
Diagnosefindung der Chronischen Myelomonozytären Leukämie über CD56 Expression auf Monozyten

Michaela Zahradnik MSc^a, Dr. Karl Schrattbauer^b,
Andrea Hauser MSc^b

^a FH Campus Wien, AUSTRIA

^b Donauespital SMZ-Ost Institut für Labormedizin, AUSTRIA

KURZFASSUNG:

Die Chronische Myelomonozytäre Leukämie (CMML) ist eine hämatologische Neoplasie, die aufgrund einer klonalen Entartung der hämatopoetischen Stammzelle entsteht. Als Erstmanifestation der Erkrankung zeigt sich eine Erhöhung der Monozytenzahl im peripheren Blut. Die Diagnostik der CMML ist wegen der Heterogenität des klinischen, hämatologischen und morphologischen Erscheinungsbildes und der fehlenden spezifischen zytogenetischen Veränderungen schwierig. Neben der Abgrenzung zu anderen hämatologischen Neoplasien müssen reaktive Monozytosen vor der Diagnosestellung ausgeschlossen werden. In der vorliegenden Forschungsarbeit wurde untersucht, ob die routinemäßige durchflusszytometrische Analyse der CD56 Expression auf Monozyten beim Bestehen einer absoluten Monozytose (Monozyten > 1 G/l) im peripheren Blut geeignet ist, um die reaktive Zellvermehrung von klonalen Prozessen abzugrenzen. Ziel der Studie war die Definition und Etablierung eines Algorithmus für eine erweiterte durchflusszytometrische Analyse bei PatientInnen mit absoluter Monozytose zur ehestmöglichen Erkennung und Diagnostizierung der CMML.

1 EINLEITUNG

1.1 Die Chronische Myelomonozytäre Leukämie (CMML)

Die CMML ist eine maligne hämatologische Neoplasie mit einem medianen Erkrankungsalter zwischen 65 und 75 Jahren. Sie entsteht durch eine klonale Entartung der hämatopoetischen Stammzelle und ist gekennzeichnet durch eine absolute Vermehrung der Monozyten in Blut und Knochenmark. Gleichzeitig kann ein Anstieg von myeloischen Blasten und Dysplasie unterschiedlicher Stärke in einer oder mehreren myeloischen Zelllinien vorliegen. Aufgrund des morphologischen Erscheinungsbildes in Blut und Knochenmark wurde die CMML ursprünglich den Myelodysplastischen Syndromen zugeordnet. Verläufe mit hohen Leukozytenzahlen und ausgeprägter Splenomegalie haben die WHO 2001 dazu veranlasst, für die CMML in der Klassifikation der myeloischen Erkrankungen eine eigene Gruppe, die Myelodysplastischen/Myeloproliferativen Neoplasien zu schaffen.¹ Die Inzidenz der CMML wird derzeit mit 3 Neuerkrankungen auf 100.000 Personen jährlich beziffert. Sowohl bei der dysplastischen als auch bei der proliferativen Variante der CMML ist ein Übergang in die Akute Leukämie möglich. Das mediane Überleben der PatientInnen wird in den meisten Publikationen mit 12-35 Monaten angegeben. Die Diagnostik der CMML ist wegen der Heterogenität und der fehlenden spezifischen zytogenetischen Veränderungen schwierig. Ebenso gibt es Erscheinungsformen ohne dysplastische Veränderungen. Bei 40% der Erkrankten wurden Punktmutationen im RAS Gen nachgewiesen. In etwa 5% der Fälle findet man Mutationen im JAK2-Gen (V617F)¹, Aberrationen im TET2-Gen liegen bei bis zu 50% der PatientInnen mit CMML vor. Verschiedene Studien berichten über Mutationen in den Genen ASXL1, CBL, RUNX1 und EZH2.^{2,3,4,5} Es wird allerdings vermutet, dass keine dieser Veränderungen krankheitsauslösend ist, sondern als sogenanntes sekundäres Ereignis gesehen werden kann. Jedoch scheinen TET2- und CBL-Mutationen frühe pathogenetische Modifikationen zu sein.² Ein hohes Risiko für den Übergang der CMML in die Akute Leukämie besteht bei Vorliegen einer Trisomie 8. Die derzeit einzige Therapiemaßnahme, die die Chance auf eine Heilung der CMML bietet, ist die allogene

