

Laboratorijska hematologija v lovu za majhnimi kloni – določanje merljivega preostanka bolezni (MRD)

Laboratory hematology in the hunt for small clones – Determination of measurable residual disease (MRD)

Katarina Reberšek¹, Sandra Šučurović¹, Helena Podgornik^{1,2}

¹Univerzitetni klinični center Ljubljana, Klinični oddelek za hematologijo

²Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo

Avtor za korespondenco:

Doc. dr. Helena Podgornik, spec. med. biokem., spec. lab. med. gen.

Univerzitetni klinični center Ljubljana, Klinični oddelek za hematologijo, Zaloška 7, 1000 Ljubljana

e-pošta: helena.podgornik@kclj.si

POVZETEK

Merljivi preostanek bolezni (MRD) so levkemične celice, preostale po zdravljenju, ki so biološko zmožne povzročiti ponovitev bolezni v določenem časovnem intervalu. Te celice so tako merilo tumorskega bremena kot tudi neposredni vzrok ponovitve bolezni. V ta namen potrebujemo izjemno občutljive in specifične načine preiskovanja.

Ustrezno občutljivost za določanje MRD izpolnjujejo molekularno genetske metode in večbarvna pretočna citometrija. Med metodami molekularne genetike je najbolj uveljavljen kvantitativni RT-PCR. Pri pretočni citometriji ciljno občutljivost dosežemo tako, da preštejemo zelo veliko število celic. Specifičnost zaznavanja levkemičnega klona je pogojena z uporabo stabilnih označevalcev bolezni, ki jih praviloma prepoznamo ob postavitvi diagnoze in jih nato iščemo ob periodičnem določanju MRD. Ustrezni genet-

ski označevalci so bodisi fuzijski ali mutirani geni, pri določanju s pretočno citometrijo pa specifični imunofenotip levkemičnih celic.

MRD ne glede na uporabljen metodo podajamo v odstotkih. Za zanesljivost rezultata je bistvenega pomena, da je kakovost vzorca čim boljša. Pri večini krvnih bolezni je občutljivost zaznavanja MRD boljša v kostnem mozgu kot v venski krvi in ključno je, da je način določanja standardiziran. Glede na vrsto bolezni se razlikujejo prazne vrednosti za interpretacijo kliničnega pomena MRD, časovni intervali določanja MRD ter predpisan klinični poseg, temelječ na rezultatih določanja MRD.

Ključne besede: merljivi preostanek bolezni, MRD, pretočna citometrija, qPCR

»

ABSTRACT

Measurable residual disease (MRD) are leukemia cells remaining after treatment that are biologically capable of causing a relapse of disease over a period of time. These cells are both a measure of tumor burden and a direct cause of disease recurrence. Therefore, we need extremely sensitive and specific analytical methods.

Molecular genetic methods and multicolor flow cytometry meet the appropriate sensitivity for MRD determination. Among the molecular genetic methods, quantitative RT-PCR is the most widely used. In flow cytometry, a large number of cells must be counted to achieve the target sensitivity. The specificity of leukemic clone detection is based on the use of stable markers of the disease, which are usually identified at the time of diagnosis and then sought at the periodic determination of MRD. Relevant genetic markers are either fusion or mutated genes

and, when determined by flow cytometry, the specific immunophenotype of leukemic cells.

Regardless of the method used, the MRD is given as a percentage. For the reliability of the result, it is essential that the quality of the sample is as good as possible. In most blood cancers, the sensitivity of MRD detection is better when analysed in the bone marrow than in the venous blood, and it is crucial that the method is standardized. Depending on the type of disease, cut-off values for the interpretation of the clinical significance of MRD, time intervals for determining MRD and clinical intervention based on the results of MRD determination differ.

Key words: measurable residual disease, MRD, flow cytometry, qPCR

UVOD

Merljivi preostanek bolezni (MRD) so levkemične celice, preostale po zaključeni kemo-, imuno-, radioterapiji, ki so biološko zmožne povzročiti ponovitev bolezni v določenem časovnem intervalu (1). Te celice so tako merilo tumorskega bremena kot tudi neposredni vzrok ponovitve bolezni. Periodična preverjanja odziva na zdravljenje dajo informacijo o občutljivosti levkemičnih celic na kemoterapijo in učinkovitosti celotnega zdravljenja ter usmerjajo nadaljnjo izbiro zdravljenja (2). Pri levkemijah so MRD lahko tako ostanki izvornih levkemičnih celic, ki so povzročile bolezen, kot tudi sekundarne levkemične celice, ki so nastale s selekcijo klonov ali transformacijo primarnih levkemičnih celic (2). Zgodovinsko je v hematologiji prepoznavanju ostanka bolezni služil citomorfološki pregled kostnega mozga, ki pa ima zelo majhno občutljivost in specifičnost. V zadnjih dvajsetih letih je bilo zato v razvoj dovolj občutljivih in specifičnih metod za določanje MRD vloženo ogromno napora (3). Sprva uveljavljeni izraz minimalni preostanek bolezni je v zadnjih letih zamenjal ustrežnejši izraz merljivi preostanek bolezni, ki opozarja na omejitve zaznavanja klona z občutljivostjo metode.

