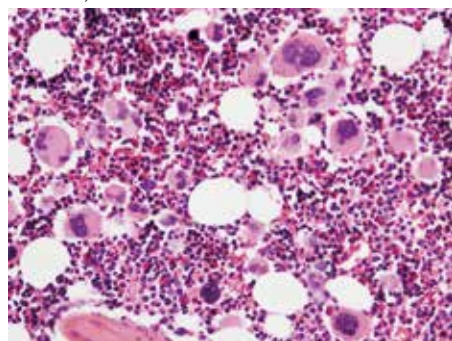
Diagnostika *BCR-ABL1*-negatívnych MPN je, podobne ako v predchádzajúcej SZO klasifikácii, založená na kombinácii tzv. „veľkých“ a „malých“ diagnostických kritérií (2, 3). Morfológia nádorových buniek vyšetrená biopsiou KD je dlhodobo považovaná za rozhodujúcu pre diferenciálnu diagnostiku *BCR-ABL1*-negatívnych PMN a najmä ich iniciálnych štádií (7). Problém však je, že hodnotenie niektorých histologických znakov, najmä morfológie MGK radu je do veľkej miery subjektívne ovplyvnené množstvom vedomostí a najmä skúseností vyšetrujúceho patológa. Preto niektoré práce v minulosti spochybňovali objektivitu hodnotenia týchto znakov širokou verejnosťou patológov vrátane špecializovaných hematopatológov (15). V následnosti na to pracovná skupina prof. Thieleho (najuznávanejší odborník v bioptickej diagnostike MPN a spoluautor SZO klasifikácie) bližšie špecifikovala a štandardizovala tieto diagnostické

kritériá s výslednou interpersonálnou reprodučibilitou až takmer 90 % (5), čím opätovne potvrdila úlohu biopsie KD v diagnostike MPN. K významným zmenám došlo aj na úrovni molekulárno-genetických analýz, kedy za uplynulé desaťročie bolo identifikovaných viacero nových genetických abnormalít s diagnostickým, ale aj prognostickým potenciálom pre *BCR-ABL1*-negatívne MPN. Ide najmä o mutácie kalretikulínového génu vyskytujúce sa v prípadoch *JAK2V617F*, resp. *MPL* negatívnych prípadov ET a PMF, výrazne pomáhajúce k potvrdeniu klonality týchto ochorení (4).

Diagnostické kritériá PV spočívajú v kombinácii laboratórnych údajov s mol-genetickými analýzami a morfológiou KD (tabuľka 2). Morfológia KD, ktorá doteraz hrala menší význam v potvrdení ochorenia, získala na význame najmä svojím potenciálom odhaliť skoré štádiá PV (tzv. „prepolycytemické“ štádium), v ktorých sa pacienti klinicky manifestujú len trombocytózou, bez zreteľnej polyglobúlie, a preto nespĺňajú kritériá rozvinutého štádia ochorenia. Tieto prípady boli následne poddiagnostikované, resp. mylne diagnostikované ako iné typy MPN, a preto neboli adekvátne liečené. Morfológický obraz PV je preto dnes základným diagnostickým prvkom ochorenia umožňujúcim odlíšiť PV nielen od skorých štádií iných MPN, ako aj od podstatne častejších, nenádorových zmien hemopoézy asociovaných s polyglobúliou (16). PV sa manifestuje hypercelulárnou KD pri trilineárnej aktivácii všetkých troch radov hemopoézy, pričom zrnitá granulopoéza a erytropoéza sú morfológicky bez patologických zmien. Najdôležitejším znakom sú topograficky disorganizované MGK s tendenciou k zhlukovaniu až tvorbe tzv. „riedkych zhlukov“, kedy pomedzi nakopené MGK možno identifikovať zvyšky okolitej hemopoézy. Morfológicky ide o zmes malých, stredne veľkých až veľkých foriem (obrázok 2), jadrá sú normolobulizované až hyperlobulizované, často s objemnými, svetlými lalokmi, ktoré sa vzájomne prelínajú a môžu tak pripomínať „obláčikovitú“ morfológiu (7, 12). Toto viedlo v minulosti ku konfúzií termínov, kedy tzv. „obláčikovitá“ („cloud-like“), resp. „balónovitá“ jadrá typické pre PMF boli



