

# CITOGENETSKE PREISKAVE PRI SLOVENSKIH BOLNIKIH Z AKUTNO LEVKEMIJO

## CYTOGENETIC ANALYSIS IN SLOVENIAN ACUTE LEUKEMIA PATIENTS

*Helena Podgornik, Alenka Prijatelj, Peter Černelč*

Klinični oddelek za hematologijo, Univerzitetni klinični center, Zaloška 7, 1525 Ljubljana

---

### Izvleček

- Izhodišča** *Osnovna citogenetska preiskava je ena od temeljnih diagnostičnih preiskav pri novo odkritih bolnikih z levkemijo. Njeni izsledki so temeljni za natančno opredelitev vrste levkemije, določitev napovedi poteka bolezni in izbire intenzivnosti zdravljenja. Pri velikem deležu bolnikov z akutno mieloblastno levkemijo (AML) prepoznana citogenetska sprememba omogoči oceno uspešnosti zdravljenja oziroma določitev minimalnega preostanka bolezni (MRD). Zanimala sta nas delež citogenetskih sprememb pri naših bolnikih z levkemijo ter primerljivost ugotovljenih izsledkov s tistimi, ki jih navaja literatura.*
- Metode** *V laboratoriju za citogenetiko smo v zadnjih dveh letih preiskavo opravili pri 120 bolnikih z akutno levkemijo. Celice kostnega mozga smo kratkotrajno gojili in nato uporabili G-proganje (Giemsa-trypsin). Pri večini preiskovancev smo za določitev ponavljajočih se kromosomskih sprememb uporabili tudi fluorescenčno hibridizacijo »in situ« (FISH).*
- Rezultati** *Uspešnost osnovne citogenetske preiskave je bila 90 % in skoraj pri 70 % bolnikov smo našli klonske kromosomske spremembe. Pogostnost ugotovljenih kromosomskih sprememb je bila večinoma primerljiva s podatki v literaturi, kar velja tudi za delež bolnikov s kompleksnimi kromosomskimi preureditvami in normalnim kariotipom.*
- Zaključki** *Delež bolnikov, pri katerih bi lahko prezrli katero od kromosomskih sprememb, smo zmanjšali z uporabo molekularnih citogenetskih in molekularnogenetskih preiskav na najmanjšo možno mero. Na osnovi rezultatov zadnjih dveh let lahko zaključimo, da so naši bolniki z levkemijo deležni ustrezne citogenetske diagnostične obravnave, ki je povsem primerljiva z obravnavo v centrih za zdravljenje akutnih levkemij v zamejstvu.*
- Ključne besede** *akutna levkemija; citogenetika; kromosomske preureditve; FISH*

---

### Abstract

- Background** *Modern therapeutic concepts in acute leukemia are based on individual risk stratification at diagnosis and during follow-up. Cytogenetics plays a central role for classification and for prognostication in acute myeloid (AML) and considering t(9;22) determination also in acute lymphoblastic leukemia (ALL). This method also helps to determine a suitable genetic marker for later monitoring of minimal residual disease (MRD). Results of standard cytogenetics obtained in our laboratory were analyzed and compared with literature data.*
- Methods** *During the last two years cytogenetic analysis was done in 120 adults and children who were diagnosed with acute leukemia. Bone marrow cells were short-time cultivated to obtain metaphases which were analyzed after G-banding (Giemsa-trypsin). In majority of cases fluorescent in situ hybridization (FISH) was also applied to determine or confirm the suspected chromosomal aberrations.*

---

### Avtorica za dopisovanje / Corresponding author:

doc. dr. Helena Podgornik, Klinični oddelek za hematologijo, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Zaloška 7, 1525 Ljubljana

---

Results	<i>The standard cytogenetics was successful in 90 % of samples. In 70 % of AL patients clonal chromosomal changes were found. Recurrent chromosomal aberrations were determined with expected frequency as previously published for other populations. Also the frequencies of patients with a normal karyotype and complex chromosomal changes were in the expected range.</i>
Conclusions	<i>Using molecular cytogenetic and genetic methods a possibility that some of chromosomal changes were overlooked was considerably minimized. On the basis of the analyzed data we can be confident that the cytogenetic diagnostic approach in our acute leukemia patients is in accordance with international guidelines.</i>
<b>Key words</b>	<i>acute leukemia; cytogenetics; chromosomal aberrations; FISH</i>

