

Leukemie en lymfoom

Docenten: prof.dr. H.R. Delwel, dr. P.J.M. Leenen, dr. S.C.A. van Blokland en prof. dr. I.P. Touw

1 Toelichting

1.1 Achtergrondinformatie

Kijk vóór dit practicum de stof van ZO3-Bloed en beenmerg en PR1-Bloed en bloedcelvorming nog eens door!

In voorafgaand onderwijs heb je gezien dat de diverse typen bloedcellen essentiële functies uitoefenen bij het handhaven van de homeostase: transport van zuurstof, bloedstolling, en verschillende vormen van afweer tegen ongewenste indringers, zoals virussen en bacteriën. Omdat bloedcellen een beperkte levensduur hebben, worden ze voortdurend vervangen door nieuwgevormde cellen, die in de volwassen situatie ontstaan in het beenmerg door proliferatie en differentiatie van voorlopercellen.

Bij de behandeling van kankerpatiënten met cytostatica blijkt dat het beenmerg, met het darmepitheel, van de gezonde weefsels het meest gevoelig is voor deze farmaca die snel prolifererende cellen doden. Hieruit blijkt dat het beenmerg één van de organen is met de meest actieve celdeling. Wanneer de proliferatie en differentiatie van voorlopercellen in het beenmerg ontregeld raakt, kan dit uiteindelijk leiden tot het ontstaan van leukemie.

1.2 Leerdoelen

Na dit practicum kun je:

- beoordelen en beargumenteren of een bloed/beenmerg uitstrijk normaal of afwijkend is
- indien we te maken hebben met een leukemie, beargumenteren welke differentiatielijn is aangedaan
- de bloed/beenmerg afwijkingen correleren aan de klachten van een patiënt

1.3 Literatuur

- Collegeaantekeningen
- Kumar Basic Pathology, 10e editie, Hoofdstuk 11, pagina 478-485

1.4 Overige informatie

Studiebelasting

Dit practicum neemt twee uur in beslag (exclusief voorbereidingstijd).

Vorbereiding

Neem bovenstaande literatuur door als voorbereiding op het vaardigheidsonderwijs. Er wordt verwacht dat je:

- vertrouwd bent met de begrippen uit onderstaande lijst;
- de zelfstudieopdracht *Bloed en Beenmerg* (wk. 1) hebt afgerond;
- de opdrachten van het practicum globaal hebt doorgenomen.

Begrippenlijst

Hematopoiese	Leukemie
Beenmerg May Grünwald-Giemsa kleuring Pluripotente stamcel Div. ontwikkelingsstadia van de granulopoiese Neutrofiele, eosinofiele, basofiele granula Div. ontwikkelingsstadia van de erythropoiese Megakaryocyt Trombocyt Lymfocyt (klein en groot) Plasmacel Monocyt	Leukemische blasten Chronische leukemie Acute leukemie Myeloïde leukemie Lymfatische leukemie

2 Handleiding

Dit practicum bestaat uit twee onderdelen:

- korte heroriëntatie in uitstrijken van normaal bloed en beenmerg
- het bestuderen van preparaten van drie verschillende casussen over leukemie

2.1 Normaal bloed- en beenmerg

De preparaten van normaal bloed en beenmerg heb je al in PR1 (wk.1) bekeken. De reden om ze hier opnieuw te kort bekijken is om je een goed beeld te vormen van de normale situatie, ter vergelijking met de leukemie casus die hierna volgen.

Preparaat 1: uitstrijk normaal perifeer bloed (mens), (May-Grünwald Giemsa)

Open het bestand van de perifeer bloeditstrijk met de bovenstaande hyperlink of maak gebruik van de virtuele preparatendoos die beschikbaar is na het inlogscherf. Oriënteer je in het preparaat (begin bij lage vergroting). Gebruik daarbij het gedeelte met de juiste celdichtheid (de 'baard' van de uitstrijk). Om te bepalen of in een uitstrijk afwijkingen worden gevonden zijn vooral de volgende aspecten van belang:

- de verhouding tussen erythrocyten : trombocyten : leukocyten
- de verhouding tussen de verschillende typen granulocyten: lymfocyten : monocyt
- het voorkomen van grote (geactiveerde) lymfocyten
- het voorkomen van onrijpe voorstadia van granulocyttaire cellen.