**Obrázok 2.** Zmes malých, stredne veľkých až veľkých MGK s hyperlobulizovanými jadrami a objemnými lalokmi jadier, typické pre PV (HE, 100-krát)



zaznamenané aj v prípadoch PV. Iničiálne štádiá PV sú zväčša bez výraznejšej MF, bez depozít železitého pigmentu, aj keď tento dôležitý diagnostický znak môže byť ovplyvnený množstvom rôznych pridružených ochorení pacienta, ktoré treba brať pri hodnotení KD do úvahy.

PMF je dynamické ochorenie s variabilnou klinickou aj laboratórnou manifestáciou a morfológiou KD, ktoré sa menia v závislosti od progresie MF v KD a transformácie ochorenia z prefibrotického do rozvinutého, fibrotického štádia. Diagnostické kritériá staršej verzie SZO klasifikácie (2) sa vzťahovali len na rozvinuté štádiá PMF, čo neumožňovalo potvrdiť skoré štádiá ochorenia sprevádzané len trombocytózou, klinicky imitujúce iné MPN, najmä prognosticky výrazne odlišnú esenciálnu trombocytémiu (ET) (5). Aktuálna SZO klasifikácia (3) preto uvádza osobitné diagnostické kritériá prefibrotickej (tabuľka 3) a fibrotickej PMF (tabuľka 4), pričom v oboch prípadoch ide o kombináciu charakteristickej morfológie KD, resp. genetických abnormalít (tzv. „veľké“ diagnostické kritériá) s výrazne varirujúcimi laboratórnymi údajmi a klinickou manifestáciou ochorenia („malé“ diagnostické kritériá). Počínajúce prefibrotické štádiá vykazujú obraz hypercelulárnej KD pri bilineárnej aktivácii granulopoézy a MGK. Granulopoéza má zvyčajne zachovanú maturáciu, bez zreteľných abnormalít, zatiaľ čo erytropoéza býva redukovaná, ale bez dysplázií. MGK tvoria riedke, ale aj „tesné“ zhluky (MGK v tesnom vzájomnom kontakte, bez vmedzených buniek iných radov hemopoézy), morfologicky ide prevažne o väčšie formy so zreteľne abnormálnymi jadrami, najmä v zmysle

**Tabuľka 3.** Diagnostické kritériá prefibrotického štádia primárnej myelofibrózy

Veľké kritériá
1. Proliferácia megakaryocytov s atypiami bez výraznejšej myelofibrózy (MF0/MF1) sprevádzané zvýšenou celularitou KD s proliferáciou granulopoézy a často redukciou erytropoézy
2. Neprítomnosť SZO kritérií <i>BCR/ABL1</i> -pozitívnej CML, PV, ET, myelodysplastického syndrómu alebo iných myeloidných neoplázií
3. Prítomnosť mutácie <i>JAK2</i> , <i>CALR</i> alebo <i>MPL</i> génu alebo iného klonálneho markera, alebo vylúčenie reaktívneho pôvodu ľahkej retikulínovej myelofibrózy v KD
Malé kritériá
Prítomnosť aspoň jedného z nasledujúcich kritérií potvrdené dvoma následnými vyšetreniami
Anémia nespôsobená iným ochorením
Leukocytóza $\geq 11 \times 10^9/L$
Palpovateľná splenomegália
Hladina laktátdehydrogenázy nad normu pre konkrétne vyšetrujúce laboratórium
Diagnóza prefibrotického štádia PMF vyžaduje všetky tri veľké kritériá a aspoň jedno malé kritérium

