

Ostre białaczki u psów i kotów

Rafał Sapierzyński

z Katedry Patologii i Diagnostyki Weterynaryjnej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Warszawie

Według przyjętych metod klasyfikacji w oparciu o następujące kryteria: zachowanie biologiczne nowotworu, morfologia komórek nowotworowych, immunofenotyp komórek nowotworowych, stwierdzone nieprawidłowości cytogenetyczne i molekularne nowotworowe rozrosty komórek szpiku kostnego dzieli się na: ostre białaczki szpikowe (acute myeloid leukemia – AML), nowotwory mieloproliferacyjne (myeloproliferative neoplasms; dawniej białaczki przewlekłe) oraz zespoły mielodysplastyczne (myelodysplastic syndrome – MDS; 1, 2, 3; **tab. 1**). Do ostrych białaczek, które wywodzą się z komórek szpiku kostnego, ale nie zalicza się ich do białaczek szpikowych, należą ostre białaczki limfatyczne (acute lymphoid leukemia – ALL).

Białaczka ostra jest złośliwym rozrostem wywodzącym się z komórek pnia (stem cell) hematopoezy, które zachowały zdolność do proliferacji, przy jednoczesnym zahamowaniu zdolności do różnicowania (zatrzymanych na różnym etapie różnicowania), z reguły powstającym w obrębie szpiku kostnego, chociaż miejscem wyjścia białaczki może też być na przykład śledziona lub grasica, jednak i w tych przypadkach zazwyczaj dochodzi do masowego zajęcia krwi i szpiku kostnego (1, 4). Intensywna proliferacja komórek w szpiku kostnym doprowadza z czasem do wyparcia prawidłowej hematopoezy, czemu towarzyszy zestaw typowych zmian hematologicznych, a w ich konsekwencji objawów klinicznych, takich jak: cechy skazy krwotocznej, niedokrwistości oraz podatność na zakażenia bakteryjne i pasożytnicze. Białaczki to drugie po chłoniakach pod względem częstości występowania nowotwory

tkanki hemopoetycznej u psów, u których stanowią około 9% nowotworów komórek krwi (5). Ze względu na pochodzenie/różnicowanie się komórek nowotworowych, białaczki ostre dzieli się na ostre białaczki szpikowe i ostre białaczki limfatyczne. Podstawowym badaniem, które z dużą dozą prawdopodobieństwa pozwala na rozpoznanie ostrej białaczki jest cytologiczne badanie szpiku kostnego. W większości przypadków ujawnia ono specyficzny obraz mikroskopowy. Zazwyczaj ostre białaczki u zwierząt są rozpoznawane w stadium, gdy dochodzi już do masowego zajęcia szpiku kostnego z towarzyszącym stłumieniem prawidłowej hematopoezy (**ryc. 1**; 1, 4). W takiej formie białaczki mają szczególnie drastyczny przebieg kliniczny, niekorzystne rokowanie, a możliwości leczenia białaczek ostrych, bez względu na ich podtyp, są niewielkie, bowiem średni okres przeżycia psów po rozpoznaniu wynosi około 20 dni i waha się w granicach od 2 do 138 dni, chociaż w pojedynczych przypadkach może być znacznie dłuższy (2, 4, 6).

Kryteria rozpoznania białaczki ostrej

Według klasycznej klasyfikacji opracowanej przez grupę francusko-amerykańsko-brytyjską (klasyfikacja FAB z 1976 r.), działając w oparciu o mikroskopową ocenę morfologii oraz immunofenotypu komórek rozrostu, w trakcie której na podstawie proporcji zidentyfikowanych poszczególnych komórek blastycznych oraz stopnia ich zróżnicowania dokonuje się rozpoznania i klasyfikacji poszczególnych typów ostrej białaczki (7). Dodatkowo, klasyfikacja ta

Acute leukemias in dogs and cats

Sapierzyński R. Department of Pathology and Veterinary Diagnostics, Faculty of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences – SGGW

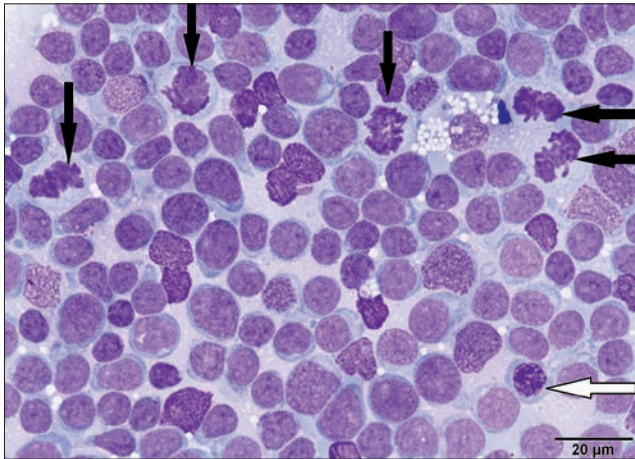
This article aims at the presentation of leukemias in small animals. Leukemia is progressive, malignant disease of blood-forming organs marked by distorted proliferation and development of leukocytes and their precursors in blood and bone marrow. Pathological proliferations of bone marrow are classified into acute leukemias (ALs), myeloproliferative neoplasms and myelodysplastic syndromes. Among these neoplasms, acute leukemias are the most commonly recognized in veterinary medicine. These are group of malignant neoplasms of hematopoietic cells, that are classified basing on the cells immunophenotype and morphology. Roughly speaking, according to the indications adapted from the French-American-British (FAB) system, ALs in animals are divided into: acute myeloid leukemias and acute lymphoid leukemias, with additional subcategories within each of both groups. In small animals, acute leukemia is recognised basing on the identification of at least 30% of blastic cells among all nucleated cells in bone marrow. According to other authors however, if there is $\geq 20\%$ blast cells in either bone marrow or peripheral blood, AL is unquestioned. Majority of animals with ALs, regardless of subtype, have cytopenias of two or more lineages and moderate to severe neoplastic leucocytosis is commonly observed. Clinical signs of ALs are usually non-specific, with general weakness, appetite loss and pale mucosal membranes. Lymph nodes enlargement, splenomegaly and hepatomegaly are present in most patients with acute leukemia. Because of the poor differentiation, the cellular origin and subtype of AL cannot be easily determined. General morphological examination has to be accompanied by cytochemical procedures and, preferably, immunophenotyping.

Keywords: leukocytosis, acute leukemia, bone marrow cytology, dog, cat.

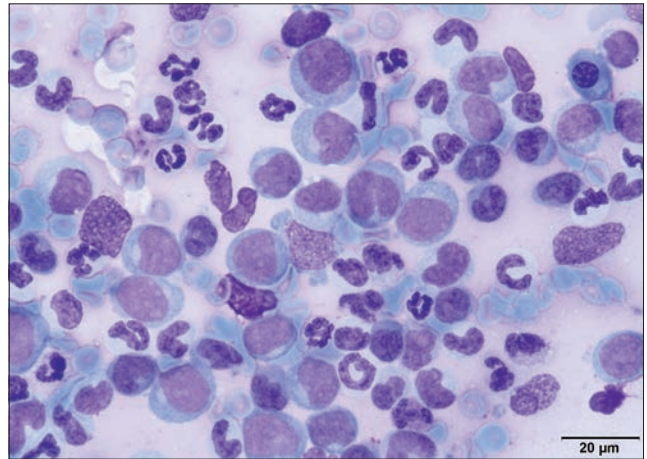
rekomendowała rozpoznanie białaczki ostrej przy odsetku komórek blastycznych stanowiących minimum 30% komórek

Tabela 1. Klasyfikacja patologicznych rozrostów szpiku kostnego (według 3)

Grupa rozrostu	Kryteria rozpoznania	Klasyfikacja
Ostre białaczki szpikowe (acute myeloid leukemia – AML)	Zazwyczaj cytopenia i $\geq 20\%$ blastów we krwi obwodowej lub szpiku kostnym	Na podstawie morfologii komórek oraz ich immunofenotypu, m.in.: ostra białaczka niezróżnicowana, ostra białaczka z różnicowaniem granulocytarnym, ostra białaczka mielomonocytna i inne
Nowotwory mieloproliferacyjne (myeloproliferative neoplasms – MPN) Dawniej białaczki przewlekłe	Cytoza wynikająca z obecności nowotworowych komórek we krwi (komórki o prawidłowej morfologii), szpik bogatokomórkowy, blasty stanowią $< 5\%$ komórek jądrzastych szpiku	Na podstawie morfologii komórek: czerwienica prawdziwa, nadpłytkowość samoistna, przewlekła białaczka neutrofilowa i inne
Zespoły mielodysplastyczne (myelodysplastic syndromes – MDS)	Cytopenia bez cech regeneracji, zmiany dysplastyczne krwinek, blasty stanowią od 5 do 20% jądrzastych komórek szpiku kostnego; możliwe włóknienie szpiku kostnego	W zależności od tego, w której linii komórkowej zmiany są najbardziej wyrażone, np. niedokrwistość oporna na leczenie z nadmiarem blastów



Ryc. 1. Obraz cytologiczny szpiku kostnego psa z ostrą białaczką limfoblastyczną. Widoczna intensywna proliferacja komórek nowotworowych, o czym świadczy niezwykle wysoki indeks mitotyczny (czarnymi strzałkami oznaczono figury mitotyczne). Obraz ukazuje też praktycznie całkowite zastąpienie komórek hematopoezy przez komórki nowotworowe (białą strzałką oznaczono jedyną komórkę hematopoezy, erythroblasta zasadochłonnego). Barwienie odczynnikiem Giemsy, powiększenie 400×



Ryc. 2. Obraz cytologiczny szpiku kostnego psa z ostrą białaczką mieloblastyczną. Praktycznie wszystkie widoczne komórki jądrzaste są komórkami szeregu granulocytarnego (w górnym prawym rogu pojedynczy erythroblast), a komórki blastyczne stanowią powyżej 30% z nich – kryterium rozpoznania ostrej białaczki zostało spełnione. Barwienie odczynnikiem Giemsy, powiększenie 400×

jądrzastych szpiku (all nucleated cells – ANC; **ryc. 2**). Klasyfikacja FAB przez lata ulegała aktualizacji, modyfikacji i została też zaadoptowana do stosowania u psów i kotów (3, 6, 8, 9). W hematologii ludzkiej wprowadzenie nowych technik badawczych opartych na metodach biologii molekularnej, które umożliwiły precyzyjną charakterystykę rozrostów szpiku kostnego na poziomie chromosomów i genów, zaowocowało utworzeniem aktualnie obowiązującej klasyfikacji Światowej Organizacji Zdrowia (klasyfikacja WHO, uaktualniona w 2008 r.). Dodatkowo, stwierdzenie typowych, powtarzalnych zmian cytogenetycznych w komórkach rozrostu pozwala na rozpoznanie choroby niezależnie od odsetka blastów w badanym materiale. Co istotne, klasyfikacja WHO pozwala na powiązanie specyficznych typów białaczki z konkretnymi zmianami cytogenetycznymi, a także na tej podstawie umożliwia określenie rokowania odnośnie do przebiegu choroby oraz reakcji na zastosowane leczenie (2).

