

WYKRYWANIE MINIMALNEJ CHOROBY RESZTKOWEJ W OSTREJ BIAŁACZCE LIMFOBLASTYCZNEJ U DZIECI

DETECTION OF MINIMAL RESIDUAL DISEASE
IN ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA IN CHILDREN

Tomasz SZCZEPAŃSKI¹, Anna PITUCH-NOWOROLSKA², Bogdan MAZUR³

¹Katedra i Klinika Pediatrii, Hematologii i Onkologii Dziecięcej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego, ²Zakład Immunologii Klinicznej, Polsko-Amerykański Instytut Pediatrii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, ³Katedra i Zakład Mikrobiologii i Immunologii Śląskiego Uniwersytetu Medycznego

Streszczenie: Wykrywanie choroby resztkowej metodą cytometrii przepływowej jest oparte o określenie immunofenotypu komórek białaczkowych w okresie diagnostycznym ze szczególnym uwzględnieniem zaburzeń ilościowych i jakościowych ekspresji determinant. Największe znaczenie ma wykrywanie choroby resztkowej w okresie uzyskania pierwszej remisji. Omówiono o również szczegółowo problemy z oceną choroby resztkowej i interpretacją uzyskanych wyników w ostrej białaczce limfoblastycznej z linii limfocytu B i T.

Summary: Detection of minimal residual disease (MRD) in acute lymphoblastic leukemia with flow cytometry is based on precise description of leukemia cell at diagnosis including aberrant expression of determinants. The important clinical significance of MRD is in time of obtaining the first remission of acute leukemia. The problems with MRD assay and interpretation of results in acute lymphoblastic B and T leukemia are discussed.

Określenie minimalna choroba resztkowa – MRD (ang. *minimal residual disease*) dotyczy komórek białaczkowych, które w ilości śladowej przetrwały stosowane leczenie przeciwnowotworowe. Do wykrywania ich obecności w ostrej białaczce limfoblastycznej – ALL (ang. *acute lymphoblastic leukemia*) stosuje się dwie metodyki – molekularną i cytometryczną. W cytometrii przepływowej poszukiwanie MRD wymaga technik zwanych technikami populacji śladowych (*rare events technique*), dzięki którym można wykrywać komórki białaczkowe z czułością 1: 10000 – 1: 100000 (10^{-4} do 10^{-5}). Do wykazania obecności komórek stanowiących śladową populację potrzebne są odpowiednie techniki ułatwiające poszukiwania

pojedynczych komórek. Istnieją możliwości „zagęszczenia” tych populacji komórkowych, które potencjalnie zawierają w sobie poszukiwane komórki – jest to możliwość „ograniczania” (bramkowania) określonych populacji komputerowo po zbiorze wysokiej liczby komórek (np. 500 000–1000 000) lub wstępnego sortowania i analizy wysortowanej populacji. Zaletą metody komputerowego ograniczania badanych populacji lub ich selekcjonowania na podstawie ekspresji determinant restrykcyjnych dla danej populacji komórek jest to, że oceniamy cały materiał przy okazji badając szpik w danej fazie leczenia chorego. Wadą jest konieczność opracowywania zbiorów dużych, co może spowolnić pracę komputera. Ze względu na specyfikę metodyki cytometrii przepływowej, dla pewności wykrycia MRD konieczna jest obecność zgrupowania co najmniej 10–20 komórek o immunofenotypie białaczkowo-swoistym. Stąd nawet przy wprowadzeniu do cytometru miliona komórek, maksymalna czułość metody nie przekroczy 10^{-5} , a najczęściej oscyluje wokół 10^{-4} . Metoda komputerowego ograniczania badanych populacji jest w chwili obecnej najczęściej stosowaną techniką wykrywania MRD w ALL z zastosowaniem cytometrii przepływowej. Zaletą metody wstępnego sortowania jest zmniejszenie ilości badanego materiału do populacji zawierającej poszukiwane komórki. Wadą metod wykorzystujących sortowanie jest czasochłonność, konieczność posiadania sortera (i związany z tym duży koszt badania) i co najważniejsze możliwość „zgubienia”, uszkodzenia poszukiwanych komórek, co w efekcie prowadzi do fałszywie negatywnego wyniku badania. Dlatego metoda ta nie znalazła do tej pory powszechniejszego zastosowania w prospektywnych badaniach nad MRD w ALL.

