

Nowe trendy w diagnostyce i leczeniu chorób układu krwiotwórczego

Dr hab. Iwona Malinowska
Katedra i Klinika Pediatrii,
Hematologii i Onkologii Warszawski
Uniwersytet Medyczny

Próby poprawy wyników leczenia białaczek

- Przeszczepianie komórek hematopoetycznych
- Intensyfikacja istniejących protokołów
- Lepsze rozumienie patogenezы białaczek i mechanizmów oporności na leczenie
- Indywidualizacja terapii w oparciu o poziom choroby resztkowej, aktywności enzymów metabolizujących i indywidualny profil genów

Białaczki występujące u dzieci

- Ostra białaczka limfoblastyczna
Acute Lymphoblastic Leukaemia (ALL) **80%**
- Ostra białaczka szpikowa
Acute Myeloid Leukaemia (AML) **15%**
- Przewlekła białaczka szpikowa
Chronic Myeloid Leukemia (CML) **3%**
- Młodzieńcza białaczka mielomonocytoza
Juvenile Myelomonocytic Leukemia (JMML) **2%**

ALL u dzieci

- Zapadalność - 25 przypadków na 1000000/rok
- Najwięcej zachorowań wśród dzieci 2-5 lat
- Przyczyna nieznana
- Związek z wrodzonymi chorobami genetycznymi: z. Downa, z. Wiskotta-Aldricha, z. ataksja-teleangiektazja, z. Fanconiego, z. Blooma, anemia Blackfana-Diamonda, Nijmegen breakage s., Li-Fraumeni s., X-linked agammaglobulinemia, z. Shwachmana-Diamonda

Objawy

- **ALL z prekursorów B** - bóle kostne, stawowe, utykanie, gorączka, zmęczenie, bladość, krwawienia, limfadenopatia, hepatosplenomegalia
- **B-ALL** - masy nowotworowe pozaszpikowe w jamie brzusznej, na szyi, objawy zajęcia OUN- bóle gł, wymioty, apatia
- **T-ALL** - guz w śródpiersiu, niewydolność oddechowa, objawy zajęcia OUN

Ostre białaczki - badania diagnostyczne

WBC

Leukocytoza, Leukopenia, Norma

Rozmaz ręczny

Neutropenia

Niedokrwistość

Małopłytkowość

Biochemia

Podwyższony kwas moczowy

LDH

Zaburzenia jonowe (K, Na, Ca, P)

RTG k.p.

