

Histopathologie: beenmerg en leukemie

Docenten Dr. P.J.M. Leenen, prof. dr. I.P. Touw

1 Toelichting

1.1 Achtergrondinformatie

VO Histopathologie: beenmerg en leukemie en ZO Hemopoïese en leukemische ontsporing vormen een vervolg op de patiëntdemonstratie en het college Bloedcelproliferatie, differentiatie en verstoring bij kanker.

Maak ZO Hemopoïese en leukemische ontsporing voorafgaand aan het volgen van VO Histopathologie: beenmerg en leukemie.

In voorafgaand onderwijs (thema Ba1A en de betreffende colleges in de vorige week en de zelfstudieopdracht over *Hemopoïese en leukemische ontsporing*) 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

Dit vaardigheidsonderwijs sluit aan bij de weekleerdoelen.

De leerdoelen van dit vaardigheidsonderwijs sluiten aan bij de leerdoelen van de colleges over beenmerg en leukemie en van de zelfstudieopdracht *Hemopoïese en leukemische ontsporing*.

Meer specifiek kun je na afloop van dit vaardigheidsonderwijs:

- beoordelen en beargumenteren of een beenmerg- of bloeduitstrijk normaal dan wel leukemisch is, en, indien leukemisch, wat de meest waarschijnlijke aangedane differentiatielijn is
- bloed- en beenmerggegevens correleren aan de specifieke klachten van een leukemiepatiënt.
- uitleggen dat leukemische ontsporing van hematopoïetische cellen een klonale aandoening is.

1.3 Literatuur

- Collegeaantekeningen
- Mescher, A.L. (2016). *Junqueira's Basic Histology*. (14th ed.). New York: McGraw-Hill. ▶ 254 - 265, 273 - 276, "Lymphocytes"
- Zelfstudieopdracht *Hemopoïese en leukemische ontsporing* (incl. e-ZO 'Hematopoietic Cells')

1.4 Overige informatie

Studiebelasting

Dit vaardigheidsonderwijs 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 *Hemopoïese en leukemische ontsporing* hebt afgerond;
- de opdrachten van het vaardigheidsonderwijs globaal hebt doorgenomen.

Begrippenlijst

<i>Hemopoïese</i>	<i>Leukemie</i>
Beenmerg	Leukemische blasten
May Grünwald-Giemsa kleuring	Chronische leukemie
Pluripotente stamcel	Acute leukemie
Div. ontwikkelingsstadia van de granulopoïese	Myeloïde leukemie
	Lymfatische leukemie
Neutrofiële, eosinofiele, basofiele granula	
Div. ontwikkelingsstadia van de erytroïese	
Megakaryocyt	
Trombocyt	
Lymfocyt (klein en groot)	
Plasmacel	
Monocyt	

2 Handleiding

Dit vaardigheidsonderwijs 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

[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 monocyten
- 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 donkergekleurde klompjes beenmerg in het midden van de uitstrijk (hier is de verdeling van voorlopercellen het meest representatief). 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 granulocyttaire : erythrocytaire voorlopercellen
- relatieve frequentie van lymfocyttaire en monocyttaire cellen
- voorkomen van megakaryocyten

Identificeer enkele rijpere stadia van de verschillende differentiatielijnen m.b.v. de determinatietabel aan het eind van de beschrijving van dit VO.

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 perifere 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 hemopoietische 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?

De normaalwaarden voor het *perifere bloed* zijn:

Tabel 1

Erytrocyten	♀ 3,7 – 5,0 × 10 ¹² / L; Hb 7,5 - 10 mmol/L ♂ 4,3 – 5,5 × 10 ¹² / L; Hb 8,7 - 11,2 mmol/L
Trombocyten	140 – 360 × 10 ⁹ / L
Leukocyten	5 – 10 × 10 ⁹ / L
Neutrofiële 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-) typering doorlaggend.

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 lichamenlijk 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 perifeer 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 lichamenlijk 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
- leukocyten alkalische fosfatase verlaagd
- 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 lichamenlijk onderzoek valt op dat de patiënt wat bleek is. Er is een duidelijke kloppijn ter plaatse van de lumbale wervelkolom.

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

Figuur 1

Röntgenopname van de schedel van patiënt van casus 3.

