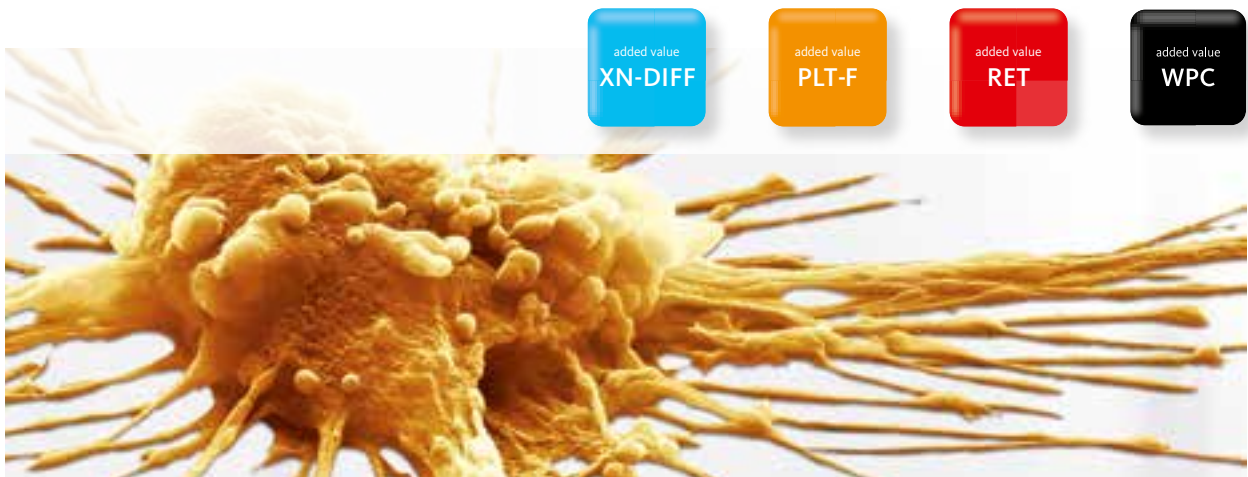


# BEFUNDBEISPIEL DER XN-SERIE

Nr. 06: Refraktäre Zytopenie mit multilineärer Dysplasie (RCMD)



## 1. KLINISCHER FALL

Zwei Tage vor der hier dargestellten Blutuntersuchung suchte ein 59-jähriger Mann aufgrund von Abgeschlagenheit und Blutungsneigung seinen Hausarzt auf, der ihn ins Krankenhaus überwies. Dort wurde nachfolgend die Diagnose einer refraktären Zytopenie mit multilineärer Dysplasie (RCMD) gestellt, eine Form des myelodysplastischen Syndroms (MDS). Im Knochenmark wurde ein Blastenanteil von weniger als 5% festgestellt. Dadurch konnten eine refraktäre Anämie mit Blastenexzess (Blastenanteil RAEB-1: 5–9%, RAEB-2: 10–19%) und eine akute myeloische Leukämie (AML) ausgeschlossen werden (Blastenanteil  $\geq 20\%$ ). Daneben war eine chronische myelomonozytäre Leukämie (CMML) unwahrscheinlich, da die Monozytenzahl unter  $1.000/\mu\text{L}$  lag. Es wurde umgehend die Suche nach einem geeigneten allogenen Knochenmarkspender eingeleitet.

## 2. ERGEBNISSE

Der Patient litt unter Anämie und Thrombozytopenie. Die Erythropoese war ineffektiv: Der Retikulozyten-Produktionsindex (RPI)<sup>1</sup> war mit 0,4 stark erniedrigt. Die Thrombopoese war ineffektiv – die Fraktion der unreifen Thrombozyten (IPF%) war nicht erhöht.

Darüber hinaus konnten im Bereich der Erythrozytenfragmente (FRC) Zellen gefunden werden, was für das Vorkommen von fragmentierten, dysplastischen oder anderen stark mikrozytären Erythrozyten sprach.

Auch die Leukozyten waren auffällig: Die deutlich verminderte Granularität der neutrophilen Granulozyten (NEUT-SSC: 106,1 Ch; normal: ca. 140 – 160 Ch) sprach für eine Myelodysplasie. Und in der Tat zeigten sich im Ausstrich des peripheren Bluts dysplastisch veränderte neutrophile Granulozyten mit vermindert bis nicht segmentierten Kernen (Pseudopelger-Zellen) und mit verminderter Granulation. Die Differenzierung war abgesehen von einer leichten absoluten Monozytose unauffällig, aktivierte oder atypische Lymphozyten waren nicht vorhanden, sodass ein Infekt eher ausgeschlossen werden konnte. Die Monozyten waren nicht eindeutig vermehrt, was gegen eine chronische myelomonozytäre Leukämie (CMML) sprach (WHO: anhaltende Monozytose von >1.000/µL). Das hämatologische Analysengerät hatte den Verdacht auf Blasten mitgeteilt. Dies wurde durch die mikroskopische Untersuchung bestätigt (1%).

<sup>1</sup>  $(RET\% * HCT) / (Retikulozyten-Shift * Standard-HCT)$ , Shift (1 bis 2,5) höher je niedriger der HCT