Zgodnie z wytycznymi klasyfikacji rozrostów komórek tkanki krwiotwórczej według systemu WHO do rozpoznania ostrej białaczki u ludzi upoważnia stwierdzenie, że co najmniej 20% komórek jądrzastych krwi obwodowej lub szpiku kostnego stanowią komórki blastyczne. Zmiana koncepcji odnośnie do granicznej wartości odsetka blastów w białaczkach ostrych u ludzi (we wcześniejszej klasyfikacji odsetek ten stanowił 30% komórek jądrzastych szpiku) wynikała z faktu, że rokowanie u pacjentów z odsetkiem blastów w granicach 20–30% było podobne do tego stwierdzanego u pacjentów z odsetkiem blastów przekraczających 30%. Możliwe, że podobnie jest u zwierząt, i pomimo że nie

ma dobrze zaplanowanych badań, które potwierdzałyby taką koncepcję, to według najnowszego podręcznika patologii weterynaryjnej oraz niektórych ostatnio publikowanych prac, przyjęto powyższe kryterium – do rozpoznania białaczki ostrej niezbędne jest wykazanie, że odsetek komórek blastycznych w szpiku kostnym i/lub krwi obwodowej jest równy lub wyższy niż 20% (2, 10). Z drugiej strony, w większości ostatnio opublikowanych prac naukowych dotyczących ostrych białaczek u zwierząt rozpoznanie AL stawiono w przypadkach, gdy odsetek blastów w szpiku kostnym był równy lub przekraczał 30% (7, 8, 9), dlatego też w tej publikacji zastosowany zostanie kompromis – 30(20)%.

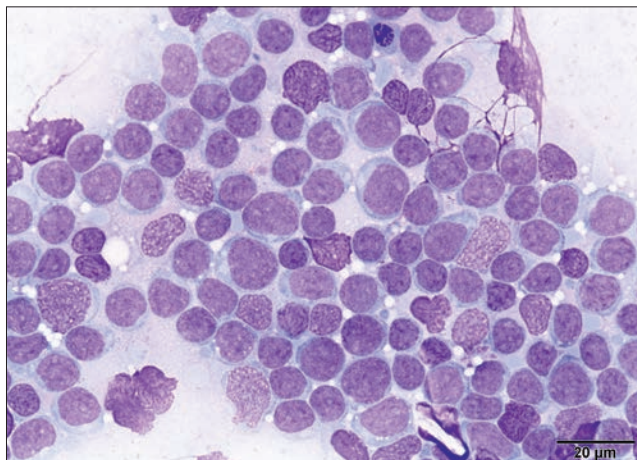
Warunkiem rozpoznania białaczki ostrej jest stwierdzenie, że blastyczne komórki stanowią minimum – 30(20)% jądrzastych komórek szpiku kostnego lub/i krwi obwodowej

Pomimo podejmowanych prób dostosowania klasyfikacji WHO do stosowania u psów, nie ma wciąż jednoznacznych kryteriów takiego podziału i w dalszym ciągu hematologowie weterynaryjni, stawiając rozpoznanie, opierają się na, jak się wydaje, mniej precyzyjnej klasyfikacji FAB (6). Powyższa sytuacja wynika z faktu, że w przypadku białaczek u zwierząt brak jest ciągle wielu informacji niezbędnych do przeprowadzenia adaptacji systemu WHO – brakuje danych epidemiologicznych, immunofenotypowych, a w szczególności informacji uzyskiwanych w toku badań genetycznych i molekularnych – w onkologii człowieka potwierdzenie specyficznego

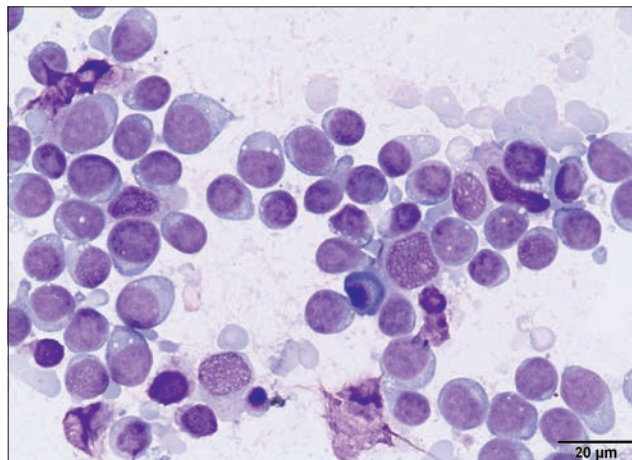
podtypu białaczki często opiera się na specyficznych zmianach cytogenetycznych – informacji takich brakuje u pacjentów weterynaryjnych. Pomimo to wydaje się, że szczegółowa analiza immunofenologiczna, poparta badaniami immuno fenotypu komórek nowotworowych pozwala na dość precyzyjną klasyfikację rozpoznanej białaczki ostrej u psa lub kota do jednej z kategorii opisanych poniżej (2).

Klasyfikacja białaczek ostrych

W oparciu o klasyfikację FAB ostre białaczki u zwierząt dzieli się na ostre białaczki limfoblastyczne (acute lymphoblastic leukemia – ALL) oraz ostre białaczki szpikowe (ostre białaczki mieloidalne, acute myeloid leukemia – AML; 2, 5, 11, 12, 13, 14, 15). W przypadku całkowitego braku zróżnicowania komórek nowotworowych, gdy nie da się określić, czy wywodzą się one z linii limfoidalnej, czy mieloidalnej – rozpoznaje się ostrą białaczkę niezróżnicowaną (**ryc. 3**; acute undifferentiated leukemia – AUL; 2, 6, 7, 9). W ostatnio opublikowanych badaniach obejmujących dużą populację psów z różnymi typami ostrych białaczek nie wykazano przydatności klasyfikacji FAB jako czynnika rokowniczego, który pomógłby w doborze metody leczenia, a także pozwalałby przewidzieć reakcję na zastosowane leczenie (6). Według autorów tej pracy, poczynione obserwacje wskazują, że stosowana obecnie u psów klasyfikacja FAB wydaje się nie mieć przydatności praktycznej, dlatego istnieje konieczność opracowania nowego podejścia klasyfikacyjnego. Wydaje się, że jednym z istotnych czynników utrudniających opracowanie przydatnej klasyfikacji ostrych białaczek u psów jest niewielka liczba publikacji,



Ryc. 3. Obraz cytologiczny szpiku kostnego psa z ostrą białaczką niezróżnicowaną (AUL). Widoczne komórki blastyczne nie wykazują cech umożliwiających ich bliższą klasyfikację, wykonane barwienia immunocytochemiczne, z zastosowaniem przeciwciał antyCD3 i antyCD79alfa dały wynik ujemny. Barwienie odczynnikiem Giemsa, powiększenie 400×



Ryc. 4. Obraz cytologiczny szpiku kostnego psa z ostrą białaczką limfoblastyczną (ALL-L2). Widoczne nowotworowe limfoblasty, w tym przypadku wykonano barwienie immunocytochemiczne, które wykazało reakcję z przeciwciałem CD79alfa, co potwierdziło rozpoznanie. Barwienie odczynnikiem Giemsa, powiększenie 400×

które prezentowałyby analizy dotyczące odpowiednio dużych populacji psów dotkniętych ostrą białaczką. To z kolei jest zapewne wynikiem sytuacji, że w wielu przypadkach sam fakt rozpoznania białaczki ostrej u psa, czyli choroby o wyjątkowo niekorzystnym rokowaniu, sprawia, że właściciel podejmuje decyzję o eutanazji pacjenta i w ten sposób zwierzęta są eliminowane jako potencjalny materiał do prowadzenia stosownych badań. Wprawdzie można pobrać materiał do analiz genetycznych, immunofenotypowych, cyto- i histopatologicznych, jednak nie da się tych informacji powiązać z metodami leczenia czy rokowaniem. W badaniach własnych obejmujących grupę 31 psów z rozpoznaną ostrą białaczką na chemioterapię zdecydowało się 23% właścicieli, co może wydawać się wcale nie małą liczbą (zważywszy na spodziewane efekty terapii), jednak z drugiej strony mało liczebna populacja zwierząt, u których zastosowano leczenie i przeanalizowano jego efekty, nie daje możliwości podjęcia stosownych badań (4).

Ostre białaczki limfoblastyczne

Ostra białaczka limfoblastyczna (ALL) wywodzi się z prekursorowych komórek limfoidalnych (limfoblastów lub promiocytoz) zatrzymanych na wczesnych etapach zróżnicowania – komórek blastycznych, o wysokiej aktywności proliferacyjnej. Warto w tym miejscu przypomnieć podobieństwa pomiędzy białaczkami limfatycznymi a chłoniakami. Białaczka limfatyczna wywodzi się z limfocytów szpiku kostnego, często zajmuje krew obwodową (a nierzadko wtórnie również i narządy obwodowe, w tym węzły chłonne), z kolei chłoniak też wywodzi się z limfocytów, jednak spoza szpiku kostnego, w tym głównie z węzłów chłonnych, innych narządów

limfatycznych i narządów nielimfatycznych (chłoniaki najczęściej tworzą zmiany lite, guzowate lub naciekają narządy w sposób rozlany). Jeżeli w przebiegu chłoniaka komórki nowotworowe są obecne we krwi obwodowej (często także wtórnie zajmują szpik kostny) wtedy zjawisko to nazywa się chłoniakiem z obrazem białaczkowym. Odróżnienie zaawansowanej formy chłoniaka (przebiegającego z zajęciem szpiku kostnego i krwi obwodowej) od białaczki limfatycznej (gdy wtórnie dochodzi do zajęcia węzłów obwodowych) jest trudne, a niekiedy niemożliwe (patrz dalej).

