

Acute promyelocytenleukemie (APL): een diagnose met verschillende gezichten

Acute promyelocytic leukemia (APL): a diagnosis with different faces

dr. K. Meijer¹, dr. A.M.L. Peek², drs. B. Roerig³, dr. E. van den Berg⁴, dr. E. Ammatuma⁵, dr. G. Huls⁵, dr. A.B. Mulder⁶, dr. E. van Mirre⁷

SAMENVATTING

Acute promyelocytenleukemie is een zeldzame hematologische maligniteit die berucht is vanwege de ernstige coagulopathie, maar heeft bij tijdige behandeling een goede prognose. Daarom is snelle diagnostiek essentieel, met een belangrijke rol voor cytomorfologische beoordeling van de perifere bloeduitstrijk. Aanwezigheid van karakteristieke promyelocyten met takkenbossen maken de diagnose voldoende waarschijnlijk om te starten met ATRA. In dit artikel wordt aan de hand van enkele casus geïllustreerd dat het herkennen van de pathologische promyelocyten niet altijd eenvoudig is.

(NED TIJDSCHR HEMATOL 2019;16:191-6)

SUMMARY

Acute promyelocytic leukemia is a rare hematological malignancy, known for its sudden life-threatening coagulopathy, whereas it has good prognosis with prompt treatment. Rapid diagnosis is paramount and the presence of faggot cells in the peripheral blood smear is sufficiently supporting the diagnosis to start initial treatment. In this article we describe three cases, illustrating that recognizing the pathological promyelocytes is not always that simple.

INLEIDING

Acute promyelocytenleukemie (APL) is een zeldzame vorm van acute myeloïde leukemie (AML) met specifieke moleculaire, morfologische, biologische en klinische kenmerken. Opvallend hierbij is een uitrijpingsstop in het promyelocytenstadium. De klinische presentatie is berucht om coagulopathie die verantwoordelijk is voor 5-10% mortaliteit.¹ Vaak presenteren patiënten zich met pancytopenie met slechts een enkele pathologische promyelocyt, waarin de

kenmerkende takkenbossen - bundels van Auerse staven - worden gevonden; dit is de 'klassieke' hypergranulaire variant van APL. In 30% van de casus is sprake van een variant (v)APL met zeer atypische promyelocyten, die veel lijken op promonocyten. Deze pathologische promyelocyten hebben zeer fijne en daarom slecht zichtbare granulatie en deels opvallende bi-lobaire (vlindervormige) kernen en de takkenbossen zijn minder frequent aanwezig; dit is de microgranulaire variant van APL.² In tegenstelling tot klassieke APL

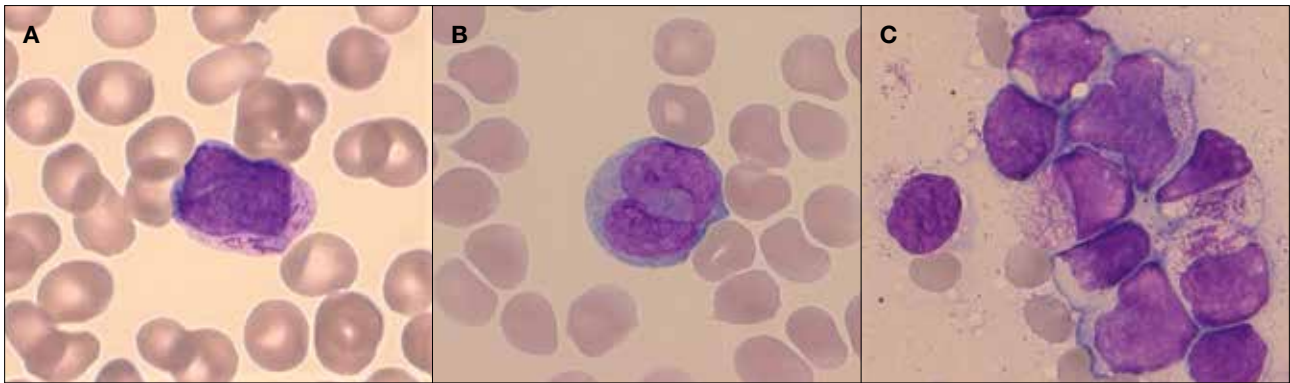
¹klinisch chemicus, afdeling Laboratoriumgeneeskunde, Laboratorium voor Speciële Hematologie, UMCG, ²kinderhemato-oncoloog, afdeling Kindergeneeskunde, UMCG, ³internist-hematoloog, afdeling Interne Geneeskunde, Ommelander Ziekenhuis Groningen, ⁴laboratoriumspecialist klinische genetica, afdeling Genetica, UMCG, ⁵internist-hematoloog, afdeling Hematologie, UMCG, ⁶arts klinische chemie, afdeling Laboratoriumgeneeskunde, Laboratorium voor Speciële Hematologie, UMCG, ⁷klinisch chemicus, afdeling Klinische Chemie, Certe Medische Diagnostiek en Advies, locatie Martini Ziekenhuis.