## Uvod

Akutna mieloična levkemija (AML) in akutna limfatična levkemija (ALL) sta klinično in biološko heterogeni, kompleksni klonski boleznii, ki nastaneta z različnimi mehanizmi levkemogeneze.<sup>1,2</sup> Sodobni načini zdravljenja zahtevajo natančno razvrstitev podvrste akutne levkemije za napoved poteka bolezni ob postavitvi diagnoze in med zdravljenjem. Določitev označevalca za poznejše spremljanje minimalnega preostanka bolezni (MRD) pa je drugi razlog za individualno in celovito diagnostično obravnavo vsakega posameznega bolnika.<sup>3</sup> Te zahteve izpolnjuje t.i. multimodalni diagnostični pristop, ki upošteva rezultate citomorfologije, multiparameterske pretočne citometrije (MFC), citogenetske analize, fluorescenčne *in situ* hibridizacije (FISH) in molekularne genetike.<sup>3</sup> Osnovna citogenetska preiskava je torej najpomembnejša preiskava sodobne diagnostične obravnave bolnika z akutno levkemijo in jo predpisujejo vse smernice za obravnavo te bolezni.<sup>4,5</sup> Njen domet so okrepili postopki molekularne citogenetike, ki pa imajo skupaj s preiskavami molekularne genetike vlogo dopolnilnih preiskav. Izsledki citogenetskih raziskav pa so nenazadnje ključni tudi za temeljno razumevanje levkemogeneze in posledično za razvoj ustreznih zdravil.<sup>6,7</sup>

## Metode

V obdobju zadnjih dveh let (februar 2006 - januar 2008) smo preiskali vzorce 120 bolnikov, pri katerih je bila postavljena diagnoza akutna levkemija.

### Osnovna in molekularna citogenetika

Celice kostnega mozga smo kratkotrajno (24 ur) gojili in jih nato po običajnem postopku<sup>8</sup> pripravili za citogenetsko preiskavo. Po predhodnem praganju GTG (Giemsa-tripsin) smo kromosomske spremembe opredelili na osnovi ISCN 2005 (International System for Human Cytogenetic Nomenclature). Pri bolniku smo ugotovili normalen kariotip po pregledu 20 metafaz. Preiskave FISH smo opravili z molekulskimi DNA-sondami proizvajalca Abbott (ZDA). Dva preiskovalca sta pregledala najmanj 200 interfaznih jeder. Rezultat je povprečje obeh vrednosti.

## Rezultati in razpravljanje

Za osnovno citogenetsko preiskavo pri hematoloških boleznih lahko kot izhodiščni biološki vzorec uporabimo biopsijski stebriček, aspirat kostnega mozga ali vzorec venske krvi. Uspešnost kariotipizacije je bila pričakovano najboljša pri aspiratu kostnega mozga (Razpr. 1). Celokupna uspešnost citogenetske analize pri biopsijskem stebričku kot izhodiščnem materialu naj bi bila do 60 %, <sup>8</sup> česar pa mi ne dosežemo. Za oceno uspešnosti preiskave pa bi morali iz biopsijskega stebrička ocenjevati večje število vzorcev. Nekoliko manjša je tudi uspešnost citogenetske preiskave pri venski krvi, vendar je tudi delež teh vzorcev majhen. S celokupno uspešnostjo preiskave (90 %), še zlasti pa z uspešnostjo preiskave pri aspiratu kostnega mozga (92,7 %), pa ustrezamo smernicam in zahtevam standardov, ki urejajo kakovost dela v citogenetskih laboratorijih. Te postavljajo kot ciljno vrednost 85-odstotno uspešnost kariotipizacije pri vzorcih kostnega mozga.<sup>9</sup> 75 % vseh preiskav smo opravili pri odraslih bolnikih z akutno levkemijo, pri katerih je prevladovala AML (82 %), medtem ko smo pri otroških levkemijah (25,8 % vseh levkemij) večino preiskav opravili pri bolnikih z B-ALL (87 % vseh otrok). Literatura soglaša, da je citogenetska preiskava najbolj težavna pri ALL, tako zaradi majhnega mitotskega indeksa pri tej bolezni kot tudi zaradi slabe morfolologije kromosomov. Naši rezultati potrjujejo, da smo tudi pri tej podvrsti levkemije dokaj uspešni (75 %), pri otrocih celo še nekoliko bolj. Pri AML pa praviloma osnovno citogenetsko preiskavo uspešno izvedemo. Ob diagnozi naj bi klonske kromosomske spremembe našli vsaj pri dveh tretjinah bolnikov z levkemijo,<sup>5,10</sup> s čimer se dobro ujemajo tudi naši rezultati (70 %) (Razpr. 2). Redkeje pa se najdejo kromosomske spremembe pri bolnikih s T-ALL,<sup>5</sup> pri katerih tudi mi sprememb nismo našli. Pri teh bolnikih je tudi uspešnost citogenetske preiskave manjša (Razpr. 1). Pogostnost ponavljajočih se kromosomskih sprememb z znanim napovednim pomenom (Razpr. 3) je pri slovenski populaciji primerljiva z navedbami v literaturi.<sup>10,12</sup> Najpogostejši ponavljajoči se kromosomski preureditvi najdemo pri ALL. Kar pri 40 % odraslih bolnikov in pri enem otroku z B-ALL smo določili napovedno zelo neugodno translokacijo t(9;22) oziroma Ph kromosom, kar je v skladu s pričakovano pojavnostjo pri odraslih in otrocih.<sup>4</sup> Pri 20 % otrok z