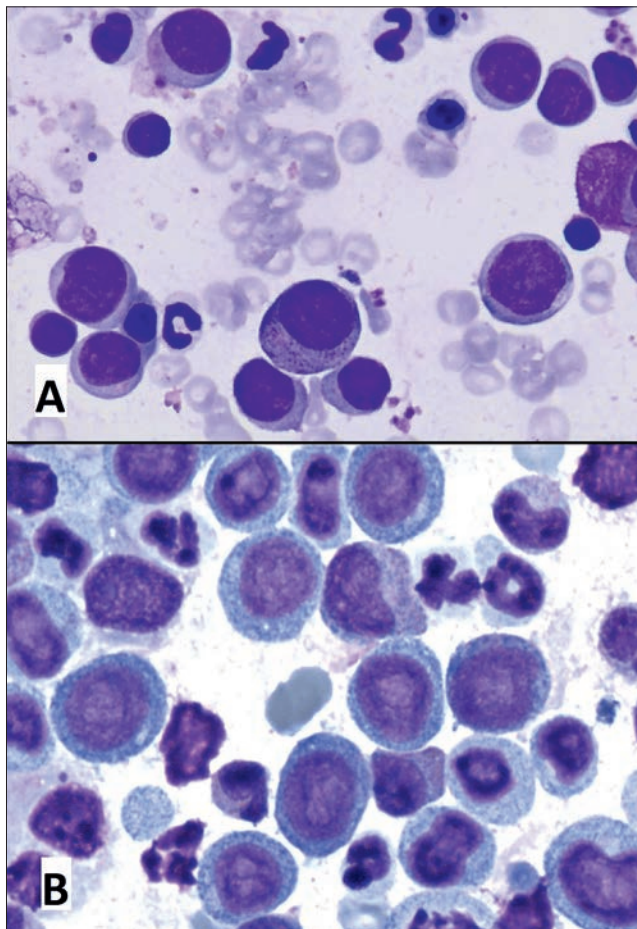
ALL rozpoznaje się u psów w różnym wieku, od kilku miesięcy do 14 lat (średnia 5,5–7,1 roku), nieznacznie częściej u samców, psów dużych (w jednym z badań mediana masy ciała wyniosła 30 kg), przy czym owczarki niemieckie, golden retrievery i labradory wydają się predysponowane do rozwoju tej formy ostrej białaczki (7). U psów ALL mogą wywodzić się z limfocytów T (w jednym z badań był to najczęściej rozpoznawany immunofenotyp ALL), B (w innym z badań był to najczęściej rozpoznawany immunofenotyp ALL), limfocytów nie-B i nie-T oraz limfocytów NK (6, 7, 9). ALL u kotów są najczęściej białaczkami wywodzącymi się z komórek T, rozpoznaje się je u osobników w wieku od 6 miesięcy do 14 lat (średnia poniżej 5 lat), bez predylekcji rasowej i płciowej. W wielu przypadkach (od 60 do 80%) u chorych zwierząt wykrywa się współistniejące zakażenie wirusem białaczki kotów, chociaż notowano też przypadki ALL u kotów z zakażeniem FIV i bez zakażenia FeLV (16).

Bazując na podstawie wartości stosunku jądro-cytoplazmatycznego, wielkości i kształtu jądra komórkowego, liczby i wielkości jąder, zasadochłonności cytoplazmy i obecności wakuoli cytoplazmatycznych ALL można sklasyfikować jako: ALL

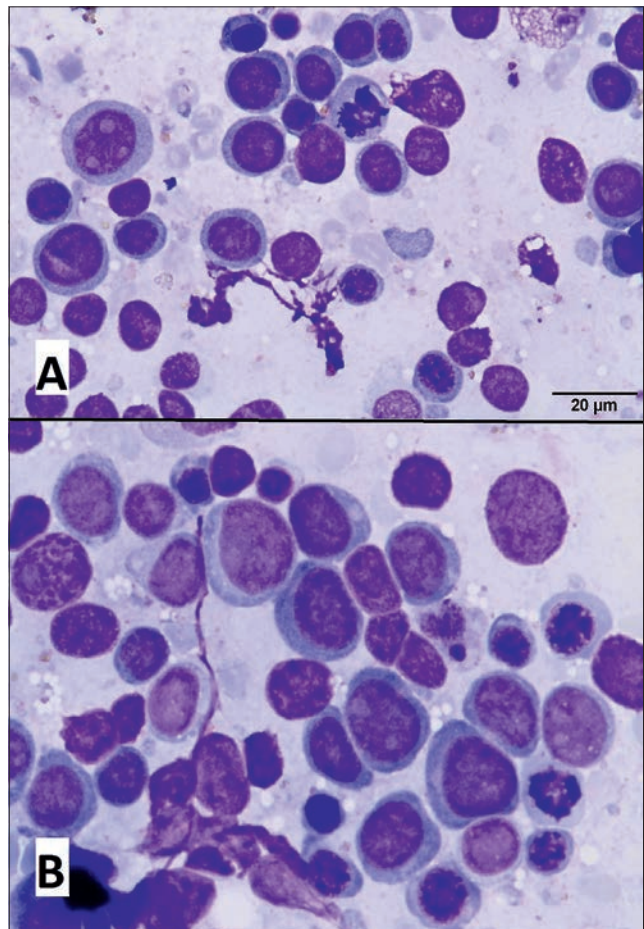
L1, ALL L2 i ALL L3 (ta podklasyfikacja ma znaczenie rokownicze w ostrych białaczkach limfoblastycznych u ludzi; 8). Wprawdzie ta podklasyfikacja nie ma przydatności praktycznej u zwierząt, to jest istotna, bowiem wariant ALL L1 (komórki są małe, homogenne, o wysokim indeksie jądro-cytoplazmatycznym, jądra komórkowe okrągłe lub nieznacznie rozszczerzone, chromatyna homogenna, jąderka niewidoczne lub słabo widoczne, cytoplazma skąpa jasna, pozbawiona ziarnistości i wakuoli) może być trudny do odróżnienia od przewlekłej białaczki limfocytarnej – w takich przypadkach oprócz analizy cytologicznej szpiku kostnego w rozpoznaniu należy uwzględnić przebieg choroby, zaobserwowane objawy kliniczne, a także wyniki innych badań (badanie morfologiczne krwi, immunofenotypowanie); wydaje się jednak, że ta forma ALL występuje najrzadziej u zwierząt. W przypadku białaczek ALL L2 i ALL L3 blasty mają umiarkowanie obfitą, zasadochłonną cytoplazmę, jądra komórkowe o rozproszonej chromatynie, jąderka są zazwyczaj widoczne (dobrze widoczne w ALL L3), pojedyncze lub mnogie (ryc. 4). Inne cechy komórek to anizocytoza, anizokarioza i pleomorfizm jądrocytozy, w komórkach mogą być obecne drobne ziarnistości oraz drobne wakuole – szczególnie liczne w ALL L3 (16).

Ostre białaczki szpikowe

Ostre białaczki szpikowe –AML (ostre białaczki mieloblastyczne, ostre białaczki mieloidalne, ostre białaczki nielimfoblastyczne) charakteryzują się proliferacją i nagromadzeniem w szpiku kostnym i krwi obwodowej blastycznych lub niedojrzałych nielimfoidalnych komórek krwi, jednego szeregu lub kilku jednocześnie, a warunkiem rozpoznania AML jest stwierdzenie



Ryc. 5. Obraz cytologiczny szpiku kostnego dwóch psów z ostrą białaczką mieloblastyczną (AML-M2). Część widocznych blastów wykazuje uziarninowanie cytoplazmy (szczególnie na rycinie B). Barwienie odczynnikiem Giemsa, powiększenie 400×



Ryc. 6. Obraz cytologiczny szpiku kostnego psa z ostrą białaczką erytroblastyczną (AML-M6). Dominują proerytroblasty/rubroblasty – komórki o okrągłym jądrze komórkowym z niewyraźnymi jąderkami, intensywnie zasadochłonną cytoplazmą, z widocznym przejaśnieniem cytoplazmy. Barwienie odczynnikiem Giemsa, powiększenie 400×

że odsetek nielimfoidalnych komórek blastycznych w szpiku kostnym jest równy lub przekracza 30% wszystkich komórek jądrzastych szpiku, z wyłączeniem limfocytów, plazmocytów, makrofagów i mastocytów (7, 8, 9, 16). Jednak, jak wspomniano wcześniej, stosując kryteria rozpoznawania białaczek ostrych u ludzi dopuszcza się rozpoznanie białaczki ostrej, gdy ów odsetek jest równy lub przekracza 20% (2). W przypadkach AML szpik jest zazwyczaj bogatokomórkowy, z jego masywnym zajęciem i praktycznie całkowitym wyparciem prawidłowej hematopojezy (typową cechą jest niedokrwistość i trombocytopenia), obserwuje się też cechy nieprawidłowej erytropoezy (dyserytropoezy), granulopoezy (dysgranulopoezy) i megakariopoezy (dysmegakariopoezy; 16). Klasyfikacja FAB dzieli ostre białaczki szpikowe na podstawie morfologii i proporcji poszczególnych komórek blastycznych oraz stopnia zróżnicowania nielimfoidalnych komórek szpiku kostnego, w czym pomocne są barwienia cytochemiczne, immunohistochemiczne, a także badania z użyciem mikroskopu elektronowego. Na podstawie powyższego rozróżnia się kilka typów

ostrych białaczek szpikowych, podsumowanych w tabeli 2.

Do najpowszechniejszych ostrych białaczek szpikowych u psów należą: AML M1 (ostra białaczka mieloblastyczna bez różnicowania, 23–44% wszystkich AML), AML M4 (ostra białaczka mielomonocytna, 28–32% wszystkich AML), AML M5 (ostra białaczka monocytarna; 8–45% wszystkich AML), rzadziej rozpoznaje się inne typy białaczek (6, 9, 16). U kotów dominują białaczki szpikowe – AML-M1 i AML M2, dość często (zdecydowanie częściej niż u psów) stwierdza się AML-M6, inne typy białaczek ostrych występują rzadziej (8, 17, 18, 19).