## a. Numerische Patientendaten

WBC-PARAMETER	DATEN	RBC-PARAMETER	DATEN	RBC-FLAG(S)	
WBC (10 <sup>9</sup> /L)	5,85	RBC (10 <sup>12</sup> /L)	2,98	Anämie	
NEUT# (10 <sup>9</sup> /L)	3,29	HGB (g/L)	83		
LYMPH# (10 <sup>9</sup> /L)	1,66	HCT (L/L)	0,253	PLT-PARAMETER	
MONO# (10 <sup>9</sup> /L)	0,88	MCV (fL)	84,9	PLT-I (10 <sup>9</sup> /L)	45
EO# (10 <sup>9</sup> /L)	0,00	MCH (pg)	27,9	PLT-F (10 <sup>9</sup> /L)	36
BASO# (10 <sup>9</sup> /L)	0,02	MCHC (g/L)	328	PDW (fL)	14,9
IG# (10 <sup>9</sup> /L)	0,03	RDW-SD (fL)	51,8	MPV (fL)	12,6
HFLC# (10 <sup>9</sup> /L) <sup>§</sup>	0,00	RDW-CV (%)	16,9	P-LCR (%)	45,6
NEUT%	56,3	NRBC# (10 <sup>9</sup> /L)	0,01	PCT (L/L)	0,0006
LYMPH%	28,4	NRBC% (/100WBC)	0,2	IPF# (10 <sup>9</sup> /L) <sup>§</sup>	1,3
MONO%	15,0	MicroR (%) <sup>§</sup>	6,4	IPF (%)	3,6
EO%	0,0	MacroR (%) <sup>§</sup>	3,1	PLT-FLAG(S)	
BASO%	0,3	HYP0-H <sub>e</sub> (%) <sup>§</sup>	2,0	Thrombozytopenie	
IG%	0,5	HYP0R-H <sub>e</sub> (%) <sup>§</sup>	0,9		
HFLC% <sup>§</sup>	0,0	RET# (10 <sup>9</sup> /L)	39,6		
NEUT-SSC (ch) <sup>§</sup>	106,1	RET%	1,33		
NEUT-SFL (ch) <sup>§</sup>	38,1	IRF (%)	49,9		
WBC-FLAG(S)		RET-H <sub>e</sub> (pg)	28,7		
Blasten?		Delta-H <sub>e</sub> (pg) <sup>§</sup>	1,8		
		FRC# (10 <sup>12</sup> /L) <sup>§</sup>	0,0250		
		FRC% <sup>§</sup>	0,84		

§ Forschungsparameter

## b. Scattergramme

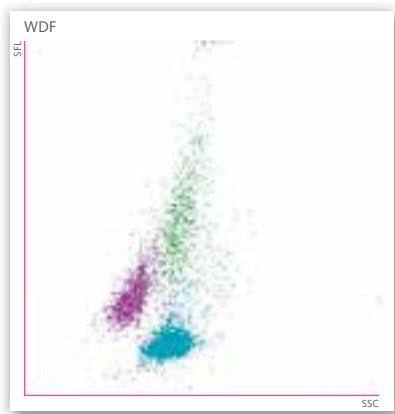


Abbildung 1: WDF-Scattergramm

Das WDF-Scattergramm zeigt eine Auffälligkeit der Lymphozyten- und Monozytenpopulation und löst damit den Warnhinweis »Blasten/Abn Lympho?« aus. Bei XN-Systemen mit installierter WPC-Applikation (WPC = white progenitor cells) triggert dieser Warnhinweis eine zusätzliche Messung im WPC-Kanal. Die Informationen aus dem WPC-Messkanal ermöglichen in den meisten Fällen den Warnhinweis »Blasten/Abn Lympho?« genauer zu spezifizieren. Im vorliegenden Fall wurde dadurch der Hinweis »Blasten/Abn Lympho?« unterdrückt und der Hinweis »Blasten?« angezeigt. Damit konnte man bei der morphologischen Nachuntersuchung ein besonderes Augenmerk auf diese pathologische Zellgruppe legen.

Die Applikation WPC (Clinical value WPC) für Systeme der XN-Serie ermöglicht – in Kombination mit der Standard-Applikation XN-DIFF – ein zweistufiges Flagging für myeloische Vorstufen und anormale lymphatische Blutzellen. Die spezifischen Warnhinweise erleichtern nicht nur die morphologische Begutachtung, sondern helfen dem Labor in einigen Fällen sogar, durch eine weitere Reduktion der Flaggingrate Ausstriche einzusparen.

Im WPC-Kanal wird ein spezieller Fluoreszenzmarker eingesetzt, der aufgrund des unterschiedlichen Lipid-Gehalts der Zellmembran verschiedener Zellgruppen unterschiedlich stark in die Zellen eindringt. Gemessen und ausgewertet werden in der ersten Darstellung das Seitwärtstreuung und die Fluoreszenzintensität (Abb. 2a/2b) und in der zweiten Darstellung das Seitwärtstreuung und das Vorwärtstreuung (Abb. 3a/3b).

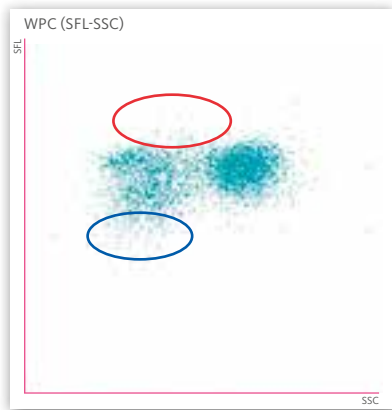
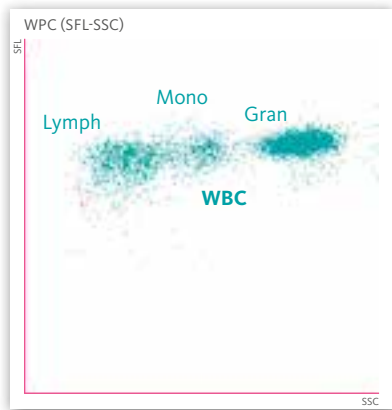


Abbildung 2a und 2b: WPC (SFL-SSC)-Scattergramm des Patienten im Vergleich zu einem unauffälligen Scattergramm

Das WPC-(SFL-SSC)-Scattergramm des WPC-Kanals zeigt kaum Zellen im Bereich höherer Fluoreszenz, die auf abnorme Lymphozyten (O) hinweisen würden. Die Wolke streut jedoch in den Bereich niedriger Fluoreszenz hinein (O), was ein erster Hinweis auf Blasten sein kann.