Correspondentie graag richten aan dhr. dr. K. Meijer, klinisch chemicus, afdeling Laboratoriumgeneeskunde, UMCG, Hanzeplein 1, Postbus 30001, 9700 RB Groningen, tel.: 06 52 72 47 66, e-mailadres: kornelis.meijer@umcg.nl

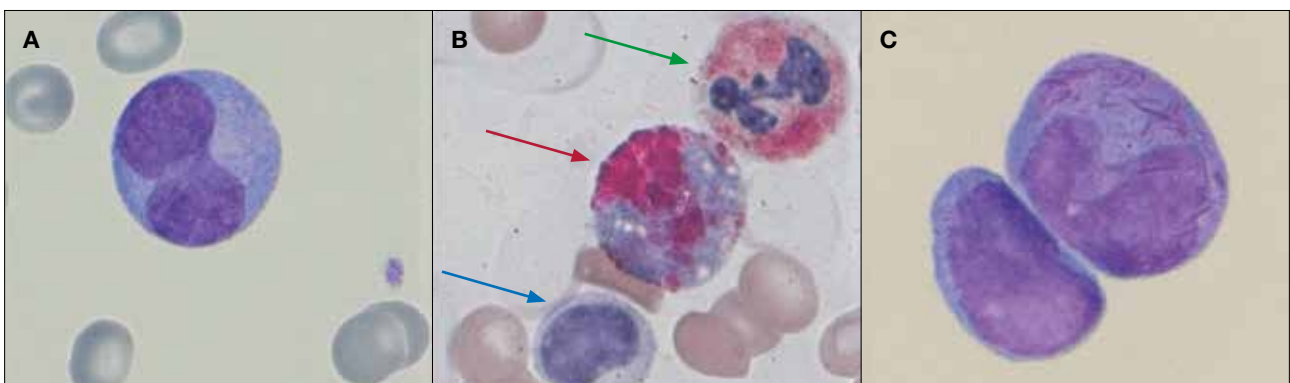
Trefwoorden: acute promyelocytenleukemie, ATRA, t(15;17), takkenbossen

Keywords: acute promyelocytic leukemia, ATRA, faggot cells, t(15;17)

ONTVANGEN 4 SEPTEMBER 2018, GEACCEPTTEERD 19 DECEMBER 2018.



FIGUUR 1. Pathologische promyelocyten in casus 1. **A.** Afwijkende promyelocyt met meerdere Auerse staven. **B.** Microgranulaire bi-lobaire promyelocyt. **C.** In het beenmerg zijn veel promyelocyten met fijne en grove Auerse staven te vinden.



