

# Przewlekła białaczka szpikowa jako drugi nowotwór mieloproliferacyjny u pacjentki z wieloletnim przebiegiem pierwotnej mielofibrozy

## Chronic myeloid leukemia as the second myeloproliferative neoplasm evolving after primary myelofibrosis

Bożena Katarzyna Budziszewska<sup>1</sup>, Monika Prochorec-Sobieszek<sup>2</sup>,  
 Katarzyna Borg<sup>2</sup>, Iwona Solarska<sup>2</sup>, Ewa Lech-Marańda<sup>1</sup>, Krzysztof Warzocha<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Klinika Hematologii, Instytut Hematologii i Transfuzjologii, Warszawa

<sup>2</sup>Zakład Diagnostyki Hematologicznej, Instytut Hematologii i Transfuzjologii, Warszawa

### Streszczenie

*Przewlekłe nowotwory mieloproliferacyjne (MPN) dzieli się na choroby bez obecności chromosomu Filadelfia (Ph) i przewlekłą białaczkę szpikową (CML) z obecnością chromosomu Ph. Chociaż każdy z tych nowotworów cechuje się określonymi objawami klinicznymi i laboratoryjnymi, to niekiedy choroby te mogą współistnieć, prezentując klinicznie i trudne do klasyfikacji zespoły nakładania. Przedstawiono przypadek 44-letniej pacjentki, u której w 2004 roku rozpoznano, zgodnie z obowiązującymi kryteriami Światowej Organizacji Zdrowia, pierwotną mielofibrozę (PMF). Po 4 latach obserwacji u chorej pojawił się chromosom Ph, ale obraz morfologiczny szpiku pozostawał taki, jak w PMF. Rozpoznano wówczas CML o nietypowej prezentacji histologicznej szpiku. Leczenie imatynibem, trwające 10 miesięcy, było nieskuteczne i powikłane głęboką niedokrwistością, wymagającą zmniejszania dawki, odstawiania leku i przetaczania koncentratów krwinek czerwonych. Dopiero włączenie nilotynibu spowodowało eradykację klonu Ph(+), ale jednocześnie ujawniło kilka nieprawidłowych klonów Ph(-) z licznymi mutacjami, świadczącymi o dużej niestabilności genetycznej. Przebieg kliniczny i wyniki badań molekularnych pozwoliły na rozpoznanie dwóch nowotworów PMF i CML, które najprawdopodobniej rozwinęły się z dwóch niezależnych klonów komórkowych. Prezentowany przypadek dowodzi, że diagnostyka MPN nie zawsze jest łatwa, a w sytuacjach o nietypowym przebiegu klinicznym i nakładających się aberracjach molekularnych należy brać pod uwagę współistnienie dwóch nowotworów. Duże znaczenie w takich przypadkach ma monitorowanie cytogenetyczne i molekularne, które nie tylko umożliwia dokonanie właściwego rozpoznania MPN, ale również, co przedstawiono w niniejszej pracy, pozwala na identyfikację nowych klonów komórkowych prowadzących do rozwoju kolejnego nowotworu.*

**Słowa kluczowe:** przewlekłe nowotwory mieloproliferacyjne, pierwotna mielofibroza, przewlekła białaczka szpikowa, niestabilność genetyczna

*Hematologia* 2012; 3, 3: 271–279

## Abstract

*Chronic myeloproliferative neoplasms (MPN) can be categorised into Philadelphia-negative (Ph-) disorders and Philadelphia-positive (Ph+) chronic myeloid leukaemia (CML). Each of these neoplasms presents specific clinical and laboratory symptoms however occasionally these diseases may coexist together, thus making classification difficult when such syndromes overlap. A case study is presented of just such an occurrence. This was a 44-year-old woman with primary myelofibrosis (PMF) that had been recognised in 2004 according to obligatory WHO criteria. After four years of follow-up the Ph chromosome appeared. Despite still having bone marrow morphology characteristic of PMF, CML was found as shown by an atypical bone marrow histology. A ten-month treatment with imatinib proved ineffective with complications arising of profound anaemia thereby requiring dose reduction, withdrawing the drug and red blood cell transfusion. It was only by administering nilotinib that the Ph+ clone was eradicated, however at the same time some abnormal Ph- clones were observed showing numerous mutations indicative of genetic instability. The clinical course and molecular biology results then enabled recognition of two MPNs, namely PMF and CML, which had probably evolved from two independent cell clones. This case therefore demonstrates that diagnosing MPN can be challenging. The coexistence of two neoplasms should be taken into consideration in cases presenting an unusual clinical course and overlapping molecular abnormalities. Cytogenetic and molecular monitoring is thus important in such clinical cases. It allows not only a diagnosis MPN, but also new cell clones can be identified that lead to another MPN emerging as shown in this case report.*

**Key words:** chronic myeloproliferative neoplasms, primary myelofibrosis, chronic myeloid leukemia, genetic instability

*Hematologia 2012; 3, 3: 271–279*

## Wprowadzenie

Pierwotna mielofibroza (PMF, *primary myelofibrosis*), podobnie jak czerwienica prawdziwa (PV, *polycythemia vera*) i nadpłytkowość samoistna (ET, *essential thrombocythemia*), należą do przewlekłych nowotworów mieloproliferacyjnych (MPN, *myeloproliferative neoplasms*) Filadelfia-ujemnych (Ph-, *Philadelphia negative*). Poza tymi zasadniczymi zespołami, według klasyfikacji Światowej Organizacji Zdrowia (WHO, *World Health Organization*) z 2008 roku, do grupy MPN Ph- zalicza się również: układową mastocytozę, przewlekłą białaczkę eozynofilową, przewlekłą białaczkę neutrofilową i niesklasyfikowany MPN [1]. Wszystkie te choroby charakteryzuje klonalna mieloproliferacja, ale różnorodność objawów i przebiegu klinicznego jest związana z profilem genetycznym. Obecność chromosomu Philadelphia (Ph) i/lub genu fuzyjnego *BCR-ABL* jest niezbędnym kryterium rozpoznania przewlekłej białaczki szpikowej (CML, *chronic myeloid leukemia*). Wiadomo jednak, że mutacja *BCR-ABL* może się również pojawić w innych nowotworach układu

krwiotwórczego i nie towarzyszą jej kliniczne i laboratoryjne cechy CML [2–5]. W PMF najczęściej spotykane zmiany cytogenetyczne, takie jak: del(20q), del(13q), del(12p), trisomia chromosomu 8, 9 oraz nieprawidłowości chromosomu 1 i 7, występują u 50–60% pacjentów [6, 7]. Molekularne markery obserwowane w PMF to przede wszystkim mutacje V617F w genie *JAK2* oraz mutacja *ASXL1*, występujące odpowiednio z częstością 60% i 40% przypadków. Pozostałe mutacje, takie jak: *MPL*, *IDH1/IDH2*, *TET2*, *CBL*, *EZH2*, występują u 4–17% chorych na PMF [8–10].

