

## DIFÚZNÍ B-VELKOBUNĚČNÝ LYMFOM PROJEVUJÍCÍ SE JAKO AUTOIMUNNÍ HEMOLYTICKÁ ANEMIE. DIAGNOSTICKÁ ÚSKALÍ

### DIFFUSE LARGE B-CELL LYMPHOMA MANIFESTING AS AUTOIMMUNE HEMOLYTIC ANEMIA. DIAGNOSTIC PITFALLS

SOUKUP P.<sup>1</sup>, MAALOUF J.<sup>1</sup>, KOUBA M.<sup>1</sup>, PÍSAČKA M.<sup>1</sup>, KAČÍRKOVÁ P.<sup>1</sup>, ČERMÁK J.<sup>1</sup>, POHLREICH D.<sup>1</sup>, PYTLÍK R.<sup>2</sup>, CETKOVSKÝ P.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ÚSTAV HEMATOLOGIE A KREVŇÍ TRANSFÚZE, PRAHA

<sup>2</sup> I. INTERNÍ KLINIKA VŠEOBECNÁ FAKULTNÍ NEMOCNICE, PRAHA

**Souhrn:** Autoimunní hemolytická anémie (AIHA) s tepelnými i chladovými protilátkami je relativně vzácné onemocnění, které bývá často sdružené s jinými nemocmi, například s maligními lymfoproliferacemi. Zde uvádíme případ pacientky s difúzním velkobuněčným B-lymfomem s postižením kostní dřeně, který se manifestoval jako těžká AIHA s tepelnými i chladovými protilátkami a byl jako AIHA léčen. Až časný relaps AIHA vedl k odhalení základní diagnózy. Pacientka byla dále léčena kombinovanou chemoterapií s Rituximabem, která vedla k rychlému vymizení titrů jak tepelných tak chladových protilátek. Uvádíme dále přehled literatury a zdůrazňujeme nutnost včasného vyšetření kostní dřeně před zahájením imunosupresivní léčby pro AIHA.

**Klíčová slova:** autoimunní hemolytická anémie, difúzní velkobuněčný lymfom, rituximab

**Abstract:** Autoimmune hemolytic anemia (AIHA) with combined warm and cold agglutinins is a relatively rare disorder, frequently associated with other diseases, e.g. malignant lymphomas. We report a case of diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) with bone marrow infiltration with initial manifestation as severe AIHA with warm and cold agglutinins. The patient received therapy for AIHA until early relapse unmasked the underlying malignancy. The patient then received combination chemotherapy with Rituximab (anti-CD20 monoclonal antibody), which led to rapid disappearance of antibody titres. We include a review of literature and emphasise the importance of early bone marrow examination before starting immunosuppressive therapy for AIHA.

**Keywords:** autoimmune haemolytic anaemia, diffuse large B-cell lymphoma, rituximab

#### Úvod

Autoimunní hemolytická anémie (AIHA) s tepelnými i chladovými protilátkami byla poprvé popsána v roce 1969[9] a navržena coby samostatná klinická jednotka v roce 1985 Shulmanem a kol. [1]. Její incidence se uvádí kolem 8% všech případů AIHA. Bývá často sdružena s jinými onemocněními: nejčastěji jde o systémový lupus erythematosus (SLE) či jiné autoimunní systémové onemocnění nebo maligní lymfoproliferace či jiné onemocnění [2,3,4,5]. Hemolýza může být poměrně těžká a přes iniciační dobrou odpověď na kortikoidy [1,7] může tato AIHA recidivovat či přecházet do formy chronické hemolytické anémie a vyžadovat tak další léčbu, která však nebývá tak účinná, jako v případě klasického typu AIHA s tepelnými protilátkami. V případě sekundární AIHA je nutné závčas diagnostikovat a zaléčit primární příčinu.