Układ krzepnięcia

Szpik

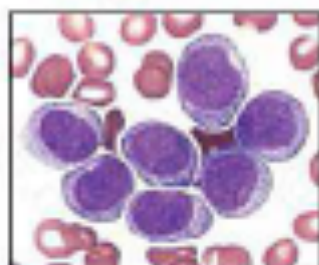
Morfologia

Cytochemia

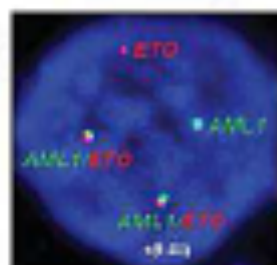
Immunofenotyp

Genetyka

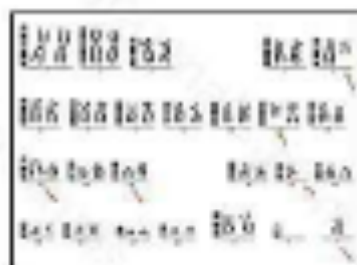
Morphology



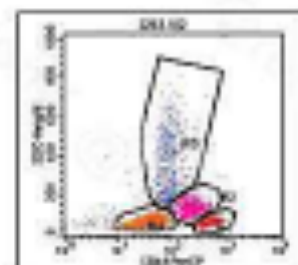
FISH



Cytogenetics



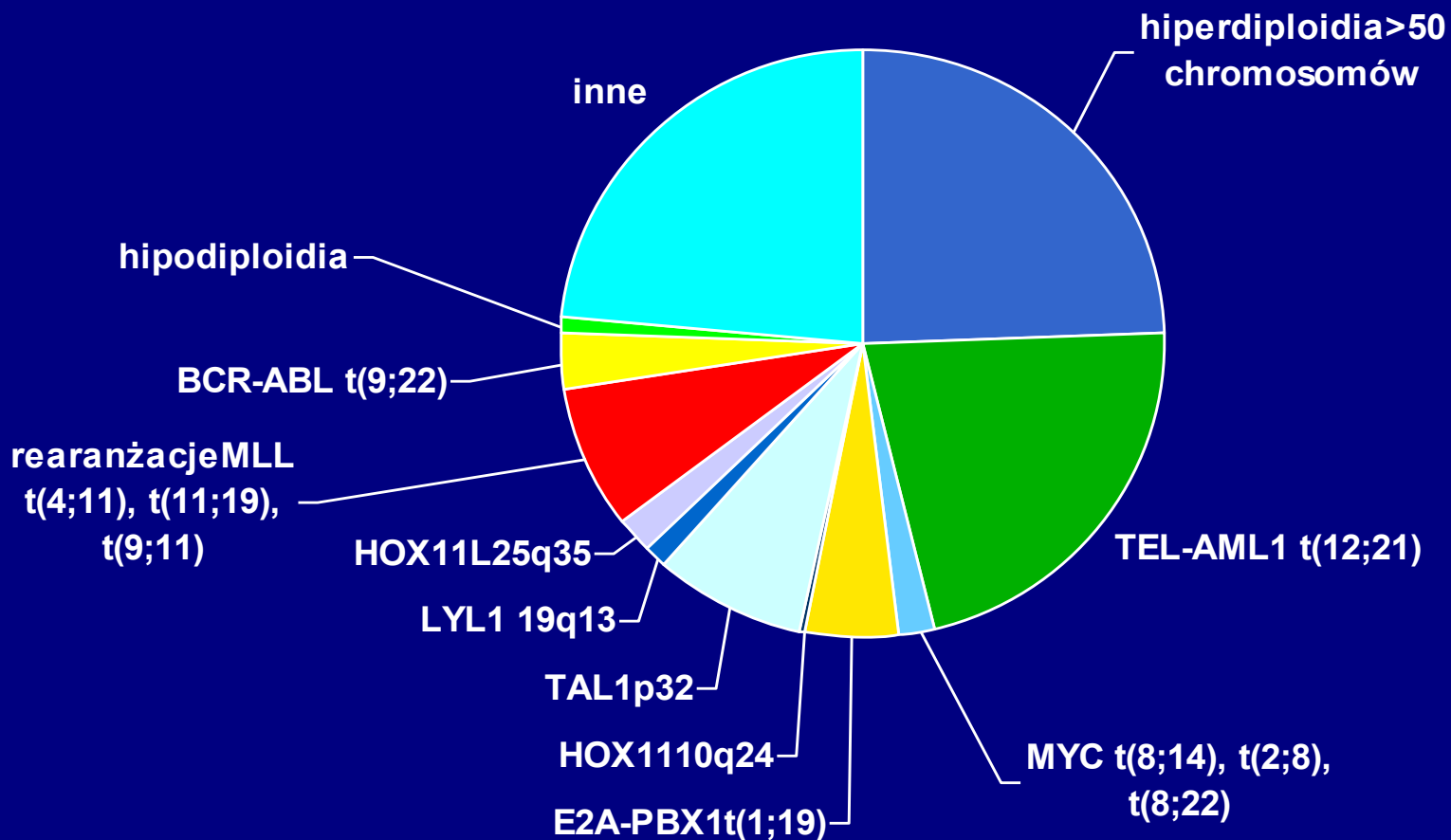
Flow cytometry



Next-generation sequencing-based mutation profiling



Aberracje chromosomalne w ALL u dzieci



Zaburzenia genetyczne w ostrych białaczkach

- Rola w patogenezie
- Znaczenie diagnostyczne (klasyfikacja cytogenetyczna i molekularna)
- Znaczenie rokownicze
- Cel terapii

Mechanizmy leżące u podstawy powstawania ostrych białaczek

- Nieprawidłowa ekspresja protoonkogenów
- Translokacje chromosomowe, powodujące powstanie aktywnych kinaz i zmienionych czynników transkrypcyjnych
- Zaburzenia liczbowe chromosomów