Chociaż w klasyfikacji WHO z 2008 roku przedstawiono jasny, zintegrowany pod względem klinicznym, histologicznym i genetycznym system kryteriów rozpoznania poszczególnych nowotworów mieloproliferacyjnych, to ich różnicowanie czasami bywa trudne z powodu nakładania się klinicznych i laboratoryjnych objawów tych chorób [11].

W niniejszej pracy zaprezentowano przypadek chorej z rozpoznaną początkowo PMF, u której po 4 latach doszło do rozwoju CML.

## Opis przypadku

Czterdziestoczteroletnia chora została skierowana do Poradni Chorób Krwi Instytutu Hematologii i Transfuzjologii (IHT) w 1998 roku z powodu nadpłytkowości i niewielkiego powiększenia śledziony (dolny brzeg 1 cm poniżej lewego łuku żebrowego). Badanie krwi obwodowej ujawniło podwyższoną liczbę płytek (PLT, *platelets*) — 637 G/l, przy prawidłowym stężeniu hemoglobiny (Hb) oraz prawidłowej leukocytozie. W rozmazie krwi obwodowej mieloblasty stanowiły 2%, promielocyty — 2%, granulocyty pałeczkowate 8%, granulocyty segmentowane — 55%, limfocyty — 28%, monocyty — 1%; wykazano podwyższoną aktywność fosfatazy alkalicznej granulocytów (FAG) 104 *score* (norma 15–65). Chora nie wyraziła wówczas zgody na badanie szpiku i nie zgłaszała się do poradni na kolejne wizyty. W 2003 roku pacjentka przebyła lobektomię prawego płuca z powodu raka niedrobnokomórkowego płuc i subtotalną strumektomię z powodu wola guzowatego tarczycy.

W 2004 roku chora została ponownie skierowana do Poradni Hematologicznej IHT. W badaniu morfologicznym krwi stwierdzono umiarkowaną niedokrwistość normocytową (Hb 9,8 g/dl); liczba krwinek białych pozostawała prawidłowa (7,7 G/l), a liczba PLT utrzymywała się na górnej granicy normy (449 G/l). W rozmazie krwi obwodowej obserwowano: 1% mieloblastów, 4% mielocytów, 5% metamielocytów, 40% granulocytów pałeczkowatych, 22% granulocytów segmentowatych, 1% granulocytów kwasochłonnych, 1% granulocytów zasadochłonnych, 24% limfocytów, 2% monocytów oraz obecność erytroblastów i krwinek czerwonych w kształcie łez. W badaniu ultrasonograficznym (USG) stwierdzono powiększoną śledzionę o długości 170 mm. W trepanobiopsji szpik wykazywał zwiększoną komórkowość; przeważała linia granulocytowa z zachowanym dojrzewaniem. Zwracały uwagę liczne, atypowe duże i małe megakariocyty w skupieniach, zlokalizowane okołoboleczkowo oraz włóknienie retikulino-podścieliska w stopniu 2. według EUMNET (*European Myelofibrosis Network*) (ryc. 1.A, B). Zgodnie z kryteriami WHO z 2001 roku rozpoznano przewlekłą idiopatyczną mielofibrozę [12]. W tym czasie nie wykonano badań molekularnych i cytogenetycznych, ale w 2012 roku przeprowadzono retrospektywną ocenę techniką fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH *fluorescence in situ hybridization*), pod kątem obecności genu fuzyjnego *BCR-ABL1*, w jądrach interfazowych izolowanych z materiału trepanobiopsyjnego pobranego od chorej w 2004 roku. Analiza 65 ko-

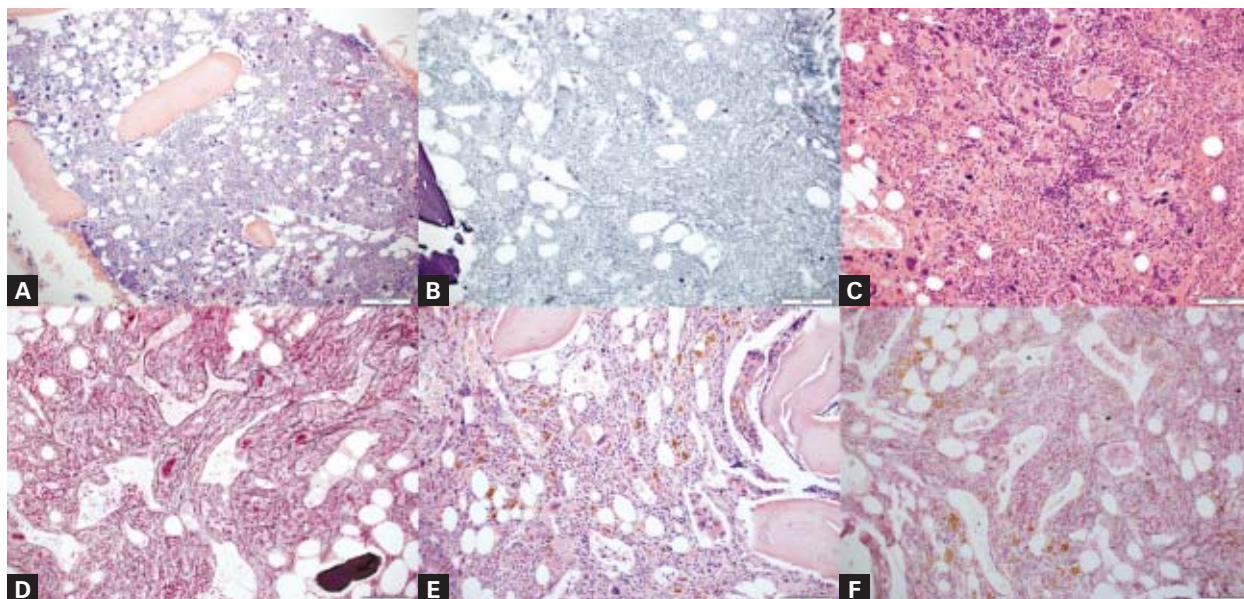
mórek nie wykazała obecności *BCR-ABL* charakteryzującego CML. W tym okresie chorą systematycznie monitorowano; wskaźniki morfologiczne utrzymywały się na stabilnym poziomie, nie wymagała leczenia cytoredukcyjnego ani przetaczania koncentratów krwinek czerwonych (kkcz) czy płytkowych (kcp).

