

Pregledni prispevek/Review article

# CITOGENETIČNE IN MOLEKULARNOGENETIČNE PREISKAVE PRI UGOTAVLJANJU KRONIČNE MIELOIČNE LEVKEMIJE IN SPREMLJANJU ZDRAVLJENJA

THE ROLE OF CYTOGENETICS AND MOLECULAR GENETICS IN DIAGNOSIS OF  
CHRONIC MYELOID LEUKEMIA AND MONITORING OF TREATMENT RESPONSE

Helena Podgornik<sup>1</sup>, Tadej Pajič<sup>1</sup>, Nadja Kokalj-Vokač<sup>2</sup>, Andreja Zagorac<sup>2</sup>, Ruth Rupreht<sup>3</sup>,  
Peter Černelč<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Klinični oddelek za hematologijo, Klinični center, Zaloška cesta 7, 1525 Ljubljana

<sup>2</sup> Laboratorij za medicinsko genetiko, Splošna bolnišnica Maribor, Ljubljanska 5, 2000 Maribor

<sup>3</sup> Zavod RS za transfuzijsko medicino, Šljamerjeva 6, 1000 Ljubljana

Prispelo 2004-02-13, sprejeto 2004-03-23; ZDRAV VESTN 2004; 73: Suppl. I: 13-7

**Ključne besede:** standardna citogenetična preiskava; FISH; kvantitativni PCR

**Izvleček** – Izhodišča. Kronična mieloična levkemija (KML) je značilen primer klonske mieloproliferativne bolezni, pri kateri se citogenetična in molekularnogenetična znanja in na njih temelječe preiskave uporabljajo za natančno potrditev bolezni, za učinkovito spremljanje zmanjševanja bolezenskega klona celic med zdravljenjem, za spremljanje morebitne ponovitve bolezni in minimalnega preostanka bolezni.

**Metode.** Za potrditev bolezni določamo translokacijo t(9;22) s standardno citogenetično preiskavo, uspešnost zdravljenja pa spremljamo z dvema molekularnogenetičnima preiskavama, fluorescenčno in situ hibridizacijo (FISH) ter verižno reakcijo s polimerazo v realnem času (Q-RT-PCR). Pregledali smo izsledke teh preiskav, ki smo jih opravili pri 40 bolnikih na Kliničnem oddelku za hematologijo v Ljubljani in Laboratoriju za medicinsko genetiko v Mariboru v zadnjih štirih letih.

**Rezultati.** Za spremljanje KML v prvem obdobju do stabilne citogenetične remisije smo prisotnost kromosoma Philadelphia potrjevali s preiskavo FISH. Po približno letu in pol je Ph (+) celic praviloma manj kot 5–10%, zato smo bolezen začeli spremljati s preiskavo Q-RT-PCR, nadaljevali pa smo tudi s preiskavo FISH. Ugotovili smo dobro ujemanje obeh metod pred popolno citogenetsko remisijo. Izračunali smo tudi izhodiščno vrednost razmerja prepisov BCR-ABL/ABL (0,94) in na njeni osnovi določili delež bolnikov, ki so dosegli dobro molekularno remisijo.

**Zaključki.** Temeljna preiskava pri diagnosticiranju hematoloških novotvorb je standardna citogenetična preiskava kostnega mozga. Za ciljno potrjevanje pričakovanih kromosomskih nepravilnosti ob odkritju bolezni lahko vzporedno izvajamo tudi preiskavi FISH ter PCR. Pri bolnikih z akutno levkemijo je v obdobju remisije raven rakastih celic tako majhna, da je večinoma najustreznejša preiskava PCR. Če z njo ne zaznamo prisotnosti rakastega klona, lahko zanesljivo napovemo ugoden potek bolezni.

**Keywords:** standard cytogenetic analysis; FISH; quantitative PCR

**Abstract** – Background. Chronic myeloid leukemia serves as a model for the disease where the knowledge as well as the development of different new methods from molecular biology were successfully introduced into the clinical practice.

**Methods.** Standard cytogenetic analysis was primarily used for detecting the translocation between chromosomes 9 and 22: t(9;22) while fluorescence in situ hybridization (FISH) and real time PCR (Q-RT-PCR) were mainly employed for monitoring of the disease. We evaluated the results of both molecular diagnostic methods. During the past few years the work has been done in the laboratory of the Department for haematology in Ljubljana and Laboratory for Medical Genetics in Maribor.

**Results.** A good correlation of results obtained by both methods was confirmed for the period of time before the complete cytogenetic remission. We also established an initial BCR-ABL/ABL ratio of 0.94 which is a basis for later determination of a major molecular remission which is defined as  $\geq 3$  log reduction in BCR-ABL/ABL.