prítomnosti abnormálne konfigurovaných, výrazne denzných, dysplastických jadri (obrázok 3). Typickou morfológiou asociovanou s PMF je prítomnosť objemných, hypolobulizovaných jadri so svetlým chromatínom, v minulosti označovaných aj ako „obľáčikovité“ či „balónovité“ jadrá (obrázok 3) (7, 12). Treba však zdôrazniť, že v prípadoch PMF možno identifikovať aj morfológiu MGK typickú pre ET, najmä pri vysokej trombocytóze v PK, čo komplikuje diferenciálnu diagnostiku iničiálnych štádií MPN (7, 12). Prefibrotické štádiá sú bez zrnivosti väziva (MF0), resp. vykazujú ľahké zrnivovanie retikulínových vlákien, bez sprievodnej kolagénovej fibrózy (MF1 presnejšie definovaná v tabuľke 5). Rozvinuté fibrotické štádiá sa vyznačujú zreteľnou retikulínovou fibrózou sprevádzanou rôznou mierou kolagénovej fibrotizácie KD (MF2/MF3 – tabuľka 5), resp. zrnivovaním kostných trabekúl (tzv. osteoskleróza). Celularita býva variabilná, pri nižších stupňoch MF skôr zvýšená proliferáciou bieleho a MGK radu, v pokročilejších štádiách však väzivo výrazne redukuje hemopoézu a vedie k jej nerovnomernému, ložiskovému usporiadaniu v KD. Cievy a sínusy KD sú zrnivé, dilatované, často obsahujúce zhluky extramedulárnej hemopoézy. MGK sú výrazne zrnivé,

**Tabuľka 4.** Diagnostické kritériá rozvinutého štádia primárnej myelofibrózy

Veľké kritériá
1. Proliferácia megakaryocytov s atypiami sprevádzaná rozvinutou retikulínovou alebo kolagénovou myelofibrózou (MF2/MF3)
2. Neprítomnosť SZO kritérií <i>BCR/ABL1</i> -pozitívnej CML, PV, ET, myelodysplastického syndrómu, alebo iných myeloidných neoplázií
3. Prítomnosť mutácie <i>JAK2</i> , <i>CALR</i> , alebo <i>MPL</i> génu, alebo iného klonálneho markera, alebo vylúčenie reaktívneho pôvodu myelofibrózy v KD
Malé kritériá
Prítomnosť aspoň jedného z nasledujúcich kritérií, potvrdené dvoma následnými vyšetreniami
Anémia nespôsobená iným ochorením
Leukocytóza $\geq 11 \times 10^9/L$
Palpovateľná splenomegália
Hladina laktátdehydrogenázy nad normu pre konkrétne vyšetrujúce laboratórium
Leukoerytroblastóza
Diagnóza fibrotického štádia PMF vyžaduje všetky tri veľké kritériá a aspoň jedno malé kritérium

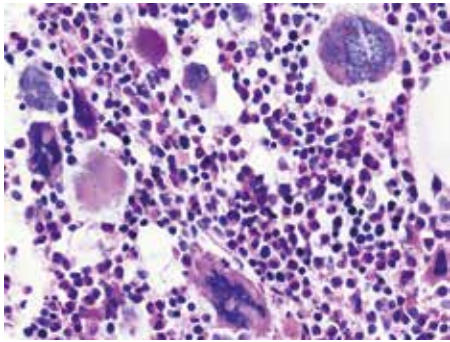
**Tabuľka 5.** Grading myelofibrózy

<b>MF-0:</b> roztrúsené retikulínové vlákna bez prekřížení zodpovedajúce normálnej KD
<b>MF-1:</b> riedka sieť retikulínových vlákien s početnými prekříženiami, najmä v okolí ciev
<b>MF-2:</b> difúzna a hustá sieť retikulínu s početnými prekříženiami, občas s fokálnymi zväzkami hrubých vlákien prevažne zodpovedajúce kolagénu a/alebo fokálna osteoskleróza
<b>MF-3:</b> difúzna a hustá sieť retikulínu s početnými prekříženiami a zväzkami hrubých vlákien zodpovedajúcimi kolagénu, zvyčajne sprevádzané osteosklerózou