#### Popis případu

U 37-leté pacientky, bez významnějšího předchorobí se od začátku prosince 2002 začala objevovat progredující únava, dušnost, tinitus, vertigo a otoky dolních končetin. 22. 12. 2002 byla akutně přijata do okresní nemocnice pro celkové zhoršení stavu, febrilie (až 40 °C) a kolapsy. Byla zjištěna těžká makrocytární anémie s mírnou leukocytózou a normálním počtem destiček, dále hyperbilirubinémie a pozitivita přímého Coombsova testu. Stav uzavřen jako suspektní AIHA a byla zahájena terapie kortikoidy (Solumedrol 1g denně). Dne 23. 12. byla pacientka přeložena na naše pracoviště. Na základě imunohematologického vyšetření potvrzena diagnóza AIHA s tepel-

nými i chladovými protilátkami (IgG negativní, pozitivní chladové, stopy tepelných, C3c a C3d pozitivní, anti-I a anti-i pozitivní-viz Tabulka 1). Bylo pokračováno v podávání kortikoidů ve stejné dávce, po osmi dnech, vzhledem k minimálnímu efektu, přidán cyklofosfamid (200 mg i.v.). Pro neuspokojivý účinek této kombinace byly za další čtyři dny zahájeny plasmaferézy (celkem 5 sezení s výměnou 2000 ml plasmy a substitucí 5% albumínem). Došlo ke stabilizaci červeného krevního obrazu, výraznému poklesu titru všech protilátek a normalizaci hodnot bilirubinu. Současně s plasmaferézami se snižovala dávka kortikoidů i cyklofosfamidu, jehož podávání bylo pro trombocytopenii záhy ukončeno. Od počátku bylo pátráno po eventuální primární příčině tohoto stavu, provedli jsme kompletní náběry k objasnění virologické, imunologické, revmatologické a infekční etiologie, či etiologie nádorové a také CT hrudníku, břicha, malé pánve. Na základě jediných signifikantních nálezů (CA 125-69 IU/l, a cystoid pravého ovária dle CT) indikováno gynekologické vyšetření, které však bylo negativní. Kontrolní hladina Ca 125 již prakticky v normě (31,6, norma < 35 kIU/l), Elektroforéza bílkovin neprokázala přítomnost M komponenty. Dále provedena aspirace kostní dřeně s cytologickým nálezem pro AIHA atypicky těžké dyserytropoezy, s 3% atypických lymfoidních elementů (FACS negativní ve smyslu klonální lymfoproliferace). Následná trepanobiopsie neprokázala přítomnost maligních lymfoidních elementů, pouze hypocelulární hematopoezu s hyperplázií erytropoezy. Pacientka byla v dobrém klinickém stavu propuštěna 24. 1. 2003 do ambulantní péče se stabilním červeným krev-

ním obrazem, normálními biochemickými parametry a nulovým titrem chladových protilátek. Byla převedena na perorální podávání kortikoidů (Prednison 80 mg).