Om deze aspecten goed te kunnen zien is het soms nodig om van vergroting te veranderen.

De normaalwaarden voor de frequenties van verschillende typen leukocyten in het bloed staan in Tabel 1 op de volgende pagina.

Preparaat 2: uitstrijk normaal beenmerg (mens), (May Grünwald Giemsa)

Selecteer bij kleine vergroting een gebied met een redelijke celdichtheid in de nabijheid van de centraal liggende celklontjes (hier is de verdeling van cellen het meest representatief en de kleuring het best).

Oriënteer je in het preparaat. Pas waar nodig de vergroting aan.

Let op de volgende aspecten:

- dichtheid van kernhoudende cellen
- verhouding blasten : rijpere (kernhoudende) voorlopercellen
- verhouding granulocytair : erythrocytair voorlopercellen
- relatieve frequentie van lymfocytair en monocytair cellen
- voorkomen van megakaryocyten

Identificeer enkele rijpere stadia van de verschillende differentiatielijnen m.b.v. de determinatietabel.

Voor de vaststelling of een beenmerg acuut leukemisch is, is het **percentage blasten** essentieel. Hiermee worden dan myeloblasten of lymfoblasten bedoeld (erytroblasten-leukemie is zeldzaam en daarom is het minder relevant om de erytroblasten in deze bepaling te betrekken).

Dit betekent voor het normale beenmerg dat het percentage blasten vrijwel gelijk staat aan het percentage myeloblasten.

- 1 Wat is het percentage blasten in dit preparaat?

2.2 Leukemie

Voor de opdrachten in dit onderdeel beoordeel je preparaten van patiëntenmateriaal. Werk hierbij samen met één of twee collega-studenten!

Bestudeer bij elke casus:

- de korte samenvatting van de belangrijkste klinische bevindingen en laboratoriumwaarden
- het preparaat van het perifeer bloed van de patiënt
- het preparaat van het beenmerg van de patiënt
- de evt. bijgeleverde additionele informatie

Formuleer per casus een antwoord op de volgende vragen:

- 2 Is het perifere bloedprofiel afwijkend of niet? Beargumenteer je antwoord.
Vergelijk daarvoor de perifere bloeduitstrijk van de patiënt met de controle uitstrijk.
- 3 Is het beenmergprofiel afwijkend of niet? Beargumenteer je antwoord.
- 4 Wat is de aard van de afwijking? (toename, afname, verschuiving)
- 5 Welke hematopoietische differentiatielijn is betrokken?
- 6 Heeft de patiënt een chronische of een acute leukemie?
- 7 Welke klachten kun je relateren aan de aard van de afwijkingen die je hebt waargenomen in de preparaten?

Tabel 1. Normaalwaarden van cellen in het perifere bloed

Erytrocyten	♀ $3,7 - 5,0 \times 10^{12} / L$; Hb 7,5 - 10 mmol/L ♂ $4,3 - 5,5 \times 10^{12} / L$; Hb 8,7 - 11,2 mmol/L
Trombocyten	$140 - 360 \times 10^9 / L$
Leukocyten	$5 - 10 \times 10^9 / L$
Neutrofiele granulocyten	40 – 80%
Eosinofiele granulocyten	0 – 6%
Basofiele granulocyten	0 – 2%
Lymfocyten	15 – 50%
Monocyten	2 – 10%

Normaliter zijn er geen voorstadia van de verschillende rijpe cellen in het bloed aanwezig. Bij een infectie kan een zogenaamde ‘linksverschuiving’ optreden, waarbij onrijpe (met name staafkernige) granulocyten in het bloed worden gevonden.