W czerwcu 2008 roku doszło do zwiększenia leukocytozy do 29 G/l, w tym mieloblasty stanowiły 2%, promielocyty — 3%, mielocyty — 8%, metamielocyty — 23%, granulocyty pałeczkowate — 9%, granulocyty obojętnochłonne — 23%, kwasochłonne — 1%, zasadochłonne — 19%, limfocyty — 10%, a monocyty — 2%; widoczne były krwinki w kształcie łez i erytroblasty. Utrzymywała się niedokrwistość (Hb 9,5 g/dl) przy prawidłowej liczbie PLT (320 G/l). Stwierdzano obniżoną aktywność FAG (5 *score*). W badaniu USG opisano progresję splenomegalii (237 mm). W trepanobiopsji szpiku obserwowano progresję cech włóknienia i zwiększoną komórkowość. Obserwowano ponadto liczne dysplastyczne duże i małe megakariocyty w skupieniach, zlokalizowane okołoboleczkowo, hematopojęzę wewnątrzrzatokową, nasilone włóknienie retikulino-podścieliska (stopień 3.) oraz liczne poszerzone sinusoidy. Linia granulocytowa wykazywała cechy odmłodzenia, zaś linia czerwonej krwi była relatywnie uboższa (ryc. 1.C, D). Analiza kariotypu komórek szpiku kostnego wykazała obecność translokacji (9;22)(q34;q11) w 65% metafaz. Badanie molekularne metodą reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR, *polymerase chain reaction*) potwierdziło obecność transkrypty *BCR-ABL* p210. Nie stwierdzono mutacji V617F w genie *JAK2*.

Występowanie genu fuzyjnego *BCR-ABL*, brak mutacji V617F genu *JAK2*, wzrost leukocytozy z przesunięciem w lewo, zwiększenie odsetka granulocytów zasadochłonnych oraz obniżona aktywność FAG, przy charakterystycznej dla PMF morfologii szpiku, a szczególnie megakariocytów, stworzyły problem we właściwej klasyfikacji tej choroby. Zgodnie z kryteriami WHO z 2008 roku [1], według których obecność genu fuzyjnego *BCR-ABL* wyklucza diagnozę PMF, u chorej rozpoznano CML o atypowej prezentacji histopatologicznej przypominającej mielofibrozę i w lipcu 2008 roku włączono leczenie imatynibem w dawce 400 mg.

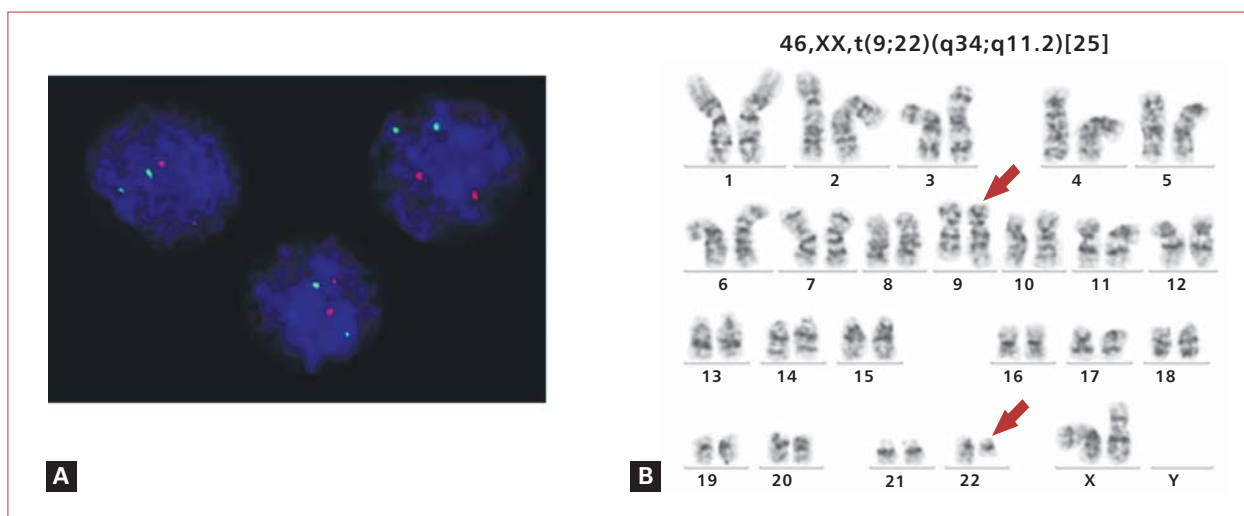
Po 2 miesiącach leczenia wystąpiła niedokrwistość (Hb 6,7 g/dl) 4. stopnia według WHO wymagająca przetaczania kkcch i czasowego odstawienia leku. Ponowne włączenie inhibitora kinazy, nawet w zmniejszonych dawkach (300 mg, 200 mg, 100 mg), nie zapobiegało bardzo ciężkiej niedokrwistości. Po 10 miesiącach stosowania imatynibu,