Během ambulantního období (od 24.01 do 20.03.2003) byly hodnoty krevního obrazu stabilizované v mezích normy při terapii Prednisone 40 mg p.o. a Cyclofosfamidem 50 mg p.o. až do 20.3., kdy dochází po viróze k poměrně náhlému poklesu hodnot červeného krevního obrazu. Pacientka byla akutně přijímána dne 27. 3. s recidivou AIHA s vysokým titrem chladových protilátek a přítomností i tepelných protilátek (Tabulka 1). Vzhledem k předchozím zkušenostem byla okamžitě zahájena kombinovaná imunosuprese (Solumedrol 250 mg a Cyklofosfamid 150 mg p.o. a provedeny plazmaferézy (celkem 14x, viz tab.). Skutečnost, že se jedná o velmi časný relaps nás vedla k zopakování veškerých vyšetření pátrajících po primární příčině, včetně CT a aspirace kostní dřeně. Kromě poněkud objemnější sleziny ve srovnání s předchozím CT, nebyla prokázána žádná patologie. Vyšetření aspirátu kostní dřeně bylo bez výraznějších atypií, CA 125-19 kIU/l (v mezích normy). Pro prudký pokles hodnoty trombocytů bylo podáváno Cyklofosfamidu po týdnu ukončeno. Přesto nadále setrvává trend výrazného poklesu trombocytů, těžká anemie a neustále vysoký titr protilátek. Proto bylo 16.4. zopakováno vyšetření kostní dřeně včetně trepanobiopsie. Cytologicky v kostní dřeni nalezeno 36,6% lymfoidních blastických elementů s odpovídajícím nálezem při cytometrickém vyšetření (37 % CD 19,20,22,38, FMCT a LC kappa+). Cytogeneticky nález 48 XX, s rozsáhlými změnami karyotypu (FISH na c-myc normální; IgH 2 kopie na chromozomu 14 a třetí kopie na marker chromozomu; BCL-2 3 kopie genu nejspíše při trisomii chromozomu 18 a čtvrtá kopie na marker chromozomu. Hybridizační studie probíhá). Histologicky z trepanobiopsie kostní dřeně potvrzena diagnóza difúzního velkobuněčného B-lymfomu. 16.4. dochází k výraznému zhoršení celkového stavu s kvalitativní poruchou vědomí, hyperkalcémií, hyperfosfatémií a laboratorními známkami pre-renální insuficience (Ca - 4.09 mmol/l, P - 2.48 mmol/l, K - 4.8 mmol/l, U - 27.8 mmol/l, Kr - 88 umol/l, LD 12.0 ukat/l, bilirubin - 42.7 umol/l, B2-mikroglobulin - 3.6 ug/l, CA 125- 83.2 IU/l, Clearance Kr 0.7 ml/s, Tubulární resorpce - 0.954). Stav zvládnut konzervativní léčbou (hyperhydratace, bifosfonáty, kalcitonin, atd.) a dne 18. 4. zahájen první cyklus R-CHOP (Rituximab den 1 a 15, Cyklofosfamid, Vincristin, Adriamycin, Prednison-modifikovaná dávka vzhledem k již chronické kortikoterapii). Chemoterapii pacientka snesla bez výraznějších komplikací. Od osmého dne cyklu podáváno G-CSF pro neutropenii, celkem 12 dní. Titr jak chladových tak tepelných protilátek promptně poklesl na nulové hodnoty (Tabulka 1). V době odeslání této publikace pacientka po druhém cyklu R-CHOP dosáhla kompletní dřeňové remise. V plánu podání celkem tří cyklů tohoto režimu a následně 3 cykly ESAP (včetně mobilizačního) s následnou vysokodávkovanou chemoterapií s podporou autologních kmenových krvetvorných buněk.

## Diskuse

AIHA s kombinovanými tepelnými a chladovými protilátkami je relativně vzácnou klinickou jednotkou. Často bývá sekundární při základním systémovém onemocnění nebo v rámci maligní nemoci nejčastěji lymfoproliferace (většinou níže a středně maligní B-lymfoproliferace). Jako v případě klasické AIHA s tepelnými protilátkami zahrnuje léčba v první řadě imunosupresi a to hlavně kortikoidy, eventuálně s přidáním cyklofosfamidů či cyklosporínu A. Dále lze zvažovat splektomii, podávání imunoglobulinů, Danazol či provádění plazmaferéz, které sice mohou z oběhu přechodně odstranit IgM protilátky ale jejichž efekt bývá dočasný. Nové modality zahrnují podávání anti-CD 20 monoklonální protilátky (ritu-

ximab), kdy výsledky zejména u sekundárních AIHA s chladovými protilátkami jsou celkem povzbudivé [5,7,8]. Účinnost Rituximabu v těchto popsaných případech lze vysvětlit i faktem, že se jedná o sdruženou AIHA s maligní lymfoproliferací, nejčastěji typu B-non Hodgkinského lymfomu, kde Rituximab se stává součástí léčebných protokolů [10,11]. V případě maligních lymfoproliferací může AIHA jednak onemocnění předcházet, jednak se vyskytovat současně [2]. Zdá se, že chladové protilátky jsou produktem maligního klonu [4] ale přesný mechanismus jejich vzniku nebyl zatím podrobně vysvětlen [2]. Cytogeneticky byl pozorován častější výskyt trizomie chromozomu 3 v případech AIHA s chladovými protilátkami sdružených s maligními lymfomy [6].