**Conclusions.** Standard cytogenetic analysis of bone marrow cells is the basic diagnostic approach in haematologic malignancies. At the same time FISH and PCR can also be used for confirmation of recurrent chromosomal abnormalities. FISH is the most appropriate method for CML monitoring during the first period of therapy. When cytogenetic remission is achieved, Q-RT-PCR is a method of choice. In acute leukaemia PCR is mainly used in remission for the detection of malignant clone. If the clone can not be detected even by nested RT-PCR, prognosis of the disease is rather good.

## Uvod

Molekularna citogenetika in molekularna genetika je doživela v zadnjih desetletjih izjemen razvoj, ki je pripeljal do uvedbe številnih novih preiskav in načinov zdravljenja v klinično hematologijo. Sorazmerno dobra dostopnost in homogenost vzorca krvi in kostnega mozga pri levkemijah in malignih limfomih je eden od razlogov, da so se prav na področju hematologije te preiskave uveljavile. Pri hematoloških obolenjih to pomeni sintezo vseh informacij, tako tradicionalnih citomorfoloških in imunofenotipskih kot tudi novejših genomskih, proteomskih in farmakogenomskih (1). Kronična mieloična levkemija (KML) je primer klonske mieloproliferativne bolezni, pri kateri se citogenetična in molekularnogenetična znanja in na njih temelječe preiskave uporabljajo za potrditev bolezni, učinkovito spremljanje zmanjševanja bolezenskega kлона celic med zdravljenjem, spremljanje morebitne ponovitve bolezni in minimalnega preostanka bolezni (2). Kromosom Philadelphia (Ph) je bil prva ugotovljena ponavljajoča se kromosomska nenormalnost, ki je bila povezana s pojavom maligne novotvorbe. S klasično citogenetično preiskavo so dokazali, da nastane zaradi recipročne translokacije t(9;22)(q34;q11.2). Molekularnogenetične preiskave so kasneje potrdile, da ta translokacija vodi do fuzije protoonkogenega ABL, ki leži na kromosomu 9 in BCR področja na kromosomu 22 (3). Za opredelitev bolezni uporabljamo standardno citogenetično preiskavo, zdravljenje pa spremljamo z molekularnogenetičnimi in molekularnogenetičnimi preiskavami. Te preiskave trenutno omogočajo spremljanje odziva na zdravljenje pri približno polovici hematoloških novotvorb (4).

## Standardna citogenetična preiskava

Standardna citogenetična preiskava ostaja temeljno, preprosto in učinkovito orodje za vpogled v genom (5). Pomembna je v vseh obdobjih bolezni: za opredelitev diagnoze, za določitev velikosti malignega kлона, posredno za napoved prognoze, za potrditev remisije in ugotovitev ponovitve bolezni. Poleg teh neposredno uporabnih rezultatov pa je zelo pomembna tudi na področju osnovnih raziskav genov, ki so ključni za nastanek novotvorbe (6). Ugotavljanje specifičnih kromosomskih sprememb, s pomočjo fluorescenčne in situ hibridizacije (FISH) in verižne reakcije s polimerazo (PCR), lahko povzroči, da spregledamo dodatne kromosomske preureditve, ki so prisotne že ob samem začetku bolezni, ali pa nastanejo med ali po zdravljenju. To je najbolj raziskano pri bolnikih s KML, pri katerih so med zdravljenjem z imatinib mezilatoma nastale klonske kromosomske spremembe v celicah brez Ph kromosoma (1). Po smernicah ameriških medicinskih genetikov uporabimo preiskavo FISH po prej opravljeni standardni citogenetični preiskavi (7). Sterilno odvzet aspirat kostnega mozga za citogenetično preiskavo prenesemo v sterilno gojišče, ki omogoča ohranitev vitalnosti celic med prenosom vzorca v citogenetski laboratorij. Gojišču mora biti dodan Na-heparin, ki v nasprotju z nekaterimi antikoagulantami, npr. EDTA, ne deluje toksično in ne vpliva na kasnejšo delitev in zorenje celic v kulturi. Prenos do laboratorija mora biti hiter, na vsak način pa izveden prej kot v 24-ih urah. Poteka lahko pri sobni temperaturi, transport na ledu ni priporočljiv (8). Kariotip navadno razkrije ponavljajoče se in tudi preostale kromosomske nepravilnosti.

## Preiskave za potrjevanje specifičnih kromosomskih nepravilnosti

Prenos po Southernu, FISH z molekularskimi sondami ter različne izvedbe PCR so osnovne preiskave, ki jih uporabljamo za ugotavljanje pričakovanih specifičnih kromosomskih preureditev pri hematoloških novotvorbah. Tudi pri nas redno uporabljamo FISH in PCR preiskavi. Ker ima vsaka od preiskav določene prednosti in omejitve, različna je njuna občutljivost,

stabilnosti tarčnih molekul ter zgradbi sond, je prav, da izbere mo metodo, ki bo pri posameznem bolniku in bolezni dala najbolj zanesljiv in informativen podatek.