Voor de beoordeling of beenmerg een normaal of afwijkend profiel heeft, gelden de volgende getallen (WHO-richtlijn):

normaal:	<2% blasten
patiënt in remissie:	<5% blasten
myelodysplastisch syndroom:	<20% blasten
acute leukemie:	>20% blasten

Deze cijfers zijn van belang bij het stellen van de diagnose acute myeloïde leukemie. Voor de lymfatische leukemie zijn vooral de verdere (immuno-) typeringens doorslaggevend.

2.2.1 Casus 1

Een 35-jarige vrouw wordt opgenomen met hoge koorts die sinds twee dagen bestaat. Zij voelt zich al een week niet goed en is snel moe en kortademig. Ook is haar opgevallen dat zij gemakkelijk blauwe plekken krijgt.

Bij lichamelijk onderzoek wordt een zieke, bleke vrouw gezien. Er zijn meerdere blauwe plekken en puntbloedingen in de huid. De patiënt geeft groen sputum op. Lever en milt zijn niet vergroot.

Laboratoriumbevindingen

- bloedbeeld: Hb = 4.2 mmol/L; Leukocyten = $23.6 \times 10^9/L$; Trombocyten = $3 \times 10^9/L$
- afwijkend karyotype (soms)

Preparaten

- [preparaat 3: uitstrijk perifere bloed patiënt casus 1](#) (May-Grünwald Giemsa-kleuring)
- [preparaat 4: uitstrijk beenmerg patiënt casus 1](#) (May-Grünwald Giemsa-kleuring)

2.2.2 Casus 2

Een 60-jarige man bezoekt de huisarts vanwege buikklachten. Hij heeft reeds langere tijd een vol gevoel in de bovenbuik, met name na het eten. Ook is hij wat sneller moe dan vroeger. De verdere anamnese vermeldt geen bijzonderheden.

Bij lichamelijk onderzoek wordt een niet-zieke man gezien. Bij palpatie van de buik valt op, dat de milt vergroot is. Er zijn geen blauwe plekken of puntbloedingen.

Laboratoriumbevindingen

- bloedbeeld: Hb= 8.6 mmol/L; Leukocyten= $120 \times 10^9/L$; Trombocyten= $820 \times 10^9/L$.
- verhoogd urinezuur
- chromosomale translocatie (t9;22)

Preparaten

- [preparaat 5: uitstrijk perifeer bloed patiënt casus 2](#) (May-Grünwald Giemsa-kleuring)
- [preparaat 6: uitstrijk beenmerg patiënt casus 2](#) (May-Grünwald Giemsa-kleuring)

2.2.3 Casus 3

Een 70-jarige man bezoekt de huisarts met klachten van moeheid die sinds enkele maanden bestaan. Ook heeft hij in toenemende mate last van pijn in de rug.

Bij lichamelijk onderzoek valt op dat de patiënt wat bleek is. Er is een duidelijke kloppijn ter plaatse van de lumbale wervelkolom.



Figuur 1. Röntgenopname van de schedel van patiënt van casus 3.

Eigendom Erasmus MC, afdeling Hematologie.

Laboratoriumbevindingen

- bloedbeeld: verhoogde bezinking (BSE=96 mm) en een matige bloedarmoede (Hb=6.8 mmol/L)
- monoklonale gamma-globulineband in de serumelectroforese
- röntgenfoto's tonen de volgende afwijkingen:
 - meerdere ingezakte ruggewervels.
 - lytische lesies in de schedel (zie figuur 1)
- nierfunctieafwijkingen