FIGUUR 2. Pathologische promyelocyten in casus 2. **A.** Bi-lobaire microgranulaire promyelocyt in perifeer bloed. **B.** De microgranulaire promyelocyten kleuren duidelijk aan met myeloperoxidasekleuring (rode pijl), normale granulocyten kleuren licht aan (groene pijl) en lymfocyten kleuren niet aan (blauwe pijl). **C.** In het beenmerg zijn duidelijk promyelocyten met takkenbossen zichtbaar.

presenteren deze patiënten zich regelmatig met hyperleukocytose, hetgeen van belang is voor de risicostratificatie. APL wordt gestratificeerd in drie risicocategorieën op basis van het leukocyten- en trombocytenaantal (Sanz-criteria3)*:

Laag risico: leukocyten $<10 \times 10^9/l$ en trombocyten $>40 \times 10^9/l$

Intermediair risico: leukocyten $<10 \times 10^9/l$ en trombocyten $<40 \times 10^9/l$

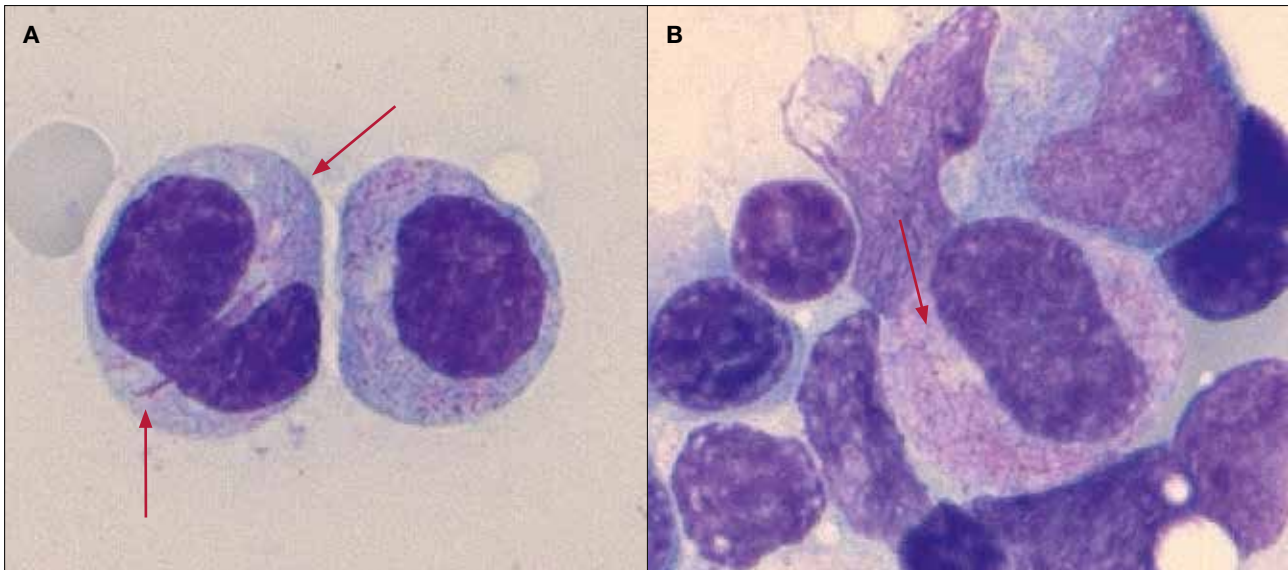
Hoog risico: leukocyten $>10 \times 10^9/l$ ongeacht trombocytenaantal

Zowel de hypergranulaire als de microgranulaire variant worden veroorzaakt door een translocatie van de lange armen van chromosoom 15 en 17 ($t(15;17)(q24.1;q21.2)$); hierbij ontstaat een *PML-RARA*-fusiegen. Het *PML*-gen is een tumor-suppressorgen en het *RARA*-gen codeert voor een kernrecep-

tor voor retinoïnezuur, een metaboliet van vitamine A. In sporadische gevallen fuseert het *RARA*-gen met andere genen, waaronder het *PLFZ*- of *NPM*-gen.