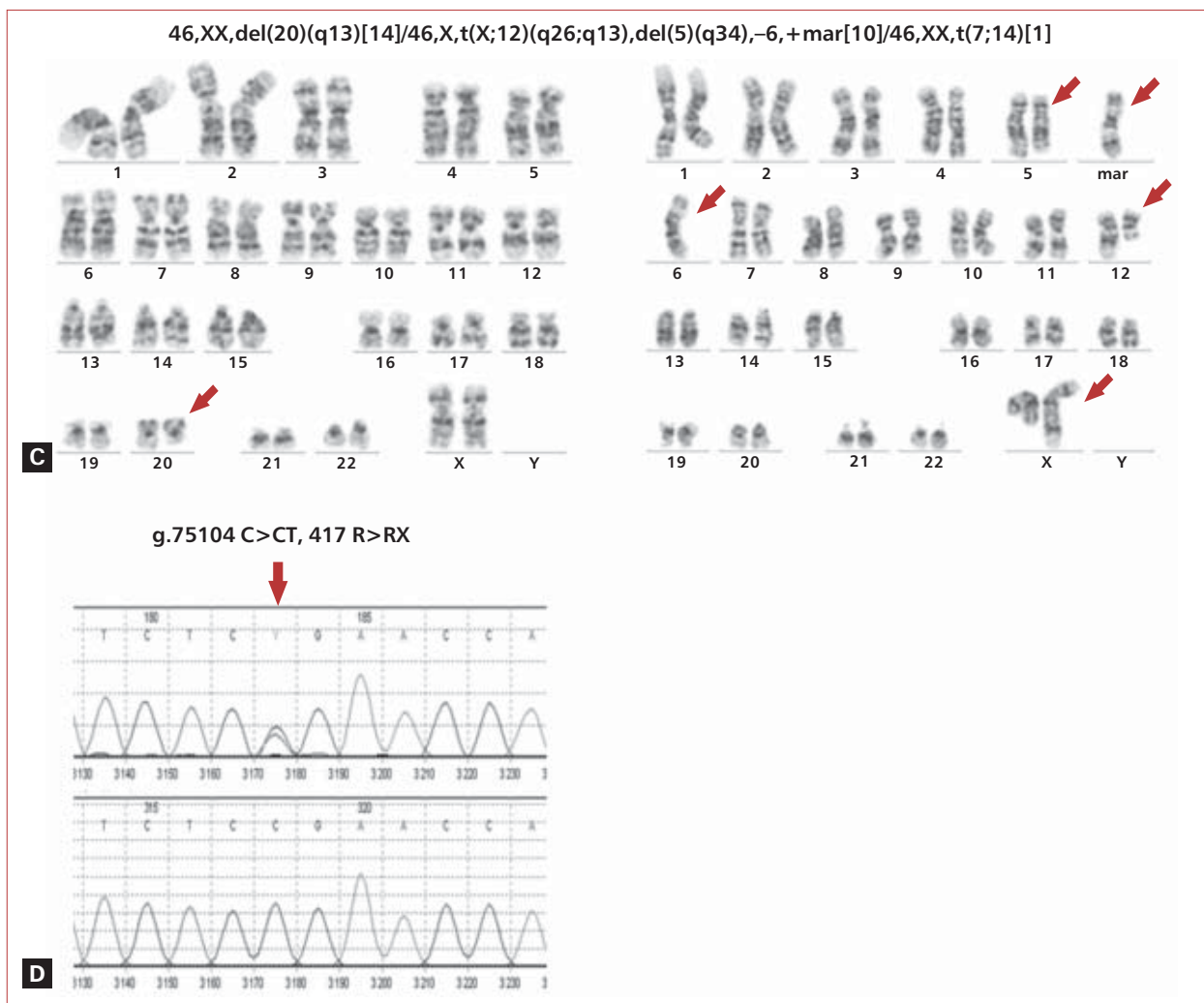




**Rycina 1.** Obraz histopatologiczny trepanobiopsji szpiku chorej na przewlekłą białaczkę szpikową wtórną do pierwotnej mielofibrozy: **A.** Badanie 1 (2004 r.). Szpik o zwiększonej komórkowości z proliferacją linii granulocytowej. Liczne atypowe duże i małe megakariocyty w skupieniach, w lokalizacji okołoboleczkowej. Barwienie hematoksyliną i eozyną (H&E),  $\times 100$ ; **B.** Włóknienie retikulinoe podścieliska w stopniu 2. Barwienie metodą Gomoriego,  $\times 100$ ; **C.** Badanie 2 (2008 r.): progresja mielofibrozy. Szpik o zwiększonej komórkowości, liczne atypowe duże i małe megakariocyty. Barwienie H&E,  $\times 200$ ; **D.** Nasilonie włóknienie retikulinoe podścieliska (stopień 3.) oraz poszerzone sinusoidy. Barwienie metodą Gomoriego,  $\times 200$ ; **E.** Badanie 3 (2011 r.). Szpik o zwiększonej komórkowości z przewagą linii granulocytowej z odmłodzeniem. Linia czerwonoekrwinkowa zubożała. Dysplastyczne duże i małe megakariocyty. Hematopoeza wewnątrzszatkowa. Barwienie H&E,  $\times 100$ ; **F.** Włóknienie retikulinoe podścieliska (stopień 3.). Barwienie metodą Gomoriego,  $\times 100$

**Figure 1.** Bone marrow trephine biopsy of the patient with chronic myeloid leukemia evolving secondary to primary myelofibrosis: **A.** The first pathology report (2004). Hypercellular bone marrow with granulocytic proliferation. Numerous large and small atypical megakaryocytes in clusters adjacent to endosteum. Hematoxylin & eosin (H&E) stain,  $\times 100$ ; **B.** Reticulin fibrosis (stage 2). Gomori stain,  $\times 100$ ; **C.** The second pathology report (2008): progression of myelofibrosis. Increased bone marrow cellularity. Numerous large and small atypical megakaryocytes and numerous dilated sinusoids. H&E stain,  $\times 100$ ; **D.** Marked reticulin fibrosis (stage 3). Gomori stain,  $\times 200$ ; **E.** The third pathology report (2008). Hypercellular bone marrow. Left-shift in granulopoiesis, reduced erythropoiesis. Dysplastic large and small megakaryocytes. Intrasinusoidal hematopoiesis. H&E stain,  $\times 200$ ; **F.** Reticulin fibrosis (grade 3). Gomori stain,  $\times 200$