Preparaten

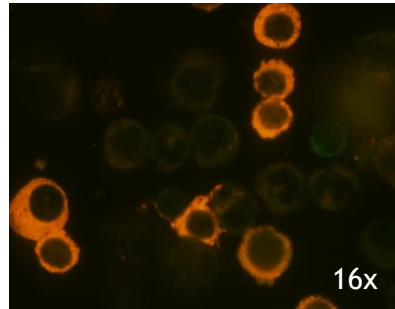
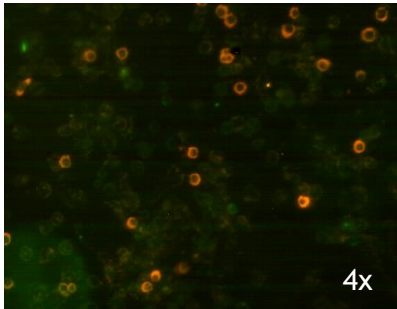
- [preparaat 7: uitstrijk beenmerg patiënt casus 3](#) (May-Grünwald Giemsa-kleuring)

N.B. de uitstrijk van perifeer bloed gaf een normaal patroon.

Immunofluorescentie opnamen

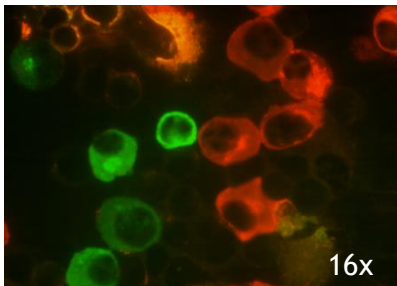
In beenmerguitstrijken van de patiënt en van controle beenmerg zijn met behulp van immunofluorescentie de cellen aangetoond die de immunoglobuline lichte keten variant 'kappa' (rood) of 'lambda' (groen) tot expressie brengen.

N.B. Bekijk de opnamen in kleur in het pdf-file.



Figuur 2. Beenmerguitstrijk van patiënt casus 3 gekleurd m.b.v. immuno-fluorescentie voor immunoglobuline-kappa (oranje/rood) en -lambda (groen) lichte keten.

Eigendom Erasmus MC, afdeling Immunologie.



Figuur 3. Beenmerguitstrijk van normaal beenmerg gekleurd m.b.v. immunofluorescentie voor immunoglobuline-kappa (rood) en -lambda (groen).

Eigendom Erasmus MC, afdeling Immunologie.

Toelichting: Voor de interpretatie van de bovenstaande beelden is het behulpzaam om de volgende deelvragen te beantwoorden:

8 Welke cellen produceren immunoglobulinemoleculen?

Immunoglobulinemoleculen bestaan uit zware ketens en lichte ketens. Van de lichte ketens zijn er twee verschillende vormen: kappa en lambda.

9 Wat is de verhouding tussen kappa- en lambda-positieve cellen in normaal beenmerg? Bij de patiënt?

10 Hoe verklaar je het verschil in de kappa - lambda verhouding tussen patiënt- en normaal beenmerg? Bedenk hierbij hoe leukemie - en kanker in het algemeen - ontstaat.

11 Wat is nu je conclusie over de aandoening van deze patiënt?

2.3 Lymfoom

Een 55 jarige man merkt gedurende enkele maanden een langzaam groeiende, pijnloze zwelling in zijn linker oksel en gaat daarmee naar de huisarts. De huisarts voelt een vast-elastische weerstand die los van de huid en onderlaag kan bewegen en denkt aan een vergrote lymfeklier. Hij vindt geen aanwijzingen voor infecties of andere ontsteking. Wel klaagt de patiënt dat hij de laatste tijd last heeft van heel veel zweten tijdens het slapen. Ook is hij de laatste maanden afgevallen, terwijl hij niet op dieet is.

De huisarts denkt aan een maligniteit van de cellen die in de lymfeklier zitten: een maligne lymfoom en stuurt de patiënt door naar de internist. Deze vraagt de chirurg de lymfeklier er uit te laten halen voor weefselonderzoek: van een gedeelte worden coupes gemaakt, een ander gedeelte wordt gebruikt voor flowcytometrisch onderzoek.