Przykładowe postaci ostrych białaczek szpikowych u zwierząt

Ostra białaczka mielomonoblastyczna (acute myelomonoblastic leukemia, AML-M4)

Polega na złośliwej proliferacji komórek szeregu granulocytarnego i monocytarnego (ryc. 7; 11). W przypadku formy białczkowej we krwi obwodowej obserwuje

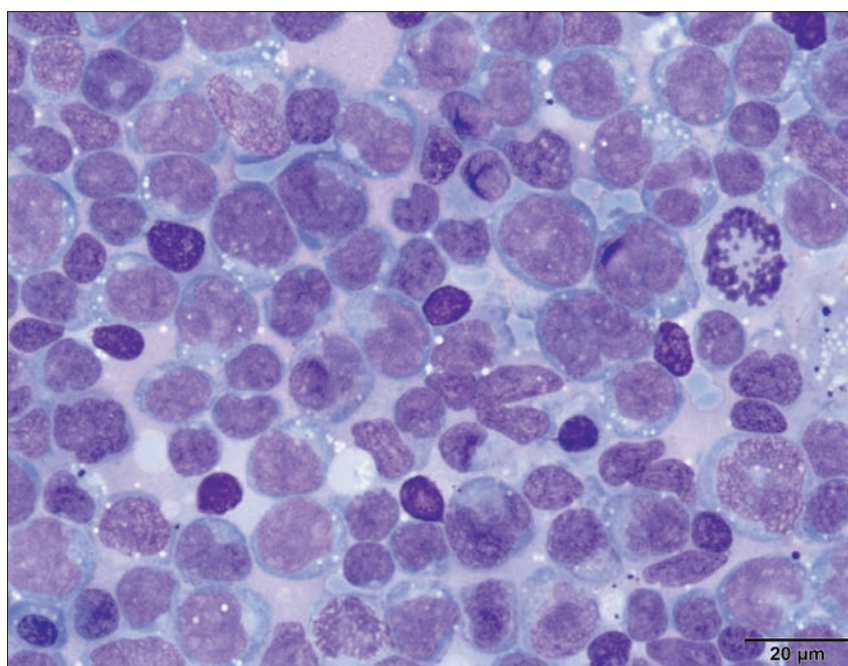
się poza dojrzałymi neutrofilami (segmentowane i pałeczkowate) i promonocytami, także komórki w typie monocytów oraz komórki blastyczne mające okrągłe, płatkowate jądro komórkowe (niekiedy o kształcie podkowiatym) z ciemnoniebieską cytoplazmą. Opisano przypadek AML M4 u 3-letniego psa, samca rasy welsh corgi pembroke, z objawami biegunki i umiarkowanej limfadenopatii (11). W badaniu hematologicznym stwierdzono: znaczną leukocytozę (65 G/l), ciężką trombocytopenię, a w badaniu biochemicznym wzrost aktywności ALT i AP. W badaniu cytologicznym rozmazów krwi wykazano obecność komórek blastycznych, które stanowiły około 40% leukocytów, co dało podstawy do rozpoznania ostrej białaczki. Szpik kostny był hiperplastyczny, ze znacznym stłumieniem linii erytroidalnej i płytkowej, a komórki blastyczne stanowiły powyżej 30% komórek jądrzastych szpiku. Większość komórek szpiku wykazała dodatnią reakcję na obecność mieloperoksydazy, wiele na obecność nieswoistej esteraazy z użyciem maślanu alfa-naftyli. Wprowadzono złożone leczenie chemioterapeutyczne, pomimo tego pies padł w 47 dniu od rozpoznania (11).

Tabela 2. Klasyfikacja ostrych białaczek szpikowych

Nazwa białaczki	Kod białaczki	Kryteria rozpoznania (przy założeniu podstawowym: minimum 30(20)% komórek blastycznych wśród wszystkich komórek jądrzastych szpiku)
Ostra białaczka mieloblastyczna bez różnicowania	AML-M1	W szpiku stwierdza się obecność mieloblastów (zazwyczaj komórki te stanowią 90% lub więcej nieerytroidalnych komórek szpiku). Powyżej 3% blastów wykazuje dodatnią reakcję z markerami linii granulocytarnej, np. sudanem czarnym B lub mieloperoxydazą. Pozostałe komórki nieerytroidalne szpiku – promielocyty, zróżnicowane neutrofile i eozynofile oraz monocyty stanowią do 10% jądrzastych komórek szpiku.
Ostra białaczka mieloblastyczna z różnicowaniem	AML-M2	Mieloblasty stanowią od 30(20)% do 89% nieerytroidalnych komórek szpiku. Powyżej 3% blastów wykazuje dodatnią reakcję z markerami linii granulocytarnej, np. sudanem czarnym B lub mieloperoxydazą. W części blastów obecne mogą być nieliczne (do 15) drobne ziarnistości cytoplazmatyczne. Komórki białaczki wykazują cechy różnicowania w kierunku linii granulocytarnej – promielocyty, granulocyty pałeczkowate stanowią przynajmniej 10% nieerytroidalnych komórek szpiku. Możliwe różnicowanie w kierunku bazofiliów lub eozynofiliów (ryc. 5).
Ostra białaczka promielocytowa	AML-M3	Komórki blastyczne w stadium promielocyta z charakterystycznym uziarninowaniem cytoplazmy, nieregularnym, nerkowatym lub dwupłytowym jądrem komórkowym. Reakcja z sudanem czarnym B lub mieloperoxydazą silnie dodatnia. Jak dotąd nie rozpoznano tego typu białaczki u zwierząt.
Ostra białaczka mielomonoblastyczna	AML-M4	Nowotworowa proliferacja linii granulocytarnej i monocytarnej – odsetek mieloblastów i monoblastów to minimum 30(20)%, z widocznymi cechami dojrzwania – różnicujące formy tych dwóch linii stanowią powyżej 20% nieerytroidalnych komórek szpiku.
Ostra białaczka monoblastyczna/monocytarna	AML-M5	Nowotworowa proliferacja monoblastów – minimum 30(20)% komórek jądrzastych szpiku, z obecnością mniej lub bardziej licznych form dojrzewających – promonocytów (w zależności od ich odsetka odróżnia się formę monoblastyczną AML-M5a lub monocytarną AML-M5b). Monoblasty, promonocyty i monocyty stanowią minimum 80% nieerytroidalnych komórek szpiku.
Ostra białaczka erytroblastyczna	AML-M6	Dominująca nieprawidłowość dotyczy linii erytroidalnej. Obecność blastów szeregu erytroidalnego (erytroblasty stanowią powyżej 50% komórek jądrzastych szpiku) i granulocytarne [blasty stanowią powyżej 30(20)% komórek nieerytroidalnych szpiku; ryc. 6] – erytroleukemia AML-M6a . Obecność i znaczna przewaga komponenty erytroidalnej (powyżej 80% komórek szpiku) z obecnością blastów tej linii we wczesnym stadium zróżnicowania i często w formie megaloblastów – erythremic myelosis – białaczka erytroblastyczna w czystej postaci AML-M6b (lub AML-M6Er) .
Ostra białaczka megakarioblastyczna	AML-M7	Nowotworowy rozrost linii megakariocytarnej – minimum 30(20)% komórek stanowią megakarioblasty, z towarzyszącą małopłytkowością i niedokrwiistością. Z uwagi na nasilone włóknienie często badanie cytologiczne szpiku jest niediagnostyczne – rozpoznanie stawia się na podstawie badania krwi obwodowej, a potwierdza badaniem histopatologicznym szpiku.
Ostra białaczka niezróżnicowana	AUL	Nie da się ocenić pochodzenia blastów jedynie na podstawie oceny cytomorfologicznej i cytochemicznej. Niezbędne barwienia immunocytochemiczne/cytomorfometryczne.

Ostra białaczka erytroblastyczna (acute erythroid leukemia, AML-M6)

Częściej występuje u kotów, które trafiają do lecznicy najczęściej w dobrej kondycji, z anemią (bładość błon śluzowych, podwyższony puls, wzrost oddychania, osłabieniem, zaburzeniami apetytu; 17, 20). W badaniu hematologicznym stwierdza się często silną anemię bez regeneracji, często z obecnością blastycznych erytrocytów we krwi, zazwyczaj także leukopenię i trombocytopenię (w takich przypadkach możliwa jest skaza krwotoczna; 17, 19, 20). Badanie kliniczne i obrazowe ujawnia organomegalię, wynikającą z obecności nacieków nowotworowych lub/i hematopojezy pozaszpikowej (19). Koty najczęściej wykazują współistniejące zakażenie wirusem białaczki kotów, w jednym z badań obejmujących dużą populację kotów z chorobami mieloproliferacyjnymi u kotów z różnymi formami AML stwierdzono zakażenie FeLV aż w 90% przypadków (8, 17, 19), jednak obserwowano też przypadki spontanicznej białaczki AML-M6 (19).



Ryc. 7. Obraz cytologiczny szpiku kostnego psa z ostrą białaczką mielomonoblastyczną (AML-M4). W tym przypadku podtyp rozrostu określono badaniem cytometrycznym. Barwienie odczynikiem Giemsa, powiększenie 400×

Ostra białaczka erytroblastyczna w czystej postaci (acute pure erythroid leukemia, AML-M6b)

Występuje bardzo rzadko u psów, opisane przypadki dotyczą psów w średnim wieku (5–6,5 roku), u których objawy kliniczne pod postacią apatii i braku apetytu pojawiły się tydzień przed pierwszą wizytą w lecznicy (13, 21). W badaniu klinicznym obserwowano bladeść błon śluzowych, hepatomegalię i splenomegalię. W badaniu krwi stwierdzono znaczny stopień niedokrwistość (z cechami słabej regeneracji) i łagodną trombocytopenię. W badaniu rozmazu stwierdzono obecność dużych i średniej wielkości komórek blastycznych o idealnie okrągłych jądrach komórkowych, z 1–2 wyraźnymi jąderkami i ciemną silnie zasadochłonną cytoplazmą oraz rozjaśnieniem cytoplazmy (komórki w typie proerytroblastów/rubiblastów – to pojęcia używane są wymiennie przez różnych autorów dla określenia najwcześniejszej postaci komórek blastycznych szeregu erytroidalnego; 13, 21). W badaniu biochemicznym surowicy stwierdzono wzrost aktywności ALT i AP. Badanie cytologiczne szpiku kostnego wykazało: szpik bogatokomórkowy z monomorficzną populacją komórek blastycznych (które w wybranych polach widzenia stanowiły 70–85% komórek jądrzastych szpiku) jak te opisane we krwi obwodowej, z typowo intensywnie zasadochłonną, pozbawioną ziarnistości cytoplazmą, które zidentyfikowano jako proerytroblasty/rubiblasty. Stwierdzono też bardziej dojrzałe komórki szeregu erytroidalnego – rubiblasty i metarubicyty, liczne megakariocyty oraz nieliczne komórki szeregu granulocytarnego, monocytarnego, plazmocyty i dojrzałe limfocyty (21). Mieloblasty i monoblasty stanowiły mniej niż 5% nieerytroidalnych komórek szpiku (co pozwoliło wykluczyć erytroleukemię; 21). W jednym przypadku w związku ze złym rokowaniem właściciel podjął decyzję o eutanazji, w drugim wprowadzono chemioterapię (cytarabina), jednak pacjent padł po 9 dniach od rozpoznania (13/12).