Het *PML-RARA*-fusie-eiwit verstoort de normale uitrijping van promyelocyten. Initiële behandeling met 'All-Trans Retinoic Acid' (ATRA) zorgt voor snelle uitrijping van de pathologische promyelocyten. De verdere behandeling bij laag en intermediair risico APL bestaat uit ATRA gecombineerd met 'arsenic trioxide' (ATO), dat een rol speelt bij de degradatie van het *PML-RARA*-fusie-eiwit en mede daardoor apoptose induceert.⁴ Deze behandeling resulteert in 100% complete remissie (CR) en een 50-maanden gebeurtenisvrije overleving ('event-free survival'; EFS) van 97%.⁵ Voor hoogrisico-APL is de standaardbehandeling ATRA gecombineerd met anthracycline en cytarabine-bevattende intensieve chemotherapie. Recentelijk is het HOVON 138-

*Volgens de WHO 2017-criteria zijn de aanwezigheid van FLT3-ITD, CD56-expressie en hogere leeftijd mogelijk additionele prognostische slechte factoren, maar de aanwezigheid van deze factoren heeft geen invloed op de behandeling.²



FIGUUR 3. Takkenbossen in casus 3. **A.** Beenmerg met een rijpere myeloïde cel met grotere en kleinere Auerse staven. **B.** Een metamyelocyt met veel zeer fijne Auerse staven. De takkenbossen zijn met rode pijlen aangegeven.

onderzoek (de APOLLO trial) gestart, een Europese intergroepstudie, waarbij de combinatie ATRA met ATO en beperkt idarubicine prospectief wordt gerandomiseerd, vergeleken met de standaardbehandeling.

Bij de meeste patiënten wordt coagulopathie gezien, die wordt veroorzaakt door diffuus intravasale stolling (DIS) en hyperfibrinolyse.¹ Hierdoor kunnen patiënten binnen enkele uren tot dagen overlijden; dit maakt APL een hematologische spoedziekte. Tijdige behandeling met ATRA verkleint de kans om te overlijden aan stollingsstoornissen en is essentieel voor de goede prognose van APL. Het is daarom van groot belang om de pathologische promyelocyt zo snel mogelijk te herkennen en de kliniek direct hiervan op de hoogte te stellen, zodat behandeling met ATRA direct kan worden gestart.

Onderstaande drie casus illustreren dat de presentatie van APL heterogeen kan zijn en een snelle herkenning van APL niet altijd eenvoudig is.

CASUS 1

Een vrouw van 65 jaar met een mammacarcinoom in de voorgeschiedenis wordt door de huisarts gezien wegens aanhoudende vermoeidheid en op de ochtend van presentatie tevens buikpijn en dunne ontlasting. In de perifere bloeduitstrijk wordt een leukocytose met veel blasten en slechts een enkele promyelocyt met takkenbossen gezien (zie *Figuur 1A*). Ook worden bi-lobaire microgranulaire promyelocyten aangetroffen (zie *Figuur 1B*). Er wordt contact opgenomen met de huisarts en de patiënte wordt met spoed naar het UMCG doorverwezen. Hier wordt het APL-beeld bevestigd en wordt

prompt gestart met ATRA. Enkele uren later wordt de t(15;17) bevestigd door middel van FISH en RT-PCR. Het beenmerg laat verdringing van de normale hematopoëse zien door pathologische promyelocyten. De immunofenotypische opmaak van de promyelocyten kan passen bij APL: CD117 zwak, deels CD34, HLA-DR⁻, CD13⁺, CD33⁺, CD15⁻, deels CD2, deels CD56. Gezien het aantal leukocyten (20,6 x 10⁹/l) en trombocyten (32 x 10⁹/l) betreft dit een hoogrisico-APL. Passend bij het prognostisch ongunstig hoog aantal leukocyten wordt tevens een *FLT3-ITD*-mutatie aangetoond. Aangezien patiënte al veel anthracyclines heeft gekregen vanwege het mammacarcinoom, werd ze behandeld volgens een hoogrisicoprotocol met ATRA, ATO en idarubicine (conform de binnenkort te starten HOVON 138). De D-dimeren liepen de eerste dagen van behandeling sterk op tot >50.000 µg/ml en de trombocyten daalden tot 4 x 10⁹/l. De stollingstijden liepen echter niet verder op en de patiënt doorstond de eerste dagen van de kuur goed met ondersteunende behandelingen. Na enkele weken herstelde het bloedbeeld.

