

Postavení cytogenetického vyšetření v současném managementu léčby dětské akutní lymfoblastické leukemie

Pavel Dvořák^{1,2}, Petra Vohradská¹, Tomáš Votava³, Lenka Doležalová³, Petr Smíšek⁴, Zdeňka Černá³, Ivan Šubrt¹

¹Ústav lékařské genetiky LF UK v Plzni a FN Plzeň

²Ústav biologie LF UK v Plzni

³Oddělení hemato-onkologické, Dětská klinika FN Plzeň

⁴Klinika dětské hematologie a onkologie FN Motol

Vznik dětské akutní lymfoblastické leukemie (ALL) je dle současných poznatků mnohastupňový proces počínající často již před narozením jedince. Na vývoj preleukemického klonu mají vliv vnější i vnitřní faktory, vrozené genetické dispozice i náhoda. Významným faktorem ovlivňujícím vznik dětské ALL mohou být infekční onemocnění. Více než konkrétní druh mikroorganismu však hraje roli abnormální odpověď imunitního systému na běžnou infekci, která může u vnímavých jedinců spustit další procesy. Výrazného pokroku bylo dosaženo v pochopení genetického profilu patologických buněk ALL. Na klinické úrovni je dnes známo mnoho korelací genetických změn s mírou agresivity chování daného subtypu leukemického onemocnění. S tím také souvisí úprava léčebných protokolů na základě stratifikace dle rizika (prognostické a/nebo prediktivní genetické faktory, sledování minimální zbytkové nemoci). Léčba dětské ALL dosahuje v porovnání s jinými maligními chorobami výborné výsledky (5leté přežití dosahuje 90%), s výjimkou leukemií v kojeneckém věku, které mají stále horší prognózu. Do laboratorní praxe se dostávají mnohé nové genetické techniky včele s metodami založenými na mikroarray technologii a sekvenování nové generace (next-generation sequencing). Silnou stránkou již plně etablovaného cytogenetického vyšetření zůstává možnost komplexního pohledu na karyotyp patologických buněk. Tento pohled nám umožňuje pochopit mechanismus vzniku přítomných aberací a také možnost zachytit diverzitu nádorových buněk ve formě vznikajících malých subklonů. Zviditelnit tento specifický cytogenetický přístup je cílem předkládaných kazuistik.

Klíčová slova: akutní lymfoblastická leukemie, prognostické faktory, cytogenetika.

Role of cytogenetic analysis in current management of childhood acute lymphoblastic leukemia treatment

Childhood acute lymphoblastic leukemia, like cancer in general, probably arises from interactions between exogenous or endogenous exposures, genetic susceptibility, and chance. This multistep process begins sometimes even during prenatal period of life. Abnormal response to a common infection remains the strongest candidate for causal exposure. More precise risk stratification and personalized chemotherapy based on the biological characteristics of leukemic cells and hosts (prognostic and/or predictive genetic markers, minimal residual disease monitoring) have pushed the cure rate of childhood acute lymphoblastic leukemia to near 90%. However with the exception of infant leukemia, which still bears a dismal prognosis. Many new genetic techniques are approaching to clinical praxis mostly based on microarray or next-generation sequencing techniques. The strong point of well-established cytogenetic analysis remains in the possibility of a complex view to the whole karyotype of pathological cells. This kind of view allows us to understand the origin of genetic abnormalities and diversity of cancer cells in the form of evolving new subclones. The main goal of the presented case reports is to bring attention to this specific advantage of cytogenetic analysis.

Key words: acute lymphoblastic leukemia, prognostic stratification, cytogenetics.

Onkologie 2015; 9(1): 38–42

Úvod

Vznik dětské akutní lymfoblastické leukemie (ALL) je dle současných poznatků mnohastupňový proces počínající obvykle již před narozením jedince. Na vývoj preleukemického klonu mají vliv vnější i vnitřní faktory, vrozené genetické dispozice i náhoda. Riziko vzniku ALL u populace dětí do 15 let je přibližně 1:2000 (1). V posledních letech bylo dosaženo velkých úspěchů v pochopení biologické podstaty a mechanismů tohoto procesu, přesto zůstává mnoho nedořešených otázek. Další postup v po-

chopní podstaty procesu vzniku ALL je komplikován skutečností, že se velmi pravděpodobně jedná o více biologicky odlišných skupin, které nemusejí mít stejný mechanismus vzniku. Také identifikace významných vnějších i vnitřních vlivů a role vrozených genetických dispozic se ukazuje jako nesnadná.