Ostra białaczka megakarioblastyczna (acute megakaryoblastic leukemia, AML-M7)

Dotyczy psów różnych ras, z trwającymi kilka tygodni objawami znacznego osłabienia, braku apetytu i utratą masy ciała (12, 15). W badaniu klinicznym stwierdza się bladeść błon śluzowych, zaniki mięśniowe, tachykardię i hipotermię oraz powiększenie śledziony (12, 15). W badaniu hematologicznym obecna jest zazwyczaj ciężka trombocytopenia, niedokrwistość

bez regeneracji i leukopenia, z obecnością komórek blastycznych. Badaniem cytologicznym stwierdza się w szpiku kostnym całkowite wyparcie prawidłowej hematopoezy, z zastąpieniem jej przez blastyczne komórki szeregu megakariocytarnego (duże komórki o ciemnej cytoplazmie z wypustkami, z obecnością drobnych wakuoli, jądra komórkowe owalne lub okrągłe, często podwójne, potrójne lub mnogie z wyraźnymi, często mnogimi jąderkami). W badaniu cytometrycznym komórki wykazują ekspresję CD9 i CD61 (markery typowe dla linii płytkowej), nieliczne komórki wykazują ekspresję CD34 (marker komórek blastycznych). W przypadkach gdy wprowadza się terapię: transfuzja krwi pełnej, antybiotykoterapia, prednizolon, arabinozyd cytozyny, reakcja na leczenie jest krótka lub żadna, pacjenci są zazwyczaj poddawani eutanazji (12, 15).

Występowanie białaczek u psów i kotów

Oszacowanie rozpowszechnienia białaczek u zwierząt jest trudne, zapewne wiele przypadków choroby nie zostaje rozpoznanych lub/i precyzyjnie sklasyfikowanych. W badaniach własnych autora, w których przeanalizowano materiał cytologiczny pobrany od psów w okresie 6 lat, badania cytologiczne szpiku kostnego stanowiły 5,1% wszystkich badań cytologicznych. Spośród tych przypadków ostrą białaczkę rozpoznano u 24,7% psów, u których przeprowadzono badanie szpiku kostnego, co stanowiło 1,3% psów poddanych badaniu cytologicznemu w analizowanym okresie (4). Trudno też jest jednoznacznie ocenić, które z białaczek ostrych występują częściej u psów, bowiem według niektórych danych częściej występują ostre białaczki limfoblastyczne, rzadziej ostre białaczki szpikowe i ostre białaczki nieodróżniane, jednak niektórzy autorzy wskazują na dominację ostrych białaczek szpikowych (6, 9, 10, 11, 12, 13, 21, 22, 23). W badaniach Adam i wsp. (9) spośród 67 różnych typów białaczek rozpoznanych u psów ich formy ostre stanowiły 72%, z czego ALL były nieco częściej rozpoznawane (56% białaczek ostrych; 37% wszystkich białaczek) niż AML (42% ostrych białaczek; 34% wszystkich białaczek). Podobnie badania Novacco i wsp. (6) wskazują, że u psów częściej rozpoznaje się ALL (41% białaczek ostrych), rzadziej AML (35% białaczek ostrych) i AUL (24% białaczek ostrych). Wydaje się też, że w przypadku badań, w których jedyną metodą oceny typu białaczki była ocena cytomorfologiczna, wiele przypadków niskozróżnicowanych białaczek szpikowych może być błędnie uznawanych za ALL, a także niektóre białaczki ALL mogą być w rzeczywistości ostrymi białaczkami szpikowymi bez różnicowania (9).

W niektórych badaniach wskazuje się na predyspozycję psów ras dużych do

występowania białaczek ostrych. Szczególnie predysponowane wydają się owczarki niemieckie (w jednym z badań było to 27% psów z ostrą białaczką), chociaż niektórzy autorzy nie potwierdzają takiej predyspozycji (6, 9, 23, 24, 25, 26). Istnieją też doniesienia o podwyższonej skłonności golden retrieverów do ostrych białaczek limfoblastycznych – 6 przypadków na 25 ALL w jednym z badań (9). Nie wykazano jak dotąd skłonności rasowych do występowania ostrych białaczek szpikowych, co być może jest wynikiem zbyt małej liczby dobrze udokumentowanych badań obejmujących liczną populację psów. W badaniach własnych obejmujących różne typy białaczek ostrych owczarki niemieckie stanowiły aż 32% wszystkich psów, a golden retrievery 16% pacjentów. Oprócz tych dwóch ras podwyższone ryzyko AL obserwowano u tosa inu, posokowców bawarskich, a także owczarków środkowoazjatyckich i psów rasy wielki pies szwajcarski (4). Uważa się, że ostre białaczki dotyczą głównie psów dorosłych, średnia wieku psów z ostrą białaczką wynosi około 8 lat, przy czym psy z ALL wydają się starsze (średnia 8 lat) niż psy z AML (6–7 lat; 9, 10, 15). W badaniach własnych białaczki ostre rozpoznano u psów w wieku od 2 do 14 lat (średnia wieku 8,2 roku; 4). Wydaje się jednak, że określony wiek nie jest czynnikiem ryzyka dla występowania białaczek ostrych u psów (8).

Podobnie jak to jest u psów, u kotów nie ma konsensusu odnośnie do częstości występowania poszczególnych typów białaczek ostrych, według niektórych danych dominują ostre białaczki szpikowe, inni autorzy wskazują na dominację ostrych białaczek limfoblastycznych (szczególnie gdy uwzględni się w tej grupie przypadki chłoniaków limfoblastycznych z uogólnieniem – zajęciem krwi i szpiku kostnego). Przeprowadzone dotąd badania nie wykazały jakichkolwiek predyspozycji rasowych czy związanych z płcią do występowania białaczek ostrych u kotów.

Obraz kliniczny

Według ostatnio publikowanych badań objawy kliniczne u psów, które zachorowały na białaczkę ostrą, nie różnią się w zależności od typu białaczki ostrej, objawy te są najczęściej niespecyficzne, mogą pojawić się nagle i nieczęsto dają się wyjaśnić z zastosowaniem podstawowych metod diagnostycznych (6, 7, 8, 9, 12, 13, 15, 21, 23, 26). Uważa się, że klasycznym przykładem jest pacjent w dobrej kondycji ciała, z okrywą włosową dobrej jakości, u którego doszło do nagłego pogorszenia się stanu zdrowia, niedającego się jasno wytłumaczyć, czemu towarzyszy spontaniczny krwotok, np. z nosa, wybroczyny na skórze

lub błonach śluzowych. W badaniach własnych autora obejmujących psy z rozpoznaną białaczką ostrą od momentu zaobserwowania pierwszych objawów klinicznych do uzyskania rozpoznania upłynęło od 2 do 60 dni, w wyjątkowych przypadkach dłużej. Objawy kliniczne u badanych pacjentów były najczęściej niespecyficzne i miały charakter osłabienia (60% psów), utrzymującej się stale lub nawracającej gorączki (57% psów), u części psów stwierdzono osłabiony lub brak apetytu, nieznacznego stopnia powiększenie obwodowych węzłów chłonnych i śledziony, z kolei utratę masy ciała oraz spowodowane trombocytopenią spontaniczne krwawienia odnotowano rzadko (4). Podobne objawy kliniczne białaczek ostrych opisują inni autorzy, stwierdza się także bladłość błon śluzowych, nawracające zakażenia czy powiększenie śledziony (3, 7). Badania obrazowe pozwalają na wykrycie lub potwierdzenie splenomegalii (w jednym z badań obecna u 76% psów z AL) hepatomegalii (w jednym z badań 39% psów z AL) bądź powiększenia węzłów chłonnych krezkowych (w jednym z badań 58% psów z AL), czy śródpiersiowych (w jednym z badań 32% psów z AL; 7). Według niektórych autorów objawy zaburzenia funkcji ośrodkowego układu nerwowego oraz powiększenie obwodowych węzłów chłonnych obserwuje się częściej u psów z ALL, z kolei w przypadku AML częściej stwierdza się gorączkę i zmiany w obrębie gałek ocznych, takie jak odklejenie siatkówki, zapalenie błony naczyniowej, obrzęk spojówek, krwistek, zaćma.

Obraz kliniczny ostrych białaczek u kotów jest zbliżony do opisanego powyżej, typowo obserwuje się objawy ciężkiej niedokrwistości, apatii, stale utrzymującej się lub nawracającej gorączki, a badanie kliniczne bardzo często ujawnia splenomegalię, hepatomegalię, limfadenomegalię (18, 19, 27). W części przypadków obserwuje się objawy skazy krwotocznej pochodzenia płytkowego, żółtaczkę czy nawracające zakażenia. Choroba może pojawić się nagle, niekiedy jednak z uwagi na stwierdzoną utratę masy ciała można podejrzewać, że proces postępuje umiarkowanie szybko (18, 19).

Badanie hematologiczne

Zaburzenia hematologiczne u zwierząt są podobne bez względu na typ białaczki ostrej, mają one najczęściej charakter cytotopenii, przykładowo niedokrwistość (obniżenie liczby erytrocytów, wartości hematokrytu i stężenia hemoglobiny) rozpoznaje się u 68–95% psów z AL (3, 4, 6, 7, 9, 18, 27). Powszechną nieprawidłowością jest też trombocytopenia, przykładowo w badaniach własnych obniżoną liczbę płytek krwi stwierdzono u 78% psów z AL, miała ona z reguły łagodne nasilenie, a spontaniczne krwawienie odnotowano jedynie u 10% psów objętych badaniem (4, 28). Co istotne, z praktycznego punktu widzenia nie wykazano istotnych różnic w częstości i nasileniu cytotopenii (liczby erytrocytów, wartości hematokrytu, trombocytopenii, neutropenii) w przypadku ALL i AML u psów, co sprawia, że badanie hematologiczne nie ma przydatności w różnicowaniu pomiędzy poszczególnymi typami białaczek ostrych u tego gatunku (7, 9). Niedokrwistość, małopłytkowość i neutropenia u pacjentów z ostrymi białaczkami mogą wynikać z wyparcia prawidłowej hematopoezy przez komórki nowotworowe (*myelophthisis*), hamującego działania cytokin wydzielanych przez komórki nowotworowe lub komórki układu odpornościowego na komórki szpiku, niszczenia krwinek na drodze immunologicznej (niedokrwistość hemolityczna), krwotoków spowodowanych małopłytkowością lub zużyciem płytek (zespół krzepnięcia wewnątrznaczyniowego) lub neutrofilów (wtórne zakażenia bakteryjne, marginacja neutrofilów). Wydaje się jednak, że najistotniejszym czynnikiem, który doprowadza do cytotopenii u pacjentów z ostrą białaczką, jest ten pierwszy mechanizm, bowiem stwierdzone, między innymi w badaniach własnych, masywne naciekania szpiku kostnego najczęściej doprowadza do całkowitego stłumienia prawidłowego procesu krwiotworzenia (4).