CASUS 2

Een meisje van 6 jaar presenteert zich bij de huisarts met aanhoudende malaise, nachtzweeten en sinds enkele dagen spontane hematomen, braken en diarree. Bij lichamelijk onderzoek worden geen hepatosplenomegalie of lymfadenopathie, maar wel diffuse hematomen op beide benen en petechiën in het gelaat aangetroffen. Het bloedbeeld laat een pancytopenie zien. In de perifere bloeduitstrijk worden cellen gezien met opvallend gevouwen, vliedervormige kernen,

TABEL 1. Laboratoriumwaarden van de besproken casus.

	Casus 1 (V, 65 jaar)	Casus 2 (V, 6 jaar)	Casus 3 (V, 75 jaar)
Hb (mmol/l)	7,3 (7,5-10)	5,9 (7,2-8,9)	8,3 (7,5-10)
WBC (x 10 ⁹ /l)	20,6 (4-10)	2,4 (4,3-11,4)	1,9 (4-10)
Lymfocyten (%)	6	72	83
Segmenten (%)	4	14	5
Monocyten (%)	0	3	12
Promyelocyten (%)	-	9	0
Blasten (%)	90	2	0
Trombocyten (x 10 ⁹ /l)	32 (150-400)	25 (199-367)	255 (150-400)
PT (sec)	13,7 (9-12)	16 (10-14,6)	11,8 (10,2-13,3)
APTT (sec)	28 (23-33)	30 (27-39)	33 (25-36)
Fibrinogeen (g/l)	1,4 (1,7-4)	3,0 (1,7-5,4)	4,4 (2-3,9)
D-dimeren (µg/l)	8917 (<500)	3397 (<500)	445 (<500)
CRP (mg/l)	72 (<5)	73 (<5)	4,7 (<5)

die worden geduid als blastaire, monocyttaire cellen. Hierop wordt bloed voor nader onderzoek naar het UMCG gestuurd met verdenking op juveniele myelomonocyttaire leukemie (JMML). Ook hier worden enkele pathologische cellen gezien met een bi-lobaire kern en met af en toe een afwijkende korreling. Ook wordt sporadisch een enkele cel met een Auerse staaf en een cel met takkenbossen gevonden. Hierop wordt de sterke verdenking op APL aan de kinderhemato-oncoloog doorgegeven. Er wordt met spoed moleculaire en cytogenetische diagnostiek naar APL ingezet en enkele uren later wordt de verdenking bevestigd. In het beenmerg worden veel promyelocyten met takkenbossen en vlindervormige kernen aangetroffen. Naast de t(15;17) wordt een *FLT3-ITD*-mutatie aangetoond. De promyelocyten passen immuunfenotypisch bij APL: CD117⁺, CD34 zwak, HLA-DR⁻, CD13 zwak, CD33, CD15 zeer zwak. Direct na het ontdekken van de takkenbossen is gestart met ATRA- en ATO-behandeling volgens het SKION-APL-protocol. Tot op heden is de APL in remissie (zowel morfologisch, cytogenetisch als moleculair) en de behandeling (consolidatie door middel van ATO en ATRA) is recentelijk afgerond.

CASUS 3

Bij een vrouw van 75 jaar wordt beenmergdiagnostiek verricht in verband met aanhoudende leukopenie en vermoeidheidsklachten. Cytomorfologische beoordeling toont een celrijk beenmerg, met een sterk dysplastische myelopoëse (rijpingsdissociatie, hypersegmentatie en reusvormen). Opvallend is de aanwezigheid van enkele Auerse staven en takkenbossen in met name de rijpere vormen van de granulopoëse (myelocyten en metamyelocyten). Vanwege het dysplastische beeld staat een MDS-EB2 (MDS met toename aan blasten, type 2) bovenaan in de differentiaaldiagnose, maar gezien de aanwezigheid van takkenbossen wordt APL overwogen en wordt direct gestart met ATRA, in afwachting van diagnostiek naar t(15;17). Door middel van cytogenetica wordt geen fusie gezien van RARA met PML of andere fusiepartners, waarop de ATRA-behandeling wordt gestaakt. Nadere flowcytometrische analyse laat geen afwijkingen zien die passen bij APL; de blasten en promyelocyten hebben geen evident verlies van markers of expressie van aberrante markers. Uiteindelijk wordt de diagnose MDS-EB2 gesteld en wordt de patiënt behandeld volgens het HOVON 135-protocol.