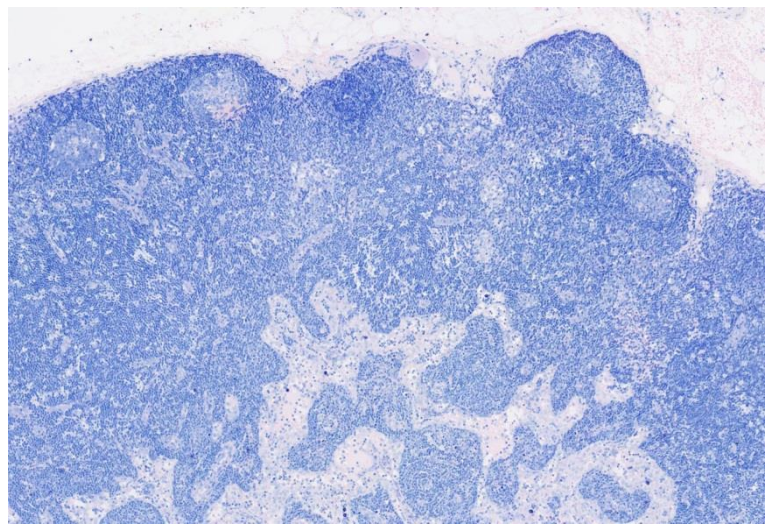
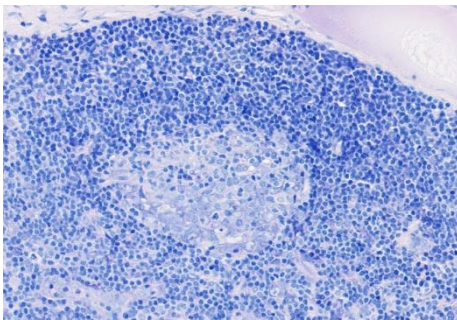
- Bestudeer de coupe van de gebiopteerde lymfeklier.

[preparaat 8: H15-4087 - HE-gekleurde coupe van lymfeklier biopt](#)

- Vergelijk de structuur met die van een normale humane lymfeklier (zie figuur 4). Identificeer hierin: follikels, paracortex en medulla.

12 Wat valt op aan het aantal, regelmatigheid en ligging van de follikels van de tumor ten opzicht van normaal?

Figuur 4. Methyleenblauw-gekleurde coupe van een normale humane lymfeklier.
Vergroting: obj. 7x en 20x.



13 Welke verschillen zie je tussen de follikels in de lymfeklier van de patiënt en die van een normale lymfeklier? (Fig. 4)

Met behulp van immunohistochemie worden coupes aangekleurd om meer informatie te krijgen over de afwijkende cellen in de follikels van de lymfeklier van de patiënt. Hiervoor worden CD20-, CD3-, CD10- en anti-Bcl-2 antistoffen gebruikt (Fig. 5).