Liczba leukocytów u psów z AL jest zmienna, waha się od stanów leukopenii do znacznej leukocytozy (zazwyczaj powyżej 40 G/L, a w przypadkach ekstremalnych powyżej 500 G/L), odsetek komórek

nowotworowych wśród leukocytów krwi obwodowej jest zmienny (od 1 do 100% leukocytów krwi obwodowej; 3, 4, 6, 9, 23). Nie wykazano, aby istniały różnice odnośnie do nasilenia leukocytozy, a podtypem białaczki ostrej (ALL i AML), a także pomiędzy ostrą białaczką limfoblastyczną i przewlekłą białaczką limfocytarną (9, 10, 11, 22), chociaż wydaje się, że odsetek blastów wśród wszystkich leukocytów krwi obwodowej jest wyższy w przypadku ALL niż AML (9). W badaniach własnych leukocytozę nowotworową obserwowano u 76% psów z AL, mediana wartości WBC wyniosła 99,6 G/L, a najwyższa liczba leukocytów wśród psów objętych badaniem wyniosła 516 G/L (4). Notowano też obecność komórek nowotworowych we krwi, pomimo leukopenii.

Rozpoznanie

Według podręcznika do patologii zwierząt autorstwa Valli i wsp. (3) do wstępnego rozpoznania i sklasyfikowania ostrej białaczki niezbędny jest minimalny zestaw testów, obejmujących badanie hematologiczne z określeniem liczby i morfologii poszczególnych komórek krwi, badanie cytologicznego szpiku kostnego, a w niektórych przypadkach badanie histopatologiczne wycinków szpiku kostnego. O ile jest to zasadne, dla postawienia precyzyjnej diagnozy z jednoznacznym określeniem podtypu białaczki ten zestaw musi zostać poszerzony o dodatkowe testy (tab. 3). Badanie cytologiczne szpiku kostnego (często także rozmazów krwi obwodowej) pozwala na precyzyjną ocenę morfologii komórek (określenie, czy są one komórkami nowotworowymi, a często z jakiej linii komórkowej się wywodzą). Z kolei badanie histologiczne (materiał pobrany w trakcie biopsji korowej szpiku) jest mniej przydatne w ocenie morfologii komórek, ale pozwala określić, w jakim stopniu doszło do naciekania szpiku kostnego, a także umożliwi wykrycie gniazd komórek nowotworowych w przypadku, gdy badanie cytologiczne nie wykazało ich obecności, a także jest niezbędne w przypadku, gdy doszło do zwłóknienia szpiku kostnego – w takich przypadkach

Tabela 3. Zestaw podstawowych testów do prawidłowego rozpoznania i klasyfikacji białaczek ostrych u zwierząt (3, 8)

Materiał do badania	Metody badania
Krew obwodowa	Ocena liczby i morfologii poszczególnych komórek krwi.
Rozmazy krwi obwodowej	Ocena morfologii poszczególnych komórek krwi; w przypadku obecności blastów identyfikacja poszczególnych komórek krwi – ocena 200 komórek jądrzastych. Barwienia cytochemiczne i immunocytochemiczne.
Aspiraty szpiku kostnego, preparaty odciskowe szpiku kostnego	Morfologia wszystkich komórek szpiku (ocena morfologiczna 200–500 komórek jądrzastych). Barwienia cytochemiczne i immunocytochemiczne.
Wycinki szpiku kostnego (bioptaty gruboigłowe)	Ocena komórkowości szpiku, gęstość i rozmieszczenie komórek, ocena architektoniki szpiku, morfologii komórek, macierzy pozakomórkowej, włóknienia.
Krew obwodowa lub aspiraty szpiku kostnego pobrane do probówki z antykoagulantem	Analiza cytometryczna immunofenotypu komórek nowotworowych: ekspresja antygenów różnicowania dla poszczególnych linii komórkowych.

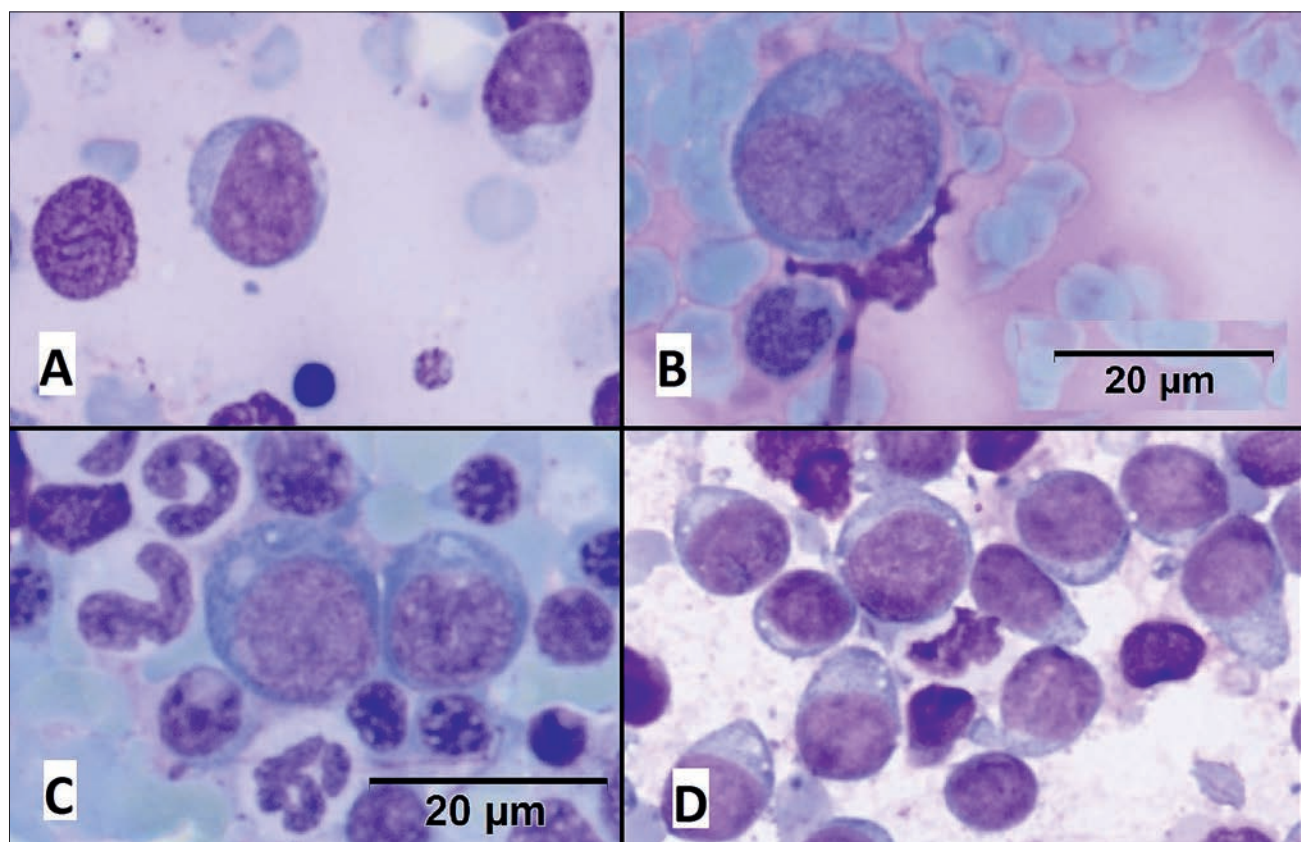
Tabela 4. Obraz morfologiczny komórek blastycznych poszczególnych linii hematopoezy

Limfoblasty	Komórki małe, średnie lub duże, o wysokim stosunku jądro-cytoplazmatycznym, o ubogiej pozbawionej ziarnistości cytoplazmie, możliwe wodniczki (liczne w niektórych przypadkach). Jądra komórkowe okrągłe, owalne lub nieregularne, z homogenną chromatyną, jąderka mogą być niewidoczne do bardzo wyraźnych.
Mieloblasty	Komórki zazwyczaj duże, o kształcie zbliżonym do okrągłego, z owalnym lub nieregularnym kształtu jądrem komórkowym o luźnej chromatynie, widocznymi jąderkami – pojedynczymi lub mnogimi; cytoplazma umiarkowanie obfita, słabo zasadochłonna, z możliwą obecnością drobnych ziarnistości azurochłonnych.
Monoblasty	Przypominają mieloblasty, są większe, przy czym ich jądro ma bardziej nieregularny kształt, niekiedy rozszczepiony, chromatyna jest typowo marmurkowata, jąderka wyraźne w liczbie 1–3. W cytoplazmie widoczny może być obszar przejaśnienia przyjądrowego, możliwa obecność drobnych azurochłonnych ziarnistości oraz drobnych wypustek cytoplazmatycznych.
Proerytroblasty/rubiblasty	Komórki zazwyczaj duże lub średniej wielkości, o kształcie zbliżonym do okrągłego, zazwyczaj pojedyncze (niekiedy podwójne), idealnie okrągłe jądro komórkowe o gruboziarnistej chromatynie, z wyraźnymi, pojedynczymi lub mnogimi jąderkami; cytoplazma umiarkowanie obfita, silnie zasadochłonna, z przejaśnieniem przyjądrowym, pozbawiona ziarnistości i wakuoli. W komórkach nowotworowych widoczne są też cechy dyserytropoezy – asynchronia jądro-cytoplazmatyczna, obecność jąder podzielonych lub podwójnych, rozpad jąder komórkowych, wakuolizacją chromatyny.
Megakarioblasty	Komórki pleomorficzne, duże, średnie lub małe, zazwyczaj w kształcie zbliżonym do okrągłego, jednojądrowe, ale często dwu- lub wielojądrowe, z wysokim stosunkiem N/C, jąderka wyraźne, pojedyncze lub mnogie, cytoplazma dość obfita, silnie zasadochłonna, często z drobną wakuolizacją i wypustkami.