Idealni test določanja MRD naj bi natančno kvantificiral levkemične celice. Zahteve, ki jim mora ustrezati metoda določanja MRD, so naslednje (3):

- Velika občutljivost. Občutljivost določanja MRD mora biti najmanj 1 levkemična celica med 10 000 levkociti, kar je izraženo s potenco 1×10^{-4} , v deležu pa 0,01 %.
- Velika specifičnost. Metoda mora zagotavljati zanesljivo ločevanje med levkemičnimi in normalnimi celicami.
- Hitrost. Rezultat mora biti na voljo v razumno kratkem času, ker je od tega odvisno prilagajanje terapije.
- Dovoljšna robustnost, ki omogoča medlaboratorijsko primerjavo.

Merilo ustrezne občutljivosti izpolnjujeta dva načina določanja, in sicer molekularno genetske metode in večbarvna pretočna citometrija (MFC). Ti dve metodi izpolnjujeta tudi zahtevi po hitrosti in robustnosti izvedbe. Specifičnost metode oziroma zanesljivo razlikovanje med levke- »

mičnimi in nelevkemičnimi celicami temelji na ustreznem označevalcu levkemične celice, ki ga praviloma prepoznamo ob diagnozi. Med zdravljenjem ali po njem nato temu označevalcu sledimo. Glede na to so označevalci določanja MRD bodisi povezani s specifičnim imunofenotipom (LAIP – leukemia associated immunophenotype) oziroma z genetskimi posebnostmi levkemične celice.

Ujemanje med rezultati MRD, pridobljenimi s pomočjo MFC, ali molekularno genetskimi metodami je praviloma zelo dobro; pri prazni vrednosti 0,01 % je večje od 90 % (3). Večino razlik gre pripisati približno za desetiški logaritem večji občutljivosti molekularne genetike. Za zdaj imata oba načina svoje prednosti in slabosti, nobeden od njiju pa ni povsem specifičen in občutljiv za napoved ponovitve bolezni (1).

Ko imamo torej ustrezno tehniko in ustrezen označevalec, je za kakovost in uporabnost MRD ključno še (4):

- Standardizacija določanja. Z jasno postavljenimi smernicami se izboljšujeta tudi standardizacija in medlaboratorijska primerljivost.
- Določitev klinične prazne vrednosti, ki je povezana bodisi s preživetjem do napredovanja bolezni bodisi s celokupnim preživetjem. Ključni rezultat določanja MRD je zaznaven ali nezaznaven MRD, ki ga interpretiramo glede na klinično prazno vrednost.
- Časovni intervali določanja. Ti so odvisni tako od posamezne bolezni kot od uporabljene sheme zdravljenja ter tkiva, v katerem se MRD določa.
- Klinični poseg, temelječ na rezultatih določanja MRD. Če MRD ne vpliva na klinične odločitve, tudi njegovo določanje nima smisla.

DOLOČANJE MRD S PRETOČNO CITOMETRIJO

Že pred klinično uporabo pretočne citometrije je fluorescenčna mikroskopija pokazala imunofenotipske posebnosti levkemičnih celic, vendar ta metoda ni dovolj občutljiva za določanje MRD. Dovoljšno občutljivost omogoča kombinacija številnih fluorokromov na isti celici, kar je omogočila uporaba MFC. Za določanje MRD je priporočena istočasna uporaba vsaj 8 barv (5). Uporaba najustrežnejših LAIP pri MFC je konceptualno različna glede na značilnosti posamezne bolezni. Pri akutni limfoblastni levkemiji T (T-ALL) npr. zadošča že zaznavanje nezrelih celic v kostnem mozgu, ker normalne nezrele timocite sicer najdemo le v priželjcu. Torej ne gre za pravi LAIP, pač pa za specifično najdbo glede na kompartment. Nasprotno pa limfoblaste B najdemo tudi v normalnem kostnem mozgu, ob regeneraciji pa se lahko njihov delež izrazito poveča. Torej potrebujemo pri B-ALL specifičen levkemični odtis oziroma LAIP (3). LAIP je lahko aberantno izražanje določenih označevalcev, ki jih pri normalnih celicah iste vrste sicer ne najdemo, lahko opazimo asinhronizem, pri katerem najdemo antigene, značilne za zrele celice na nezrelih levkemičnih celicah, lahko pa gre tudi za prekomerno ali znižano izražanje ali celo izgubo antigenov, ki so normalno izraženi na izbrani celični liniji. Čim bolj imunofenotip odstopa od normalnega, tem bolj specifično je zaznavanje MRD. Zato so v pretočni citometriji dodajani vedno novi označevalci, ki omogočijo natančnejšo opredelitev LAIP. Diagnostični vzorec je pri tem izjemne-

ga pomena, ker je sicer kasnejše zaznavanje MRD zelo nezanesljivo. Pri otroških ALL ima LAIP npr. kar 98 % vseh bolnikov, kar omogoča dovolj občutljivo sledenje MRD pri domala vseh bolnikih. Prav tako ga ima že izhodiščno limfocit pri kronični limfocitni levkemiji (KLL), pri akutni mieloblastni levkemiji (AML) pa le del bolnikov.