## Preiskava FISH

V primerjavi s standardno citogenetično preiskavo je prednost preiskave FISH v tem, da obide največji problem klasične citogenetike – zadostno število delečih se tumorskih celic (6). Tarčna molekula je navadno DNK v interfaznem ali metafaznem jedru celice, ta pa je pritrjena na predmetno mikroskopsko steklo. S tako pritrjeno DNK hibridizira enostranska komplementarna sonda DNK. Nukleotidi sonde so označeni s fluorescenčnim barvilom, kar omogoči kasnejšo oceno označenih celic s pomočjo fluorescenčnega mikroskopa (9).

Po zgradbi DNK sond ločimo različne vrste preiskav FISH. Pri določanju kompleksnejših kromosomskih preureditev lahko uporabimo tudi t.i. večbarvni FISH, pri katerem uporabimo 3 do 4 različno obarvane sonde. Pri določanju številčnih kromosomskih nepravilnosti (monosomije, diploidije, trisomije) uporabljamo centromerne sonde. Molekulske sonde za FISH so lahko večje od sond in začetnih oligonukleotidov, ki jih uporabljamo pri preiskavi PCR, kar je v primerih, ko so točke preloma zelo oddaljene, velika prednost. Tako je npr. pri delečih kromosoma 13q, ki so prognostično pomembne pri plazmocitomu, FISH najbolj razširjena za ugotavljanje omejenih kromosomske nepravilnosti (10). Obenem FISH omogoča zaznavanje določenih preureditev, ki jih s klasično kariotipizacijo ne opazimo (11). Zato se je delež bolnikov, pri katerih odkrijemo kromosomske nepravilnosti, z uvedbo tehnike FISH zelo povečal (12). Za potrditev KML je preiskava FISH posebno pomembna pri tistih bolnikih, pri katerih s standardno citogenetično preiskavo kromosoma Ph ne ugotovimo. Pri preureditvah, ki na molekularni ravni vodijo do enakih posledic kot t(9;22), gre najbolj pogosto za vključitev 3' ABL gena v kromosom 22. Zato govorimo o zamaskiranem Ph kromosomu. S preiskavo FISH dokažemo tudi dodatni kromosom Ph, ki spada med najpogostejše dodatne kromosomske spremembe, ki jih ugotovimo predvsem v blastni preobrazbi KML. Dodatni kromosom Ph nastane iz spremenjenega kromosoma 22 in ne kot posledica še ene translokacije. Je pomemben za oceno poteka bolezni (8).

Preiskava FISH je ključna predvsem ob postavitvi diagnoze, v začetku zdravljenja ali ob ponovitvi bolezni, ko je količina nenormalnih celic velika in je potrebna sorazmerno majhna analitska občutljivost. Za ugotavljanje minimalnega preostanka bolezni (MRD) po zdravljenju pa je FISH premalo občutljiv, saj pri najboljših molekularskih sondah občutljivost seže pod 1% (13). Delež lažno pozitivnih izsledkov je zaradi naključnega prekrivanja signalov lahko sorazmerno velik. Na osnovi poskusov z zdravimi osebami so ugotovili, da je lahko lažno pozitivnih rezultatov celo 5% (14). Medtem ko je ujemanje med rezultati verižne reakcije s polimerazo v realnem času (Q-RT-PCR) pri kostnem mozgu in krvi zelo dobro, nekatere raziskave oporekajo zanesljivost FISH na vzorcih krvi brez razvrščanja celic bele vrste pred tem (15). FISH lahko izvedemo neposredno na celicah krvi (odvzeta z dodatkom Na-heparina) ali kostnega mozga, ki jih izoliramo. Navadno pa jih predhodno kratkotrajno gojimo kot za standardno citogenetično preiskavo. FISH pa je zlasti pomembna pri tistih vzorcih, kjer klasična citogenetična preiskava zaradi odsotnosti metafaz ni mogoča (16).