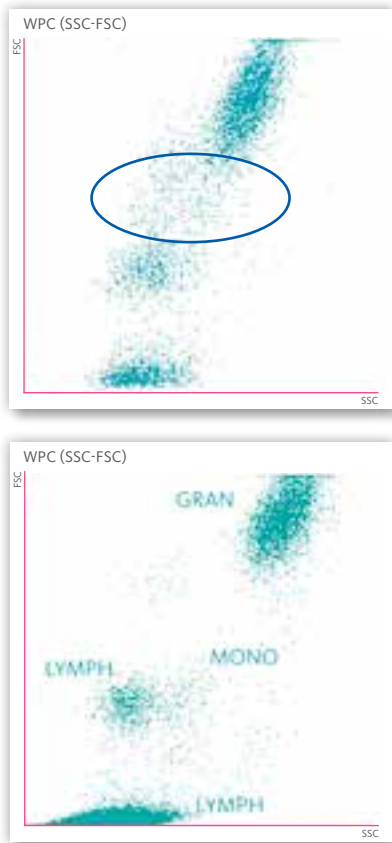


Abbildung 3a und 3b: WPC-(SSC-FSC)-Scattergramm des Patienten (oben) im Vergleich zu einem unauffälligen Scattergramm (unten) Im WPC-(SSC-FSC)-Scattergramm des Patienten sind vermehrt Zellen im Bereich zwischen Lymphozyten und Granulozyten sichtbar (O), ein weiteres Indiz für das Vorkommen von Blasten.

Anmerkung: Für die Bestimmung der WBC-Warnhinweise führt das System sehr viele Informationen zusammen. Es werden sowohl die Zahlenwerte der Leukozytendifferenzierung aus beiden WBC-Messkanälen (WDF- und WPC-Kanal), als auch die »Flaggingareas« der Scattergramme von WDF-, WPC-(SFL-SSC) als auch WPC-(SSC-FSC) ausgewertet. Das WBC-Flagging des Systems lässt sich daher schwer durch die isolierte Betrachtung einzelner Scattergramm-Darstellungen erklären.

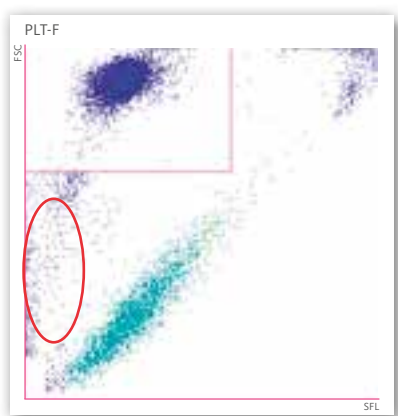


Abbildung 4: PLT-F-Scattergramm

Die Thrombozytenmessung im PLT-F-Kanal bestätigt das Vorliegen einer Thrombozytopenie. Der Anteil der Fraktion unreifer Thrombozyten (IPF%) ist mit 3,1% im Normalbereich und spricht nicht für eine gesteigerte Thrombopoese. Zudem wurden in diesem Kanal vereinzelt Fragmentozyten (oder andere Formen von Mikrozyten) detektiert (0).

### c. Morphologische Bilder

Im peripheren Blut sind bei den meisten Patienten mit MDS abnorme Erythrozyten (Anisozytose, Poikilozytose und weitere Abweichungen), abnorme Thrombozyten (Anisothrombozytose und verminderte bis fehlende Granulation), sowie abnorme Granulozyten (in vielen Fällen verminderte bis fehlende Granulation und abnorme Segmentierung der Kerne – z. B. Pseudopelger-Zellen oder auch »rundkernige Neutrophile«) sichtbar.

Hyposegmentierte Granulozyten-Kerne (Pseudopelger-Zellen, rundkernige Granulozyten) kommen aber auch bei schweren viralen oder bakteriellen Infektionen vor (sogenannte »Infekt-Pelger-Zellen«) [6]! Dabei sind die Zytoplasmata aber zumeist nicht stark vermindert granuliert oder gar agranulär.

Die dysplastischen Veränderungen der Hämatopoese sind in den meisten Fällen gut am Blutbild ablesbar. Für die morphologische Klassifikation eines Falls ist aber die zusätzliche Untersuchung des Knochenmarks unerlässlich, da einige Phänomene sich erheblich zwischen peripherem Blut und Knochenmark unterscheiden können – deshalb schreibt die WHO-Klassifikation die Untersuchung beider Materialien vor. Die folgende morphologische Darstellung beschränkt sich jedoch auf das periphere Blut.

Die Veränderungen der Granulozyten bei verschiedenen Fällen von MDS sind sehr unterschiedlich und auch unterschiedlich stark ausgeprägt. Das Ausmaß der hämatopoetischen Insuffizienz und das Ausmaß der morphologischen Anomalie sind nicht streng korreliert.