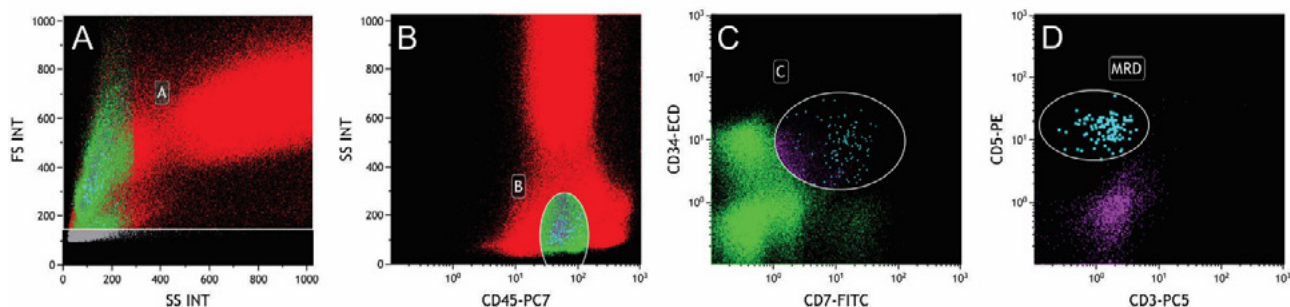
V vsakem izvidu podamo število vseh analiziranih celic in/ali število CD45+ celic (levkocitov), spodnjo mejo zaznave (LOD) in spodnjo mejo kvantifikacije (LOQ). S pretočno citometrijo lahko zaznamo klon, ko populacijo z določenim imunofenotipom sestavlja najmanj 20 celic, kvantificiramo jih lahko, ko je v zaznanem klonu najmanj 50 celic. Kvantitativni rezultat MRD (%) izdamo izključno nad mejo kvantifikacije (LOQ) in je razmerje med številom celic klona ter številom vseh analiziranih celic oziroma levkocitov (CD45 pozitivne celice) pomnoženo s 100. LOD, LOQ ter interpretacija rezultata so tako neposredno odvisni od števila vseh analiziranih celic. Za doseganje ciljne občutljivosti je priporočljivo, da preštejemo med 500000 in 1000000 celic (5). Zato je kakovost vzorca bistvenega pomena, občutljivost zaznave pa znatno znižuje hemodilucija oziroma premajhna količina vzorca.

Pristop k določanju MRD z MFC se med laboratoriji lahko nekoliko razlikuje (način zamejevanja, izbira klonov, fluo- »

rokromov, posebnosti aparata). Ne glede na to pa mora biti končni rezultat medlaboratorijsko povsem primerljiv. Zanesljivost in primerljivost rezultatov potrjujejo tudi sheme mednarodnih kontrol, ki so za MRD pri številnih boleznih že dostopne. Gre torej za zelo zanesljivo in medlaboratorijsko primerljivo metodo, zato se je tudi široko uveljavila.

MRD AML. Za določevanje MRD pri bolnikih z AML uporabimo označevalce, ki so značilni za nezrele celice (CD34, CD117), v kombinaciji z označevalci, ki so aberantno izraženi na mieloblastih (CD2, CD7, CD19, CD56). Če je bila izhodiščno postavljena diagnoza akutne monocitne ali mielomonocitne levkemije, uporabimo označevalce, ki so značilni za monocitno vrsto, da določimo delež monocitne vrste v analiziranem vzorcu. Če pri analizi MRD zaznamo levkemične celice in je njihov delež nad 0,1 %, izdamo izvid kot zaznaven MRD. Če je njihov delež pod 0,1 %, je klinični pomen teh preostalih celic zaenkrat neznan, saj je pod klinično prazno vrednostjo. Če levkemičnih celic ne zaznamo, izdamo izvid kot nezaznaven MRD (5).

MRD ALL. MFC je uporabna za določanje MRD pri veliki večini bolnikov z ALL. Zato je bila prva metoda sledenja MRD, katere rezultati so služili za postavitve ključnih mejnikov za usmerjanje zdravljenja. Prazna klinična vrednost 0,01 % izhaja iz uporabe štiribarvne pretočne citometrije. Že v devetdesetih letih prejšnjega stoletja se je MRD uveljavila za klinične odločitve pri pediatričnih bolnikih, v zadnjem obdobju pa postaja vse pomembnejša tudi pri odraslih bolnikih z ALL (6). Za določevanje MRD pri B-ALL uporabimo označevalce, ki so značilni za nezrele celice B (CD10, CD19, CD34), v kombinaciji z označevalci, ki so na le-teh aberantno izraženi (CD38, CD44, CD58, CD66c, CD81, CD123). Pri T-ALL iščemo nezrele celice T-celične linije s kombinacijo označevalcev CD1a, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, TdT in CD34 (Slika 1). Če pri analizi MRD zaznamo levkemične celice in je njihov delež nad 0,01 %, izdamo izvid kot zaznaven MRD. Če je njihov delež pod 0,01 %, je klinični pomen teh preostalih celic za zdaj neznan, saj je pod klinično prazno vrednostjo.