## Razpr. 1. Število preiskovancev in uspešnost citogenetske preiskave glede na biološki vzorec in vrsto akutne levkemije pri odraslih in otrocih.

Table 1. Number of samples and successful cytogenetic analysis according to leukemia type in adults and children.

	Vse preiskave število (%) All analysis number (%)	Pediatrični bolniki Pediatric patients	Uspešnost število (%) Successful analysis number (%) <sup>*</sup>	Uspešnost pri otrocih število (%) Successful analysis in pediatric patients number (%) <sup>†</sup>
Vsi bolniki z AL / All AL patients	120	31	108 (90 %)	26 (86,7 %)
AML	80	7	78 (97,5 %)	7 (100 %)
ALL	40	24	30 (75 %)	19 (79,2 %)
B-ALL	34	21	27 (79,4 %)	17 (81 %)
T-ALL	6	3	3 (50 %)	2 (66,7 %)
Biopsijski stebriček / Bone core biopsy	3 (2,5 %)	/	1 (33,3)	/
Venska kri / Peripheral blood	7 (5,8 %)	4 (13,3 %)	5 (71,4 %)	3 (75 %)
Aspirat KM / BM aspirate	110 (91,7 %)	26 (86,6 %)	102 (92,7 %)	23 (88,5 %)

KM - kostni mozeg, \* - računano na vse preiskave, † - računano na pediatrične bolnike

BM - bone marrow, \* calculated as percentage of all analysis, † calculated as percentage of analysis in pediatric patients

## Razpr. 2. Pogostost normalnega in kompleksno preurejenega kariotipa.

Table 2. Frequency of normal and complex karyotype.

	Vsi bolniki All patients	Pediatrični bolniki Pediatric patients	AML	ALL	s-AML
* Vsi bolniki / All cases	120	30	80	40	12
Klonske kromosomske spremembe / Clonal chromosomal aberrations	82 (68,3 %)	20 (66,7 %)	57 (71,2 %)	25 (62,5 %)	11 (91,7 %)
Normalen kariotip / Normal karyotype	38 (31,6 %)	10 (33 %)	23 (28,8 %)	15 (37,5 %)	1 (8,3 %)
Kompleksne spremembe / Complex karyotype	32 (27,1 %)	8 (26,7 %)	19 (23,8 %)	12 (30 %)	6 (50 %)

\* osnova za izračun deleža

\* basis for calculation of %

B-ALL smo potrdili prisotnost translokacije t(12;21), ki je sicer kriптиčna, tako da jo določamo s preiskavo FISH. Zanimivo je, da smo translokacijo t(8;21) večkrat ugotovili pri otrocih kot pa pri odraslih. Gre za najpogostejšo preureditev pri otroški AML. Preureditev gena MLL na kromosomu 11 (11q23) je sprememba, ki jo najdemo pri različnih oblikah levkemij in zajema obširen nabor partnerskih genov pri različnih preureditvah.<sup>13</sup> Pri naših bolnikih smo doslej ugotovili prisotnost translokacij t(6;11) in t(9;11).