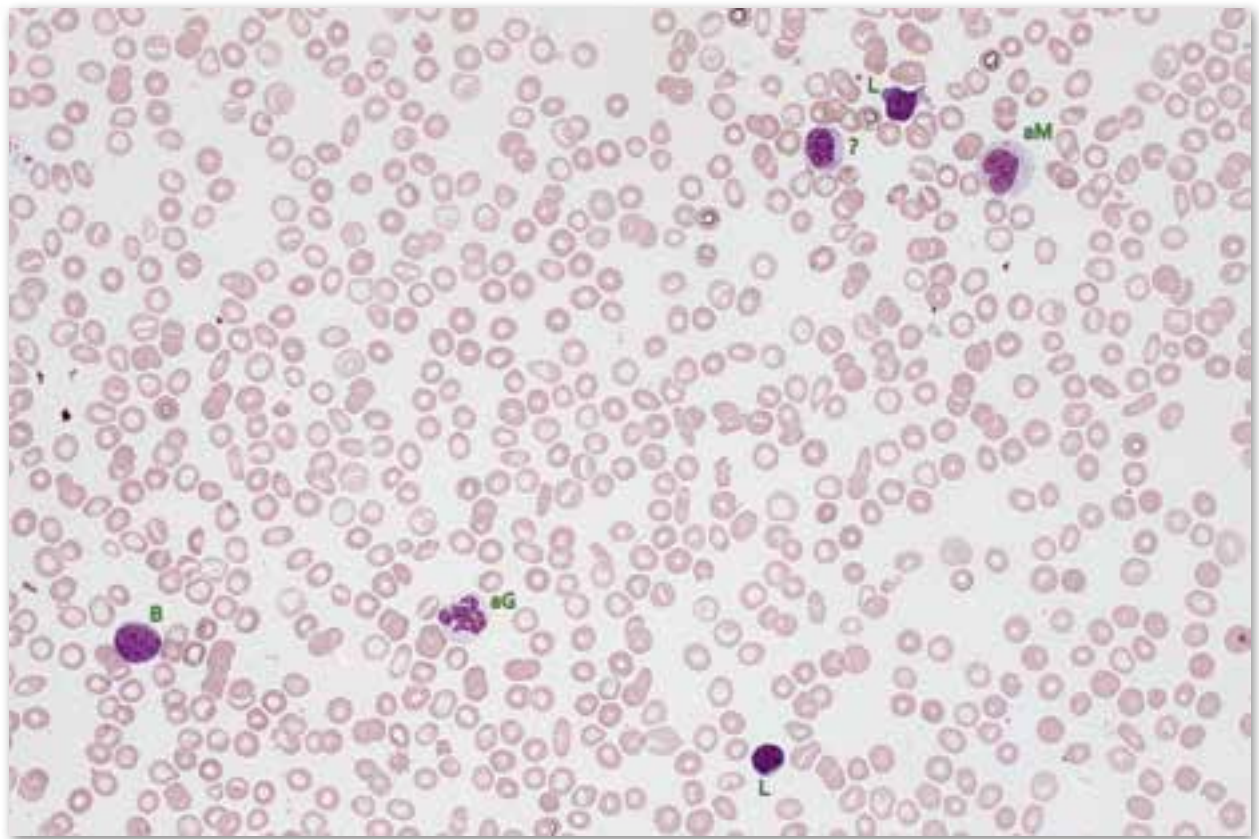


Abbildung 5: RCMD

Schwere Anisozytose, Poikilozytose, Mikrozyten, Sphärozyten, Stomatozyten, Ovalozyten, Targetzellen und Anisochromasie bei einem Patienten mit MDS.

*B: Blast; aG: abnorm segmentierter Granulozyt; L: Lymphozyt; ?: abnorme rote Vorstufe oder abnormer Metamyelozyt; aM: abnormer Metamyelozyt mit fehlender Granulation des Zytoplasmas*

*Bildquelle: Th. Binder*



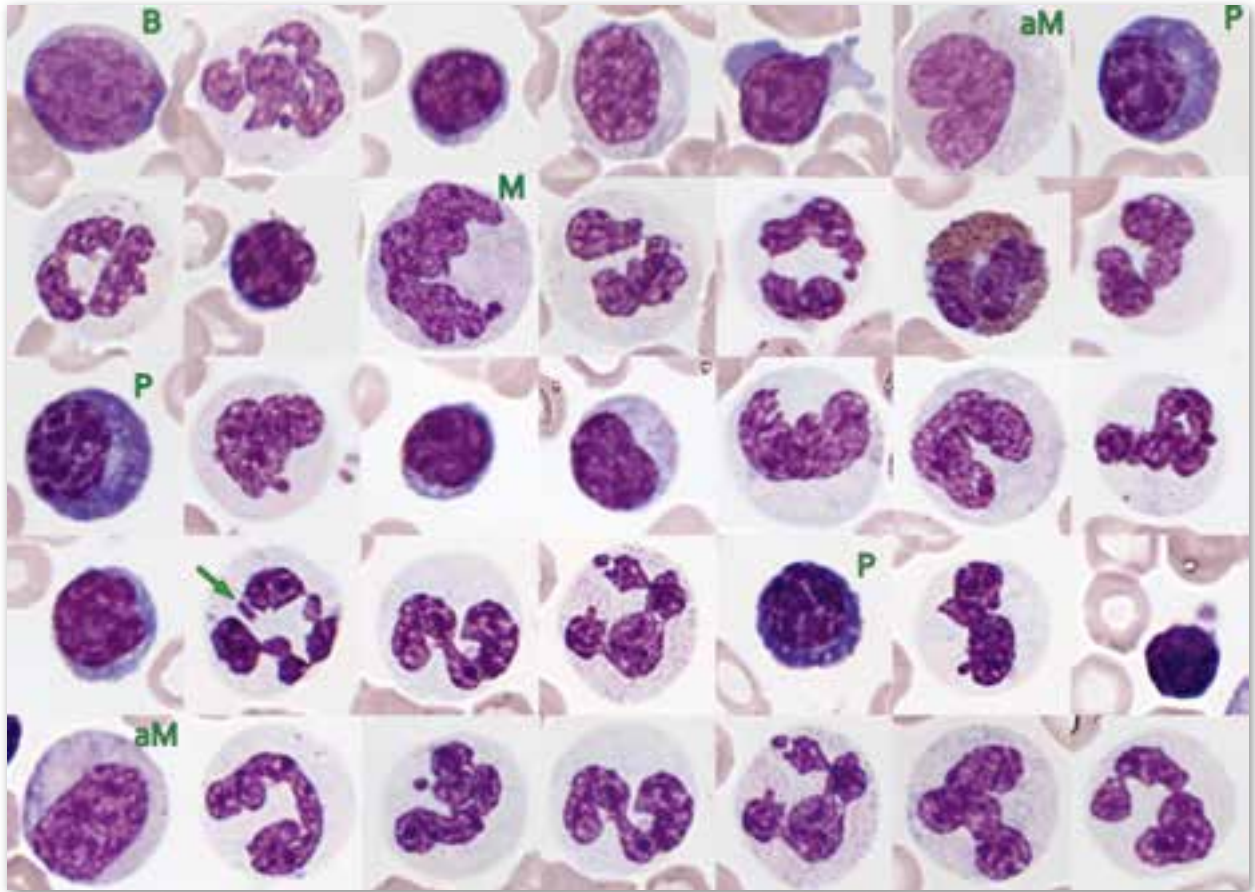


Abbildung 6: RCMD

Leukozyten aus verschiedenen Aufnahmen ausgeschnitten; atypische Granulozyten, teils plump segmentiert, teils mit filigranen Kernen, teils mit hyposegmentierten Kernen, Zytoplasmata mit geringer bis fehlender Granulation. Die Patientin entwickelte etwas mehr als zwei Jahre nach dieser Erstuntersuchung eine AML, später mit meningealem Befall.