Slika 1: Stopenjsko zamejevanje MRD pri bolniku s T-ALL. Iz analize najprej izločimo celični debris (množica A v razsevnom diagramu A), nato se omejimo na blastno okno (množica B v razsevnom diagramu B) in iščemo izhodiščni imunofenotip T-limfoblastov (z množico C zamejimo dvojno pozitivno (CD7 in CD34) populacijo v razsevnom diagramu C ter z množico MRD zamejimo CD5 pozitivno in CD3 negativno populacijo v razsevnom diagramu D).

MRD KLL. Limfomske celice pri kronični limfocitni levkemiji (KLL) imajo značilen imunofenotip, ki se razlikuje od normalnih limfocitov B in večine drugih limfomskih celic. Limfomske celice izražajo celične označevalce B linije CD19, CD20 skupaj s CD5, CD23, CD43, CD200 in ROR1. Če limfomske celice zaznamo, podamo njihov delež, sicer navedemo, da limfomskih celic nismo zaznali. Klinična prazna vrednost je 0,01 %, saj je dokazano, da imajo bolniki s preostalo boleznijo nad to vrednostjo slabše preživetje. Kljub temu pa je določanje MRD v rutinski

klinični praksi zaenkrat odsvetovano, ker ni znano, katere klinične odločitve bi morale biti sprejete ob zaznavnem MRD. Poleg tega so na tržišču nove zdravilne učinkovine, s katerimi dosežemo dober nadzor bolezni, le redki bolniki pa ob tem dosežejo nezaznaven MRD, s čimer postane določanje MRD nesmiselno (7, 8).

MRD plazmocitom. Ločevanje med normalnimi plazmatkami in plazmocitomskimi celicami lahko dosežemo z uporabo MFC, ker nobeno izmed uporabljenih proti- »

teles ne loči zanesljivo med normalnimi plazmatkami in plazmocitomskimi celicami. Za določitev MRD uporabljamo protitelesa proti CD38 in CD138 za identifikacijo plazmatk v kombinaciji s CD19, CD27, CD45, CD56, CD81 in CD117 za opredelitev, ali je njihov imunofenotip

normalen ali aberanten. MRD naj bi pri plazmocitomu po novih smernicah obvezno določali, vendar še ni znano, katere klinične odločitve bi morale biti sprejeti ob zaznavnem MRD (9, 10).

DOLOČANJE MRD Z MOLEKULARNO GENETIKO

Tako kot pri imunofenotipu, lahko tudi pri genetskih označevalcih ločimo dva konceptualno različna označevalca. Prvi je specifični podpis vsakega limfocita, povezan z enkratnostjo preureditev genov za težko verigo imunoglobulinov Ig oziroma T-celični receptor (TcR) med zgodnjo diferenciacijo limfocitov B in T, ko prihaja do združevanj segmentov V, D in J. Nadaljnja enkratnost in raznovrstnost vključujeta še naključne insercije ter delecije nukleotidov na povezovalnih mestih teh segmentov. Ker so notvorbe po opredelitvi klonalne, predstavlja vsaka rakava bolezen limfatične linije ekspanzijo klonalne populacije s specifičnim zapisom Ig/TcR (3). Ig/TcR preureditve tako sodijo med univerzalne označevalce. S pomočjo sekvenciranja omenjenih genov lahko določimo specifično preureditev genov ob postavitvi diagnoze, nato pa ji sledimo. MRD lahko določamo preko enkratnih preureditev teh genov pri večini bolnikov s KLL ter B- in T-ALL. Pri bolnikih z ALL za odkrivanje klonalne populacije s specifičnim zapisom Ig/TcR lahko uporabimo tudi sekvenciranje naslednje generacije (NGS), ki z uporabo univerzalnih začetnih oligonukleotidov omogoča spremljanje vseh preureditev genov Ig/TcR hkrati. S tem zagotavlja popolno sliko ne le o preostalem levkemičnem klonu ampak tudi o normalnem imunskem repertoarju (11).

Druga podvrsta označevalcev so specifične preureditve, povezane s posamezno vrsto oziroma podvrsto bolezni. Največkrat se kot označevalci uporabljajo fuzijski ali mutirani geni oziroma raven njihovega izražanja preko določanja mRNA, iz katere sintetiziramo cDNA. Občutljivost zaznavanja je zaradi intenzivnosti izražanja bistveno večja kot pri uporabi genomske DNA (12).

Za določanje MRD je najbolj razširjena uporaba kvantitativnega RT-PCR (qPCR), ki je v primerjavi z alternativnimi metodama, digitalnim PCR ter NGS, tudi cenejša. MRD izražamo v odstotkih tudi pri molekularno-genetski analizi. Da izničimo vpliv spremenljive kakovosti in

količine RNA, vse analize, temelječe na RT-qPCR, vključujejo uporabo hišnega gena, na katerega normaliziramo vrednost izražanja tarčnega gena. Raven izražanja tarčnega gena se normalizira tako, da izračunamo razmerje med količino prepisa tarčnega (fuzijskega ali mutiranega) gena in referenčnega gena, ki je praviloma *ABL1* (13). To vrednost, ki jo imenujemo normalizirano število kopij (NŠK), pomnožimo s sto, da rezultat izrazimo v odstotkih.