Významné faktory vzniku dětských leukemií

Z vnějších faktorů byl prokázán vliv ionizujícího záření (např. záření vznikající při výbuchu

atomových bomb, rentgenové záření), jeho vliv na současnou populaci by však neměl být velký. Vliv neionizujícího záření (např. záření z běžných elektrických spotřebičů) je hodně diskutován, ale dosud se jej nepodařilo validně experimentálně dokázat (1). Významným faktorem pro vznik dětské ALL jsou infekční onemocnění. Více než konkrétní druh mikroorganismu však hraje roli abnormální odpověď imunitního systému na běžnou infekci u vnímavých jedinců. Vnímavost jedince v tomto smyslu může být dána vrozenými genetickými dispo-

Tabulka 1. Přehled genetických skupin dětské prekurzorové B-ALL, jejich četnost a rizikovitost (kompilace z literárních zdrojů použitých v článku)

Genetická skupina	Četnost (%)	Rizikovitost
Hyperdiploidní	25	nízká
ETV6-RUNX1	20	nízká
BCR/ABL1 like	9	vysoká
KMT2A (MLL)	6	vysoká
TCF3-PBX1	4	střední
CRLF2	4	vysoká
ERG	3	vysoká
BCR/ABL1	2	vysoká
dic(9;20)	2	vysoká
iAMP21	2	vysoká
Hypodiploidní	1	vysoká
TCF3-HLF	0,5	vysoká

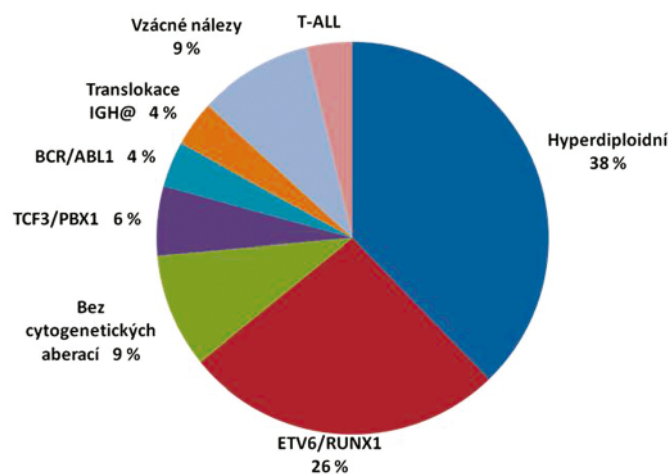
zicemi (v populaci běžnými variantami genů). Dlouhodobě je známo, že děti s Downovým syndromem mají asi 40násobné riziko vzniku ALL než běžná populace. Analýzy na základě studia kandidátních genů nepřinesly statisticky významné výsledky. Celogenomové asociační studie (GWAS) na velkých souborech pacientů a zdravých kontrol prokázaly vliv běžných alelických variant u 4 genů – IKZF1, ARID5B, CEBPE a CDKN2A. Účinek těchto níže rizikových variant se počítá až po 10násobné riziko pro nosiče variant ve všech 4 genech v homozygotní formě (1).

Biomarkery a genetický profil

Stanovení rizikovitosti onemocnění u konkrétního pacienta vychází z kombinace prognostických a prediktivních markerů získaných při zachytu onemocnění a během prvních týdnů léčby. Za významné markery se v současnosti považují především klinické údaje (věk, počáteční počet bílých krvinek, CNS status – míra eventuální infiltrace centrálního nervového systému leukemickými buňkami), odpověď na léčbu sledovaná pomocí hladiny minimální zbytkové nemoci/choroby (minimal residual disease, MRD) a biologická charakteristika patologického klonu (imunofenotypizace, cytogenetické vyšetření, molekulárně genetická vyšetření) (1, 2, 3). Na hodnocení MRD v přesně daných termínech se uplatňují především metody molekulárně genetické a imunofenotypizační, které dosahují výrazně vyšší citlivosti než vyšetření cytogenetické (4). Výrazného pokroku bylo dosaženo v pochopení genetického profilu patologických buněk ALL a jeho korelace s agresivností chování daného subtypu onemocnění na klinické úrovni. Stejně jako v ostatních oborech medicíny je v současné hematologii uplatňován koncept personalizované medicíny. S tím také souvisí