**Rycina 2.** Cytogenetyczna i molekularna analiza przeprowadzona u chorej na przewlekłą białaczkę szpikową wtórną do pierwotnej mielofibrozy: **A.** Wynik badania metodą fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* jąder interfazowych izolowanych z materiału trepanobiopsyjnego wskazuje prawidłowy obraz sygnałów specyficznych dla genów *BCR* (zielony) i *ABL1* (czerwony, Vysis); **B.** Kariogram prezentujący izolowaną translokację t(9;22)(q34;q11.2); **C.** Kariogramy nieprawidłowych linii komórkowych Ph<sup>-</sup> (aberracje wskazano strzałkami); **D.** Wynik sekwencjonowania eksonu 12 genu *ASXL1* wykazujący mutację „stop kodon”

**Figure 2.** Cytogenetic and molecular analysis performed in the patient with chronic myeloid leukemia evolving secondary to primary myelofibrosis: **A.** The FISH test of interphase nuclei isolated from bone marrow shows correct signal of genes *BCR* (green) and *ABL1* (red, Vysis); **B.** Karyogram (karyotype) presents isolated translocation t(9; 22) (q34; q11.2); **C.** Karyograms of abnormal Ph<sup>-</sup> cell lines (aberrations indicated by arrows); **D.** DNA sequencing of exon 12-coding gene *ASXL1*, demonstrating “stop codon” mutation

w kwietniu 2009 roku, nie uzyskano większej odpowiedzi cytogenetycznej. W związku z nieskutecznością oraz złą tolerancją leczenia odstawił imatynib. Włączono danazol w dawce 200 mg oraz enorton w dawce 20 mg.

Po 4 miesiącach od odstawienia imatynibu obserwowano wzrost leukocytozy do 133 G/l, przy stężeniu Hb 11,3 g/dl i liczbie PLT 364 G/l. W rozmazie krwi obwodowej mieloblasty stanowiły 8%, promielocyty — 10%, mielocyty — 10%, metamie-

locyty — 12%, granulocyty pałeczkowate — 23%, granulocyty obojętnochłonne — 16%, kwasochłonne — 3%, zasadochłonne — 4%, limfocyty — 7%, zaś monocyty — 1%; widoczne były krwinki w kształcie łez i erytroblasty. W badaniu przedmiotowym dominowała hepatosplenomegalia, a w badaniu USG wielkość śledziony określono na 200 mm. Włączono leczenie cytoredukcyjne hydroksymocznikiem (HU, *hydroxyurea*) i 6-merkaptopuryną (6-MP), uzyskując po 6 miesiącach, tj. w maju 2010 roku,

prawidłową leukocytozę. Jednocześnie chora wymagała przetoczeń kkcż co 1–2 miesiące. Do października 2011 roku jej stan kliniczny pozostawał stabilny, liczby krwinek białych i PLT utrzymywały się w granicach normy, a w rozmazie krwi obwodowej obserwowano przesunięcie w lewo. Ze względu na zwiększające się zapotrzebowanie na przetoczenia kkcż i postępującą splenomegalię (w badaniu USG długość śledziony ok. 280 mm) dokonano ponownej oceny hematologicznej. W badaniu morfologicznym stwierdzano leukocytozę 25,8 G/l, wartość Hb 4,1 g/dl, liczbę PLT 428 G/l, natomiast w rozmazie krwi obwodowej mieloblasty stanowiły 9%, promielocyty — 1%, mielocyty — 4%, metamielocyty — 6%, granulocyty pałeczkowate — 17%, granulocyty obojętnochłonne — 45%, zasadochłonne — 8%, limfocyty — 8%, monocyty — 2%. W badaniu histopatologicznym szpik wykazywał zwiększoną komórkowość. Dominowała linia granulocytowa (MPO+) z odmłodzeniem. Komórki blastyczne z ekspresją w CD117 stanowiły około 5% komórek linii granulocytowej, a z ekspresją CD34 — około 1%. Linia czerwonych (CD71+) była zubożała z niewielką dyserytropoezą. Obserwowano liczne megakariocyty, postaci dysplastyczne duże i małe w skupieniach okołobeleczkowych. Nasiliło się włóknienie retikulino- podścieliska (3. stopień). Widoczne były także hematopoeza wewnątrz- zatokowa i złogi hemosydera w podścielisku. Morfologicznie rozpoznano zaawansowaną PMF ze zwiększonym odsetkiem blastów (ryc. 1.E, F). W badaniu cytogenetycznym, wykonanym w październiku 2011 roku, stwierdzono 100% metafaz (25/25) z translokacją t(9;22)(q34;q11.2). Badanie techniką FISH potwierdziło występowanie genu fuzyjnego *BCR-ABL*. Wykluczono delecje genów *ATM* i *TP53*. Analiza molekularna nie wykazała obecności mutacji *JAK2* V617F ani mutacji w domenie kinazowej genu *BCR-ABL*.

Zdecydowano o ponownym włączeniu inhibitora kinazy tyrozynowej — nilotynibu w dawce 2 razy 400 mg, przy jednoczesnym podawaniu hydroksymocznika w dawce 500 mg/dobę. Ze względu na utrzymującą się głęboką niedokrwistość (Hb 5–6 g/dl) chora nadal wymagała przetoczeń kkcż, co 3–4 tygodnie. Analiza kariotypu w marcu 2012 roku, po 3 miesiącach leczenia nilotynibem, wykazała eradykację klonu Ph+ z obecnością dwóch nieprawidłowych linii komórkowych obciążonych w pierwszym klonie izolowaną delecją 20q oraz kariotypem złożonym w drugiej linii komórkowej. Stwierdzono klonalne aberracje chromosomowe w postaci delecji terminalnej 5q, monosomii chromosomu 6 pary, translokacji t(X;12) i chromosomu markerowego;

w jednej komórce stwierdzono izolowaną translokację t(7;14) (ryc. 2.C). Jednocześnie, w celu weryfikacji rozpoznania, przeprowadzono retrospektywną analizę mutacji w genach zaangażowanych w patogenezę mieloproliferacji *JAK2* i *ASXL1* (ekson 12), *IDH1/IDH2* (ekson 4), *MPL* (ekson 10), *CBL* (eksyony 8, 9), *TET2* (eksyony 4-11) oraz *EZH2* (eksyony 2–20) w próbce krwi pobranej w 2008 roku i aspiracie szpiku kostnego z 2011 roku. Zidentyfikowano mutację prowadzącą do przedwczesnej terminacji translacji w genie *ASXL1* w klonie *BCR-ABL*+ (p.R417\*, w odniesieniu do sekwencji referencyjnej NM\_015338.5) tylko w komórkach szpiku kostnego z 2011 roku (ryc. 2.D). Dodatkowo stwierdzono mutacje w genach *TET2* i *EZH2*, najprawdopodobniej o charakterze polimorficznym.