## Preiskava PCR

Ugotavljanje strukturnih kromosomskih nepravilnosti, translokacij, delecij in inverzij oziroma iz njih nastalih združenih ali okvarjenih genov s PCR temelji na oligokonukleotidih (angl. primer), ki so komplementarni zaporedju DNK ob prelomih na kromosomih. Prelomna mesta se od bolnika do bolnika razlikujejo, vendar ležijo znotraj določenih regij kromosoma. Pri

levkemijah so te regije lahko široke tudi nekaj 100 kbp, tako da PCR na osnovi genomske DNK ni mogoča. Zato uporabimo himerično informacijsko RNK (mRNK), ki jo prepisemo v komplementarno DNK (cDNK) z uporabo naključnih ali specifičnih oligonukleotidov in encima reverzna transkriptaza (RT). cDNK je osnova za PCR reakcijo, ki jo označimo kot RT-PCR (17). Ker je razvoj, vrednotenje in vzdrževanje velikega števila različnih PCR protokolov za prepoznavanje vse več kromosomskih nepravilnosti zamudno in drago, se ob pojavu, ponovitvi ter po zdravljenju boleznih s citotoksičnimi zdravili vse bolj uporablja hkraten PCR (multiplex PCR) (1). Ta omogoči, da lahko v eni reakciji z več pari oligonukleotidov ugotovimo več ciljnih segmentov cDNK, ki so značilni za posamezne kromosomske nepravilnosti (18). S tem zmanjšamo stroške in skrajšamo čas preiskav. Za vse PCR preiskave uporabimo periferno kri ali kostni mozeg, ki ju odvezamo z dodatkom EDTA.

### Preiskave za določanje minimalnega preostanka bolezni (MRD)

Če pride do ponovitve bolezni, je to posledica preostalega malignega kлона celic, ki jih lahko ugotovimo le z najbolj občutljivimi preiskavami. Ta majhen klon malignih celic imenujemo tudi MRD. Cilj zdravljenja je, da dosežemo molekularnogenetično remisijo. Prisotnost kлона malignih celic načeloma napoveduje ponovitev bolezni, čeprav zveza med preostankom malignih celic in ponovitvijo bolezni ni povsem jasna (7, 19). Občutljivost, ki je potrebna pri preiskavah za določanje MRD, je reda velikosti  $10^{-5}$  do  $10^{-6}$ . Nadalje naj bi bilo mogoče ovrednotenje števila celic, bile naj bi hitro izvedljive, cenene in specifične (1). Merilu zadostne občutljivosti ter velike specifičnosti ustrezajo preiskave PCR (4). Med njimi ima posebno mesto *vgnezdena PCR* (angl. nested). Pri njej povečamo specifičnost in občutljivost tako, da pridelek PCR iz prve reakcije v naslednji reakciji PCR pomnožimo z oligonukleotidi, ki se prilagodijo znotraj prvega pridelka PCR. Preiskava je zelo občutljiva, vendar ugotovimo samo odsotnost ali prisotnost značilnega segmenta genomske ali cDNK. Ne omogoči pa količinskega vrednotenja (17). Za spremljanje MRD je zato bolj primeren t.i. kvantitativni PCR (Q-PCR). Najbolj uveljavljena je preiskava PCR v realnem času (Q-RT-PCR). Združuje pomnoževanje in ugotavljanje iskanega zaporedja v enem koraku. Za ugotavljanje pomnoženih DNK ali cDNK molekul lahko uporabimo fluorescenčno barvilo, ki se po vsakem ciklusu reakcije PCR vgradi med verigi DNK, ali fluorescenčno označen oligonukleotid - sondo. Sonda se veže na ustrezno mesto znotraj področja pomnoževanja PCR. Med izgradnjo verige DNK Taq polimeraza s 5'-nukleazno aktivnostjo razgradi vezano sondo. Pri tem se sprosti obveščevalno barvilo, ki po vzbujanju s svetlobo določene valovne dolžine fluorescira. Vsak cikel reakcije merimo naraščajočo intenzivnost fluorescence, ki je sorazmerna količini pridelka PCR. Po reakciji računalniški program določi tisti cikel PCR reakcije, ko se intenzivnost fluorescence loči od ozadja (ang. threshold cycle,  $C_t$ ). Število kopij (ali količino) nukleotidnega zaporedja v vzorcu izračunamo iz umeritvene krivulje na osnovi  $C_t$  vrednosti. Umeritveno krivuljo pripravimo s pomočjo znane začetne količine RNK, cDNK, posebej za to pripravljene plazmida ali DNK (20).

## Bolniki in metode

### Bolniki

Med letoma 1999 in 2004 smo v Laboratoriju za medicinsko genetiko v Mariboru ugotovili pri 40 bolnikih prisotnost translokacije t(9;22) s klasično citogenetično analizo. Pri vseh bolnikih smo zdravljenje spremljali s FISH, pri desetih (10/40) pa smo translokacijo s FISH potrdili tudi ob postavitvi diagnoze. PCR preiskave smo naredili v laboratoriju Kliničnega oddelka

za hematologijo v Ljubljani. 15 bolnikov (15/40) smo spremljali z obema preiskavama tudi v času prehoda v citogenetično remisijo, 20 bolnikov (20/40) pa v obdobju popolne citogenetične remisije.