Obrázek 1. Cytogenetické výsledky FN Plzeň 2004–2014

- 53 dětí s ALL
(B-ALL 51 dětí,
T-ALL 2 děti)



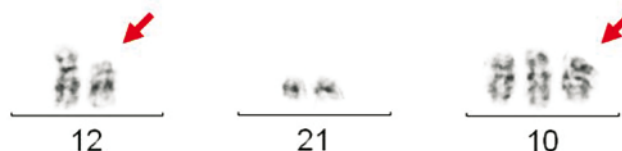
Obrázek 2. Cytogenetické vyšetření – kazuistika 1

G-pruhování:

1. hlavní klon **46,XY,der(12)del(12)(p11p12)t(12;21)(p13;q22)[5]**



2. subklon **47,idem,+10[2]**

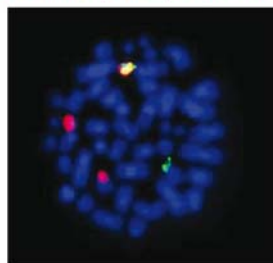


3. normální karyotyp **46,XY[13]**

Obrázek 3. Cytogenetické vyšetření – kazuistika 1

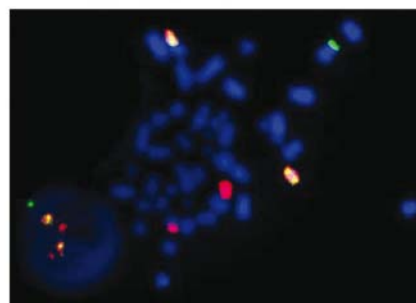
FISH:

73 % int. jader (6/15 mitóz) TEL/AML1



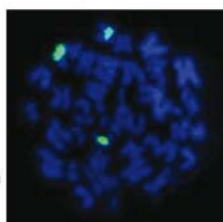
Sonda: LSI TEL/AML1 SG/SO ES Probe(Vysis)

18 % jader (3/15 mitóz) duplikace TEL/AML1 +der(21)t(12;21)(p13;q22)



13 % jader (2/16 mitóz) trizomie 10

Sonda: 10 alpha Satellite (Aquarius-Cytocell)

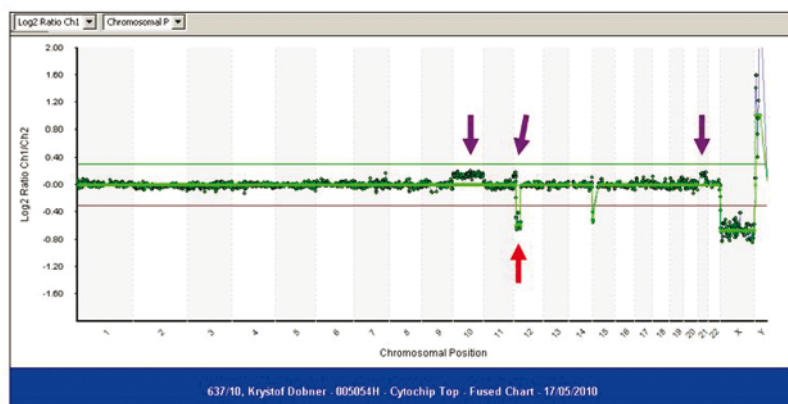


Obrázek 4. Cytogenetické vyšetření – kazuistika 1

arrayCGH (CytoChip Focus Haematology):