U naší pacientky v době stanovení diagnózy probíhala velice těžká hemolýza s přítomností tepelných i chladových protilátek spolu s aktivací komplementu a IgM anti I a anti-i protilátek (Tabulka 1). Počáteční léčba vysokými dávkami metylprednisolonem nevedla k očekávanému zlepšení (jak laboratornímu tak klinickému), proto byl přidán cyklofosfamid a po několika dnech byly zahájeny plazmaferézy. Pátrání po eventuální primární příčině neprokázalo žádnou významnou patologii, kromě zvýšené hodnoty CA- 125 a cytologického nálezu z aspirátu kostní dřeně, kde byla popsána těžká dysplázie červené krevní řady a přítomnost 3 % atypických lymfoidních elementů. Imunofenotypizační vyšetření neprokázalo klonalitu těchto elementů, cytogeneticky byl zcela normální nález, ani histologické vyšetření kostní dřeně nepotvrdilo nic, co by svědčilo pro lymfoidní patologii. V době provedení vyšetření kostní dřeně byla pacientka již 10 dní léčena vysokými dávkami kortikoidů a 4 dny cyklofosfamidem. Tato intenzivní terapie byla nezbytně nutná pro velice těžkou probíhající hemolýzu. Vzhledem k tomu, že pacientka nakonec zareagovala na kombinovanou terapii (normalizace krevního obrazu a titru chladových i tepelných protilátek), byl stav uzavřen jako idiopatická AIHA. U nemocné došlo velice záhy k relapsu hemolýzy, který byl rezistentní k dříve účinné terapii. Na základě této skutečnosti, znovu provedené vyšetření kostní dřeně (cytologie, FACS, histologie) potvrdilo diagnózu difúzního velkobuněčného B-lymfomu a byla zahájena příslušná léčba.

Vzhledem k tomu, že vysoce maligní lymfomy jsou výborně citlivé na podávání kortikosteroidů a cyklofosfamid (většinou součást standardní chemoterapie lymfomů), je velice pravděpodobné, že v době provedení iniciačního vyšetření kostní dřeně a CT vyšetření, kdy byla pacientka již několik dní léčena těmito léky pro těžkou hemolýzu, byla nálož nádoru snížena a maligní lymfom proto nebyl diagnostikován. Ke stanovení diagnózy došlo až při relapsu, kdy byly podávány nižší dávky kortikoidů (podávání cyklofosfamidu bylo přerušeno pro těžkou trombopenii) a nádorová nálož byla již vyšší po iniciační přechodné odpovědi. Třetí vyšetření kostní dřeně s nálezem infiltrace maligními lymfoidními buňkami bylo tak definitivní z hlediska diagnostiky.

Je známo, že podávání dokonce i nízkých dávek kortikosteroidů může změnit cytologický i histologický nález a tím výrazně znesnadnit stanovení diagnózy především lymfoproliferativních onemocnění (například podávání kortikoidů u alekemie akutní lymfoblastové leukémie, kdy je podezření na těžkou aplastickou anémii může vést k oddálení diagnózy a potažmo cílené léčby). Jelikož je AIHA s chladovými protilátkami u jinak zdravých jedinců poměrně vzácné onemocnění, je vždy nutné pátrat po primární příčině a je zejména potřeba hned zpočátku vyloučit lymfoproliferativní onemocnění. Z výše uvedeného vyplývá, že je vhodné provádět vyšetření kostní dřeně před zahájením kortikoterapie, což, jak se však ukázalo v tomto případě, není vždy možné vzhledem k probíhající, život ohrožující hemolýze.