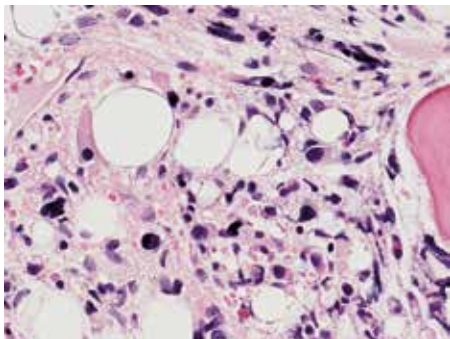
zhluky, tvoriace objemné zhluky a pruhy, ktoré sú paratrabekulárne či intrasinusoidálne dislokované, pričom dominujú stredne veľké a menšie formy s výrazne atypickými, denznými, dysplastickými jadrami (obrázok 4). Transformácia prefibrotickej PMF do fibrotického štádia je postupný, dlhodobý proces, ktorého dynamika je u jednotlivých pacientov individuálna, nepredikovateľná (9), bez možnosti účinnej terapie. Zriedkavo sa stretávame aj s prípadmi PMF zachytenými až v pokročilom fibrotickom štádiu, čo pripúšťa aj možnosť výrazne rýchlej progresie tohto ochorenia.

ET je najzriedkavejším a zároveň najťažšie diagnostikovateľným ochorením spomedzi MPN, keďže jeho klinická manifestácia je nešpecifická, nevykazuje žiadnu pre seba špecifickú genetickú abnormalitu a morfológický

**Obrázok 3.** Veľké MGK s hyperlobulizovanými, denznými, dysplastickými jadrami (vľavo) a objemné, svetlé, „obláčikovité“ jadro MGK (vpravo hore) typické pre PMF (HE, 400-krát)



**Obrázok 4.** Tesné zhluky stredne veľkých a malých MGK s hypolobulizovanými, denznými, dysplastickými jadrami, výraznou myelofibrózou a redukciou hemopoézy v terminálnych štádiách PMF (HE, 400-krát)



obraz býva imitovaný iniciálnymi štádiami iných MPN, najmä PMF (1, 5, 15). Základom spoľahlivého potvrdenia ET je kombinácia trombocytózy a charakteristického morfológického obrazu KD sprevádzaného genetickou abnormalitou typickou pre MPN a v prípade jej neprítomnosti, vylúčenie reaktívneho pôvodu trombocytózy (tabuľka 6). Celularita KD zodpovedá aktuálnemu veku pacientov s ET, prípadne je len ľahko zvýšená s monolinéárnym zmožením MGK, ktoré sú prevažne rozptýlené, ale môžu tvoriť aj riedke zhluky. Morfológicky dominujú veľké formy s hyperlobulizovanými, hlboko lobulizovanými jadrami s primeranou denzitou chromatinu, ktoré bývajú v literatúre prirovnávané k „jelením parohom“ (tzv. „staghorn-like“ morfológia) (obrázok 5). Treba však pripomenúť, že hyperlobulizované jadrá MGK vrátane hlbokoj lobulizácie typickej pre ET možno identifikovať aj v iných typoch BCR-ABL1-negatívnych MPN, najmä ak bývajú asociované s výraznou trombocytózou (7, 12). Granulopoéza a erytropoéza nebývajú u pacientov s ET alterované, preto akékoľvek zmoženie či posun doľava v gra-

**Tabuľka 6.** Diagnostické kritériá esenciálnej trombocytémie

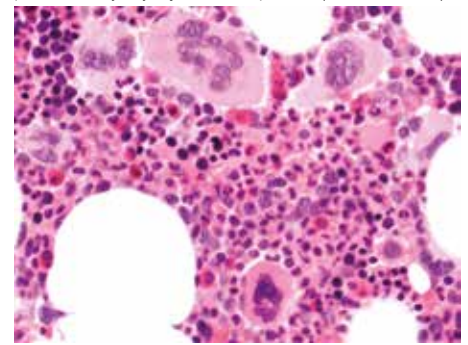
Veľké kritériá
1. Trombocyty > 450x10 <sup>9</sup> /L
2. Biopsia KD s proliferáciou megakaryocytov s zvýšeným množstvom veľkých megakaryocytov s hyperlobulizovanými jadrami, bez významného zmoženia či posunu doľava neutrofilnej granulopoézy alebo erytropoézy. Veľmi zriedkavo minimálne zmoženie retikulínových vlákien (MF1)
3. Neprítomnosť WHO kritérií BCR/ABL1-pozitívnej CML, PV, PMF, myelodysplastického syndrómu alebo iných myeloidných neoplázií
4. Prítomnosť mutácie JAK2, CALR alebo MPL génu
Malé kritériá
Prítomnosť klonálneho markera
Vylúčenie možnosti reaktívnej trombocytózy
Diagnóza ET vyžaduje všetky štyri veľké kritériá alebo prvé tri veľké kritériá a malé kritérium