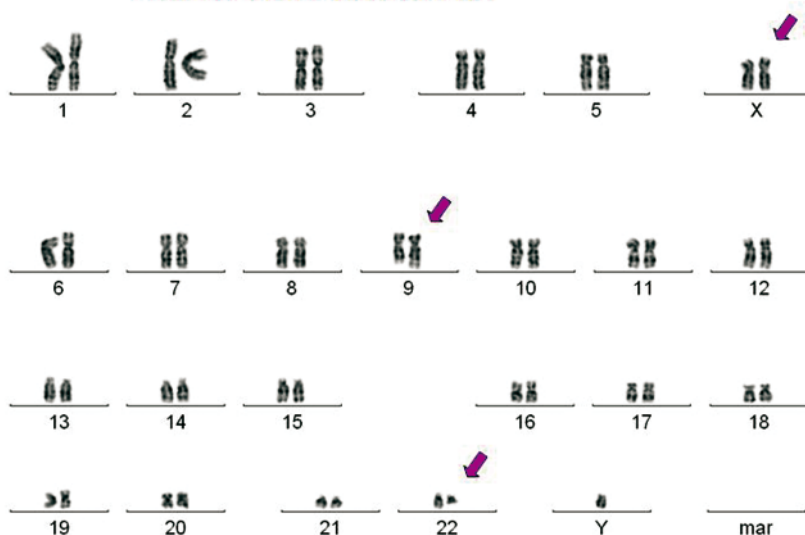
delece v oblasti 12p13.2→12p11.21 (20Mb oblast od 3' ETV6 (TEL) směrem k centromere) ↓

mírné zvýšení množství genetického materiálu v oblasti celého chromosomu 10, 12p13.33→12p13.2 a 21q11.2→21q22.12 ↓

**Obrázek 5.** Cytogenetické vyšetření – kazuistika 2

G-pruhování:

1. hlavní klon 47,XY,+X,t(9;22)(q34;q11)[5]



2. normální karyotyp 46,XY[10]

úprava léčebných protokolů a obecně výborné výsledky léčby dětské ALL v porovnání s jinými maligními chorobami (5leté přežití dosahuje 90%) (5). Výjimkou z této pozitivní situace jsou stále ko-jenecké akutní leukemie, které mají výsledky horší. Tabulka 1 přináší současný přehled genetických skupin dětské prekurzorové B-ALL, jejich četnost a rizikovost. Dětská prekurzorová B-ALL tvoří přibližně 85% všech případů dětské ALL, u přibližně 10% je diagnostikována T-ALL a přibližně 2% tvoří zralá B-ALL.

Vývoj cytogenetického vyšetření

Výchozím materiálem pro cytogenetické vyšetření je u hematologických malignit kostní

dřeň, eventuálně periferní krev. Po krátkodobé kultivaci buněk (obvykle 24 hodin) je buněčné dělení zastaveno mitotickým blokátorem (kolchicin), ke vzorkům je přidán hypotonický roztok způsobující zvýšení objemu vnitřních buněčných struktur a dále fixace (metanol s kyselinou octovou), která mimo jiné způsobuje křehkost buněčných membrán. Za specifických podmínek (nízká teplota, vysoká vlhkost) je tato cytogenetická suspenze kapána na podložní sklo. U některých dělicích se buněk dojde k prasknutí cytoplazmatické i jaderné membrány a uvolnění mitotických chromozomů do okolí. Chromozomy jsou následně barveny různými barvicími technikami. Celosvětově nejrozšířenějším barvením je tzv.

G-pruhování (natrávení trypsinem a obarvení roztokem Giemsa-Romanowski). Na obarvených chromozomech lze pod optickým mikroskopem hodnotit početní a strukturální změny s rozlišením přibližně 5–10 megabází (MB). Ze strukturálních změn jde především o translokace, inverze, delece, amplifikace či inserce. Také do této oblasti zasáhl rychlý rozvoj informačních a komunikačních technologií a umožnil další vývoj cytogenetických technik. Šlo především o digitalizaci nasnímaných obrázků karyotypů a vývoj mnoha metod na pomezí cytogenetiky a molekulární genetiky (molekulární cytogenetické metody) v období kolem roku 2000. V rutinní praxi i výzkumu se dnes významně uplatňují metody založené na fluorescenční in situ hybridizaci (FISH) a celogenomové hybridizaci (CGH) umožňující rozlišení abnormalit o velikosti několika desítek kilobází (kb). Postupně bylo odhaleno mnoho primárních i sekundárních cytogenetických abnormalit a jejich vztah k rizikovosti onemocnění a jeho prognóze.