14 Welke cellen kleuren aan met resp. CD20 en CD3 antistoffen?

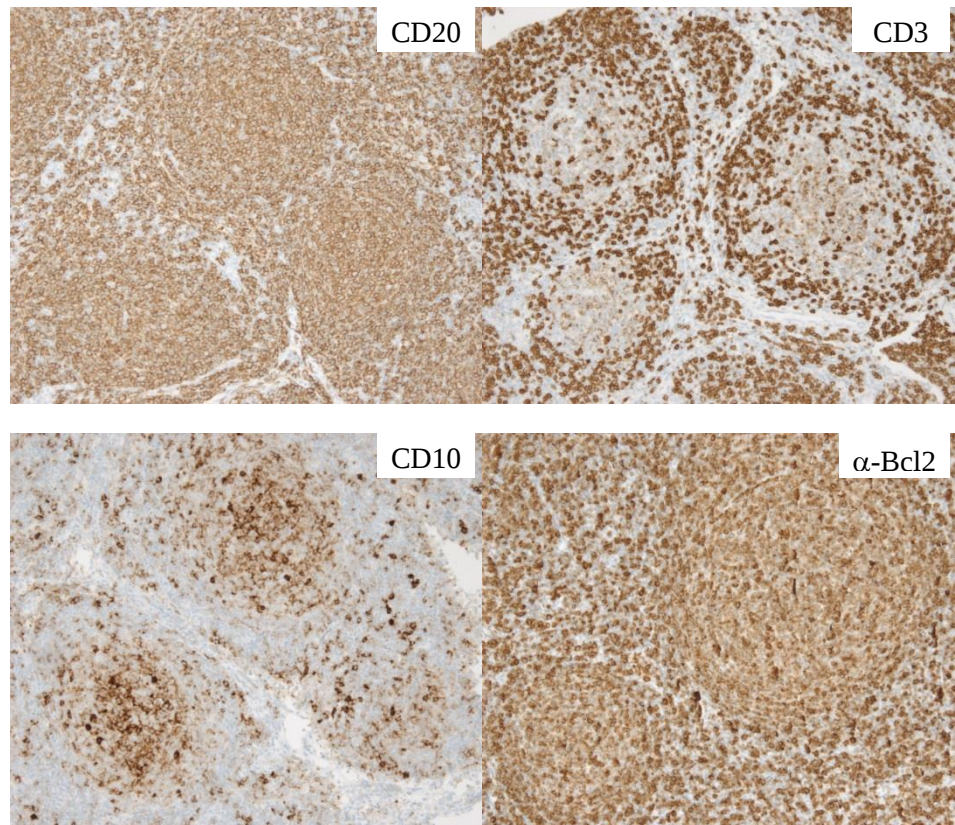
CD10 antistoffen kleuren in lymfeklieren de B-cellen in kiemcentra aan. Deze cellen zijn normaliter negatief voor het anti-apoptose molecuul Bcl2.

15 Wat zijn de overeenkomsten en verschillen in het fenotype van de cellen in de follikels van de patiënt vergeleken met normaal?

Figuur 5.

Immunohistochemische kleuring van een lymfeklier van een patiënt met CD20-, CD3-, CD10- en anti-Bcl2 antistoffen.

Eigendom: afd. Pathologie, Erasmus MC.



16 Welke pathologische diagnose stel je op basis van bovenstaande bevindingen?

Omdat de patiënt klachten heeft van zijn ziekte wordt hij met een relatief milde chemotherapie behandeld. Dit heeft een goed resultaat: de klachten verdwijnen en hij komt weer aan.

Na een jaar valt de patiënt echter weer af en heeft hij weer last van nachtzweeten. Bovendien valt hem een snel groeiende zwelling in zijn rechter oksel op. De internist-hematoloog laat de chirurg deze verwijderen voor pathologisch onderzoek.

- Bestudeer de coupe van de gebiopteerde lymfeklier.

[preparaat 9: H14-25643 - HE-gekleurde coupe van lymfeklier biopt van recidief](#)

- Vergelijk de histologische structuur van dit preparaat met dat van het vorige biopt.

17 Wat is het meest opvallende verschil tussen het eerste biopt en dat van het recidief?

Figuur 6 toont twee foto's van immunohistochemisch gekleurde coupes met Ki-67 antistoffen van het eerste biopt en het recidief.

Ki-67 expressie correleert met de delingsactiviteit en dus de groeisnelheid van de tumorcellen.

18 Welke van de twee tumoren heeft de hoogste groeisnelheid?

19 Wat is de diagnose bij het recidief? Is dit terugkeer van de oorspronkelijke tumor of een nieuwe diagnose?

Figuur 6. Immunohistochemische kleuring van een lymfeklier van een patiënt met anti-Ki-67 antistoffen.

Links: eerste biopt

Rechts: biopt van recidief

Eigendom: afd. Pathologie, Erasmus MC.