Obowiązująca klasyfikacja immunologiczna ALL wyróżnia dwie główne jednostki chorobowe, tj. ALL z komórek prekursorowych limfocytów B (BCP-ALL) i ALL z komórek prekursorowych limfocytów T (T-ALL), a w ich obrębie szereg podtypów (tab. 1 i 2). Określenia immunofenotypów dokonuje się na podstawie standardowych zestawów przeciwciał z wykorzystaniem wielokolorowej cytometrii przepływowej.

TABELA 1. Charakterystyka immunofenotypowa ALL z komórek prekursorowych limfocytów B

Markery	pro-B-ALL	common ALL	pre-B-ALL	transitional-pre-B-ALL ^a
TdT	++	++	++	++
CD10	–	++	++	++
CD19	++	++	++	++
CD20	–	+	+	+
CD22	++	++	++	++
CyCD79	++	++	++	++
Pre-B CyIg μ	–	–	++	++
SmVpre-B/ λ 5	–	–	–	++
SmIg-CD79	–	–	–	++
CD34	+	+	+	+
HLA-DR	++	++	++	++

Symbole: – <10% białaczek wykazuje ekspresję; + 25–75% białaczek wykazuje ekspresję; ++ >75% białaczek wykazuje ekspresję. ^a~5% pacjentów z pre-B-ALL ma "transitional pre-B-ALL", którą definiuje się w sytuacji jednoczesnej ekspresji pre-B CyIg μ i powierzchniowej ekspresji na błonie komórkowej kompleksu pre-B (pre-B SmIg μ -D79) bez ekspresji dojrzałych łańcuchów lekkich κ lub λ .

TABELA 2. Charakterystyka immunofenotypowa ALL z komórek prekursorowych limfocytów T

Markers	immature T-ALL		common thymocytic T-ALL		mature T-ALL
	prothymocytic (pre-T-ALL)	immature thymocytic	Sm CD3 ⁻	Sm CD3 ⁺	
TdT	++	++	++	++	++
CD1	-	-	++	++	-
CD2	+	++	++	++	++
CyCD3	++	++	++	++	++
SmCD3	-	-	-	++	++
CD4 ⁻ /CD8 ⁻	++	+	-	-	-
CD4 ⁺ /CD8 ⁻	-	±	±	±	+
CD4 ⁻ /CD8 ⁺	-	±	±	±	±
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	-	-	+	+	±
CD5	-	++	++	++	++
CD7	++	++	++	++	++
TCR αβ	-	-	-	60%–70%	
TCR γδ	-	-	-	30%–40%	
HLA-DR	+	-	-	-	-

Symbole: - <10% białaczek wykazuje ekspresję; ± 10–25% białaczek wykazuje ekspresję;
+ 25–75% białaczek wykazuje ekspresję; ++ >75% białaczek wykazuje ekspresję

Poszukiwanie komórek białaczkowych wśród populacji prawidłowych komórek hematopoetycznych różni się dla dwóch głównych podtypów. Do elektronicznego bramkowania poszukiwanych populacji wykorzystuje się ekspresję determinant restrykcyjnych dla danej linii limfoidalnej. Ich obecność można wykazać zarówno w cytoplazmie (CD3 dla T-ALL i CD79a, CD22 dla BCP-ALL), jak i na powierzchni komórek (odpowiednio CD3 i/lub CD7 dla T-ALL lub CD19, CD22 dla BCP-ALL). Dobór przeciwciał zależy od podstawowego immunofenotypu komórek białaczkowych określonego przy rozpoznaniu choroby. Wykrywanie choroby resztkowej jest możliwe dzięki temu, że w porównaniu do prawidłowych komórek prekursorowych limfocytów, limfoblasty białaczkowe wykazują zaburzenia ekspresji determinant na powierzchni komórek (brak lub dodatkowa ekspresja), co określa się mianem immunofenotypu białaczkowo-swoistego bądź nietypowego. Podział immuno-fenotypów nietypowych obejmuje immunofenotypy niepełne, ko-ekspresję, asynchronię i fenotypy ektopowe.