Stammzelltransplantation. Vorbereitende dosisreduzierte Konditionierung ermöglicht die Transplantation auch für ältere PatientInnen. Eine Risikoeinschätzung wird im Einzelnen individuell vorgenommen, um eine optimale Therapieentscheidung zu treffen.⁶ Speziell zu Beginn der Erkrankung ist, insbesondere bei fehlender Dysplasie, die rasche Abgrenzung gegenüber reaktiven Monozytosen notwendig, um die Diagnosefindung zu beschleunigen. Ebenso ist die Abgrenzung zu verwandten hämatologischen Neoplasien in Bezug auf Therapieentscheidung und Prognoseabschätzung bedeutsam. Im hämatologischen Labor des Sozialmedizinischen Zentrums Ost wird daher eine erweiterte durchflusszytometrische Untersuchung bei Patienten mit absoluter Monozytose (Monozyten im peripheren Blut > 1 G/l) angestrebt. Zugrundeliegend sind mehrere publizierte Studien über aberrante Expression von CD56 auf Monozyten bei diagnostizierter CMML.^{7,8,9} Gleichzeitig wird über erhöhte CD56 Expression bei reaktiven Prozessen berichtet. Für die Diagnosestellung der CMML werden laut WHO (2008) derzeit folgende Kriterien gefordert:

- Monozytose > 1G/l – andere Ursache ausgeschlossen
- BCR/ABL Philadelphia-Chromosom negativ
- Blasten < 20% im Blut und/oder KM
- Dysplasie in mindestens einer Zellreihe
- Chromosomenaberrationen (falls keine Dysplasiezeichen)

Neben diesen aufgelisteten Diagnosekriterien existieren keine diagnostischen Tests, die das Vorliegen einer CMML beweisen. Die definitive Diagnose kann erst gestellt werden, wenn die Monozytose wiederholt über Wochen beziehungsweise Monate vorliegt und mittels Knochenmarkspunktion eine Blastenvermehrung und/oder Dysplasie der myeloischen Zelllinien nachgewiesen wird.

1.2 Expression von CD56

Das CD56 Molekül ist ein 140 kD Glykoprotein der Zelloberfläche, eine Isoform des Nervenzellen-Adhäsionsmoleküls (NCAM). CD56 wird auf Gehirnzellen und an den motorischen Endplatten exprimiert, wo es im Zusammenhang mit Zell-Zell-Adhäsionen eine wichtige Rolle spielt. Linienspezifisch wird CD56 im peripheren Blut von NK-Zellen exprimiert, daneben finden sich kleine CD56 positive Populationen von normalen CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten sowie Granulozyten. Die Funktion des CD56 Moleküls auf der Oberfläche von NK-Zellen scheint bei Adhäsionsvorgängen während ihrer zytotoxischen Aktivität bedeutsam zu sein. Im peripheren Blut gesunder Personen zirkuliert ein geringer Prozentsatz von Monozyten mit schwacher Expression von CD56 (< 10%) der mit dem Alter ansteigt.¹⁰ Phänotypische, morphologische und funktionelle Analysen können die Population eindeutig reifen Monozyten zuordnen. Die Funktion dieses kleinen Subsets ist derzeit noch nicht genau bekannt.¹¹ Es wird ein regulatorischer Einfluss auf Entzündungszellen über Kooperation mit Integrinen (LFA-1, LFA-2) und Interaktion mit NK-Zellen zur Erhöhung der Toxizität vermutet.¹² Ein Anstieg CD56 exprimierender Monozyten im peripheren Blut konnte bei reaktiven Prozessen beobachtet werden. Bei PatientInnen mit Morbus Crohn in der aktiven Phase war beispielsweise eine 2.7 fache Erhöhung reifer Monozyten mit CD56 Expression im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe durchflusszytometrisch nachzuweisen. (6.2, 3.7% - 13.4%, versus 2.3, 1.1% - 3.8%)