**Tabulka 1. Dynamika titrů protilátek, krevního obrazu a biochemických parametrů.**

Datum	Hgb	Retik	Plt	LD	Bili	IgG	C3c	C3d	v 37 °C	v 4 °C	t 4 °C I	t 4 °C i	t 4 °C vl
23. 12.	3,7	54	186	8,5	55,4	neg	2+	3+	stopy	4+	253	8	4000
27. 12.	4,9	177	172	7,4	33,8	neg	neg	2+	neg	4+	512	16	4000
30. 12.	5,5	83	177	7,5	37,3	neg	4+	3+	neg	4+	nt	nt	nt
02. 01.	4,1	83	506	7,5	37,3	neg	1+	3+	stopy	4+	2000	8000	4000
06. 01.	9,8	69	182	5,2	23,7	neg	1+	1+	neg	1+-2+	128	128	128
08. 01.*	11,0	np	199	np	26,8						16	neg	16
08. 01.!											16	neg	16
10. 01.	9,8	np	168	np	21,6	neg	stopy	1+	neg	neg	16	neg	16
20. 01.	10,1	8	69	6,1	7,9				neg	neg	8	neg	2
28. 01.	13,4	40	217	10,9	9,5	neg		1+	neg	neg			
27. 02.	14,3	27	256	12,9	6,8	neg		neg	neg	neg			
21. 03.	10,2	49	290	10,4	36,9	neg		3+	neg	1+			
27. 03.	5,6	48	489	12	68,4	neg	4+	3+	1+	4+	2000	4000	4000
03. 04.	7,0	90	70	np	25,8	1+	1+	1+	2+	4+	4000		
07. 04.	7,7	37	29	5,3	42,4	neg		2+	2+	3+	512	1000	1000
11. 04.	6,0	11	19	9,6	71,6	neg		2+	neg	3+	2000		
14. 04.	7,3	4	13	10,4	44,6	stopy		3+	stopy	4+	1000	32	1000
18. 04.	7,8	np	17	14	40,5								
22. 04.	9,8	11	44	13,1	10,3			2+	neg	2+	256	512	256
28. 04.	10,1	3	9	7,4	14,6	neg		1+	neg	stopy	64	neg	32
06. 05.	11,2	np	36	np	8,0	neg		neg	neg	neg			

Hgb = hemoglobin; retik = retikulocyty (promile); plt = trombocyty; LD = laktát dehydrogenáza; bili = celkový bilirubin; v 37 °C = volné protilátky při 37 °C; v 4 °C = volné protilátky při 4 °C; t 4 °C I = titr anti-I protilátek při 4 °C; t 4 °C i = titr anti-i protilátek při 4 °C; t 4 °C vl = titr volných protilátek při 4 °C; neg = negativní; nt = netitrováno; np = neprovedeno; \* = před plasmferézou; ! = po plasmferéze

**Tabulka 2. Přehled léčby.**

Datum	Kortikoidy	Cyklofosamid	Plasmaferéza	ERD	Tromb
<b>1. hospitalizace (23. 12. 2002- 24. 01. 2003)</b>					
23. 12. 2002	1000 mg SM				
30. 12. 2002	1000 mg SM	200 mg i. v.			
03. 01. 2003	1000 mg SM	200 mg i. v.	Ano (3. 1.-5. 1.)*		
06. 01. 2003	500 mg SM	200 mg i. v.	Ano*		
10. 01. 2003	250 mg SM	200 mg i. v.	Ano*		
13. 01. 2003	125 mg SM				
22. 01. 2003	80 mg PDN			17 TU	0
<b>Ambulantní sledování</b>					
28. 01. 2003	40 mg PDN	50 mg p. o.			
<b>2. hospitalizace (27. 03. 2003-12. 05. 2003)</b>					
27. 03. 2003	250 mg SM	150 mg p. o.			
03. 04. 2003	250 mg SM	100 mg i. v.	Ano (2. 4.-15. 4.)*		
08. 04. 2003	125 mg SM				
11. 04. 2003	125 mg SM				
14. 04. 2003	125 mg SM				
18. 04. 2003	80 mg SM	R- CHOP			
22. 04. 2003	125 mg SM			38 TU	14 TU