Sorazmerno pogoste so tudi aneuploidije, zlasti trisomija 8, ki jo srečamo pri približno 10 % akutnih levkemij. Monosomiji kromosomov 5 in 7 oziroma deleciji dolgih krakov teh dveh kromosomov sta spremembi z izgubo materiala, ki so zelo značilne za sekundarne levkemije, kjer jih lahko najdemo kar pri polovici bolnikov.<sup>14</sup> Našli smo jih pri četrtini sekundarnih levkemij. Pogosteje določimo tudi trisomijo kromosoma 21, medtem ko je frekvenca preostalih kromosomskih sprememb majhna.

Za izid zdravljenja sta poleg ponavljajočih se kromosomskih sprememb z jasnim napovednim pomenom pomembna še t.i. normalni kariotip ter prisotnost kompleksnih kromosomskih preureditev (Razpr. 2). V vsaki od teh dveh skupin najdemo približno 30 % bolnikov, pri čemer se izsledki pri odraslih in otrocih znatno ne razlikujejo. O kompleksnih preureditvah govorimo takrat, ko pri bolniku najdemo več kot dve kromosomski spremembi. Našli naj bi jih pri 15 % *de novo* levkemij in pri polovici sekundarnih levkemij.<sup>14</sup> Pri nas smo določili kompleksne preureditve pri 28 % AML in pri 40 % s-AML. Verjetna razlaga za ta

odklon je v tem, da je tudi med t.i. *de novo* levkemijami nekaj sekundarnih. Posebne pozornosti je deležna skupina bolnikov, pri kateri standardna citogenetska preiskava ne pokaže nobenih kromosomskih sprememb. Nekatere sorazmerno pogoste preureditve lahko prezremo ali pa so kriптиčne, torej jih ob osnovni citogenetski preiskavi ne prepoznamo. Mednje sodita dokaj pogosti translokacija t(12;21) in nekatere preureditve MLL gena na področju 11q23. Ker sta obe napovedno zelo pomembni, sta vključeni v osnovni nabor sond FISH, ki jih uporabljamo pri posameznih vrstah levkemij. MLL preureditev določamo s preiskavo FISH sploh pri vseh vrstah levkemij, t(12;21) pa pri vseh otroških B-ALL. V panel preiskav FISH je pri otrocih vključena še t(9;22), ki jo določamo tudi pri vseh odraslih bolnikih z B-ALL. V skupini z normalnim kariotipom najdemo le približno tretjino slovenskih bolnikov z levkemijo, medtem ko literatura navaja 40–50 % bolnikov.<sup>15</sup> To pripisujemo zelo sistematičnemu določanju sprememb z metodami molekularne genetike in citogenetike. Bolniki z normalnim kariotipom sodijo v vmesno napovedno skupino. Za nadaljnjo opredelitev stopnje tveganja je potrebno pri teh bolnikih določiti najmanj še mutacijo genov *FLT3* in *NPM1*.<sup>16</sup> Zaenkrat pri nas določamo mutacijo *FLT3*. To je tudi skupina bolnikov, kjer naj bi se pokazal pomen presejalne multiplksne PCR preiskave na prisotnost različnih kromosomskih preureditev. Ta preskus je pomemben tudi pri bolnikih, pri katerih je bila kariotipizacija neuspešna. Pri tej skupini bolnikov tudi sicer uporabimo širši nabor preiskav FISH.

*Razpr. 3. Ugotovljene ponavljajoče se kromosomske spremembe pri naših bolnikih z AL.*

Table 3. *Recurrent chromosomal aberrations found in our patients with AL.*

Preureditev Chromosomal aberration	Vsi All	Pediatrični bolniki Pediatric patients	Napovedni pomen Prognostic significance
-7/del(7q)	8	1	Slab / Adverse
-5/5q-	8	/	Slab / Adverse
+21	8	2	Dober/slab
+8	7	/	Good / Adverse Srednji / Slab Intermediate / Adverse
t(9;22)(q34;q11)	5	1	Slab / Adverse
MLL preureditev	5	1	Slab / Adverse
t(8;21)(q22;q22)	4	3	Dober / Good
t(15;17)(q22;q11)	4	/	Dober / Good
t(12;21)(p12;q22)	4	4	Dober / Good
+11	2	1	Slab / Adverse
inv(16)(p13;q22)	1	/	Dober / Good
t(3;3)(q21;q26)	1	/	Slab / Adverse
t(8;14)	1	1	Slab / Adverse
t(6;9)	1	/	Slab / Adverse
amp(21)(q22)	1	1	Slab / Adverse