Die Beteiligung dieser Zellen als Mediator bei der dysregulierten T-Zellantwort wird vermutet.¹²

Über Bestimmung des Immunphänotyps der Monozyten im Knochenmark bei CMML wurde von mehreren Studiengruppen eine verstärkte Expression von CD56 festgestellt und als möglicher Wegweiser zur Diagnosefindung erkannt und empfohlen.^{13,14} 2005 belegte eine Studie mit 20 an CMML erkrankten PatientInnen in 16 Fällen eine aberrante CD56 Expression auf Monozyten im KM.⁸ Eine weitere Studie zeigte 2007, dass bei PatientInnen mit CMML die verstärkte CD56 Expression nicht nur auf Zellen des Knochenmarks, sondern, wenngleich etwas schwächer, auch auf Monozyten des peripheren Blutes nachzuweisen war.⁷ Die Ergebnisse

sind die Grundlage dieser Forschungsarbeit. Nach unserem Wissensstand wurde bisher noch keine Studie durchgeführt, in der in Form eines Screenings die CD56 Expression auf Monozyten bei Monozytosen > 1 G/l im peripheren Blut analysiert wurde.

Ziel der Studie ist die Definition und Etablierung eines Algorithmus für eine erweiterte durchflusszytometrische Analyse bei PatientInnen mit absoluter Monozytose zur ehestmöglichen Erkennung und Diagnostizierung der CMML.

2 MATERIAL UND METHODEN

Das Studienkollektiv umfasste 105 PatientInnen, davon 68 männliche und 37 weibliche Personen. Eingeschlossen wurden PatientInnen, deren peripheres Blut für eine hämatologische Routineuntersuchung in das Institut für Labormedizin eingeschendet worden war und eine absolute Monozytose (Monozyten > 1 G/l) aufwies. Es wurde keinerlei Auswahl hinsichtlich zuweisender Station oder diagnostischer Fragestellung getroffen. Als Kontrollgruppe wurden an unterschiedlichen Tagen insgesamt 30 Blutproben von PatientInnen mit einem physiologischen Leukozyten- und CRP-Wert und einem Monozytenwert < 0.8 G/l gewählt.

Insgesamt wurden 147 Analysen der CD56 Expression auf Monozyten am Durchflusszytometer durchgeführt, davon waren 12 Proben als Kontrollmessungen erfasst. Für die Identifizierung der Monozytenpopulation wurden mehrere monoklonale Antikörper verwendet. (Anti-CD4, Anti-CD11c, Anti-CD14, Anti-CD33, Anti-CD64). Pro Patient wurden drei Röhrchen mit je fünf Fluoreszenzfarbstoffen angesetzt. Die Auswertung erfolgte mittels Multi-File-Analyse. Parallel wurde über mikroskopische Diagnostik eine Beurteilung der Monozyten hinsichtlich Unreifezeichen beziehungsweise Dysplasiezeichen in einer oder mehreren Zelllinien durchgeführt. Die Zuordnung der Ergebnisse einschließlich der Beurteilung der Zellmorphologie erfolgte nach einem Schema in vier Kategorien. Als weiteres Auswertekriterium wurde die persistierende Monotzyose im Verlauf von drei Monaten kontrolliert.

3 ERGEBNISSE

3.1 Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse

Die durchflusszytometrische Analyse der CD56 Expression auf Monozyten in der Kontrollgruppe ergab Werte zwischen 0.1% und 9.5%. In der Studiengruppe lagen die Messergebnisse bei 98 PatientInnen unter 20%. Sie sind mit einem grünen Pfeil gekennzeichnet und gelten als „negativ“. Bei zwei Proben lag der Wert bei 30% und 40%, der blaue Pfeil kennzeichnet diese Ergebnisse als „reaktiv“. Fünf PatientInnen wiesen eine CD56 Expression auf mehr als 41% der Monozyten auf (69%, 71%, 82%, 87%, 90%). Sie sind mit einem roten Pfeil markiert und werden als „positiv“ bezeichnet.