*B: Blast, M: Monozyt mit hyperlobuliertem Kern, P: »Pseudoplasmazelle«, am ehesten apoptotische unreife T-Zelle, aM: abnormer Metamyelozyt, Pfeil: plumpes Auerstäbchen (?)*

*Bildquelle: Th. Binder*

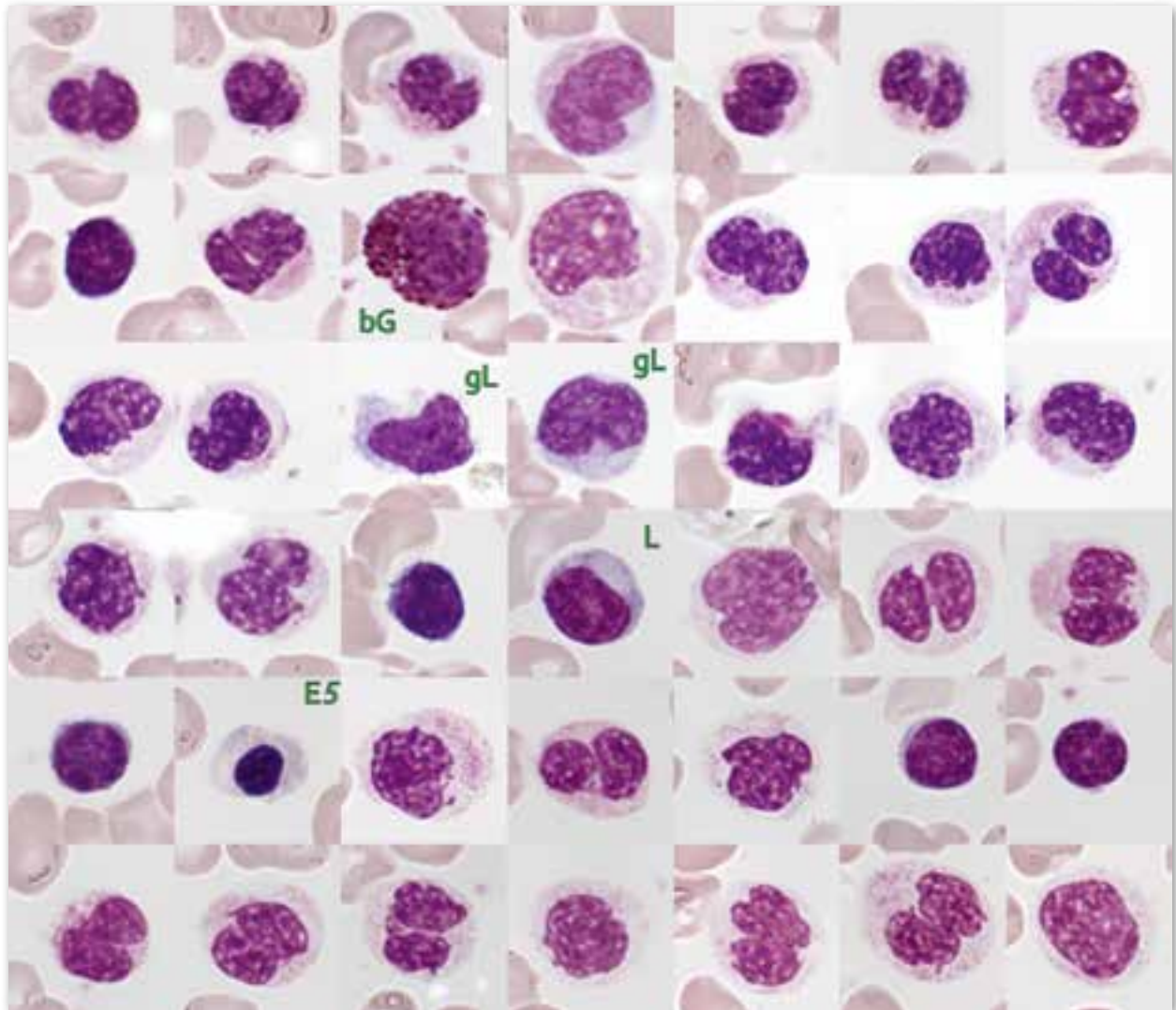


Abbildung 7: RAEB-2

Leukozyten aus verschiedenen Aufnahmen ausgeschnitten; schwer atypische neutrophile Granulozyten, alle plump segmentiert, zahlreiche Pseudopelger-Zellen, einige rundkernige Neutrophile, schwache bis fehlende Granulation der Zytoplasmata. Bei vielen MDS-Fällen führt die Reifungsstörung der Granulopoese zu einer unzuverlässigen bis unmöglichen Klassifikation einzelner Zellen, teils wegen apoptotischer Veränderung der Kerne; zumeist werden die apoptotischen Zellen aber bereits im Knochenmark abgebaut. Nachfolgend ein Fall mit vielen nicht klar einzuordnenden Zellen.