AANWIJZINGEN VOOR DE PRAKTIJK

- 1** Het kenmerkende fenotype voor acute promyelocytenleukemie (APL) betreft takkenbossen in promyelocyten of een bi-lobulaire 'vlindervormige' kern bij variant-APL. Deze pathologische promyelocyten komen doorgaans in lage aantallen voor, waardoor het van belang is het gehele preparaat goed door te kijken.
- 2** Korte lijnen met de derde lijn zijn essentieel voor snelle bevestiging en behandeling van APL-verdachte casus.
- 3** Takkenbossen zijn niet pathognomonisch voor APL en kunnen in uitzonderlijke gevallen ook bij MDS worden gezien.
- 4** Bij vAPL kunnen takkenbossen ontbreken en is slechts zeer fijne korreling waar te nemen en zijn de kernen bi-lobair, waardoor ze voor promonocyten kunnen worden aangezien.
- 5** Bij gereede verdenking op APL (op basis van morfologie, immuunfenotypering of coagulopathie) moet direct worden gestart met ATRA, in afwachting van bevestiging door middel van 'immunostaining' met PML-antilichamen, Fast-FISH of PCR voor het *PML-RARA*-fusiegen.

BESCHOUWING

Deze drie casus laten zien dat APL een heterogene presentatie kent. Als takkenbossen op het eerste oog niet aanwezig zijn, is APL niet uitgesloten. Casus 1 laat zien dat gevouwen bi-lobulaire kernen de beoordelaar alert moeten maken op de mogelijke aanwezigheid van een microgranulaire APL-variant. Een cytologische kleuring, zoals een MPO-kleuring of een Sudan-Black-kleuring, kan helpen onderscheid te maken met promonocyten en maakt het ook eenvoudiger om takkenbossen aan te tonen. Casus 2 laat zien dat APL een ziekte is die op alle leeftijden kan voorkomen. Presentatie van AML op de kinderleeftijd is echter zeldzaam en APL maakt slechts 5-8% hiervan uit.⁶ Casus 3 laat zien dat, in tegenstelling tot translocatie t(15;17) en varianten, takkenbossen niet pathognomonisch voor APL zijn. Ook bij myelodysplastische syndromen kan het voorkomen. Opvallend was de bijkomende dysplasie, de uitrijping van de granulocyttaire reeks en dat de takkenbossen en Auerse staven beperkt waren tot de rijpere stadia.

Klassiek presenteert APL zich met pancytopenie, waarbij het zoeken is naar leukocyten in het bloedbeeld. Vaak is er slechts een enkele pathologische promyelocyt in een heel preparaat aantoonbaar. Het is dus van belang om bij verdenking op APL voldoende cellen te beoordelen. Volgens de richtlijn van de Vereniging Hematologische Laboratoriumdiagnostiek (VHL) voor de beoordeling van de microscopische differentiatie moeten bij verdenking op een maligniteit minstens 200 cellen worden beoordeeld.⁷ Dit betekent dat bij presentatie van leukopenie meerdere preparaten moeten

worden beoordeeld. De digitale microscoop is in opkomst in veel ziekenhuislaboratoria. Deze microscoop maakt zelf foto's van leukocyten en classificeert deze. Het herkenning algoritme is nog niet optimaal, maar omdat binnen een beoordelingsgebied alle leukocyten worden gefotografeerd en op een rij gezet, wordt het zoeken voor de analist een stuk eenvoudiger en kan sneller een groot aantal cellen worden beoordeeld. Voor het nauwkeurig beoordelen van pathologische promyelocyten en blasten met Auerse staven blijft manuele differentiatie echter essentieel.