### Standardna in molekularna citogenetika

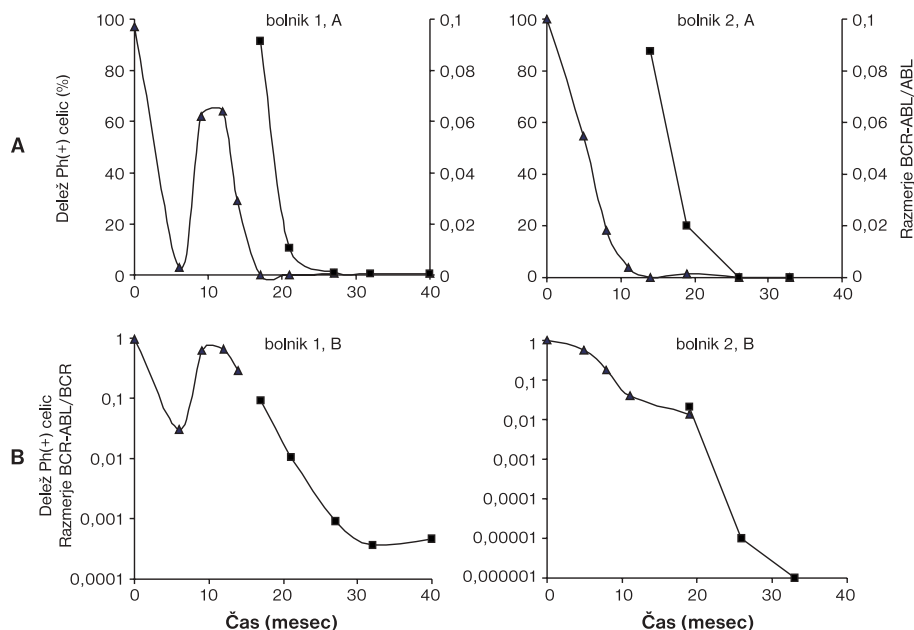
Celice kostnega mozga smo kratkotrajno (24 h) gojili pri 37 °C v atmosferi s 5% CO<sub>2</sub>. Gojenje smo izvajali v dveh vzporednih kulturah. Uporabili smo dve različni komercialno dostopni gojišči, KarriMax (Gibco, Velika Britanija) in Amniomed (Biochrom, Nemčija), ki smo jima dodali timidin do končne koncentracije 1 mM. Aspirat kostnega mozga, ki smo ga prej sprali s Hanksovo raztopino, smo vcepili v gojišče, začetna koncentracija celic je bila  $1 \times 10^6$ /ml. Pol ure pred zaključkom gojenja smo kulturi dodali kolcemid, 0,1 µg/ml. Celice smo po običajnem postopku pripravili za citogenetično preiskavo (8). FISH preiskavo smo opravili s pomočjo molekulskih DNK sond BCR/ABL ES (Vysis, ZDA).

### Molekularna genetika

Postopek osamitve mRNK molekule iz celic kostnega mozga ( $5 \times 10^6$  levkocitov) smo izvedli na kolonah po protokolu High Pure RNA Isolation reagenčnega kompleta (Roche, Nemčija). Kolone so izdelane in oblikovane izključno za osamitev celotne RNK, po načinu adsorpcije na steklenih vlaknih (21). Obratno prepisovanje 1 µg RNK in Q-RT-PCR smo izvedli po usklajenem postopku Q-RT-PCR evropske mreže za ugotavljanje MRD pri levkemijah z uporabo načina TaqMan (Applied Biosystem, VB) (22). Za pripravo umeritvene krivulje smo za standard uporabili komercialno pripravljene plazmide s serijskimi razredčitvami znanega števila kopij od  $10^6$  do  $10^1$  (Ipsogen, Francija).