W BCP-ALL występują następujące immunofenotypy atypowe:

- niepełny – najczęstszą formą tego zaburzenia immunofenotypu jest brak ekspresji CD45 (zwłaszcza izoformy CD45RA) czy HLA-DR, ale można również czasami stwierdzić niższą ekspresję CD19 (zmiany ilościowe);
- nadmierna ekspresja antygenu, np. hiperekspresja CD10 lub CD58;
- ko-ekspresje – ekspresja determinant dodatkowych z innych linii (np. determinant mieloidalnych na co najmniej 20% komórek białaczkowych); ten typ zaburzeń immunofenotypu jest najczęstszy;
- immunofenotyp asynchroniczny – równoczesne występowanie determinant typowych dla wczesnych etapów ontogenezy komórek danej linii i determinant

TABELA 3. Przykładowe zestawienie przeciwciał dla wykazania obecności choroby resztkowej w ostrej białaczce limfoblastycznej z komórek prekursorowych limfocytów B i T z wykorzystaniem 4 fluorochromów

Immunofenotyp	Poszukiwanie choroby resztkowej
ALL z komórek prekursorowych limfocytów B (BCP-ALL)	CD19/CD34/CD10/CD58 CD19/CD34/CD10/TdT CD19/CD34/CD10/CD38 CD19/CD34/CD10/CD45 CD19/CD34/CD10/CD22 CD19/CD20/CD34/CD10 CD19/CD34/CD10/CD13 (lub CD33, CD15) CD19/CD34/CD10/CD66c CD19/CD45/CD9/CD34 CD19/CD45/CD10/CD20 CD19/CD34/CD10/NG2
ALL z komórek prekursorowych limfocytów T (T-ALL)	CD3/CD5/CD34/CD7 CD3/CD5/cytCD3/TdT CD3/CD7/cytCD3/TdT CD3/CD5/CD99/CD7

typowych dla dojrzałych etapów, np. dla limfocytu B będzie to stwierdzenie ekspresji CD20 na komórkach CD45⁻, czy ekspresji CD34 i łańcuchów immunoglobulin na tych samych komórkach;

– immunofenotyp ektopowy – ekspresja białka NG2 (normalnie niewystępującego na komórkach hematopoetycznych) na komórkach BCP-ALL z rearanżacją genu MLL.

W dobie wieloparametrycznej cytometrii przepływowej do monitorowania MRD w BCP-ALL wykorzystuje się zaburzenia ilościowe, tj. zmienioną ekspresję determinant typowych, np. CD19, CD20, CD22, CD10, CD38, TdT itd. Komórki białaczkowe zajmują puste przestrzenie (*empty space*), pomiędzy prawidłowymi komórkami prekursorowymi limfocytów B. Tabela 3 zawiera przykładowe zestawienia przeciwciał do monitorowania MRD z wykorzystaniem 4 fluorochromów.

W T-ALL wykrywanie MRD jest możliwe u około 90% pacjentów dzięki zastosowaniu jednoczesnego monitorowania ekspresji TdT i antygenów T-komórkowych (tab. 3). U zdrowych ludzi jednoczesną ekspresję TdT i markerów T-komórkowych stwierdza się wyłącznie na tymocytach w grasicy, komórki o takim fenotypie są niezmiernie rzadkie w szpiku kostnym i krwi obwodowej. Jeśli już stwierdzi się jednoczesną ekspresję TdT i markerów T-komórkowych, z reguły dotyczy to CD2 i/lub CD7, natomiast ekspresja TdT i CD3, CD4, CD5 czy CD8 jest białaczkowo-swoista. W T-ALL możliwe jest również monitorowanie MRD poprzez wykrywanie za pomocą cytometrii przepływowej asynchronicznej ekspresji antygenów (np. CD34⁺/CD3⁺) czy nadmiernej ekspresji antygenów (np. CD7⁺⁺, CD99⁺⁺). Podobnie jak w BCP-ALL wieloparametryczna cytometria przepływowa wykazuje, że blasty T-ALL zajmują puste przestrzenie pomiędzy normalnymi komórkami prekursorowymi limfocytów T. Łączne

zastosowanie różnych immunofenotypów białaczkowo-swoistych pozwala na wykrywanie MRD praktycznie u wszystkich pacjentów z T-ALL.