Digitalni PCR (ddPCR) je v rutinskem določanju MRD za zdaj bistveno manj razširjen kot qPCR. Njegova prednost je, da je metoda absolutna, kar omogoča zanesljivo kvantifikacijo tumorskega bremena, ne da bi za vsako določitev posebej pripravljali umeritveno krivuljo (14). Njena slabost pa, da za zdaj ni medlaboratorijsko standardizirana, kar zmanjšuje njeno zanesljivost in ponovljivost. Enako slabost ima pri določanju MRD tudi NGS.

Občutljivost zaznavanja MRD je odvisna od ravni izražanja tarčnega gena posamezne levkemične celice, ki se med bolniki lahko znatno razlikuje (12). Zato je nujno potrebna analiza izhodiščnega vzorca za vsakega bolnika posebej, ker na tej osnovi lahko kasneje izračunamo občutljivost zaznavanja MRD specifično za posameznika. Pri tem drugi pomembni dejavniki, ki vplivajo na občutljivost reakcije, kakršna sta hemodilucija ali slaba regeneracija, niso vključeni, splošno pa zmanjšujejo občutljivost (12). Specifičnost preiskave zagotavljamo tudi z uporabo pozitivnih in negativnih kontrol. Ker so največja težava spremljanja MRD lažno pozitivni rezultati, je eno od pomembnih pravil, da na osnovi enega pozitivnega rezultata ne sprejemamo kliničnih odločitev. Vselej je potrebna potrditev predhodnega rezultata na novem vzorcu po predpisanem časovnem zamiku.

MRD KML. Za določanje MRD pri bolnikih s kronično mieloično levkemijo (KML) kot označevalce uporabljamo različne prepise fuzijskega gena *BCR::ABL1*, ki nastaja »

nejo kot posledica translokacije t(9;22)(q34;q11). Pri KML lahko določamo MRD za tri prepise: e13a2 (b2a2), e14a2 (b3a2) in e1a2. Najbolj pogosta prepisa sta e13a2 in e14a2 (~ 98 % bolnikov), za katera raven izražanja spremljamo v mednarodnem merilu (IS) (15). Raven izražanja se kot zgoraj napisano izračuna v odstotkih, to vrednost nato pomnožimo s konverzijskim faktorjem, ki ga laboratorij pridobi z mednarodnimi primerjavami oziroma ga določi s pomočjo standardov. Tako izražen rezultat je medlaboratorijsko primerljiv (16). Ob diagnozi določimo raven izražanja fuzijskega gena *BCR::ABL1* v venski krvi, kar kasneje pri sledenju MRD služi za določitev molekularnega odziva (MR) na tarčno zdravljenje s tirozin kinaznimi inhibitorji (TKI). Izhodiščna točka mednarodnega merila je vrednost 100 %

IS, ki pomeni povprečno standardizirano začetno vrednost izražanja fuzijskega gena *BCR::ABL1* nezdravljenih bolnikov s KML. 0,1 % IS je za tri desetiške logaritme zmanjšana vrednost glede na izhodiščno in je privzeta kot glavni MR (MMR = 3.0) na zdravljenje. Doseganje stabilnega MMR je cilj zdravljenja in naj bi ga bolniki dosegli po 12 do 18 mesecih od začetka zdravljenja. Določitev MR 4.0 do MR 5.0 predstavlja globoki MR (15). Preiskavo izvajamo vsake tri mesece do potrjenega stabilnega MMR in nato trajno vsake tri do šest mesecev. Zmanjšanje MR je vedno razlog za skrbnejše spremljanje bolnika in morebitno spremembo načina zdravljenja. V Tabeli 1 prikazujemo odvisnost MR od IS glede na čas od začetka zdravljenja s TKI in pričakovani odziv na zdravljenje.

Tabela 1: Sledenje MRD pri KML po začetku zdravljenja s TKI in pričakovani molekularni odziv v mednarodnem merilu (IS). MMR – glavni molekularni odziv; TKI – tirozin kinazni inhibitor.

Čas od začetka zdravljenja s TKI (meseči)	Pričakovano zmanjšanje izražanja <i>BCR::ABL1</i>	<i>BCR::ABL1/ABL1</i> (% IS)	Molekularni odziv (MR)
3	1 log	≤ 10,0	1.0
6	2 log	≤ 1,0	2.0
12	3 log	≤ 0,1	3.0 (MMR)
> 18	4 log	≤ 0,01	4.0
	4.5 log	≤ 0,0032	4.5
	5 log	≤ 0,001	5.0

MRD AML. MRD lahko določamo z molekularno-genetskimi preiskavami pri tistih bolnikih z AML, pri katerih prepoznamo zanesljiv genetski označevalec. Pri AML imamo štiri zanesljive molekularne označevalce, za katere imamo smernice o časovnih razmikih spremljanja, znani so tudi klinični posegi. Kot označevalec je najdlje v uporabi fuzijski gen *PML::RARA* (t(15;17)(q24;q21)) pri akutni promielocitni levkemiji (APL). MRD lahko spremljamo za prepise bcr1, bcr2 in bcr3 (17). V zadnjih dveh letih smo dobili tudi smernice za spremljanje AML s tremi drugimi genetskimi preureditvami. Pri AML z različicami v genu *NPM1* lahko spremljamo MRD pri različicah, ki jih označujemo kot A, B in D. Pri akutni mielomonocitni levkemiji

z eozinofilijo imamo fuzijski gen *CBFB::MYH11* (inv(16)(p13q22)), pri katerem lahko spremljamo prepise A, D in E. Ustrezen označevalec je tudi fuzijski gen *RUNX1::RUNX1T1* (t(8;21)(q22;q22)). Skupno najdemo molekularni označevalec pri približno 40 % AML (3).