nulopoézy alebo dysplázie erytropoézy spochybnujú dg. ET a treba zvážiť iné myeloidné neoplázie (PMF, MDS/MPN). V čase primodiagnostiky sú pacienti s ET bez MF v KD a len v ojedinelých prípadoch sa pripúšťa ľahký stupeň retikulínovej fibrózy (MF1), zatiaľ čo rozvinutá MF vylučuje dg. ET (9). Zásoby železitého pigmentu pri ET zvyčajne absentujú.

Pre úplnosť problematiky je nutné aspoň v skratke spomenúť zriedkavé typy MPN, ktorými sú chronická neutrofilná leukémia (CNL) a chronická eozinofilná leukémia (CEL). Ich diagnostika je v zásade založená na laboratórnom potvrdení predefinovaného množstva neutrofilov, resp. eozinofilov v PK a vylúčení opísaných MPN, ako aj širokého spektra iných, klinicky a geneticky definovaných myeloidných neoplázií, resp. reaktívnych zmien hemopoézy (t. j. diagnózy „per exclusionem“). Tieto ochorenia nevykazujú žiadne charakteristické morfológické zmeny KD a len pri diagnostike CNL môže pomôcť relatívne špecifická mutácia CSF3R, prítomná u väčšiny týchto pacientov (4).

Napriek opísaným diagnostickým kritériám a morfológickým zmenám viac či menej typickým pre rôzne typy MPN musíme skonštatovať, že napriek najlepšej snahe sa stretávame s prípadmi, ktoré vyšetrujúci patológ, resp. špecializovaný hematopatológ, nie je schopný spoľahlivo subtypizovať, t. j. bližšie netyrizovať MPN (MPN-NOS). Odôvodniť to možno viacerými skutočnosťami. Pôvod

**Obrázok 5.** Veľké MGK s hyperlobulizovanými, hlboko lobulizovanými jadrami vzhľadu „jeleních parohov“ vyskytujúcich sa pri ET (HE, 400-krát)



ochorenia v kmeňovej bunke hemopoézy so širokým diferenciačným potenciálom a možnosť vzájomnej kombinácie myeloproliferatívnych, resp. myelodysplastických zmien hemopoézy vytvárajú možnosť širokého spektra klinických i morfológických prejavov myeloidných neoplázií, ktoré nie vždy striktne spĺňajú dg. kritériá konkrétne definovanej nozologickej jednotky. Najmä v iniciálnych štádiách MPN bývajú morfológické zmeny KD len slabé a neúplne vyznačené (17) a ich subtypizácia je ťažká (prepolycytemická PV verzus prefibrotická PMF verzus ET). Treba však priznať, že napriek dlhodobým významným a nespochybniteľným výsledkom práce viacerých autorov SZO klasifikácie, ktorí sa snažia minimalizovať interpersonálnu variabilitu pri hodnotení morfológických zmien KD, vyhodnotenie niektorých úzko špecifických morfológických znakov MPN (najmä morfológie MGK) je výrazne závislé nielen od vedomostí, ale najmä od praktických skúseností vyšetrujúceho patológa (15), ktorý nie vždy je schopný sa rozhodnúť medzi zvažovanými diagnózami („sivá zóna“ MPN). Problémom sú aj terminálne, fibrotické štádiá MPN, resp. ochorenia v BF, kedy je pôvodný morfológický obraz výrazne narušený sprievodnou ťažkou fibrózou. Preto fibrotická, „spent“ fáza PV, ako aj zriedkavé prípady fibroticky transformovanej ET majú morfológické zmeny aj klinickú manifestáciu v zásade identické s terminálnym štádiom PMF (18, 12). V týchto prípadoch diferenciálnu diagnostiku umožňujú len relevantné klinické údaje (dĺžka trvania, resp. klinická a laboratórna manifestácia ochorenia v minulosti) alebo bioptická vzorka KD odobratá v skorších (prefibrotických) štádiách