Utrzymano leczenie nilotynibem. W badaniach morfologicznych obserwowano tendencję do leukopenii i małopłytkowości niewymagającą zmiany dawkowania nilotynibu. W ocenie przeprowadzonej w lipcu 2012 roku obserwowano progresję splenomegalii (długość śledziony w badaniu USG — 310 mm); utrzymywało się wysokie zapotrzebowanie na przetoczenia kkcż (6–7 j. co 4 tygodnie). Ponowna ocena kariotypu, w lipcu 2012 roku, wykazała utrzymującą się remisję klonu CML oraz obecność trzech nieprawidłowych linii komórkowych Ph-. W klonie komórek Ph-, obciążonych kariotypem złożonym, wykazano dodatkowo wtórną aberrację strukturalną świadczącą o progresji zmian cytogenetycznych. Analiza molekularna wykazała większą odpowiedź molekularną — obecność 0,08% transkryptu *BCR-ABL* p210, w którym nie stwierdzono już mutacji genu *ASXL1*.

Po wykonaniu retrospektywnych badań cytogenetycznych i molekularnych, analizując przebieg kliniczny choroby i obrazy histopatologiczne szpiku, rozpoznano u chorej współistnienie PMF i CML. Nie stwierdzono mutacji wskazujących na klonalność mielofibrozy, takich jak *JAK2*, *MPL*, *IDH1/IDH2*, *TET2*, *CBL*, *EZH2* i *ASXL1*, ale według kryteriów WHO z 2008 roku ich obecność nie jest koniecznym warunkiem powyższego rozpoznania. Ponadto, ze względu na brak odpowiedniego materiału do badań, nie można było retrospektywnie wykonać tych oznaczeń na początku choroby w 2004 roku. Rearanżacja *BCR-ABL* była wtórnym zaburzeniem genetycznym, ponieważ nie stwierdzano jej na początku choroby (2004 r.). Pojawienie się jej w 2008 roku nie miało wpływu na obraz histopatologiczny szpiku, ale obserwowano pewne cechy kliniczne CML, takie jak: wzrost leukocytozy z przesunięciem w lewo, zwiększenie odsetka granulocytów zasadochłonnych i obniżona aktywność FAG. Aktualne badania kariotypu



wskazują na obecność czterech linii komórkowych: jednej z eradykacją klonu Ph+ i trzech linii Ph-: pierwszej obciążonej delecją 20q, drugiej z kariotypem złożonym oraz trzeciej z translokacją t(7;14), co świadczy o niestabilności genetycznej i możliwości rozwoju kryzy blastycznej.

## Dyskusja

Podstawą rozpoznania PMF według WHO jest spełnienie trzech większych i dwóch mniejszych kryteriów tej choroby [2]. W opisanym przypadku rozpoznano PMF na podstawie: występowania proliferacji i atypii megakariocytów z włóknieniem retikulicznym podścieliska w trepanobiopsji szpiku, braku kryteriów WHO dla PV, CML, zespołu mielodysplastycznego lub innych nowotworów mieloidalnych (2 kryteria większe) oraz występowania leukoerythroblastozy, niedokrwistości i splenomegalii w badaniu przedmiotowym (3 kryteria mniejsze). Trzecim większym kryterium rozpoznania PMF jest wykazanie obecności mutacji V617F genu *JAK2* lub innego markera wzrostu klonalnego (np. MPLW515L/K) lub w przypadku braku markera klonalności, wykluczenie włóknienia szpiku z powodu choroby zapalnej lub innego nowotworu. Jak już wspomniano, w 40–50% przypadków PMF nie stwierdza się żadnych mutacji wskazujących na klonalność choroby [8].

Obecność chromosomu Ph jest natomiast czynnikiem różnicującym CML z innymi MPN. Samo występowanie rearanżacji *BCR-ABL* nie upoważnia jednak do rozpoznania CML, ponieważ muszą jej towarzyszyć inne, typowe kryteria kliniczne i morfologiczne. W piśmiennictwie opisano przypadki występowania tej aberracji u chorych na ostrą białaczkę limfoblastyczną, ostrą białaczkę szpikową, w rzadkich przypadkach chłoniaków, szpiczaka i przewlekłej białaczki neutrofilowej [13–19]. Opisano również, że zarówno u zdrowych osób, jak i u pacjentów z przewlekłymi MPN Ph-, stwierdza się obecność transkryptu *BCR-ABL* [20, 21]. Niektórzy badacze uważają, że MPN Ph+ i/lub z genem *BCR-ABL* p210 są tylko klinicznymi wariantami CML, w których klasyczne cechy CML mogą się rozwinąć dopiero po kilku latach od rozpoznania MPN [22, 23]. Przykładem jest ET z obecnością *BCR-ABL* opisywana jako przypadki CML rozpoczynające się fazą trombocytocemiczną (*CML of thrombocytocemic onset*), której nie towarzyszą inne objawy CML [24–26].

W prezentowanym przypadku autorzy odrzucili hipotezę, że jest to kliniczny wariant CML, w którym obraz histopatologiczny szpiku odpowiada

mielofibrozie, ponieważ w retrospektywnej ocenie materiału trepanobiopsyjnego, pobranego od chorej w 2004 roku, nie stwierdzono obecności genu fuzyjnego *BCR-ABL*.

Najbardziej dyskusyjne jest rozstrzygnięcie, czy mamy do czynienia ze współistnieniem PMF i CML, wywodzących się z dwóch różnych klonów komórkowych, czy też jest to PMF z obecnością chromosomu Ph lub transformacja PMF w CML.

U prezentowanej chorej, po 4 latach od rozpoznania PMF oraz od 10 lat od pojawienia się nadpłytkowości, rozwinęły się objawy kliniczne oraz cytogenetyczne i molekularne CML (wzrost leukocytozy > 100 G/l, bazofilia krwi obwodowej 19%, obniżona aktywność FAG, progresja splenomegalii, obecność chromosomu Ph i genu fuzyjnego *BCR-ABL*). Jednak morfologia szpiku nadal wykazywała cechy charakterystyczne dla PMF, nie obserwowano typowych dla CML megakariocytów, a w linii granulocytowej stwierdzano cechy odmłodzenia.