S pomočjo osnovne citogenetske preiskave smo ugotovili kromosomske spremembe kar pri 82 bolnikih (69,5 %) (Razpr. 3). Žal je občutljivost standardne citogenetike sorazmerno nizka. Preiskava FISH jo izboljša, z razpoložljivimi DNA-sondami pa jo lahko uporabimo vsaj pri 52 bolnikih (44 %). Za določanje MRD so zaradi večje občutljivosti najustreznejše metode molekularne genetike. Vendar pa smo uporabne označevalce za to skupino diagnostičnih metod določili le pri 25 bolnikih (20,8 %).

## Zaključki

Rezultati zadnjih dveh let potrjujejo, da uspešnost citogenetskih preiskav pri slovenskih bolnikih z akutno levkemijo povsem ustreza zahtevam mednarodnih standardov. Tudi delež bolnikov s klonskimi kromosomskimi spremembami (70 %) je kazalec ustrezne diagnostične obravnave, primerljive z uveljavljenimi centri v zamejstvu. Z individualnim in multimodalnim pristopom, ki ga uporabljamo, uspevamo pri večini

slovenskih bolnikov določiti ustrezne označevalce, ki omogočajo občutljivo spremljanje bolnika tudi v obdobju remisije.

## Literatura

- Haferlach T, Bacher U, Kern W, Schnittger S, Haferlach C. Diagnostic pathways in acute leukemias: a proposal for a multimodal approach. *Ann Hematol* 2007; 86: 311-27.
- Stark B, Jeison M, Gabay LG, Mardoukh J, Luria D, Bar-Am I, et al. Classical and molecular cytogenetic abnormalities and outcome of childhood acute myeloid leukaemia: report from a referral centre in Israel. *Br J Haematol* 2004; 126: 320-37.
- Haferlach T, Kern W, Schnittger S, Schoch C. Modern diagnostics in acute leukemias. *Crit Rev Oncol Hematol* 2005; 56: 223-34.
- Smith M, Barnett M, Bassan R, Gatta G, Tondini C, Kern W. Adult acute myeloid leukaemia. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004; 50: 197-22.
- Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW. WHO Classification of tumors. Pathology and genetics of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: IARC Press; 2001.
- Bassan R, Gatta G, Tondini C, Willemze R. Adult acute lymphoblastic leukaemia. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004; 50: 223-61.
- Kearney L, Horsley SW. Molecular cytogenetics in haematological malignancy: current technology and future prospects. *Chromosoma* 2005; 114: 286-94.
- Roulston D, Le Beau MM. Cytogenetic analysis of hematologic malignant diseases. In: Barch MJ, Knutsen T, Spurbek JL, eds. *The AGT cytogenetics laboratory manual*. 3<sup>rd</sup> ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1997. p. 325-55.
- National pathology accreditation advisory council: Guidelines for cytogenetics laboratories. Canberra: Commonwealth Department of Health and Aged Care, 2001.
- Heim S, Mitelman F. *Cancer cytogenetics*. New York: Wiley-Liss; 1995.
- <http://atlasgeneticsoncology.org>
- <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>
- Rubnitz JE, Behm FG, Downing JR. 11q23 rearrangements in acute leukemia. *Leukemia* 1996; 10: 74-82.
- Alvarez S, Cigudoza JC. Gains Losses and complex karyotypes in myeloid disorders: a light at the end of the tunnel. *Hematol Oncol* 2005; 23: 18-25.
- Baldus CD, Mrozek K, Marcucci G, Bloomfield CD. Clinical outcome of de novo acute myeloid leukaemia patients with normal cytogenetics is affected by molecular genetic alterations: a concise review. *Br J Haematol* 2007; 137: 387-00.
- Chen WN, Rassidakis GZ, Medeiros LJ. Nucleophosmin gene mutations in acute myeloid leukemia. *Arch Pathol Lab Med* 2006; 130: 1687-92.