ochorenia. Morfológia KD vrátane obrazu samotných MPN je ovplyvniteľná aj množstvom vonkajších či vnútorných patologických vplyvov na organizmus (napr. onkologické, infekčné, zápalové či iné ochorenia) (19) vrátane terapie pridružených ochorení (napr. chemoterapia a rádioterapia onkologických pacientov). Rovnako aj terapia (najmä cytoredukčná) samotných MPN výrazne ovplyvňuje ich morfológiu a vylučuje spoľahlivú subtypizáciu MPN (20). Napriek tomu sa v bežnej praxi stretávame s prípadmi odoslania trepanobiopsie KD až po nasadení iniciálnej cytoredukčnej terapie, ktorá spôsobuje zásadné zmeny jednak v celularity hemopoézy (zvyčajne pokles celularity), ako proporcionality jednotlivých radov (akcentácia erytropoézy pri liečbe erytropoetínom) a najmä výrazne ovplyvňuje morfológiu MGK (redukcia počtu, veľkosti aj lobulizácie nádorových MGK vrátane možnosti úplného vymiznutia nádorovej morfológie MGK). Preto prípady po cytoredukčnej terapii SZO klasifikácia apriorne pokladá za bližšie netypizovateľné (MPN-NOS). Reaktívne, nenádorové myeloproliferácie sú zvyčajne zreteľne odlišné od obrazu MPN, najmä prítomnosťou MGK s fyziologickou morfológiou. V prípadoch výraznej trombocytózy však môžu aj nenádorové MGK svojím množstvom, veľkosťou a lobulizáciou pripomínať nádorové zmeny a viesť k mylnej dg. „triple negative“ PMF, resp. ET (t. j. MPN bez mutácií JAK2, MPL či kalretikulínového génu). Napokon treba pripomenúť, že jedným zo základných predpokladov pre spoľahlivú diagnózu MPN je dostatočne objemná a kvalitná trepanobiopsia KD, pričom najnovšia verzia SZO klasifikácie vyžaduje pre spoľahlivú analýzu hemopoézy vzorku dĺžky minimálne 1,5 cm, resp. obsahujúcu aspoň desať neúplných intertrabekulárnych priestorov, bez odberových artefaktov. To je však často len zbožným priánim vyšetrojúceho patológa, najmä

v zaujímavých či diagnosticky zložitých prípadoch (poznámka autora).

### Záver

Pri tvorbe tejto práce sme vychádzali z faktu, že naše dielo bude súčasťou komplexného spracovania problematiky diagnostiky a liečby MPN. Tento príspevok je preto len pohľadom patológa bioptika na túto širokú tému, pričom pridelený priestor vrátane limitov počtu citačných zdrojov neumožňuje bližšie rozpracovanie tematiky ani detailnejší opis komplexných diagnostických kritérií MPN definovaných SZO. Diagnostika MPN je založená na multidisciplinárnej spolupráci širokého tímu medicínskych pracovníkov, najmä hematológov, laboratórnych pracovníkov, patológov, genetikov a onkológov. Oboznámenie a pochopenie úloh, možností, problémov a praktických limitov každého člena v tomto zložitom diagnostickom reťazci by malo viesť k zlepšeniu a skvalitneniu vzájomnej spolupráce. Výsledkom je rýchla, spoľahlivá a relevantná diagnóza vychádzajúca z moderných diagnostických kritérií, ktorá je prvým predpokladom budúcej úspešnej liečby pacienta.