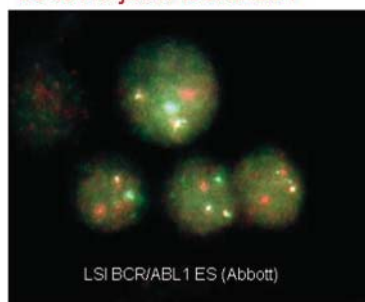
Významné primární cytogenetické abnormality

Mezi významné početní abnormality patologického klonu patří hyperdiploidie (hyperdiploidní karyotyp), která je charakterizována nenáhodným zmnožením počtu chromozomů, ve formě trisomií bývají nejčastěji nalézány chromozomy X, 4, 6, 10, 14, 17, 18 a 21 (obvykle celkem více než 50 chromozomů). Tato skupina zahrnuje přibližně jednu čtvrtinu všech dětských pacientů s prekurzorovou B-ALL a koreluje s dobrou prognózou vývoje onemocnění. Vzácnou skupinou (asi 1%) je naopak hypodiploidie (hypodiploidní karyotyp, obvykle je definována jako méně než 44 chromozomů), která však koreluje s prognózou špatnou (zejména pak near-haploidní karyotyp s počtem méně než 30 chromozomů) (1, 6). Nejčastější (přibližně 20%) ze strukturálních abnormalit je translokace mezi p raménkem chromozomu 12 a q raménkem chromozomu 21 – zápis dle cytogenetické nomenklatury je t(12;21)(p13;q22). Jako důsledek této translokace vzniká nový fúzní gen ETV6/RUNX1, dříve označovaný jako TEL/AML1, který vykazuje onkogenní aktivitu. Vlastní translokace t(12;21) je kryptická (na hranici detekčních možností) pro klasickou karyotypovací techniku G-pruhování a byla objevena až s vývojem molekulárně cytogenetické metody FISH. Přítomnost této translokace u pacienta je spojována s dobrou prognózou. Po zavedení vyšetření ETV6/RUNX1 fúze pomocí metody FISH do rutinní praxe cytogenetických laboratoří a s přibývajícími laboratorními daty

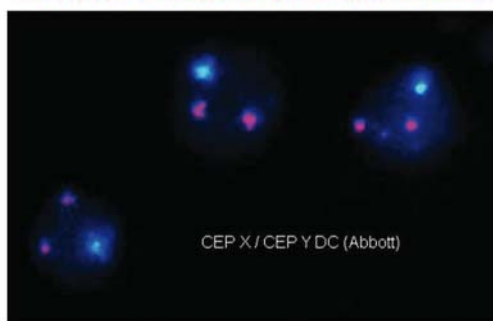
Obrázek 6. Cytogenetické vyšetření – kazuistika 2

FISH:

85 % int. jader BCR/ABL1



75 % jader s nadpočetným chromosomem X



byla identifikována další prognosticky důležitá podskupina – B-ALL s intrachromozomální amplifikací genu RUNX1 označovaná jako iAMP21. Tato vzácnější změna (2%) je naopak spojována se špatnou prognózou. Mezi další prognosticky významné translokace u dětské prekursorové B-ALL (velmi často u kojenců) patří translokace oblasti q23 na q raménku chromozomu 11 s velkou paletou jiných chromozomů vedoucí k aktivaci onkogenu KMT2A (dříve MLL). Translokace KMT2A genu jsou většinou spojovány se špatnou prognózou. Obecně známá translokace mezi chromozomy 9 a 22 – t (9; 22) (q34; q11), při které vzniká tzv. filadelfský chromozom (Ph chromozom, jde o derivovaný chromozom 22) a s ním spojená nová genová fúze BCR/ABL1, patří mezi vzácnější nálezy u B-ALL (2%). Podstatou patofyziologického procesu u tohoto subtypu ALL je aktivace tyrozinkinázy ABL1. I přes začlenění cílené biologické léčby tyrozinkinázovými inhibitory (nejčastěji používaný je imatinib mesylát) do chemoterapeutických protokolů pro léčbu dětské B-ALL a slibné výsledky velkých studií, je však spojována s vysokou rizikovostí onemocnění. Novými genetickými metodami, mezi něž patří např. celogenomové sekvenování, byla v posledních letech objevena početně poměrně významná skupina označená jako BCR/ABL1-like, u které byl nalezen stejný profil exprese genů jako u klasické BCR/ABL1 pozitivní B-ALL (přes nepřítomnost BCR/ABL1 fúze). Také BCR/ABL1-like onemocnění má vysokou rizikovost (1, 6).