## Rezultati z razpravljanjem

Preiskave za sledenje specifičnih kromosomskih nepravilnosti se pri nas sistematično uporabljajo šele zadnja štiri leta. Tako smo zbrali podatke z uporabo FISH in standardnega PCR, medtem ko je bil PCR v realnem času uveden zadnje leto. Zato je število doslej zbranih podatkov sorazmerno majhno. Tako kot v svetu imamo tudi mi največ podatkov za bolnike s KML, kjer so bile opisane preiskave uporabljene za časovno sledenje poteka bolezni. To je postalo še zlasti pomembno po uvedbi zdravljenja z imatinib mezilatom. Znano je, da je ujemanje med številom BCR-ABL prepisov v krvi in številom Ph(+) metafaz v kostnem mozgu zelo dobro (23). Večina objavljenih raziskav temelji na primerjavi rezultatov standardne citogenetične preiskave ter Q-RT-PCR (1), mi pa predstavljamo izsledke dobljene s FISH preiskavo na interfaznih jedrih in Q-RT-PCR. Slika 1 prikazuje, kako se je v obdobju treh let spreminjal delež Ph(+) celic pri dveh bolnikih s KML, zdravljenih z imatinib mezilatom. Popolno citogenetično remisijo naj bi v letu in pol doseglo 76% bolnikov, zdravljenih z imatinib mezilatoma oziroma 18% bolnikov, zdravljenih z interferonom  $\alpha$  in hkrati citozin-arabinozidom (24). Skladno z navedenimi podatki je tudi pri naših bolnikih prišlo v letu in pol do t. i. citogenetične remisije. Takrat je dosežena spodnja meja občutljivosti tehnike FISH (5–10% pozitivnih celic) in nastopi obdobje, ko začnemo z zasledovanjem MRD. V začetku zdravljenja večinoma opazimo enakomerno zmanjševanje (bolnik 2), lahko pa tudi ciklično spreminjanje (19) deleža Ph(+) celic, kot prikazuje slika 1. Delež Ph(+) celic v času zasledovanja MRD ni več dovolj informativen, ker je časovna odvisnost njegovega zmanjševanja eksponentna. Slika 1B, kjer je uporabljeno logaritemsko merilo, pokaže, da se obe preiskavi, FISH in Q-RT-PCR, medsebojno zelo dobro dopolnjujeta. S Q-RT-PCR začnemo v času med letom in letom in pol, če je seveda pri bolniku dosežen



Sl. 1. Določanje deleža Ph(+) celic s FISH (▲) in Q-RT-PCR (■) pri dveh bolnikih s KML, zdravljenih z imatinib mezilatom. (A) Prikaz zmanjševanja deleža rakavega klona celic v času; (B) odvisnost logaritma deleža rakavih celic od časa.

Figure 1. Proportion of Ph(+) cells as determined by FISH (▲) and Q-RT-PCR (■) in two CML patients on imatinib mesilate. (A) Decrease of malignant clone in time; (B) logarithmic dependence of proportion of Ph(+) cell in time.

pričakovani odgovor na zdravljenje. Meja zaznavanja Q-RT-PCR je  $10^{-5}$ , ko z vgnezdno PCR še zaznamo maligni klon, ne moremo pa ga več količinsko ovrednotiti. Pod vrednostjo razmerja  $10^{-6}$  malignega klona ne moremo več zaznati in z zdravljenjem naj bi dosegli to mejo, t. i. popolno molekularno remisijo. Grafični prikaz podatkov je koristen, ker iz absolutnih vrednosti težje opazimo upočasnitev zmanjšanja deleža malignega klona ali ustavljanje pri določeni vrednosti, ki je sicer majhna (Sl. 1B, bolnik 1).

Ob postavitvi diagnoze KML praviloma določimo zelo velike deleže celic s Ph(+) s FISH kot tudi s standardno citogenetično preiskavo (Razpr. 1). Q-RT-PCR ob postavitvi diagnoze ni v funkciji določitve translokacije same, pač pa ima vlogo pri določitvi izhodiščne srednje vrednosti deleža BCR-ABL/ABL prepisov. Ta je bistvena za določitev obsega molekularnega odziva. Po nekaterih raziskavah je omenjena srednja vrednost ob postavitvi diagnoze nad 1 (100%), kar razlagajo z velikim deležem nezrelih celic (23). Mi smo tako visoko vrednost določili le pri nekaj bolnikih (3/10). Dober molekularni odziv je dosežen, če je delež BCR-ABL/ABL prepisov za tri velikostne razrede manjši od srednje vrednosti, ki smo jo določili pred začetkom zdravljenja na večjem številu bolnikov (25). Srednja vrednost razmerja m-RNK prepisov BCR-ABL/ABL ob postavitvi diagnoze je v našem laboratoriju 0,94 (Razpr. 1). Glede na tako določeno srednjo vrednost lahko govorimo o dobri molekularni remisiji, ko je razmerje BCR-ABL/ABL pod 0,00094. Po tem kriteriju (tri velikostne razrede pod osnovno črto) smo doslej določili dober molekularni odziv pri bolnikih, ki se zdravijo leto in pol ali manj, v 55% (11/20). Mednarodne raziskave navajajo nekoliko manjše (39%) vrednosti (25). Po navedbah nekaterih avtorjev je molekularni odziv dober, če je vrednostjo razmerja m-RNK prepisov pod 0,00045 (26). Tako majhne vrednosti smo določili pri 30% bolnikov. Ker je število razpoložljivih podatkov za določitev izhodiščne povprečne vrednosti zaenkrat majhno in zato velik standardni odklon, predvidevamo, da se bodo s povečevanjem števila podatkov rezultati v prihodnje nekoliko spremenili. Zaenkrat pa pri nas veljajo te navedene vrednosti.