W piśmiennictwie opisano pojedyncze przypadki rozwoju CML w przebiegu wcześniej istniejącej PMF [27, 28]. Laibe i wsp. [27] opisali przypadek współistnienia PMF i CML u pacjenta z obecnością dwóch cytogenetycznych klonów komórkowych — jednego z del(13)(q12q21) i drugiego z t(9;22)(q34;q11). Zastosowanie imatynibu spowodowało eradykację klonu Ph+ i wzrost klonu z del 13q [27]. W prezentowanym przypadku włączenie nilotynibu także doprowadziło do eliminacji klonu Ph+ i ujawnienia się dwóch linii komórkowych Ph-, w tym jednej z del(20q), która obok del(13q), trisomii +8 i +9 stanowi najczęstszą aberrację chromosomalną w przewlekłych MPN. Może to być pośredni dowód na istnienie, również u opisanego chorej, dwóch klonalnych linii komórkowych, z których każda zapoczątkowała rozwój jednej z dwóch różnych chorób. Wykrycie mutacji *ASXL1* w klonie *BCR-ABL* potwierdza dane z piśmiennictwa wskazujące, że mutacja *ASXL1*, choć dość częsta, nie jest specyficzna dla PMF i może występować również we wszystkich fazach CML [29, 30].

Należy uwzględnić również możliwość ewolucji istniejącej PMF w CML. Jednak takie przypadki dotyczą chorych na MPN z obecnością mutacji V617F *JAK2*, u których w zmutowanych komórkach *JAK2*(+) wystąpiła translokacja t(9;22) [31–33]. U tej pacjentki nie stwierdzono mutacji w genie *JAK2*, a ponadto w obrazie histologicznym szpiku, kluczowym dla różnicowania MPN, wygląd megakariocytów pozostawał charakterystyczny dla PMF.

W piśmiennictwie opisano jeden przypadek mielofibrozy z obecnością chromosomu Ph. U pacjenta, podobnie jak u tej chorej, nie stwierdzono

markerów molekularnych charakterystycznych dla MPN. Autorzy zwrócili jednak uwagę, że chory nie odniósł korzyści z zastosowania imatynibu, a głęboka trójukładowa cytopenia wymagała odstawienia leku [34]. Kantarjian i wsp. wykazali, że u chorych na CML z towarzyszącym zwłóknieniem szpiku 4. stopnia istnieje tendencja do gorszej odpowiedzi cytogenetycznej. U chorych z mniejszym stopniem zwłóknienia imatynib może prowadzić nawet do odwrócenia procesu włóknienia szpiku [35]. Brak odpowiedniej ilości materiału do badań uniemożliwił retrospektywne oznaczenie mutacji wskazujących na klonalność PMF u opisanej chorej. Jednak równoczesny brak rearanżacji *BCR-ABL* na początku choroby, tj. w 2004 roku, pozwala na wnioskowanie, że aberracja ta była wtórnym zaburzeniem genetycznym, co sugeruje pojawienie się nowego klonu komórkowego u chorej na PMF.

### Podsumowanie

Podsumowując, opisany przypadek dowodzi, jak trudne są niekiedy klasyfikacja i leczenie PMN, zwłaszcza w sytuacji, gdy możliwe jest występowanie więcej niż jednego patologicznego klonu komórkowego. Należy zachować ostrożność w przypadku, gdy nie ma koincydencji między zmianami cytogenetycznymi i molekularnymi a wynikami histopatologicznymi szpiku, przebiegiem choroby lub odpowiedzią na leczenie. Duże znaczenie w takich przypadkach ma monitorowanie cytogenetyczne i molekularne, które nie tylko umożliwia dokonanie właściwego rozpoznania MPN, ale również, co przedstawiono w niniejszej pracy, pozwala na identyfikację nowych klonów komórkowych prowadzących do rozwoju kolejnego nowotworu.

### Piśmiennictwo

1. Thiele J., Kvasnicka H.M., Tefferi A. i wsp. Primary myelofibrosis. W: Swerdlow S.H., Campo E., Harris N.L. (red.). WHO Classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. IARC Press, Lyon 2008: 44.
2. Marasca R., Luppi M., Zucchini P., Longo G., Torelli G., Emilia G. Might essential thrombocythemia carry Ph anomaly? Blood 1998; 8: abstrakt 3084.
3. Michiels J.J., Berneman Z., Schroyens W. i wsp. Philadelphia (Ph) chromosome-positive thrombocythemia without features of chronic myeloid leukemia in peripheral blood: natural history and diagnostic differentiation from Ph-negative essential thrombocythemia. Ann. Hematol. 2004; 83: 504–512.
4. Takai K., Ushiki T., Nikkuni K., Hashidate H., Shibuya H. Atypical myeloproliferative neoplasm with a small population of Philadelphia chromosome-positive clones in the bone marrow. Rinsho Ketsueki 2011; 52: 73–77.