Eigendom Erasmus MC, afdeling Hematologie

*Preparaat*

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

N.B. Aan het uitstrijkpreparaat van het perifeer bloed van deze patiënt waren geen bijzonderheden waarneembaar.

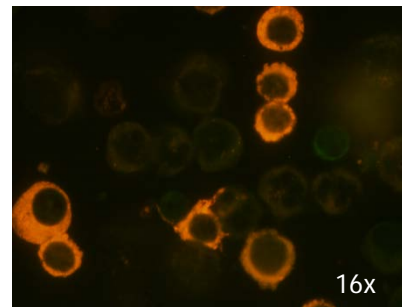
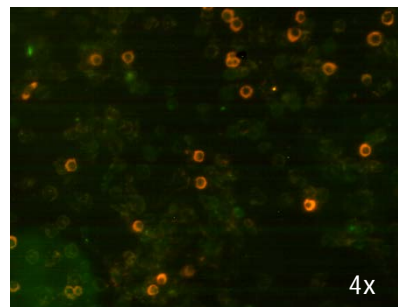
Immunofluorescentie opnamen

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.

Figuur 2

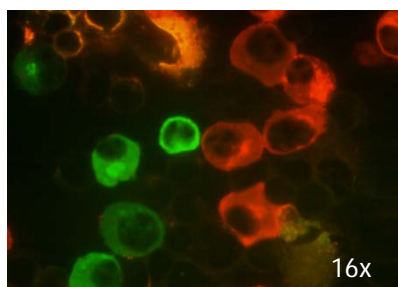
Beenmerguitstrijk van patiënt casus 3 gekleurd m.b.v. immunofluorescentie voor immunoglobuline-kappa (oranje/rood) en -lambda (groen) lichte keten.

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?

2.2.4 Casus 4

Een 64-jarige vrouw consulteert de huisarts met vermoeidheidsklachten die de laatste drie maanden bestaan en opgezette lymfeklieren. Zij heeft afgelopen jaar 2 maal een longontsteking doorgemaakt.

Bij lichamenlijk onderzoek wordt een niet-zieke vrouw gezien. In de hals en lies zijn niet-pijnlijke lymfeklierzwellingen voelbaar. Bij palpatie van de buik wordt een vergrote milt vastgesteld. Er zijn geen blauwe plekken of puntbloedingen zichtbaar.

Laboratoriumbevindingen

- Differentiatie:

Erytrocyten	3,9 x 10E12/L; Hb 7,2 mmol/L
Trombocyten	310 x 10E9/L
Leukocyten	130 x 10E9/L

- Immunglobulinen verlaagd

Preparaten

- [Preparaat 8: uitstrijk perifeer bloed patiënt casus 4](#)
(May-Grünwald Giemsa-kleuring)
- [Preparaat 9: uitstrijk beenmerg patiënt casus 4](#)
(May-Grünwald Giemsa-kleuring)

In de perifere bloeditstrijk zijn roze-gekleurde structuren te zien die niet of nauwelijks gevonden worden in het preparaat van normaal perifere bloed.

12 Zijn dit bloedcellen of is dit een artefact van de kleuring?

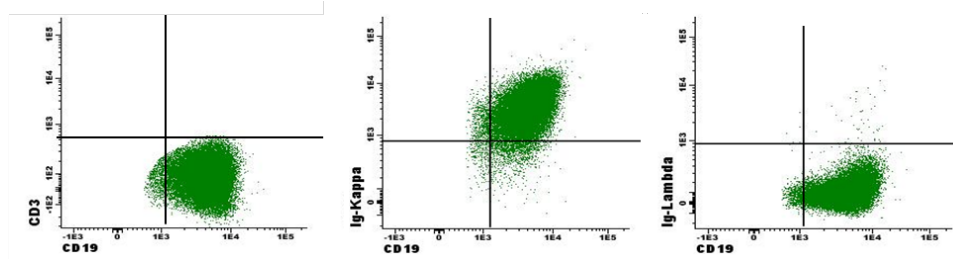
Immuunfenotypering

De identiteit van de leukocyten in het perifere bloed van deze patiënt wordt nader vastgesteld met behulp van monoklonale antistoffen waaraan fluorochromen (fluorescerende kleurstoffen) gekoppeld zijn. Deze antistoffen binden aan celtype-specifieke moleculen (markers) op de membraan van de diverse leukocyten. Het fluorescentieprofiel van de cellen wordt met een flowcytometer aangetoond.