Jednym z potencjalnych problemów monitorowania MRD u pacjentów z ALL metodą cytometrii przepływowej jest ewolucja fenotypu komórek białaczkowych w trakcie leczenia. Dlatego aby zapobiec wynikom fałszywie ujemnym, powinno się monitorować u każdego z pacjentów co najmniej dwa immunofenotypy białaczkowo-swoiste.

Monitorowanie MRD na wczesnym etapie leczenia ALL dostarcza znamiennej informacji prognostycznej, nadrzędnej w stosunku do wszystkich klasycznych czynników prognostycznych, takich jak: wiek przy rozpoznaniu choroby, liczba blastów we krwi, immunofenotyp, obecność aberracji chromosomowych, odpowiedź na profazę sterydową. Prospektywne badania w dziecięcej ALL wykazały, że najistotniejszą informację dostarcza wykrywanie MRD w szpiku kostnym przy zakończeniu leczenia indukującego remisję. Rokowanie u dzieci, u których nie stwierdza się MRD przy zakończeniu indukcji, jest bardzo dobre i obecnie rozważa się u nich zmniejszenie intensywności leczenia. Natomiast dzieci z wysokimi poziomami MRD przy zakończeniu indukcji wymagają intensyfikacji leczenia czy nawet eksperymentalnego zastosowania nowych leków, zwłaszcza jeśli wysokie poziomy MRD utrzymują się w trakcie leczenia konsolidującego remisję. Równie istotne znaczenie prognostyczne ma monitorowanie MRD u dzieci z ALL wysokiego ryzyka poddawanych allogenicznemu HSCT i u pacjentów po wznowie ALL. Ponadto wykazano, że poprzez monitorowanie MRD można uzyskać znamiennej informacji prognostycznej u dorosłych pacjentów z ALL standardowego ryzyka.

Ciągły pomiar MRD u pacjentów z ALL wykazuje, że stałe obniżanie wartości MRD do zera związane jest z pomyślnym rokowaniem, natomiast utrzymywanie się wysokich wartości MRD z reguły prowadzi do wznowy choroby. Ciągłe monitorowanie MRD z reguły wykazuje wzrost jej wartości przed klinicznymi objawami wznowy choroby. Jednakże, czasokres pomiędzy ponownym pojawieniem się lub wzrostem wartości MRD i wznową choroby może być zbyt krótki na zastosowanie skutecznego leczenia re-indukującego remisję. Należy podkreślić, że brak MRD przy zakończeniu leczenia nie jest równoznaczny z pełnym wyleczeniem pacjenta. Pomimo wysokiej czułości technik do wykrywania MRD, brak MRD nie jest równoznaczny z pełną eliminacją klonu białaczkowego, ponieważ każda z analiz bada tylko niewielką frakcję komórek szpiku kostnego. Wyniki badań prospektywnych opartych na dużych grupach pacjentów wykazały utrzymywanie się MRD przy zakończeniu leczenia u około 10% pacjentów; u większości pacjentów z MRD doszło w późniejszym okresie do wznowy ALL. Tak więc, ciągłe monitorowanie MRD w ALL ma mniejsze znaczenie i może mieć wartość kliniczną jedynie dla pacjentów wykazujących względnie opóźnioną odpowiedź na leczenie.

Ponieważ szereg analiz potwierdziło znamienność prognostyczną MRD przy zakończeniu leczenia indukującego remisję, rozpoczęto szereg prospektywnych programów leczenia ALL, głównie u dzieci, których podstawowym elementem jest modyfikacja leczenia w zależności od wielkości MRD. To dopiero pozwoli odpowiedzieć na pytanie, czy poprzez czulsze monitorowanie leczenia z zastosowaniem wiedzy o MRD można będzie poprawić wyniki leczenia ALL.