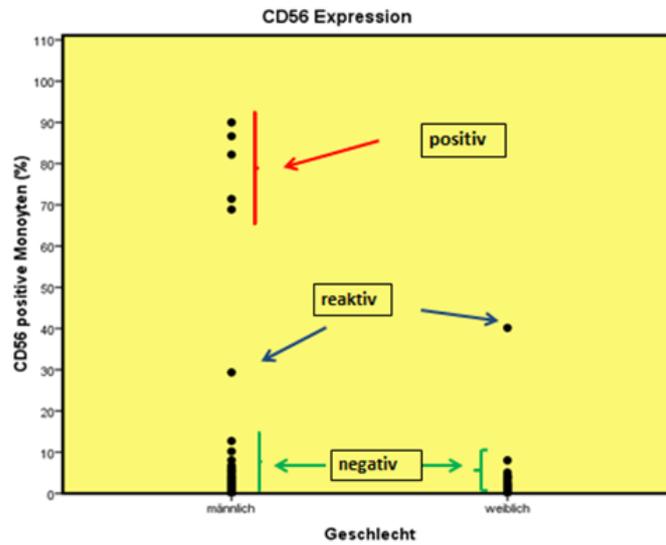
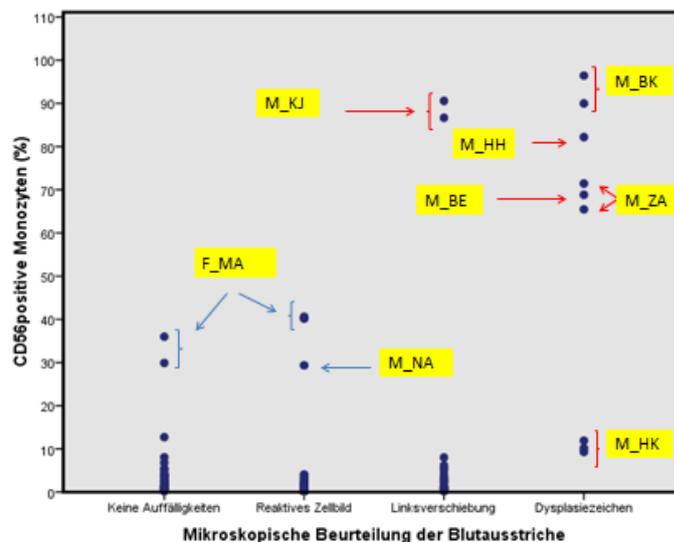


Abb. 1. Ergebnis der durchflusszytometrischen Analyse der CD56 Expression

3.2 Ergebnisse der Mikroskopischen Diagnostik

Die mikroskopische Auswertung der Blutaussstriche umfasste die Erstellung eines Differenzialblutbildes von allen anonymisierten Blutproben des Studienkollektivs inklusive der Mehrfachmessungen. Insgesamt wurden 117 Zählungen durchgeführt.

In 67 Ausstrichen konnten keine Auffälligkeiten hinsichtlich Dysplasie und Unreife der Zellen erfasst werden. 20 Präparate wiesen Zeichen eines reaktiven Zellbildes auf. In diesem war, infolge der in dieser Arbeit festgelegten Kategorisierung, auch das vermehrte Auftreten von eosinophilen Granulozyten enthalten. In 21 Ausstrichen wurde eine deutliche Linksverschiebung festgestellt und 9 Präparate wiesen Dysplasiezeichen auf. Die Pfeile in der Grafik kennzeichnen die jeweiligen Doppelbestimmungen. Die zugeordneten Bezeichnungen entsprechen der anonymisierten Patientenidentifikation. (F-weiblich, M-männlich)



3.3 Verlaufskontrolle hinsichtlich persistierender Monozytose

Bis zum Abschluss der Studie konnte bei 96 von 105 PatientInnen ein Verlauf der Monozytose kontrolliert werden. Bei 8 PatientInnen wurde eine persistierende Monozytose festgestellt.