Figuur 4 toont drie dotplots waarin de fluorescentie (als maat voor markerexpressie) van de leukemiecellen is uitgezet. CD3 is specifiek voor T-lymfocyten; CD19 voor B-lymfocyten.

Figuur 4.

Immuunfenotypering van leukemiecellen van patiënt casus 4. Elk puntje representeert één cel. De lijnen geven de grens tussen + (expressie) en – (geen expressie) aan.



Eigendom Erasmus MC,
afdeling Immunologie

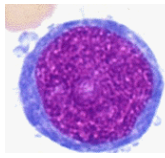
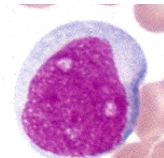

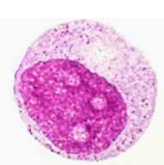
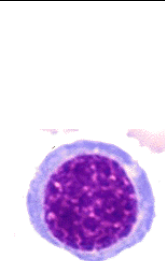
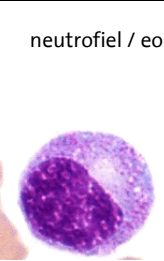
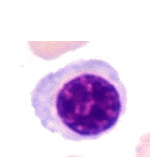
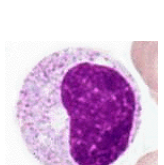
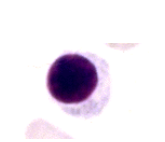


- 13 Wat is het fenotype van de leukemische cellen?
- 14 Wat is nu je conclusie over de aandoening van deze patient?

Determinatieschema voor kernhoudende voorlopers van de granulocytaire en erythrocytaire reeks in beenmerg

onderscheidende kenmerken staan in de grijze kolom of zijn onderstreept

Schema 1

Bron:
Eigendom Erasmus MC,
afdeling Immunologie.

<p>Ø 15-25 µm (2-3x ery) grote <u>ronde</u> kern met nucleoli en dispers chromatine, <u>sterk basofiel</u> cytoplasma</p>		<p>Nucleoli</p> <hr/> <p>Azurofiele granula</p>		<p>Ø 15-22 µm (2-3x ery) grote <u>min of meer</u> <u>ronde</u> kern met nucleoli en dispers chromatine, <u>basofiel</u> cytoplasma</p>	
<p>Ø 20-30 µm (3x ery) min of meer ronde kern, tamelijk basofiel cytoplasma met <u>azurofiele</u> <u>granula</u></p>				<p>Ø 20-30 µm (3x ery) min of meer ronde kern, tamelijk basofiel cytoplasma met <u>azurofiele</u> <u>granula</u></p>	
<p>Ø 1,5-3x ery <u>gekorrelde</u> ronde kern centraal gelegen, kern : cytoplasma >1, basofiel cytoplasma</p>		<p>Cytoplasma basofiel</p> <hr/> <p>Specifieke granula Kern ~ rond</p>		<p>neutrofiel / eosinofiel / basofiel</p> <p>Ø 2-3x ery min of meer ronde kern, licht basofiel cytoplasma met specifieke granula en vaak ook azurofiele granula</p>	
<p>Ø 1,5x ery ronde kern met gecondenseerd chromatine, kern : cytoplasma >1, polychromatofiel cytoplasma</p>			<p>poly- chromato- fiel</p> <p>ingedeukt</p>		<p>Ø 2x ery ingedeukte kern, licht basofiel - neutrofiel cytoplasma + specifieke granula</p>
<p>Ø 1-1,5x ery excentrische ronde kern met sterk gecondenseerd chromatine, kern : cytoplasma ≥1, acidofiel cytoplasma</p>			<p>acidofiel</p> <p>staaf- vormig</p>		<p>Ø 1,5 - 2x ery staafvormige kern met gecondenseerd chromatine, neutrofiel - licht acidofiel cytoplasma + specifieke granula</p>
		<p>geseg- menteerd</p>		<p>Ø 1,5 - 2x ery gesegmenteerde kern met gecondenseerd chromatine neutrofiel - licht acidofiel cytoplasma + specifieke granula</p>	