Za sledenje KML v času remisije uporabljamo preiskavo Q-RT-PCR, ki naj bi jo prvi dve leti izvajali na 3 do 6 mesecev, nato pa vsakega pol leta nadaljnji dve leti (27). Pred tem smo citogenetično remisijo KML spremljali s FISH. Odstopanja med rezultati obeh preiskav so precejšnja. Po podatkih iz literature imajo bolniki v popolni citogenetični remisiji vrednost BCR-ABL/ABL pod 1%, v našem primeru pa vrednosti dosegajo tudi 6% (28). Tako veliko odstopanje med metodama gre verjetno pripisati dejstvu, da tehnika FISH za oceno MRD ni primerna. Poleg tega smo šele uvajali preiskavo Q-RT-PCR. Bolniki, ki niso v citogenetični remisiji, imajo le izjemoma vrednost BCR-ABL/ABL pod 1% in tudi mi smo doslej ugotovili le en tak primer. Pri dveh bolnikih, ki sta bila po zgoraj navedenih merilih v dobri molekularno genetični remisiji, je FISH pokazal pozitiven rezultat. Vendar je bil ta zelo majhen (0,5%). V nobenem primeru pa s preiskavo FISH nismo dobili pozitivnega rezultata pri bolnikih, kjer s Q-RT-PCR nismo ugotovili malignega klona, kar je zelo pomembno s stališča zanesljivosti preiskave.

Razpr. 1. Ključni parametri za določitev citogenetične in molekularne remisije pri kronični mieloidni levkemiji z metodama FISH in Q-RT-PCR.

Table 1. Key parameters for determination of cytogenetic and molecular genetic remission at chronic myeloid leukaemia by FISH and Q-RT-PCR.

	Postavitev diagnoze First diagnosis	Prehod v citogenetično remisijo Cytogenetic remission	Dobra molekularna remisija Major molecular remission
Število analiz Number of analysis	10	15	20
Delež Ph(+) celic Amount of Ph(+) cells FISH (%)	*99,1 ± 1,2	0-8	0
Razmerje BCR-ABL/ABL BCR-ABL/ABL ratio Q-RT-PCR	*0,944 ± 0,37	0,15-0,0012	<0,00094 <0,00045
Število bolnikov Number of patients			11/20 (55%) 6/20 (30%)

\* povprečna vrednost / mean value

## Zaključki

Temeljna preiskava pri diagnostiki hematoloških novotvorb je standardna citogenetična preiskava kostnega mozga. Za ciljno potrjevanje pričakovanih kromosomskih nepravilnosti ob odkritju bolezni lahko vzporedno izvajamo tudi preiskavo FISH ter PCR. Ko spremljanje zdravljenje KML velja, da v prvem obdobju do stabilne citogenetične remisije, prisotnost Ph kromosoma ugotavljamo s FISH preiskavo. Pri večini bolnikov, ki jih zdravimo z imatinib mezilatom, je to čas približno enega leta, ko opravimo tri do štiri preiskave FISH. Ko določimo vrednost Ph(+) celic pod 5-10%, začnemo spremljati bolezen s Q-RT-PCR, ki je bolj občutljiva kot FISH. Standardno citogenetično preiskavo ponovimo pri spremembi poteka bolezni za-

radi relativno pogostega pojavljanja dodatnih kromosomskih nepravilnosti, ki jih z molekularno genetičnimi preiskavami ne zasledimo. Pri bolnikih z akutno levkemijo, pri katerih smo ugotovili kromosomske spremembe, je v obdobju remisije raven malignega kлона tako majhna, da je najprimernejša preiskava PCR. Zaradi velike občutljivosti je kvantitativna ali vgnedena PCR preiskava zaenkrat tako dobra, da pri bolnikih, kjer z njo ne zaznamo prisotnosti malignega kлона, lahko zanesljivo napovemo ugoden potek bolezni.