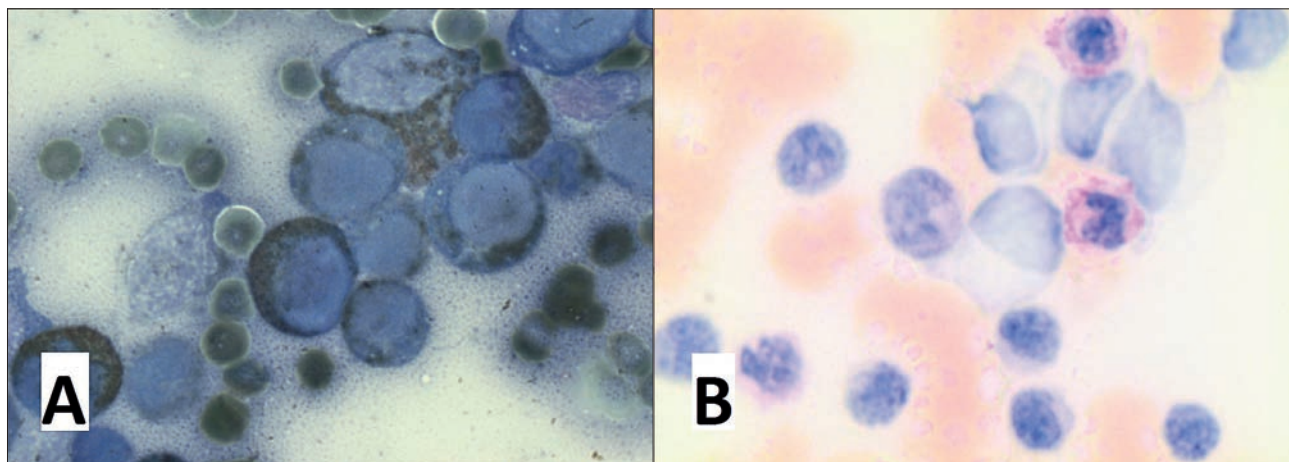
badanie cytologiczne jest niemiernodajne (3). Podczas analizy szpiku kostnego liczy się 200–500 komórek jądrzastych i określa proporcję komórek linii granulocytarnej do erytrocytarnej (stosunek G:E), ponadto stopień i poprawność dojrzewania komórek tych linii, a także odsetek komórek blastycznych pośród wszystkich komórek jądrzastych szpiku. Oceny cytologicznej szpiku dokonuje się zawsze w oparciu o wynik badania krwi obwodowej (który powinien być udostępniony patologowi). Niekiedy postawienie poprawnej diagnozy będzie wymagało przeprowadzenia

kilku badań cytologicznych szpiku kostnego w pewnych odstępach czasu (2). W części przypadków badanie cytologiczne rozmazów krwi obwodowej jest wystarczające do potwierdzenia wstępnego rozpoznania ostrej białaczki (7, 11, 13, 21, 26), w badaniach własnych w zdecydowanej większości przypadków (28 na 31) morfologia komórek nowotworowych nie budziła żadnych wątpliwości, a odsetek komórek blastycznych we krwi obwodowej i szpiku kostnym był bardzo wysoki i wynosił powyżej 80%, dlatego rozpoznanie w takich przypadkach było proste (4).

Ocena odsetka komórek blastycznych szpiku kostnego ma decydujące znaczenie dla rozpoznania ostrej białaczki. Do komórek blastycznych zalicza się limfoblasty, mieloblasty, monoblasty, promonocyty i megakarioblasty – charakterystykę morfologiczną blastów zaprezentowano w tabeli 4 (ryc. 8; 8). Proerytroblasty/rubiblasty uznaje się jako komórki blastyczne jedynie w przypadkach ostrej białaczki erytroblastycznej w czystej postaci, której u zwierząt opisano jedynie pojedyncze przypadki. Oceny odsetka blastów można dokonać w cytometrze przepływowym (wykrywanie



Ryc. 8. Obraz cytologiczny blastycznych komórek szpiku kostnego – identyfikacji dokonano w oparciu o morfologię komórek (opis morfologii komórek przedstawiono w tabeli 4): widoczne dwa mieloblasty (rycina A), monoblast (rycina B), dwa proerytroblasty/rubiblasty (rycina C) oraz limfoblasty (rycina D). Barwienie odczynnikiem Giemsa, powiększenie 400×



Ryc. 9. Przykłady barwień cytochemicznych stosowanych w rozpoznawaniu białaczek. Na rycinie A widoczny wynik barwienia na obecność mieloperoksydazy – ciemnozielone, prawie czarne ziarnistości w cytoplazmie promielocytów wskazują na obecność poszukiwanego enzymu; powiększenie 400×. Na rycinie B widoczny wynik barwienia na obecność glikogenu – różowe zabarwienie cytoplazmy neutrofilów; powiększenie 400×

obecności antygenu CD34), jednak z uwagi na fakt że nie wszystkie blasty wykazują ekspresję CD34, w każdym przypadku taka ocena powinna być potwierdzona badaniem mikroskopowym (7, 10).

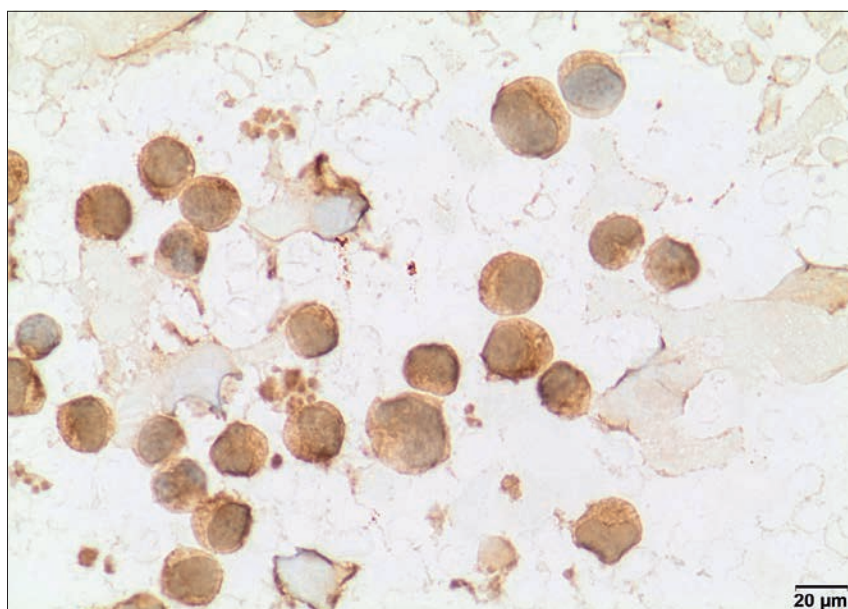
Potwierdzeniem wstępnego rozpoznania typu białaczki ostrej oraz dalszej podklasyfikacji białaczek szpikowych są barwienia dodatkowe, w tym barwienia cytochemiczne i barwienia immunocytochemiczne. Barwienia cytochemiczne pozwalają na wykazanie obecności substancji chemicznych (najczęściej enzymów) w cytoplazmie lub jądrach komórkowych, na podstawie czego można wnioskować odnośnie do pochodzenia komórek, w których owa substancja została wykryta. Najpowszechniejsze barwienia cytochemiczne służą do wykrywania aktywności mieloperoksydazy (**ryc. 9A**), aktywności nieswoistej esterazy z użyciem octanu alfa-naftyli, fosfatazy zasadowej, sudanu czarnego B, hemoglobiny czy obecności glikogenu (**ryc. 9B**). W medycynie człowieka, w związku z powszechnym stosowaniem immunofenotypowania metodą cytometrii przepływowej lub metodą immunohistochemii znaczenie barwienia cytochemicznego się zmniejsza.

W przypadku całkowitego braku zróżnicowania (ostra białaczka niezróżnicowana, bardzo wczesne prekursorzy limfocytów są nieodróżnialne morfologicznie od wczesnych prekursorów komórek mielo-, erytro-, mono- i trombopoety) określenie pochodzenia komórek jest możliwe dzięki ocenie immunofenotypu komórek nowotworowych za pomocą cytometrii przepływowej, immunocytochemii lub immunohistochemii (3, 9, 29). Materiałem do analizy są świeżo pobrane biopaty szpiku kostnego, a istotą poszukiwanie specyficznych antygenów na powierzchni komórek nowotworowych: dla linii granulocytarnej (mieloperoksydaza, CD4/CD11b/CD11c), dla linii monocytarnej (mieloperoksydaza, CD11b/CD11c/CD14/MHC klasy II), erytrocytarnej (CD71,

glikoforyna A, antygeny hemoglobiny) lub megakariocytarnej (CD9/CD41/CD61). W przypadku ostrych białaczek limfoblastycznych komórki nowotworowe wykazują ekspresję następujących markerów różnicowania: CD3, CD4, CD5, CD8 (dla białaczek T komórkowych; **ryc. 10**) lub Pax-5, CD20, CD21 lub CD79-alfa (dla białaczek B komórkowych) oraz CD 34 (dla komórek blastycznych; 7, 15, 19, 21, 29). Bazując na wynikach immunofenotypowania do rozpoznania ostrej białaczki limfoblastycznej upoważnia stwierdzenie markerów typowych dla limfocytów B lub T i braku ekspresji markerów linii mieloidalnej, do rozpoznania ostrej białaczki szpikowej upoważnia stwierdzenie markerów typowych dla linii mieloidalnej (mieloperoksydaza i/ lub CD11b, CD4, CD14) przy braku ekspresji markerów typowych dla linii limfoidalnej (6). W przypadku braku ekspresji

wymienionych wyżej markerów stawia się rozpoznanie ostrej białaczki niezróżnicowanej.

Problemem diagnostycznym może być **odróżnienie ALL od chłoniaka** w stadium zaawansowanym, który przebiega z zajęciem węzłów chłonnych, krwi i szpiku (stadium V zaawansowania klinicznego – białaczkowa/leukemiczna forma chłoniaka). Różnicowanie nie będzie też trudne w przypadku, gdy chłoniak charakteryzuje się specyficznym obrazem cytologicznym (np. chłoniak centroblastyczny, chłoniak z komórek jasnych), jednak będzie trudniejsze, gdy komórki nowotworowe nie mają wysoce specyficznej morfologii (np. chłoniaki limfoblastyczne). W przypadku chłoniaka zazwyczaj węzły chłonne są bardziej masywnie powiększone, z kolei w przypadku ALL stwierdza się masywniejsze zajęcie szpiku kostnego (nawet do 100% komórek to komórki białaczkowe),



Ryc. 10. Wynik barwienia immunocytochemicznego komórek ostrej białaczki limfoblastycznej T komórkowej – brązowa barwa cytoplazmy oznacza dodatnią reakcję; barwienie immunocytochemiczne z użyciem przeciwciała antiCD3; powiększenie 400×

niż w przypadku chłoniaka (często odsetek komórek nowotworowych nie przekracza 30% komórek jądrzastych szpiku). Pomocne może być badanie ekspresji CD34, który, jak wspomniano wcześniej, przemawia za ALL niż za chłoniakiem (z pominięciem chłoniaka limfoblastycznego – w rzeczywistości chłoniak limfoblastyczny może być utożsamiany z ALL), jednak w niektórych przypadkach ALL ekspresji CD34 się nie obserwuje (3, 9). Różnicowanie pomiędzy ALL, a chłoniakiem jest istotne z powodu odmiennego sposobu leczenia i rokowania.