5. Heller P., Kornblihtt L.I., Cuello I. i wsp. BCR-ABL transcripts may be detected in essential thrombocythemia but lack clinical significance. Blood 2001; 98: 1990–1991.
6. Tefferi A., Mesa R.A., Schroeder G., Hanson C.A., Li Ch-Y., Dewald G.W. Cytogenetic findings and their relevance in myelofibrosis with myeloid metaplasia. Br. J. Haematol. 2001; 113: 763–771.
7. Tefferi A., Skoda R., Vardiman J.W. Myeloproliferative neoplasm: contemporary diagnosis using histology and genetics. Nat. Rev. Clin. Oncol. 2009; 6: 627–637.
8. Tefferi A. Novel mutations and their functional and clinical relevance in myeloproliferative neoplasm: JAK2, MPL, TET2, ASXL1, CBL, IDH A and IKZF1. Leukemia 2010; 24: 1128–1138.
9. Ricci C., Spinelli O., Salmoiraghi S., Finazzi G., Carobbio A., Rambaldi A. ASXL1 mutations in primary and secondary myelofibrosis. Br. J. Haematol. 2011; 156: 402–414.
10. Stein B.L., Williams D.M., O'Keefe C. i wsp. Disruption of the ASXL1 gene is frequent in primary, post-essential thrombocytosis and post-polycythemia vera myelofibrosis, but not essential thrombocytosis or polycythemia vera: analysis of molecular genetics and clinical phenotypes. Haematologica 2011; 96: 1462–1469.
11. Tefferi A., Vardiman J.W. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. Leukemia 2008; 22: 14–22.
12. Thiele J., Pierre R., Imbert M. i wsp. Chronic idiopathic myelofibrosis. W: Jaffe E.S., Harris N.L., Stein H., Vardiman J.W. (red.). World Health Organization classification of tumours. Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. IARC Press, Lyon 2001: 35.
13. Ilco J.M., Kreisel F.H., Zehnbauser B.A., Kulkarni S., Hassan A., Frater J.L. The spectrum of adult B-lymphoid leukemias with BCR-ABL: molecular diagnostic, cytogenetic, and clinical laboratory perspectives. Am. J. Hematol. 2008; 83: 901–907.
14. Roth C.G., Contis L., Gupta S., Agha M., Safyan E. De novo acute myeloid leukemia with Philadelphia chromosome (BCR-ABL) and inversion 16 (CBFB-MYH11): report of two cases and review of the literature. Leuk. Lymphoma 2011; 52: 531–535.
15. Mann G., Trebo M.M., Haas O.A. i wsp. Philadelphia chromosome-positive mature B-cell (Burkitt cell) leukaemia. Br. J. Haematol. 2002; 118: 559–562.
16. Callet-Bauchu E., Salles G., Gazzo S., Dalle S., Berger F., Hayette S. Identification of a novel e8/a4 BCR/ABL fusion transcript in a case of a transformed Sézary syndrome. Haematologica 2007; 92: 1277–1278.
17. Mitani K., Sato Y., Tojo A. i wsp. Philadelphia chromosome positive B-cell type malignant lymphoma expressing an aberrant 190 kDa bcr-abl protein. Br. J. Haematol. 1990; 76: 221–225.
18. Roper N., Deangelo D., Kuo F., dal Cin P., Ghobrial I., Aster J.C. An asymptomatic 61-year-old man with BCR-ABL-positive bone marrow following autologous transplantation for multiple myeloma. Am. J. Hematol. 2010; 85: 944–946.
19. Gregoire M.J., Latger-Cannard V., Staal A. i wsp. Identification of an acute basophilic leukaemia carrying a rare e6a2 BCR-ABL transcript. Acta Haematol. 2006; 116: 216–218.
20. Bose S., Deininger M., Gora-Tybor J., Goldman J.M., Melo J.V. The presence of typical and atypical BCR-ABL fusion genes in leukocytes of normal individuals: biologic significance and implications for the assessment of minimal residual disease. Blood 1998; 92: 3362–3367.



21. Song J., Mercer D., Xiaofeng Hu X., Henry Liu H., Li M.M. Common leukemia- and lymphoma-associated genetic aberrations in healthy individuals. *J. Mol. Diagn.* 2011; 13: 213–219.
22. Emilia G., Luppi M., Ferrari M.G. i wsp. Chronic myeloid leukemia with thrombocytopenic onset may be associated with different BCR/ABL variant transcripts. *Cancer Genet. Cytogenet.* 1998; 101: 75–77.
23. Cervantes F., Colomer D., Vives-Corrons J.L., Rozman C., Montserrat E. Chronic myeloid leukemia of thrombocytopenic onset: a CML subtype with distinct hematological and molecular features? *Leukemia* 1996; 10: 1241–1243.
24. Cesar J.M., Cabello P., Ferro T., Navarro J.L. Emergence of chronic myelogenous leukemia in a patient with primary thrombocytopenia and absence of BCR/ABL rearrangement. *Cancer Genet. Cytogenet.* 2006; 167: 74–77.
25. Marasca R., Luppi M., Zucchini P., Longo G., Torelli G., Emilia G. Might essential thrombocytopenia carry Ph anomaly? *Blood* 1998; 91: 3084–3085.
26. Tefferi A. Ultra high platelet count might be a characteristic feature of chronic myeloid leukemia rather than essential thrombocytopenia. *Leuk. Res.* 2007; 31: 416–417.
27. Laibe S., Tadrist Z., Arnoulet C., Sainty D., Mozziconacci M.J. A myeloproliferative disorder may hide another one. *Leuk. Res.* 2009; 33: 1133–1136.
28. Bennett M., Chubar E. Chronic myeloid leukemia evolving after idiopathic myelofibrosis. *Isr. Med. Assoc. J.* 2007; 9: 562–563.
29. Boultonwood J., Perry J., Zaman R. i wsp. High-density single nucleotide polymorphism array analysis and ASXL1 gene mutation screening in chronic myeloid leukemia during disease progression. *Leukemia* 2010; 24: 1139–1145.
30. Makishima H., Jankowska A.M., McDevitt M.A. i wsp. *CBL*, *CBLB*, *TET2*, *ASXL1*, and *IDH1/2* mutations and additional chromosomal aberrations constitute molecular events in chronic myelogenous leukemia. *Blood* 2011; 117: e198–e206.
31. Hummel J.M., Kletecka M.C., Sanks J.K. i wsp. Concomitant BCR-ABL1 translocation and JAK2V617F mutation in three patients with myeloproliferative neoplasms. *Diagn. Mol. Pathol.* 2012; 21: 176–183.
32. Bornhäuser M., Mohr B., Oelschlaegel U. i wsp. Concurrent JAK2(V617F) mutation and BCR-ABL translocation within committed myeloid progenitors in myelofibrosis. *Leukemia* 2007; 21: 1824–1826.
33. Pardini S., Fozza C., Contini S. i wsp. A case of coexistence between JAK2V617F and BCR/ABL. *Eur. J. Haematol.* 2008; 81: 75–76.
34. Chen F., Zhang C., Wang W. i wsp. A case of Philadelphia-chromosome positive chronic idiopathic myelofibrosis. *Leuk. Res.* 2008; 32: 665–667.
35. Kantarjian H.M., Bueso-Ramos C.E., Talpaz M. i wsp. Significance of myelofibrosis in early chronic-phase, chronic myelogenous leukemia on imatinib mesylate therapy. *Cancer* 2005; 104: 777–780.