SM- Solumedrol, PDN- Prednison, R-CHOP- MabThera (Rituximab) + CHOP

\*Plasmaferézy: I. hospitalizace- 5x, II. hospitalizace- 14x

ERD = počet transfúzních jednotek (TU) erymas

Tromb = počet transfúzních jednotek TK a TKS (poolované trombocyty a trombocyty z aferézy)

**Tabulka 3. Výsledky vyšetření kostní dřenež a zobrazovacích metod.**

Datum	Sternální punkce	Imunofenotyp	Trepanobiopsie	CT	Cytogen
02. 01. 03	Těžká dyserytropoeza, 3% atypických lymfoidních elementů	Neprokázána monoklonální lymfoidní populace			22 mitóz 46 XX
06. 01. 03			Hypocelulární trilineární hemopoieza s hyperplazí erytropoesou, bez výraznějších morfol. změn		
08. 01. 03				Bez přítomnosti jasně zvětšených LU, Cystoid pravého ovaria, ostatní nálezy v normě	
28. 03. 03	Méně dysplastické změny než minule, 1.8% aktivovaných lymfocytů	Neprokázána monoklonální lymfoidní populace			
05. 04. 03				Slezina je proti minule o poznání větší, obvyklé struktury LU, H nezvětšeny. Cystoid ovaria neprokázán	
16. 04. 03	36.6% lymfoidních. blastických elementů, polymorfní, silná basofilie cytoplasmy, dysplázie erytropoezy	37% CD 19,20,22, 38, FMC7, lehké řetězce kappa	Výrazná intersticiální infiltrace maligním lymfomem B řady ze středně velkých až velkých bb CD 20 +		48 XX, Komplexní změny karyotypu

LU = lymfatické uzliny; H = hepar; CT = počítačová tomografie; cytogen = cytogenetika

#### Literatura

- SHULMAN et al: Autoimmune hemolytic anemia with both cold and warm antibodies. JAMA 1985, Mar 22-29; 253(12): 1746-8
- S.SALLAH,G. SIGOUNAS, P. VOS, N.P. NGUYEN: Autoimmune hemolytic anemia in patients with non-Hodgkin's lymphoma: Characteristics and significance. Annals of Oncology 11: 1571-1577,2000
- MORI A., TAMARU J., SUMI H., KONDO H.: Beneficial effects of rituximab in primary cold agglutinin disease refractory to conventional therapy. Eur J Haematol. 2002, Apr., 68(4): 243-6
- McNICHOLL FP: Clinical syndromes associated with cold agglutinins. Transfus Sci 2000, Feb-Apr; 22(1-2): 125-33
- BERENTSEN S, TJONNBJORD GE, BRUDEVOLD R et al: Favourable response to therapy with anti-CD20 monoclonal antibody rituximab in primary chronic cold agglutinin disease. Br J Haematol 2001;115:79-83
- MICHAUX et al: Trisomy 3 is a consistent chromosome change in malignant lymphoproliferative disorders preceded by cold agglutinin disease. Br J Haematol 1995 Oct; 91(2):421-4
- MORSELLI, LUPI, POTENZA et al: Mixed warm and cold autoimmune hemolytic anemia: complete recovery after 2 courses of rituximab treatment. Blood, 1 May 2002, Vol 99, Number 9: 3478-9
- ENGELHARDT, JAKOB, RUTER et al: Severe cold hemagglutinin disease (CHD) successfully treated with rituximab. Blood, 1 September 2002, Vol 100, No. 5: 1922-23
- Neuvedeno: A case of malignant lymphoma with cold agglutinins. Br J Haematol 1969, Jul 5; 3(661): 33-7
- PETTENYELL R, LINCH D: Position paper on the therapeutic use of rituximab in CD 20 positive diffuse large B-cell Non-Hodgkin's lymphoma. Br J Haematol 2003 Apr; 121(1):44-8
- BOYE, ELTER, ENGERT: An overview of the current clinical use of anti CD 20 monoclonal antibody rituximab. Ann Oncol 2003 Apr; 14(4):520-35