## Literatura

- Braziel ML, Shipp MA, Feldman AL et al. Molecular diagnostics. In: Broudy VC, Prchal JT, Tricot GJ eds. Hematology 2003. San Diego: American Society of Hematology, 2003: 279-93.
- Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* 2002; 100: 2292-302.
- Chen Z, Sandberg AA. Molecular cytogenetic aspects of hematological malignancies: Clinical implications. *Am J Med Gen* 2002; 115: 130-41.
- Lo Coco F, De Santis S, Esposito A, Divona M, Diverio D. Molecular monitoring of hematologic malignancies and future issues. *Semin Hematol* 2002; 39: 14-7.
- Dastugue N. The interest of standard and molecular cytogenetics for diagnosis of acute leukemia. *Pathol Biol* 2003; 51: 337-45.
- Schlegelberger B, Metzke S, Harder S, Zuhlke-Jenisch R, Zhang Y, Siebert R. Classical and molecular cytogenetics of tumor cells. In: Wegner RD ed. *Diagnostic cytogenetics*. Berlin: Springer, 1999: 151-85.
- Jameson JL, Kopp P. Principles of human genetics. In: Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL eds. *Principles of internal medicine*. 15<sup>th</sup> edition. New York: McGraw-Hill, 2001: 375-418.
- Kjeldsen E, Kolvraa S. FISH Technique, FISH probes and their application in medicine and Biology - An Overview. In: Raaustenstrauss BW, Liehr T eds. *FISH Technology*. Berlin: Springer, 2002: 3-50.
- Liebisch P, Viardot A, Baßermann N et al. Value of comparative genomic hybridization and fluorescence in situ hybridization for molecular diagnostics in multiple myeloma. *Br J Haematol* 2003; 122: 193-201.
- Bernasconi P, Cavigliano PM, Boni M et al. Is FISH a relevant prognostic tool in myelodysplastic syndromes with a normal chromosome pattern on conventional cytogenetics? A study on 57 patients. *Leukemia* 2003; 17: 2107-12.
- Drach J, Schuster J, Nowotny H et al. Multiple myeloma: high incidence of chromosomal aneuploidy as detected by interphase fluorescence in situ hybridization. *Cancer Res* 1995; 55: 3854-9.
- Roulston D, Le Beau MM. Cytogenetic analysis of hematologic malignant diseases. In: Barch MJ, Knutsen T, Spurbeck JL eds. *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual*. 3<sup>rd</sup> ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997: 325-55.
- Martin-Subero JI, Gesk S, Harder L, Grote W, Siebert R. Interphase cytogenetics of hematological neoplasms under the perspective of the novel WHO classification. *Anticancer Res* 2003; 23: 1139-48.
- Kowalczyk JR, Gaworczyk A, Winnicka D, Lejman M, Babicz M. Fluorescence in situ hybridization BCR/ABL fusion signal rate in interphase nuclei of healthy volunteer donors: a test study for establishing false positive rate. *Cancer Genet Cytogenet* 2003; 142: 51-5.
- Reinhold U, Hennig E, Leiblein S, Niederwieser D, Deininger MW. FISH for BCR-ABL on interphases of peripheral blood neutrophils but not of unselected white cells correlates with bone marrow cytogenetics in CML patients treated with imatinib. *Leukemia* 2003; 17: 1925-9.
- Van Dongen JJ, Macintyre EA, Gabert JA et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia* 1999; 13: 1901-28.
- Anon. mD<sub>3</sub> HemaVision Multiplex RT-PCR System for Typing/Subtyping of leukemia BIO RAD, Instruction manual, 2001.
- Wetzler M, Byrd JC, Bloomfield CD. Acute and chronic myeloid leukemia. In: Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL eds. *Principles of internal medicine*, 15<sup>th</sup> edition. New York, McGraw-Hill, 2001; 706-14.
- Anon. ABI Prism 7900HT. Sequence Detection System and SDS Enterprise Databased. Applied Biosystem, User Guide, 2002.
- Anon. High Pure RNA Isolation kit, ROCHE, Instruction manual, 2000.
- Gabert JA, Beillard EBW. European standardization and quality control programs of REAL-Time RT-PCR for minimal residual disease detection of fusion gene transcripts in multicentric disease of fusion gene transcripts in multicentric therapeutic trails for leukemia patients. *Blood* 2000; 96: 311a.
- Branford S, Hughes TP, Rudzki Z. Monitoring chronic myeloid leukaemia therapy by real-time quantitative PCR in blood is a reliable alternative to bone marrow cytogenetics. *British J Haematology* 1999; 107: 587-99.
- O'Brien SG, Guilhot F, Larson RA et al. Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *Engl J Med* 2003; 348: 994-1004.
- Melo JV, Hughes TP, Apperley JF. Chronic myeloid leukemia. In: Broudy VC, Prchal JT, Tricot GJ eds. *Hematology* 2003. San Diego: American society of Hematology; 2003: 132-52.
- Hochhaus A, Reiter A, Saulele S et al. Molecular heterogeneity in complete cytogenetic responders after interferon-x therapy for chronic myelogenous leukemia: low levels of minimal residual disease are associated with continuing remission. *Blood* 2000; 95: 62-6.
- Löwenberg B, Griffin JD, Tallman S. Acute myeloid leukemia and acute promyelocytic leukemia. In: Broudy VC, Prchal JT, Tricot GJ eds. *Hematology* 2003. San Diego: American society of Hematology, 2003: 82-101.
- Hughes T, Branford S. Molecular monitoring of chronic myeloid leukemia. *Semin Hematol* 2003; 40: 62-8.