4 DISKUSSION

Die durchflusszytometrische Analyse der CD56 Expression auf Monozyten ergab in der Kontrollgruppe Werte < 20%. Bei 97 PatientInnen der Studiengruppe, deren Beurteilung des Blutausstriches und der Verlaufskontrolle der Monozytose das derzeitige Vorliegen einer CMML ausschloss wurden ebenfalls Werte < 20% ermittelt. Zwei PatientInnen wiesen Werte zwischen 20% und 41% CD56 positiver Monozyten auf, sie zeigten im Ausstrich ein reaktives Zellbild. Bei fünf Patienten (alle männlich) waren Werte > 65% CD56 exprimierender Monozyten messbar. In drei Fällen wurde eine vorliegende CMML mittels Knochenmarksbefund bestätigt, ein Patient verstarb vor der Diagnosestellung und bei einem Patienten lag eine Essentielle Thrombozythämie (ET) vor. In Abb. 3 sind die Ergebnisse dargestellt. Die Grafik enthält auch die Resultate der jeweilig durchgeführten Mehrfachmessungen.

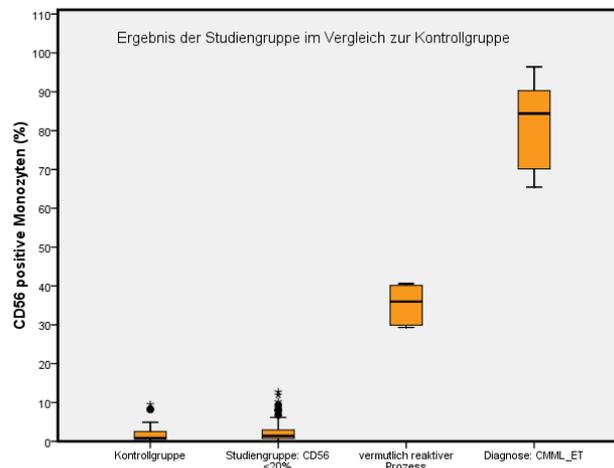


Abb. 3. CD56 Expression (%) in Kontrollgruppe und Studiengruppe

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die CD56 Expression auf Monozyten sowohl im Kontrollkollektiv als auch bei 93% der PatientInnen im Studienkollektiv (98 von 105) unter einem Wert von 20% lag. Wie die Ergebnisse der retrospektiven Datenanalyse zeigten, liegt in seltenen Fällen eine CMML ohne nachweisbarer aberranter CD56 Expression auf Monozyten vor. Eine Erhöhung der CD56 Expression kann hingegen einen raschen Hinweis auf ein eventuell vorliegendes klonales Geschehen geben. Durch spezifische Nutzung des labor-eigenen EDV-Systems wäre es möglich, Blutproben von PatientInnen > 40a mit einer über einen Zeitraum von sechs Wochen durchgängig bestehenden Monozytose gezielt einer erweiterten Analyse der CD56 Expression auf Monozyten zuzuführen. Damit könnten reaktive Prozesse abgegrenzt und die Diagnosefindung der CMML beschleunigt werden.

Ein ehestmöglichster Therapiebeginn beziehungsweise die Einleitung der Stammzellspendersuche sind aufgrund der raschen Progredienz der Erkrankung dringend zu empfehlen. Für die Diagnostik der MDS beziehungsweise der CMML wird die durchflusszytometrische Untersuchung noch nicht routinemäßig eingesetzt. Mehrere Studiengruppen befürworten die Erarbeitung eines standardisierten Protokolls. Im Jahr 2008 wurde eine Arbeitsgruppe aus Mitgliedern 23 europäischer Länder gegründet, die das Ziel verfolgt, eine kategorisierte Diagnostik und ein einheitliches prognostisches Scoringssystem für diese Erkrankungen zum Einsatz zu bringen.