### Literatúra

1. Michiels JJ, Kvasnicka HM, Thiele J. Chronic Ph1-negative myeloproliferative disorders (MPDs). European MPD Workshop, Clinical and Pathological Features of Ph1- MPDs, Rotterdam, 2004.
2. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. (Eds): World Health Organization classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: IARC Press, 2017.
3. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. (Eds): World Health Organization classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: IARC Press, 2008.
4. Tefferi A, Thiele J, Orazi A, et al. An overview on CALR and CSF3R mutations and proposal for revision of WHO diagnostic criteria for myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*. 2014;28(7):1407-1413.
5. Thiele J, Kvasnicka HM, Müllauer L, et al. Essential thrombocythemia versus early primary myelofibrosis: a multicenter study to validate the WHO classification. *Blood*. 2011;117(21):5710-5718.
6. Gianelli U, Iurlo A, Cattaneo C, et al. Cooperation between pathologists and clinicians allows a better diagnosis of Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative neoplasms. *Expert Rev Hematol*. 2014;7(2):255-264.

7. Thiele J, Kvasnicka HM, Fischer R. Histochemistry and Morphometry on Bone Marrow Biopsies in Chronic Myeloproliferative Disorders - Aids to Diagnosis and Classification. *Ann. Hematol*. 1999;78(11):495-506.
8. Michiels JJ, Kutti J, Stark P, et al. Diagnosis, Pathogenesis and Treatment of the Myeloproliferative Disorders Essential Thrombocythemia, Polycythemia Vera and Essential Megakaryocytic Granulocytic Metaplasia and Myelofibrosis. *The Nied J of Med*. 1999;54(2):46-62.
9. Kreft A, Büche G, Ghalibafian M, et al. The Incidence of Myelofibrosis in Essential Thrombocythemia, Polycythemia Vera and Chronic Idiopathic Myelofibrosis: A Retrospective Evaluation of Sequential Bone Marrow Biopsies. *Acta Haematol*. 2005;113(2):137-144.
10. Thiele J, Kvasnicka HM, Facchetti F, et al. European consensus on grading bone marrow fibrosis and assesment of cellularity. *Haematologica*. 2005;90(8):1128-1132.
11. Cervantes F, Rozman M, Rossell J, et al. A study of prognostic factors in blast crisis of Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukaemia. *Br J Haematol*. 1990;76(1):27-32.
12. Vardiman JW. Myelodysplastic syndromes, chronic myeloproliferative diseases, and myelodysplastic/myeloproliferative diseases. *Semin Diagn Pathol*. 2003;20(3):154-179.
13. Hernández JM, del Canizo MC, Cuneo A, et al. Clinical, hematological and cytogenetic characteristics of atypical chronic myeloid leukemia. *Ann Oncol*. 2000;11(4):441-444.
14. Deininger MW. Diagnosing and managing advanced chronic myeloid leukemia. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*. 2015;35:e381-e388.
15. Wilkins BS, Erber WN, Bareford D, et al. Bone marrow pathology in essential thrombocythaemia: interobserver reliability and utility for identifying disease subtypes. *Blood*. 2008;111(1):60-70.
16. Thiele M, Kvasnicka M. Diagnosis of Polycythemia Vera Based on Bone Marrow Pathology. *Curr Hematol Rep*. 2005;4(3):218-223.
17. Kvasnicka HM, Thiele J. Prodromal myeloproliferative neoplasms: the 2008 WHO classification. *Am J Hematol*. 2010;85(1):62-69.
18. Georgii A, Bühr T, Buesche G, et al. Classification and Staging of Ph-negative Myeloproliferative Disorders by Histo-pathology from Bone Marrow Biopsies. *Leukemia and Lymphoma*. 1996;22(1):15-29.
19. Foucar K, Viswanatha DS, Wilson CS. Non-Neoplastic Disorders of Bone Marrow. Washington, DC: American registry of Pathology, 2009.
20. Thiele J, Kvasnicka HM, Schmitt-Gräff A, et al. Therapy-related changes of the bone marrow in chronic idiopathic myelofibrosis. *Histol Histopathol*. 2004;19(1):239-250.

### MUDr. Juraj Marcinek, PhD.

Ústav patologickej anatómie  
JLF UK a UNM  
Kollárova 2, 036 59 Martin  
marcinek@jfmed.uniba.sk