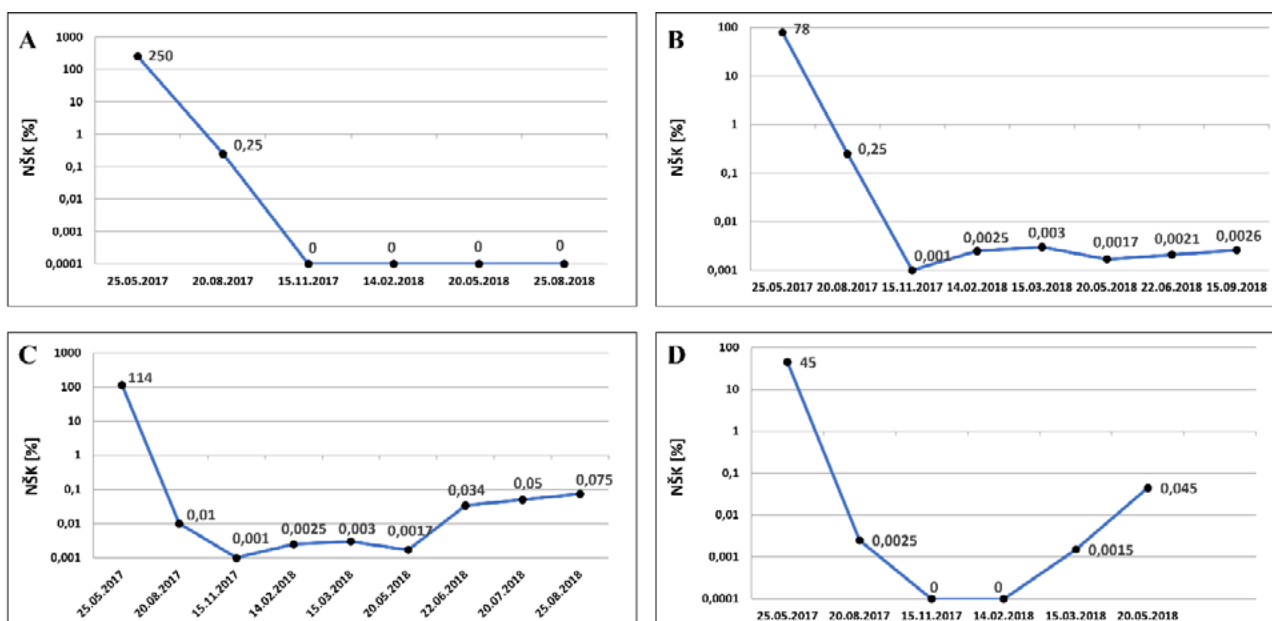
Zaradi boljše občutljivosti je najprimernejši vzorec pri vseh AML kostni mozeg. Preiskavo lahko izvedemo tudi v vzorcu venske krvi (pri vsaj $10 \cdot 10^9/L$ levkocitih in vsaj 20 % blastov), vendar ne pri APL. MRD spremljamo po dveh ciklih terapije, ob koncu terapije, nato pa vsake 3 mesece naslednjih 24 mesecev. Če MRD spremljamo na vzorcu venske krvi, to izvajamo bolj pogosto, na 4–6 tednov (5).

»

MRD razlagamo glede na predhodne rezultate preiskave kot (Slika 2):

- popolna molekularna remisija: dva zaporedna nezaznavna rezultata MRD, pridobljena v intervalu ≥ 4 tednov;
- molekularno vztrajanje pri nizkem številu kopij: relativno povečanje izražanja med dvema pozitivnima rezultatoma po koncu terapije, ki pa je manjše od desetiškega logaritma;

- molekularno napredovanje: povečanje števila kopij med dvema pozitivnima vzorcema pri bolnikih z molekularnim vztrajanjem pri nizkem številu kopij;
- molekularni relaps: povečanje števila kopij, ki je večje od desetiškega logaritma med dvema pozitivnima vzorcema pri bolnikih, ki so bili prej MRD nezaznavni.



Slika 2: Razlaga MRD glede na predhodne rezultate preiskave. A) Popolna molekularna remisija; B) molekularno vztrajanje pri nizkem številu kopij; C) molekularno napredovanje in D) molekularni relaps. NŠK – normalizirano število kopij.