LITERATURA

- [1] BENE MC, CASTOLDI G, KNAPP W, LUDWIG WD, MATUTES E, ORFAO A, VAN'T VEER MB. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia* 1995; **9**: 1783–1786.
- [2] BOROWITZ MJ, PULLEN DJ, SHUSTER JJ, VISWANATHA D, MONTGOMERY K, WILLMAN CL, CAMITTA B. Minimal residual disease detection in childhood precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2003; **17**: 1566–1572.
- [3] CAMPANA D. Determination of minimal residual disease in leukaemia patients. Review. *Brit J Haematol* 2003; **121**: 823–838.
- [4] CAMPANA D, COUSTAN-SMITH E. Minimal residual disease studies by flow cytometry in acute leukemia. *Acta Haematol* 2004; **112**: 8–15.
- [5] COUSTAN-SMITH E, BEHM FG, SANCHEZ J, BOYETT JM, HANCOCK ML, RAIMONDI SC, RUBNITZ JE, RIVERA GK, SANDLUND JT, PUI CH-H, CAMPANA D. Immunological detection of minimal residual disease in children with acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 1998; **351**: 550–554.
- [6] DWORZAK MN, FRITISCH G, FLEISCHER C, PRINTZ D, FROESCHL G, BUCHINGER P, MANN G, GADNER H. Multiparameter phenotype mapping of normal and post-chemotherapy B lymphopoiesis in pediatric bone marrow. *Leukemia* 1997; **11**: 1266–1273.
- [7] GAIPA G, BASSO G, MAGLIA O, LEONI V, CAZZANIGA G, BUGARIN C, VELTRONI M, MICHELOTTO B, RATEI R, COLIVA T, VALSECCHI MG, BIONDI MN. Drug-induced immunophenotypic modulation in childhood ALL. *Leukemia* 2005; **19**: 49–56.
- [8] LUCIO P, PARREIRA A, VAN DEN BEEMD MW, VAN LOCHEM EG, VAN WERING ER, BAARS E, PORWIT-MACDONALD A, BJORKLUND E, GAIPA G, BIONDI A, ORFAO A, JANOSSY G, VAN DONGEN JJM, SAN MIGUEL JF. Flow cytometric analysis of normal B cell differentiation: a frame of reference for the detection of minimal residual disease in precursor-B-ALL. *Leukemia* 1999; **13**: 419–427.
- [9] PORWIT-MACDONALD A, BJORKLUND E, LUCIO P, VAN LOCHEM EG, MAZUR J, PARREIRA A, VAN DEN BEEMD MW, VAN WERING ER, BAARS E, GAIPA G, BIONDI A, CIUDAD J, VAN DONGEN JJM, SAN MIGUEL JF, ORFAO A. BIOMED-1 concerted action report: flow cytometric characterization of CD7+ cell subsets in normal bone marrow as a basis for the diagnosis and follow-up of T cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL). *Leukemia* 2000; **14**: 816–825.
- [10] SZCZEPAŃSKI T. Why and how to quantify minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia? *Leukemia* 2007; **21**: 622–626.
- [11] SZCZEPAŃSKI T, VAN DER VELDEN VH, VAN DONGEN JJM. Flow-cytometric immunophenotyping of normal and malignant lymphocytes. *Clin Chem Lab Med* 2006; **44**: 775–796.
- [12] VAN WERING ER, BEISHUIZEN A, ROEFFEN ET, VAN DER LINDEN-SCHREVER BE, VERHOEVEN MA, HAHLEN K, HOOIJKAAS H, VAN DONGEN JJM. Immunophenotypic changes between diagnosis and relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 1995; **9**: 1523–1533.

Tomasz Szczepański

Katedra i Klinika Pediatrii, Hematologii i Onkologii Dziecięcej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego, ul. 3 Maja 13/15, 41-800 Zabrze

E-mail: szczep57@poczta.onet.pl

Anna Pituch-Noworolska

Zakład Immunologii Klinicznej, Polsko-Amerykański Instytut Pediatrii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego

Ul. Wielicka 265, 30-663 Kraków

E-mail: mipituch@cyf-kr.edu.pl

Bogdan Mazur

Katedra i Zakład Mikrobiologii i Immunologii Śląskiego Uniwersytetu Medycznego ul. Jordana 19, 41-808 Zabrze

E-mail: bmazur@slam.katowice.pl