*bG: basophiler Granulozyt, gL: granulierter Lymphozyt, E5: rote Vorstufe*

*Bildquelle: Th. Binder*

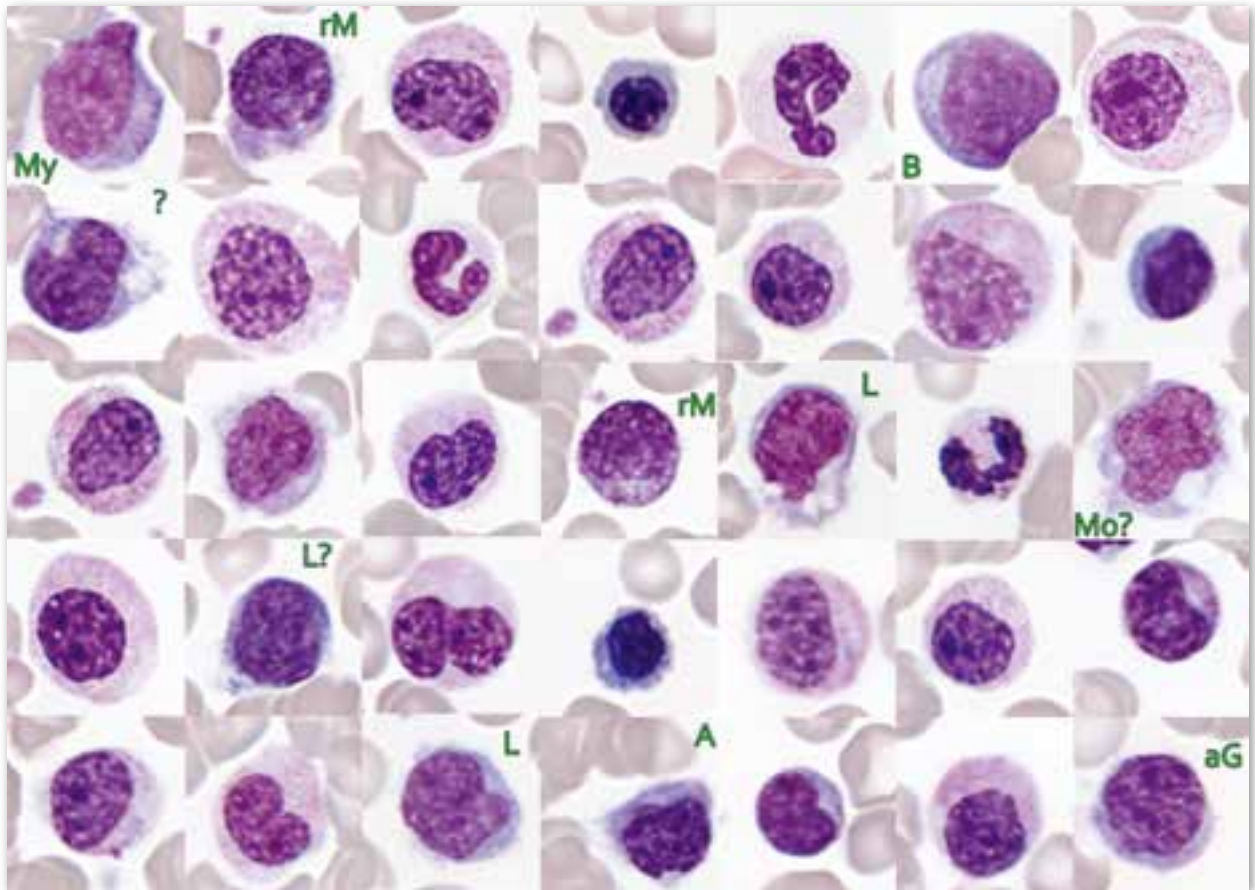


Abbildung 8: Beispiel einer weiteren RCMD

Leukozyten aus verschiedenen Aufnahmen ausgeschnitten; einige segmentierte Granulozyten-Kerne, zumeist schwere Störung der Kernsegmentierung, Zytoplasmata mit fehlender bis starker Granulation, einige schwer klassifizierbare Zellen, vereinzelte Blasten, einige Zellen mit apoptotischen Kernen.

*rM: rundkerniger Metamyelozyt, B: Blast, L: atypischer Lymphozyt (?), Mo?: wahrscheinlich Monozyt, A: unklassifizierte Zelle wegen apoptotischen Chromatins, evtl. ein Blast, My: Myelozyt oder hypogranulärer Promyelozyt, aG: atypische granulozytäre Zelle, evtl. Myelozyt*

*Bildquelle: Th. Binder*

Im Einzelfall ist es nicht möglich, zwischen atypischen Granulozyten bei MDS und solchen bei einer schweren Infektion (bakteriell, viral oder z.B. Malaria) zu unterscheiden. Dies ist nicht verwunderlich, weil die Granulozyten sowohl beim MDS als auch bei einer schweren Infektion infolge einer Zytokinvermittelten Apoptose untergehen (dies ist belegt für das MDS, hochwahrscheinlich bei den Infektionen). Auch »Hilfsparameter« wie Erythrozytenzahl und Thrombozyten sind häufig nicht hilfreich, da bei Patienten mit MDS die Anämie gering sein kann und die Thrombozytenzahl normal, andererseits bei schweren Infektionen auch Anämie und Thrombozytopenie vorliegen können. Ebenso ist es ohne Voruntersuchung und Kontrolluntersuchung häufig schwierig, zwischen echter Pelger-Anomalie und einer Pelger-Veränderung bei MDS oder Infekt zu unterscheiden. Im nachfolgenden Fall lag eine schwere Anomalie der Granulozyten bei schwer verlaufendem Virusinfekt vor. Eine echte Pelger-Anomalie und eine Myelodysplasie wurden durch eine Kontrolluntersuchung ausgeschlossen.

Pseudopelger-Zellen in geringer Zahl im Rahmen von Infekten kommen in der Laborroutine häufig vor (häufiger als Pseudopelger-Zellen bei MDS!), stellen aber wegen der klaren klinischen Daten zumeist kein Problem dar, wenn dem Untersucher das Krankheitsbild der »Infekt-Pelger-Anomalie« bekannt ist.