Pri bolnikih z AML, pri katerih nismo našli nobenega od zgoraj naštetih označevalcev, lahko uporabimo katero od drugih genetskih sprememb, ki smo jo odkrili ob postavitvi diagnoze. Najpogosteje spremljamo točkovne mutacije v določenih genih, ki jih večinoma najdemo z uporabo NGS (18). Primeren označevalec za spremljanje z NGS je tisti, ki ima ob postavitvi diagnoze alelna frekvenca vsaj 5 %. Pokritost različice, ki jo spremljamo, mora biti od 10^3 – 10^6 . Pri tem je pomembno, da vemo, kateri geni niso primerni za sledenje MRD. Geni *DNMT3A*, *ASXL1* in *TET2* niso primerni označevalci, ker v njih lahko pride do pojavnosti različic v procesu staranja oziroma pojavnosti klonalne hematopoeze. Zarodne različice (alelna frekven-

ca ob diagnozi ≥ 50 %) v genih *RUNX1*, *GATA2*, *CEBPA*, *DDX41* in *ANKDR26* prav tako niso primerni označevalci (5). Spremljanje MRD z NGS, ki ga praviloma izvajamo na vzorcu kostnega mozga, je izvedbeno in interpretacijsko zahtevno, pri čemer merila za interpretacijo rezultatov za zdaj niso jasna.

MRD ALL. Za določevanje MRD pri bolnikih z B-ALL uporabljamo nekatere fuzijske gene. Fuzijski gen *BCR::ABL1* je prisoten pri ~ 30 % odraslih bolnikov z B-ALL, pri čemer je pri ~ 70 % bolnikov to prepis e1a2, pri 30 % e13a2 ali e14a2. Spremljamo lahko vse tri prepise, rezultata pa ne podajamo v mednarodnem merilu, pač pa v odstotkih kot

pri AML. Ostala dva označevalca za spremljanje MRD pri bolnikih z B-ALL sta fuzijska gena *ETV6::RUNX1* (t(12;22)

(p13;q22)) in *TCF3::PBX1* (t(1;19)(q23;p13)) (2, 10). Najprimernejši vzorec je kostni mozeg.

IZZIVI ZA PRIHODNOST

Zgodovinsko gledano se je določanje MRD razvilo in je danes splošno uveljavljeno pri spremljanju uspešnosti zdravljenja bolnikov s KML. Dlje časa je v redni rutinski uporabi tudi pri pediatričnih in zadnja leta tudi pri odraslih bolnikih z ALL (12). Smernice za določanje smo nedavno dobili pri AML (5) ter KLL (7, 19). Precej študij je tudi pri plazmocitomu, kjer pa je vloga MRD težavna tako z izvedbenega kot aplikativnega vidika. Navkljub izjemni občutljivosti obeh metod pa nezaznani MRD ni zagotovilo, da bolezen ni več prisotna, kar v prihodnosti kliče po razvoju še bolj občutljivih metod (7).

Večina kliničnih laboratorijev rutinsko izvaja obe trenutno najzanesljivejši metodi, qPCR in MFC. Rezultate katere metode bo klinik uporabil pri svojih terapevtskih odločitvah, je najprej odvisno od bolezni same, potem pa tudi od specifičnih značilnosti bolezni pri posameznem bolniku. Pri nekaterih boleznih je uporaba metode nedvoumna. Pri KML je to qPCR (16), pri DP zaenkrat le MFC (10). Pri AML so smernice jasne, da bolnikom, pri katerih smo določili enega od štirih zanesljivih molekularnih označevalcev, sledimo s qPCR, medtem ko pri ostalih bolnikih metodo izbiramo na osnovi prisotnih označevalcev (5). Pri ALL se je zaradi hitrosti in splošne uporabnosti bolj uveljavila MFC. Ko je mogoče sledenje z obema metodama, je smiselno, da izberemo bolj občutljivo in/ali bolj specifično glede na prisotne označevalce. Istočasna uporaba obeh ni smiselna, je pa tudi zelo draga. Zato je tesno sodelovanje med laboratorijskimi strokovnjaki in hematologi tako pri izbiri najustreznejše metode za spremljanje posameznega bolnika kot tudi za interpretacijo rezultatov MRD izjemno pomembno.

Opozoriti gre na nekatere omejitve določanja MRD, ki so povezane z lastnostmi bolezni. Če gre za bolezen, ki je omejena le na kostni mozeg, kakršna je npr. akutna levkemija, je določanje bistveno bolj zanesljivo kot pa npr. pri KLL, ki vključuje več mest (kri, kostni mozeg, limfatično tkivo) (20). Verjetno največja težava MRD splošno pa je klonalna evolucija. Zdravljenje praviloma povzroči tudi selekcijo klonov, s tem pa lahko pride do spremembe označevalcev. Čeprav so izbrani označevalci zelo stabilni in sorazmerni z bolezenskim bremenom, klonalna evolucija lahko povzroči spremembo izražanja posameznega označevalca ali njegovo izgubo. Drug izziv pa so nove oblike zdravljenja, ki ciljajo prav na označevalce MRD, bodisi monoklonska protitelesa (anti-CD20) ali celična terapija CAR-T (CD19) (3). S tem povzročijo zasedbo ali izgubo označevalcev in nezanesljivo sledenje MRD.