Naast de initiële morfologische screening op APL, kan met flowcytometrie worden gescreend, aangezien de pathologische promyelocyten een afwijkend immuunfenotype hebben en flowcytometrie een grotere gevoeligheid kent dan cytologie.⁸ Flowcytometrie is echter niet bewijzend en relatief tijdrovend. Daarom is ons inziens een grotere rol weggelegd voor de cytogenetische sneltest naar t(15;17) (Fast-FISH) en de PCR naar de aanwezigheid van het *PML-RARA*-fusiegen, waarbij binnen enkele uren APL met grote zekerheid kan worden aangetoond. Als alternatief kan een kleuring met monoklonale anti-PML-antilichamen worden ingezet, waarmee door middel van immunofluorescentie snel en specifiek de aanwezigheid van APL kan worden bevestigd, ook in aanwezigheid van alternatieve fusie-eiwitten.⁹

APL kan gepaard gaan met acute verbruikcoagulopathie, dat door zowel DIS als hyperfibrinolyse kan worden veroorzaakt. Daarom is de tijdige herkenning van pathologische promyelocyten essentieel. Bij gereede verdenking op APL (vanuit morfologie, immuunfenotype of op basis van coagu-

lopathie) dient direct te worden gestart met ATRA tot het tegendeel is bewezen. ATRA is een vitamine-A-analoog en kent nauwelijks bijwerkingen (zeldzaam een allergische reactie) en kan daarom veilig worden gegeven, ook als de diagnose nog niet zeker is. Er dient wel rekening te worden gehouden met het zogenoemde APL-differentiatiesyndroom, maar het valt buiten de scope van dit artikel om hier verder op in te gaan.¹⁰ Bij uitrijping van de promyelocyten tijdens ATRA-behandeling kan het voorkomen dat takkenbossen worden gezien in de uitrijpende myelopoëse.

CONCLUSIE

APL is bij uitstek een ziekte waarbij, door een nauwe regionale samenwerking en snelle, interdisciplinaire aanpak van eerste tot derde lijn, de ziekte snel kan worden herkend en bevestigd, zodat tijdig levensreddende therapie kan worden gestart en optimale patiëntenzorg kan worden geboden. Hierbij dient bij gerede verdenking op APL direct met ATRA te worden gestart, ook als de uitslag van het genetisch onderzoek nog niet bekend is.

REFERENTIES

1. Mantha S. What's new in the pathogenesis of the coagulopathy in acute promyelocytic leukemia? *Curr Opin Hematol* 2016;23:121-6.
2. Swerdlow SH, et al. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues, revised 4th edition, volume 2. WHO, 2017.
3. Sanz MA. Definition of relapse risk and role of nonanthracycline drugs for consolidation in patients with acute promyelocytic leukemia: a joint study of the PETHEMA and GIMEMA cooperative groups. *Blood* 2000;96:1247-53.
4. Davidson K, et al. Arsenic trioxide: mechanisms of action. *Semin Hematol* 2002;39(Suppl 1):3-7.
5. Platzbecker U, et al. Improved outcomes with retinoic acid and arsenic trioxide compared with retinoic acid and chemotherapy in non-high-risk acute promyelocytic leukemia: final results of the randomized Italian-German APL0406 trial. *J Clin Oncol* 2017;45:605-12.
6. Testi AM. Acute promyelocytic leukemia (APL): comparison between children and adults. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2014;6(1).
7. Vereniging Hematologische Laboratoriumdiagnostiek - werkgroep Hematormorfologie. Aanbevolen werkwijze en terminologie bij de microscopische beoordeling van het bloedbeeld. 2013.
8. Dong HY, et al. Flow cytometry rapidly identifies all acute promyelocytic leukemias with high specificity independent of underlying cytogenetic abnormalities. *Am J Clin Pathol* 2011;135:76-84.
9. Sanz MA, et al. Management of acute promyelocytic leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* 2009;113:1875-91.
10. Patatanian E, et al. Retinoic acid syndrome: a review. *J Clin Pharm Ther* 2008;33:331.