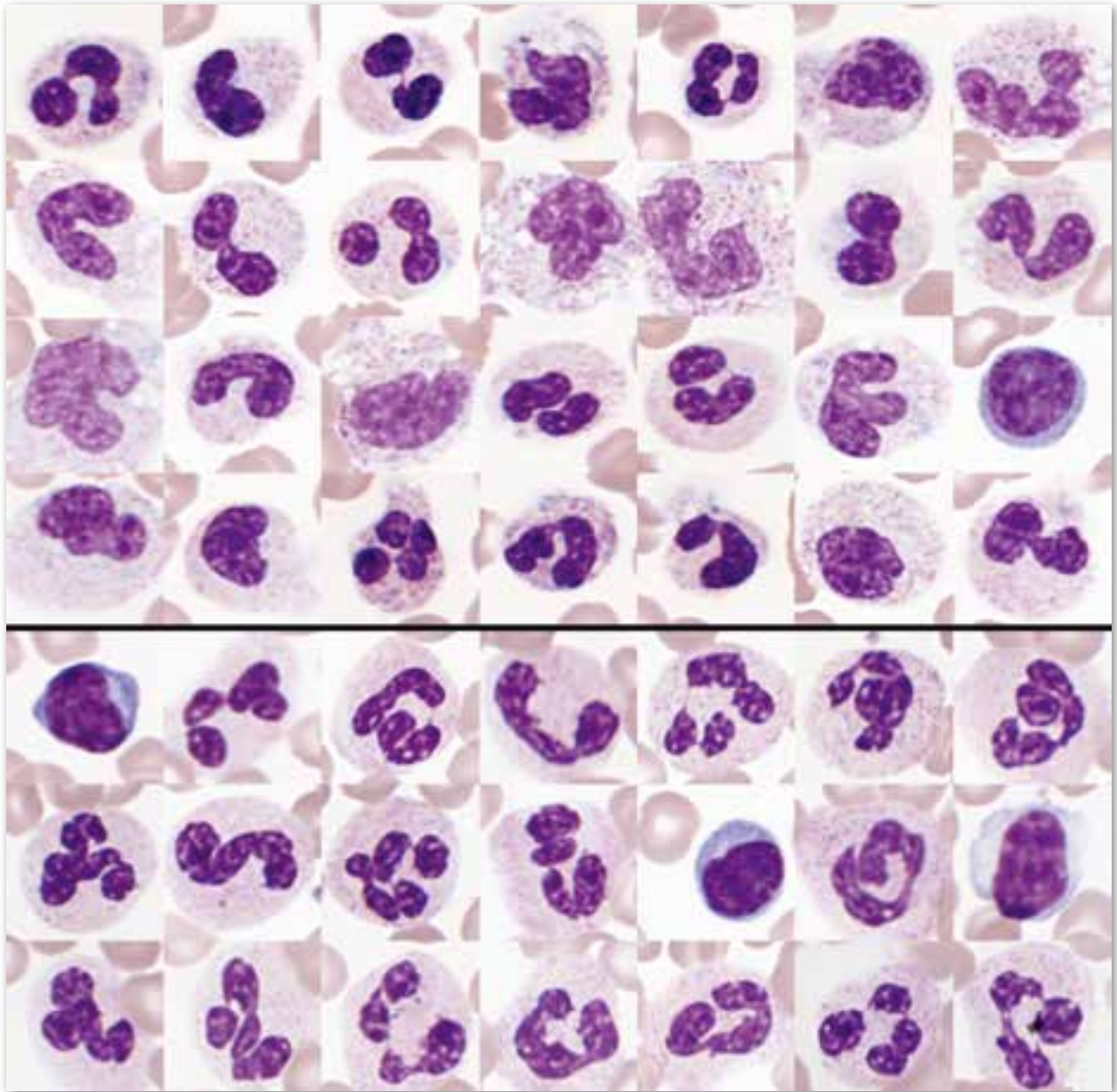


Abbildung 9: Beispiel eines Virusinfekts

Leukozyten aus verschiedenen Aufnahmen ausgeschnitten; oberhalb der schwarzen Linie (Erstuntersuchung): verminderte bis starke Granulation der Zytoplasmata, vermindert kondensierte »aufgedunsene« Kerne, daneben hochgradig kondensierte Kerne, atypische Segmentierung, einige typische Pseudopelger-Zellen; unterhalb der Linie (Kontrolluntersuchung): Normalisierung von Zytoplasma und Kernen (nach 6 Wochen).

Bildquelle: Th. Binder

### 3. GRUNDERKRANKUNG

#### **Myelodysplastische Syndrome [1, 2]**

Das myelodysplastische Syndrom (MDS) – in der Vergangenheit auch Präleukämie genannt – ist eine heterogene Gruppe von klonalen Erkrankungen des blutbildenden Systems. Charakteristisch sind: eine hyperproliferative aber ineffektive Hämatopoese mit Zytopenie, eine Dysplasie in einer oder mehreren Zellreihen, häufig zytogenetische und molekulargenetische Anomalien und ein erhöhtes Risiko für eine Progression zu einer akuten myeloischen Leukämie (AML). Das MDS gehört in eine Gruppe von Erkrankungen mit Schädigung der pluripotenten Stammzellen. Folglich können alle Zelllinien betroffen sein. Zu den klinischen Manifestationen gehören meist Anämie und/oder Thrombozytopenie, sodass oftmals in regelmäßigen Abständen Blut transfundiert werden muss. Am Ende der Erkrankung stehen ein Knochenmarkversagen und der Tod infolge von Blutungen bzw. Infektionen oder – bei rund 30–40% der Patienten – eine AML. Die Ätiologie des MDS ist weitgehend ungeklärt. Bei 90% der Fälle tritt die Erkrankung spontan als »primäres MDS« auf, während lediglich 10% als »sekundäres MDS« und damit als Komplikation einer Chemotherapie, Bestrahlung oder einer anderen genotoxischen Exposition eingestuft werden.