V nasprotju z levkemijami in limfomi, pri katerih že standardna kemoterapija navadno vodi v popolno remisijo bolezni, pa pri bolnikih s solidnimi tumorji popolnih remisij na ta način navadno ne dosežemo. Uvedba tarčnih terapij pa je povzročila dramatične spremembe v zdravljenju in spremljanju zdravljenja v onkologiji splošno. Tako je ocena popolne remisije, s tem pa tudi pojem MRD, postala aktualna pri spremljanju številnih bolnikov z rakom (21). Nedvomno je torej določanje MRD eno od razvijajočih se področij, pri katerem je število preiskav v porastu, z njim pa tudi število izzivov. »

LITERATURA

- Hourigan CS, Gale RP, Gormley NJ, Ossenkuppe GJ, Walter RB. Measurable residual disease testing in acute myeloid leukaemia. *Leukemia*. 2017;31:1482-1490.
- Kruse A, Abdel-Azim N, Kim HN, Ruan Y, Phan V, Ogana H, Wang W, Lee R, Gang EJ, Khazal S, Kim YM. Minimal Residual Disease Detection in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Int J Mol Sci*. 2020;21(3):1054.
- Gaipa G, Basso G, Biondi A, Campana D. Detection of minimal residual disease in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Cytometry B Clin Cytom* 2013;84(6):359-69.
- Rizzari C, Cazzaniga G, Coliva T, De Angelis C, Conter V. Predictive factors of relapse and survival in childhood acute myeloid leukemia: role of minimal residual disease. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2011;11(9):1391-401.
- Schuurhuis GJ, Heuser M, Freeman S, et al. Minimal/measurable residual disease in AML: a consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party. *Blood*. 2018; 131(12):1275-1291.
- Kruse A, Abdel-Azim N, Kim HN, Ruan Y, Phan V, Ogana H, et al. Minimal Residual Disease Detection in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Int J Mol Sci*. 2020;21(3):1054.
- Wierda WG, Rawstron A, Cymbalista F, Badoux X, Rossi D, Brown JR, Egle A et al. Measurable residual disease in chronic lymphocytic leukemia: expert review and consensus recommendations. *Leukemia* 2021. 35(11):3059-3072.
- Eichhorst B, Robak T, Montserrat E, Ghia P, Niemann CU, Kate AP, M. et al. Chronic Lymphocytic Leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2020; 32(1): 23-33.
- Romano A, Palumbo GA, Parrinello NL, Conticello C, Martello M, Terragnet C et al. Minimal Residual Disease Assessment Within the Bone Marrow of Multiple Myeloma: A Review of Caveats, Clinical Significance and Future Perspectives. *Frontiers in Oncology*. 2019; 9: 699.
- Dimopoulos MA, Moreau P, Terpos E, Mateos MV, Zweegman S, Cook G, et al. Multiple myeloma: EHA-ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. *Ann Oncol*. 2021; 32(3): 309-322.
- Della Starza ID, Chiaretti S, De Propriis MS, Elia L, Marzia Cavalli M, De Novi LA, et al. Minimal Residual Disease in Acute Lymphoblastic Leukemia: Technical and Clinical Advances. *Front. Oncol*. 2019; 9:726.
- Dillon R, Potter N, Freeman S, Russell N. How we use molecular minimal residual disease (MRD) testing in acute myeloid leukaemia (AML). *Br J Haematol*. 2021;193(2):231-244.
- Gabert J, Beillard E, van der Velden VH, Bi W, Grimwade D, Pallisgaard N, et al. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia—A Europe Against Cancer program. *Leukemia*. 2003;17:2318–2357.
- Drandi D, Ferrero S, Ladetto M. Droplet Digital PCR for Minimal Residual Disease Detection in Mature Lymphoproliferative Disorders. *Methods Mol Biol*. 2018;1768:229-256.
- Hochhaus A, Bacarani M, Silver RT, Schiffer C, Apperley JF, Cervantes F, et al. European LeukemiaNet 2020 recommendations for treating chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2020;34:966–984.
- Cross NPC, White HE, Colomer D, Echenrona H, Foroni L, Gottardi E, et al. Laboratory recommendations for scoring deep molecular responses following treatment for chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2015;29:999-1003.
- Döhner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*. 2017;129(4):424–447.
- Jongen-Lavrencic M, Grob T, Hanekamp D, Kavelaars FG, Al Hinai A, Zeilemaker A, et al. Molecular minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2018;378: 1189e1199.
- Rawstron AC, Fazi C, Agathangelidis A, Letestu R, Nomdedeu J, Palacio C, et al. A complementary role of multiparameter flow cytometry and high-throughput sequencing for minimal residual disease detection in chronic lymphocytic leukemia: an European Research Initiative on CLL study. *Leukemia*. 2016;30(4):929-36.
- Wierda WG. Minimal Residual Disease Provides Treatment Focus for Next Chronic Lymphocytic Leukemia Advances. *J Clin Oncol*. 2016;34(31):3722-3723.
- Luskin MR, Murakami MA, Manalis SR, Weinstock DM. Targeting minimal residual disease: a path to cure? *Nat Rev Cancer*. 2018;18(4):255-263.