5 CONCLUSIO

Die Vermehrung von Monozyten im peripheren Blut ist ein diagnostisches Kriterium der CMML, tritt aber auch bei unterschiedlichen reaktiven Prozessen auf. Die durchflusszytometrisch ermittelte CD56 Expression auf mehr als 50% der Monozyten bei bestehender Monozytose kann ein Hinweis auf ein vorliegendes klonales Geschehen mit Verdacht auf CMML sein. Die Bestimmung dieses Parameters in einem frühen Stadium kann die Diagnosestellung beschleunigen.

LITERATURVERWEISE

- [1] Orazi, A. & Germing, U. The myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms: myeloproliferative diseases with dysplastic features, *Leukemia* 22, 1308–1319 (2008).
- [2] Zentrum für Humangenetik, Dr. Klein, Dr. Rost, 2014. Chronische myelomonozytäre Leukämie.
- [3] Bou Samra, E. et al. New prognostic markers, determined using gene expression analyses, reveal two distinct subtypes of chronic myelomonocytic leukaemia patients, *Br J Haematol* 157, 347–356 (2012).
- [4] Bacher, U., Haferlach, T., Schnittger, S., Kreipe, H. & Kröger, N. Recent advances in diagnosis, molecular pathology and therapy of chronic myelomonocytic leukaemia, *Br. J. Haematol.* 153, 149–167 (2011).
- [5] Padron, E. & Abdel-Wahab, O. Importance of genetics in the clinical management of chronic myelomonocytic leukemia, *J. Clin. Oncol.* 31, 2374–2376 (2013).
- [6] Germing, U., Kündgen, A. & Gattermann, N. Risk assessment in chronic myelomonocytic leukemia (CMML), *Leuk. Lymphoma* 45, 1311–1318 (2004).
- [7] Lacronique-Gazaille, C. et al. A simple method for detection of major phenotypic abnormalities in myelodysplastic syndromes: expression of CD56 in CMML, *Haematologica* 92, 859–860 (2007).
- [8] Xu, Y., McKenna, R.W., Karandikar, N.J., Pildain, A.J. & Kroft, S.H. Flow Cytometric Analysis of Monocytes as a Tool for Distinguishing Chronic Myelomonocytic Leukemia From Reactive Monocytosis, *American Journal of Clinical Pathology* 124, 799–806, <http://ajcp.ascpjournals.org/content/124/5/799.full.pdf> (2005).
- [9] Subirá, D. et al. Immunophenotype in chronic myelomonocytic leukemia: is it closer to myelodysplastic syndromes or to myeloproliferative disorders?, *Translational Research* 151, 240–245 (2008).
- [10] Krasselt, M., Baerwald, C., Wagner, U. & Rossol, M. CD56+ monocytes have a dysregulated cytokine response to lipopolysaccharide and accumulate in rheumatoid arthritis *Arthritis Res. Ther.* 15, R139 (2013).
- [11] Sconocchia, G. et al. Phenotype and function of a CD56+ peripheral blood monocyte, *Leukemia* 19, 69–76 (2005).
- [12] Grip O1, Bredberg A, Lindgren S, Henriksson G. Increased subpopulations of CD16(+) and CD... [Inflamm Bowel Dis. 2007] - PubMed - NCBI. Available
- [13] Kern, W., Bacher, U., Haferlach, C., Schnittger, S. & Haferlach, T. Acute monoblastic/monocytic leukemia and chronic myelomonocytic leukemia share common immunophenotypic features, *Leuk. Lymphoma* 52, 92–100 (2011).
- [14] Wang, Y.-X. et al. [Significance and application value of multiparameter flow cytometry for differentiation of immunophenotype in chronic myelomonocytic leukemia, myelodysplastic syndrome and acute monocytic leukemia], *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 20, 857–862 (2012).