Výsledek ve FN Plzeň

V letech 2004 až 2014 bylo ve FN Plzeň diagnostikováno 53 dětí s ALL. Obrázek 1 představuje hlavní cytogenetické skupiny pro pacienty s B-ALL. Následující dvě vybrané kazuistiky demonstrují případy níže a vysoce rizikových pacientů.

Kazuistika 1

2,5letý chlapec s půl roku trvajícím recidivujícím respiračním infekty si občas stěžoval na bolest dolních končetin a měl zvýšenou tvorbu hematoidů. Pro nápadnou bledost byl praktickým lékařem vyšetřen krevní obraz a nalezena anémie s hemoglobinem 65 g/l a trombocytopenie $54 \times 10^9/l$, počet leukocytů byl v normě. Pro podezření z akutní hemoblastozy byl chlapec v dubnu 2010 odeslán na Dětskou kliniku FN Plzeň. Po přijetí na dětskou hematologii v klinickém nálezu dominovala výrazná hepatosplenomegalie, laboratorně v diferenciálním rozpočtu bílých krvinek byly přítomny blasty.

Vyšetřením aspirátu kostní dřeně byla s využitím flowcytometrie a molekulárně genetických metod rychle potvrzena diagnóza akutní lymfoblastické leukemie – euploidní common ALL, ETV6/RUNX1 pozitivní. Cytogenetické vyšetření nám dále přineslo bližší pohled na genetické změny v nádorových buňkách. Na chromozomu 12 účastnícím se translokace t (12; 21) odhalilo metodou G-pruhování ještě současně přítomnou delecí na p raménku chromozomu 12 a subklon s trisomií chromozomu 10. Metodou FISH byl odhalen ještě druhý subklon s duplikací derivovaného chromozomu 21, resp. duplikací ETV6/RUNX1 fúze (obrázky 2, 3 a 4 ukazují výsledky tří různých metod používaných v cytogenetických laboratořích – G – pruhování, FISH a array CGH, z nichž každá si zachovává své výhody a nevýhody). Byla zahájena terapie dle protokolu Interim AIEOP BFM 2 000 prednisonovou předfází, která proběhla bez komplikací, bez projevů syndromu nádorového rozpadu (tumor lysis syndrom). V den +8 byla splněna kritéria pro dobrou léčebnou odpověď na prednison (prednison good respons). 1. část protokolu I. byla komplikována dvěma atakami febrilní neutropenie, kultivačně zjištěn Hemophilus influenzae. Antibiotickou

léčbou došlo rychle k úpravě stavu. Přechodně četnější stolice byly upraveny dietními opatřeními. Útlum parametrů krevního obrazu i koagulopatie doprovázející aplikaci L-asparaginázy (L-ASP) byly řešeny opakovanými substitucemi. V den +33 bylo dosaženo 1. kompletní remise. 2. část protokolu I. proběhla bez větších komplikací a protokol I. byl ukončen v červnu 2010. I další protokolární léčba probíhala bez větších problémů, ve 12. týdnu byl parametr minimální zbytková nemoc (MRD) negativní a léčba byla kompletně ukončena v dubnu 2012. V lednu 2015 je pacient bez klinických a laboratorních známek původního onemocnění ALL.

Kazuistika 2

5letý chlapec s febriliemi, krční lymfadenopatií, nechutenstvím a bolestí při polykání byl v září 2004 vyšetřen na Infekční klinice FN Plzeň. Zde byla zjištěna hepatosplenomegalie a v krevním obraze leukocytoza 127 tis. , anémie s hemoglobinem 64 g/l, trombocytopenie $10 \times 10^9/l$. Chlapec byl přeložen na oddělení dětské hematologie FN Plzeň.