Rokowanie

Rokowanie u psów z rozpoznaną ostrą białaczką jest złe, śmierć spontaniczna, nagle pogarszający się stan zdrowia lub decyzja o eutanazji dotyczy zdecydowanej większości chorych zwierząt (2, 4, 6, 7, 12, 13, 15, 21). W badaniu zaprezentowanym przez Novacco i wsp. (6) obejmującym 64 psy z rozpoznaną ostrą białaczką, 21% pacjentów poddano eutanazji wkrótce po uzyskaniu rozpoznania. Z kolei w badaniach własnych większość psów, u których nie podjęto próby leczenia, zastało poddanych eutanazji, a jedynie u 23% psów objętych badaniami własnymi wprowadzono różne schematy chemioterapeutyczne, z medianą okresu przeżycia podobną do tej uzyskanej przez innych badaczy (2, 6). W pracy opublikowanej przez Bennetta i wsp. (7) u 16% pacjentów z AL właściciele podjęli decyzję o leczeniu podtrzymującym (doustne stosowanie glikokortykosteroidów), u 72% wprowadzano chemioterapię, na którą zareagowało 36% pacjentów. Mediana okresu przeżycia psów poddanych chemioterapii wyniosła 56 dni, u psów pozostawionych bez leczenia lub leczonych paliatywnie wyniosła 7,5 dnia (7). W grupie 16 psów z ostrą białaczką szpikową mediana okresu przeżycia wyniosła jedynie 7 dni, zwierzęta przeżyły od 2 do 138 dni od rozpoznania (2). W innym badaniu długość okresów przeżycia psów z AL, u których zastosowano złożone schematy chemioterapeutyczne, wyniosła od 10 do 47 dni od rozpoznania (11).

U ludzi chorujących na poszczególne typy ostrej białaczki do czynników, które wpływają na rokowanie, należą wiek pacjenta, rozpoznanie niedokrwistości w momencie rozpoznania, znacznego stopnia leukocytoza w momencie rozpoznania. W hematologii weterynaryjnej nie zidentyfikowano jak dotąd wiarygodnych czynników o znaczeniu rokowniczym w przypadku ostrych białaczek. Ostatnio opublikowano pracę, w której wykazano, że podtyp morfologiczny oraz immunofenotyp najczęściej występujących ostrych białaczek u psów nie wpływa na wyniki postępowania terapeutycznego oraz oczekiwanej długości po

chemioterapii (6). W badaniach tych jedynym czynnikiem o wartości prognostycznej (negatywnym) w przypadku ostrej białaczki bez względu na jej podtyp była neutropenia stwierdzona w dniu rozpoznania, psy z tym zaburzeniem żyły krócej niż osobniki, u których liczba neutrofilów we krwi w momencie rozpoznania była prawidłowa.

W hematologii medycznej ważne informacje o znaczeniu rokowniczym uzyskuje się w toku badań cytogenetycznych – które uznawane są za postępowanie standardowe w przypadku rozpoznania ostrej białaczki (niektóre parametry cytogenetyczne są niezbędne do postawienia rozpoznania białaczki) – jednym z najważniejszych markerów prognostycznych dla białaczek ostrych, który pozwala ocenić przebieg choroby, jest ocena kariotypu komórek nowotworowych przed rozpoczęciem leczenia (pretreatment karyotype; 2). Nieprawidłowości cytogenetyczne są często stwierdzane w komórkach białaczek ostrych u ludzi, których obecność i charakter ma kluczowe znaczenie w klasyfikacji WHO i określaniu rokowania dla pacjenta. Materiałem do badania są komórki nowotworowe pobrane ze szpiku kostnego, a także z krwi obwodowej, a ocenę kariotypu przeprowadza się za pomocą klasycznego badania cytogenetycznego lub metodą FISH (fluorescencyjna hybrydacja *in situ*). W przypadku nowotworów szpiku kostnego u zwierząt takie podejście prognostyczne jest na razie w fazie wstępnej, informacje odnośnie do występowania zmian cytogenetycznych w komórkach białaczek są nieliczne, zazwyczaj ograniczone do pojedynczych przypadków. Do ważniejszych trudności, które utrudniają ocenę analizę genotypu, należą nieliczne populacje badanych zwierząt z AL, a także problemy z identyfikacją poszczególnych chromosomów, szczególnie trudności pojawiają się przy ocenie kariotypu psów (2). Możliwe jednak, że wprowadzenie coraz bardziej precyzyjnych metod analizy nie tylko chromosomów, ale i poszczególnych genów umożliwi w przyszłości wytypowanie specyficznych zmian cytogenetycznych jako markerów o przydatności rokowniczej (2).

Piśmiennictwo

- Vardiman J.W., Thiele J., Arber D.A., Brunning R.D., Borowitz M.J., Porwit A., Harris N.L., Le Beau M.M., Hellström-Lindberg E., Tefferi A., Bloomfield C.D.: 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.
- Jouppier T.A., Bienzle D., Bernreuter D.C., Vernau W., Thrall M.A., McManus P.M.: Prognostic markers for myeloid neoplasms: A comparative review of the literature and goals for future. *Vet. Pathol.* 2011, **48**, 182–197.
- Valli V.E.O., Kiupel M., Bienzle D.: Hematopoietic system. W: Grant Maxie M.: *Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals*, vol. 3, wyd. 6, Elsevier, St. Louis, 2016, 102–268.
- Sapierzyński R., Huć T., Czopowicz M., Jankowska U., Jagielski D., Kliczkowska-Klarowicz K.: Ostre białaczki u psów – analiza 31 przypadków. *Med. Weter.* 2017, **73**, 118–123.

- Vail D.M., Young K.M.: Canine lymphoma and lymphoid leukaemia. W: *Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*, Withrow S.J., Vali D.M., wyd. 4, Saunders Elsevier, St. Louis, 2007, 699–768.
- Novacco M., Comazzi S., Marconato L., Cozzi M., Stefanello D., Aresu L., Martini V.: Prognostic factors in canine acute leukaemias: a retrospective study. *Vet. Comp. Oncol.* doi: 10.1111/vco.12136, 2015.
- Bennett J.M., Catovsky D., Daniel M.T., Flandrin G., Galton D.A., Gralnick H.R., Sultan C.: Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br. J. Haematol.* 1976, **33**, 451–458.
- McManus P.M.: Classification of myeloid neoplasms: a comparative review. *Vet. Clin. Pathol.* 2005, **34**, 189–212.
- Adam F., Villiers E., Watson S., Coyne K., Blackwood L.: Clinical pathological and epidemiological assessment of morphologically and immunologically confirmed canine leukemia. *Vet. Comp. Oncol.* 2009, **7**, 181–195.
- Stokol T., Schaefer D., Shuman M., Belcher N., Dong L.: Alkaline phosphatase is a useful cytochemical marker for the diagnosis of acute myelomonocytic and monocytic leukemia in the dog. *Vet. Clin. Pathol.* 2015, **44**, 79–93.
- Hisasue M., Nishimura T., Neo S., Nagashima N., Ishikawa T., Tsuchiya R., Yamada T.: A dog with acute myelomonocytic leukemia. *J. Vet. Med. Sci.* 2008, **70**, 619–621.
- Comazzi S., Gelain M.E., Bonfanti U., Rocchibianca P.: Acute megakaryoblastic leukemia in dogs: a report of three cases and review of the literature. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 2010, **46**, 327–335.
- Tomiyasu H., Fujino Y., Takahashi M., Ohno K., Tsujimoto H.: Spontaneous acute erythroblastic leukemia (AML-M6Er) in a dog. *J. Small Anim. Pract.* 2011, **52**, 445–447.
- Ferreira H.M.T., Smith S.H., Schwartz A.M., Milne E.M.: Myeloperoxidase-positive acute megakaryoblastic leukemia in a dog. *Vet. Clin. Pathol.* 2011, **40**, 530–537.
- Valentini F., Tasca S., Gavazza A., Lubas G.: Use of CD9 and CD61 for the characterization of AML-M7 by flow cytometry in a dog. *Vet. Comp. Oncol.* 2011, **10**, 312–318.
- Harvey J.H.: Hematopoietic neoplasms. W: *Atlas of Veterinary Hematology*, Harvey J.H., Saunders, Philadelphia, 2001, 163–184.
- Comazzi S., Paltrinieri S., Caniati M., De Dominicis S.: Erythremic myelosis (AML6er) in a cat. *J. Feline Med. Surg.* 2000, **2**, 213–215.
- Nagashima N., Kano R., Hirai A., Yamazaki J., Inoue C., Hisasue M., Moore P.F., Hasegawa A.: Acute monocytic leukaemia in a cat. *Vet. Rec.* 2005, **157**, 347–349.
- Shirani D., Nassiri S.M., Aldavood S.J., Seddigh H.S., Fathi E.: Acute erythroid leukemia with multilineage dysplasia in a cat. *Can. Vet. J.* 2011, **52**, 389–393.
- Fischer C., Tan E., Bienzle D.: Erythroleukemia in a retrovirus-negative cat. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2012, **240**, 294–297.
- Mylonakis M.E., Kritsepi-Konstantinou M., Vernau W., Valli V.E., Pardali D., Koutinas A.F.: Presumptive pure erythroid leukemia in a dog. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2012, **24**, 1004–1007.
- Tasca S., Carli E., Caldin M., Menegazzo L., Furlanello T., Gallego L.S.: Hematologic abnormalities and flow cytometric immunophenotyping results in dogs with hematopoietic neoplasia: 210 cases (2002–2006). *Vet. Clin. Pathol.* 2009, **38**, 2–12.
- Tasca S., Furlanello T., Caldin M.: High serum and urine lysozyme levels in a dog with acute myeloid leukemia. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2010, **22**, 111–115.
- Matus R.E., Leifer C.E., MacEwen E.G.: Acute lymphoblastic leukemia in the dog: a review of 30 cases. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1983, **183**, 859–862.
- Grindem C.E., Stevens J.B., Perman P.: Morphological classification and clinical and pathological characteristics of spontaneous leukaemia in 17 dogs. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 1985, **21**, 219–226.
- Miglio A., Antognoni M.T., Miniscalco B., Calvano D., Lepri E., Biretoni F., Mangili V.: Acute undifferentiated leukaemia in a dog. *Aust. Vet. J.* 2014, **92**, 499–503.
- Breuer W., Hermanns W., Thiele J.: Myelodysplastic syndrome (MDS), acute myeloid leukaemia (AML) and chronic myeloproliferative disorder (CMPD) in cats. *J. Comp. Pathol.* 1999, **121**, 203–216.
- Gelain M.E., Martini V., Giantin M., Arico A., Poggi A., Aresu L., Riodanto F., Dacasto M., Comazzi S.: CD44 in canine leukemia: Analysis of mRNA and protein expression in peripheral blood. *Vet. Immunol. Immunopath.* 2014, **159**, 91–96.
- Villiers E., Baines S., Law A.-M., Mallows V.: Identification of acute myeloid leukemia in dogs using flow cytometry with myeloperoxidase, MAC387, and a canine neutrophil-specific antibody. *Vet. Clin. Pathol.* 2006, **35**, 55–71.

Dr hab. Rafał Sapierzyński,
prof. nadzw. SGGW; e-mail: sapieh@wp.pl