Zur Prognose des Krankheitsverlaufs und zur Therapieplanung können die verschiedenen Krankheitsbilder in eine Reihe von Untergruppen unterteilt werden, jeweils abhängig von den beteiligten Zelllinien. Einige der vormals zur MDS-Gruppe gehörenden Erkrankungen wurden durch die aktuellen WHO-Kriterien neu zugeordnet. So wird etwa die chronische myelomonozytäre Leukämie (CMML) vom MDS-Typ mit einer proliferativen monozytären Zellreihe nun der Gruppe der myelodysplastisch / myeloproliferativen Neoplasien (MDS/MPN) zugeordnet.

Die aktuelle WHO-Klassifikation (2008) unterscheidet folgende Subtypen:

- Refraktäre Zytopenien mit unilineärer Dysplasie (RCUD): refraktäre Anämie (RA), refraktäre Neutropenie (RN) oder refraktäre Thrombozytopenie (RT)
- Refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten (RARS)
- Refraktäre Zytopenie mit multilineärer Dysplasie (RCMD)
- Refraktäre Anämie mit Blastenexzess (RAEB-1 und RAEB-2)
- MDS mit isolierter del(5q) (Deletion auf dem langen Arm [q] von Chromosom 5)
- Myelodysplastisches Syndrom – unklassifiziert (MDS-U)
- Myelodysplastisches Syndrom im Kindesalter
- Refraktäre Zytopenie im Kindesalter

### **Sekundäres myelodysplastisches Syndrom**

Sowohl die Chemotherapie als auch die Strahlentherapie im Rahmen der Krebsbehandlung sind genotoxisch und können klonale Veränderungen hervorrufen, die ursächlich für sekundäre maligne Erkrankungen sind. Dies trifft am häufigsten auf Alkylanzien, Epipodophyllotoxine und Anthrazykline zu. Patienten mit einer vorausgehenden Krebsdiagnose haben ein überdurchschnittlich hohes Risiko, später ein MDS oder eine AML zu entwickeln. Das sekundäre MDS verläuft meist rascher progredient als das »primäre«.

### Refraktäre Zytopenie mit multilineärer Dysplasie [3]

Bei der refraktären Zytopenie mit multilineärer Dysplasie (RCMD) sind zwei oder drei hämatopoetische Zelllinien dysplastisch verändert und es liegt eine Monozytopenie, Bizytopenie oder eine Panzytopenie vor. Weiterhin kennzeichnend sind das Fehlen von Blasten oder ein nur minimaler Blastenanteil (< 1%) im peripheren Blut, weniger als 5% im Knochenmark und das Fehlen von Auerstäbchen. Wenngleich es zur Diagnose einer Zytopenie empfohlene Grenzwerte für die unterschiedlichen Zellreihen gibt, schließt ihr Verfehlen eine RCMD nicht zwangsläufig aus, sodass die Diagnose bei Vorliegen unterstützender morphologischer oder zytogenetischer Faktoren dennoch gestellt werden kann. Fälle mit einem Blastenanteil von 2 – 4% im peripheren Blut und ohne Auer-Stäbchen sollten als RAEB-1 klassifiziert werden. Befunde mit einer Panzytopenie oder 1%igem Blastenanteil im peripheren Blut und Fehlen von Auer-Stäbchen werden als myelodysplastisches Syndrom – unklassifiziert (MDS-U) eingestuft. Bei Vorhandensein von Auerstäbchen wird die Diagnose einer RAEB-2 gestellt. Die RCMD macht rund 30% der MDS-Fälle aus. Der klinische Verlauf wird durch die betroffenen Zelllinien und das Ausmaß der Zytopenie und Dysplasie bestimmt und ist daher ganz unterschiedlich. Das mediane Überleben liegt bei 30 Monaten, aber Patienten mit komplexen zytogenetischen Anomalien haben eine deutlich schlechtere Prognose. Daneben ist ein prozentualer Blastenanteil im Knochenmark von 3,5% mit einem kürzeren Überleben assoziiert [4], und RCMD-Patienten mit einem Blastenanteil von 1% haben im Vergleich zu RCMD-Patienten ohne Blasten im peripheren Blut [5] eine kürzere Überlebensdauer.

---

## LITERATUR

### LITERATUR ZU DEN MYELODYSPLASTISCHEN SYNDROMEN:

- [1] **Brunning RD, Orazi A, Germing U, et al.** (2007): *Myelodysplastic Syndromes/neoplasms, overview*. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. (Editors): *World Health Organization Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. 4th Edition. Lyon, France. International Agency for Research on Cancer (IARC) Press: 49 – 52.
- [2] **Adès L, Itzykson R, Fenaux P.** (2014): *Myelodysplastic syndromes*. *Lancet*: elektronische Vorabpublikation.

### LITERATUR ZUR RCMD:

- [3] **Brunning RD, Bennett JM, Matutes E, et al.** (2007): *Refractory cytopenia with multilineage dysplasia*. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. (Editors): *World Health Organization Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. 4th Edition. Lyon, France. International Agency for Research on Cancer (IARC) Press: 49 – 52.
- [4] **Wang H, Wang XQ, Xu XP, et al.** (2009): *Bone marrow blasts level predicts prognosis in patients with refractory cytopenia with multilineage dysplasia*. *Eur J Haematol* 83 (6): 550 – 558.
- [5] **Knipp S, Strupp C, Gattermann N, et al.** (2008): *Presence of peripheral blasts in refractory anemia and refractory cytopenia with multilineage dysplasia predicts an unfavourable outcome*. *Leuk Res* 32 (1): 33 – 37.

### LITERATUR ZU PELGERANOMALIE BEI INFECTEN:

- [6] **Heckner, F.** (1948): *Toxisch-reaktive Kernveränderungen der Leukozyten (Pseudopelger)*. *Dtsch med Wschr* 73: 47 – 48.

Wir bedanken uns bei Dr. med. Thomas Binder (Ulm) für die Ausarbeitung des Kapitels »c. Morphologische Bilder« und die redaktionelle Mitarbeit.