Vyšetřením kostní dřeně byla potvrzena euploidní common ALL, BCR/ABL1 pozitivní, na podkladě t (9; 22) (q34;q11), tj. přítomnosti Ph chromozomu. Cytogenetické vyšetření přineslo kromě potvrzení přítomnosti klasické translokace t (9; 22) další informaci o přítomnosti nadpočetného pohlavního chromozomu X v hlavním patologickém klonu (obrázky 5 a 6). Byla zahájena léčba dle protokolu ALL IC-BFM 2002, odpověď na léčbu však byla ve stanovených parametrech nepříznivá, v den +8 špatně léčebně zareagoval na prednison, v den +15 byla pozorována minimální regrese nálezu ve dření. Následně byl vzhledem k zjištěné BCR/ABL1 pozitivitě zařazen do studie EsPhALL s Glivecem (imatinib mesylát, inhibitor tyrozinkináz 1. generace) a k pokračování chemoterapie přeložen na Kliniku dětské hematologie a onkologie FN Motol. Chlapec byl dále indikován k nepřibuzenecké transplantaci kostní dřeně. Po ukončení indukčního bloku chlapec dosáhl cytologické remise. Léčba indukční i dalšími tzv. high riskovými bloky byla ale provázena četnými závažnými komplikacemi. Vyšetřením minimální residuální nemoci před alogenní transplantací kostní dřeně byla prokázána pozitivita BCR/ABL1 na hranici citlivosti použité molekulárně genetické metody RT PCR (citlivost až $1 : 1\,000\,000$), přestavby IGH@ genu zůstaly negativní. Potransplantační průběh byl komplikován infekcí i rozvinutím reakce štěpu proti hostiteli, postupně došlo k

vývoji molekulárně genetického a poté v březnu 2006 i cytologického relapsu. Pokus o experimentální léčbu dasatinibem (tyrozinkinázový inhibitor 2. generace) byl neúspěšný, chlapec umírá na progresi základního onemocnění v červnu 2006.

Závěr

Cytogenetické vyšetření přináší klinickým lékařům hlavně informace s prognostickým či prediktivním významem. Tvoří důležitý kámen v mozaice managementu současné léčby dětské ALL směřující k cíli medicíny šité na míru konkrétnímu pacientovi. Silnou stránkou cytogenetického vyšetření zůstává kromě schopnosti detekce některých vzácnějších aberací

především možnost komplexního pohledu na karyotyp patologických buněk. Tento pohled nám umožňuje pochopit mechanismus vzniku přítomných aberací a také možnost zachytit diverzitu nádorových buněk ve formě nově vznikajících subklonů.

*Vznik článku byl částečně podpořen z grantu
č. NT 14227 od Ministerstva zdravotnictví
České republiky.*

Literatura

1. Inaba H, Greaves M, Mullighan CG. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*, 2013; 381(9881): 1943–1955. doi: 10.1016/S0140-6736(12)62187-4.
2. Pui CH, Mullighan CG, Evans WE, Relling MV. Pediatric acute lymphoblastic leukemia: where are we going and how do we get there? *Blood*, 2012; 120(6): 1165–1174. doi: 10.1182/blood-2012-05-378943.

3. Teachey DT, Hunger SP. Predicting relapse risk in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol.*, 2013; 162(5): 606–620. doi: 10.1111/bjh.12442.

4. Adam Z, Vorlíček J, Vaniček J, a kol. Diagnostické a léčebné postupy u maligních chorob. II. doplněné a aktualizované vydání. Praha: Grada Publishing, 2004: 692.5. WWW stránky České onkologické společnosti České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně: <http://www.linkos.cz/pro-odborniky/>.

6. WWW stránky – Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology: <http://atlasgeneticsoncology.org/index.html>.

Článek přijat redakcí: 18. 11. 2014

Článek přijat k publikaci: 4. 2. 2015

RNDr. Pavel Dvořák

Ústav biologie LF UK v Plzni
Alej Svobody 76, 304 60 Plzeň
Pavel.Dvorak@lfp.cuni.cz