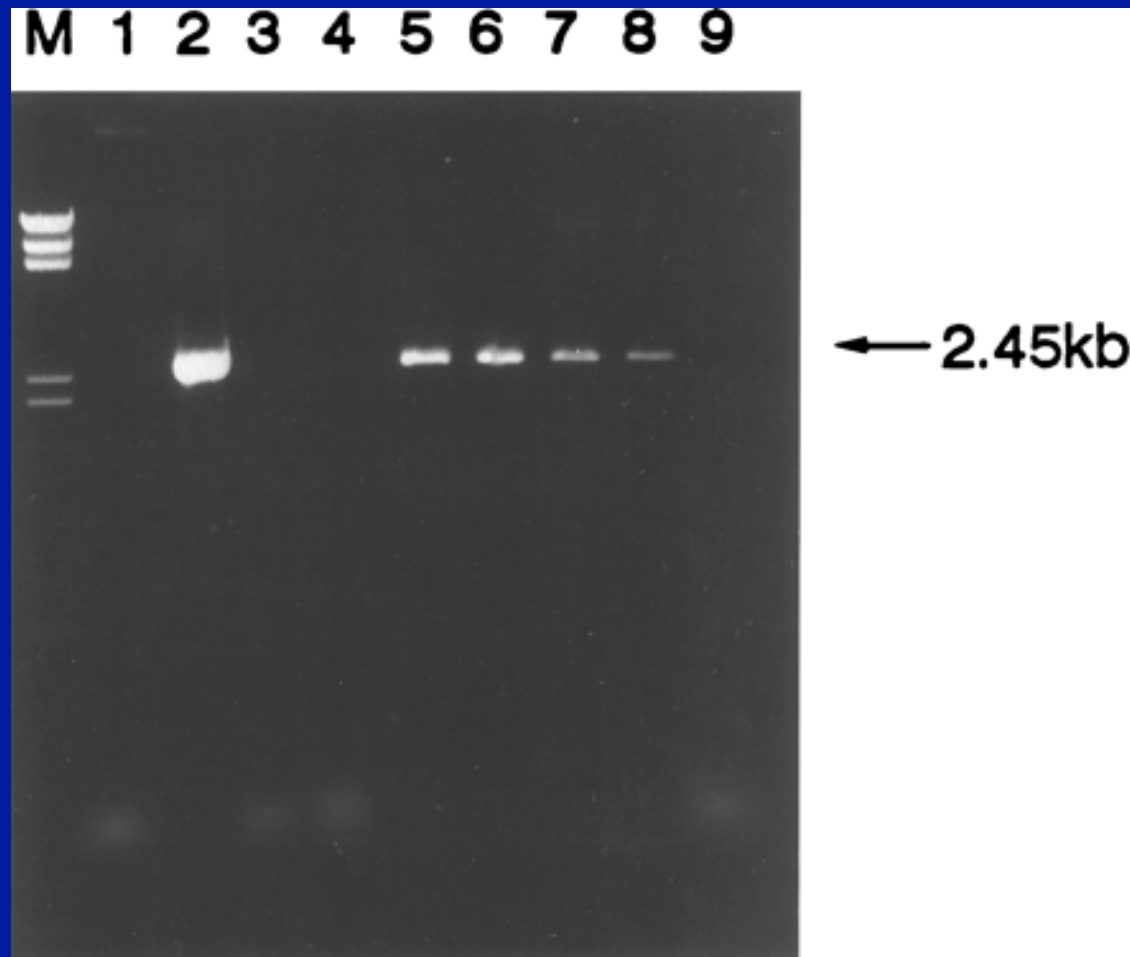
Wpływ zmian genetycznych na transformację nowotworową

Zmiany genetyczne powodują zaburzenie głównych procesów zachodzących w komórce:

- Nasilenie proliferacji
- Zablokowanie różnicowania
- Oporność na apoptozę

Płodowe pochodzenie białaczki z rearanżacją MLL

wg Gale i wsp. Proc Natl Acad Sci USA, 1997



WHO - lymphoblastic leukemia/ lymphoma:

B lymphoblastic leukemia/lymphoma, NOS

B lymphoblastic leukemia/lymphoma with recurrent genetic abnormalities

- B lymphoblastic leukemia/lymphoma with t(9;22)(q34;q11.2), BCR-ABL 1
- B lymphoblastic leukemia/lymphoma with t(v;11q23); MLL rearranged
- B lymphoblastic leukemia/lymphoma with t(12;21)(p13;q22) TEL-AML1 (ETV6-RUNX1)
- B lymphoblastic leukemia/lymphoma with hyperdiploidy
- B lymphoblastic leukemia/lymphoma with hypodiploidy
- B lymphoblastic leukemia/lymphoma with t(5;14)(q31;q32) IL3-IGH
- B lymphoblastic leukemia/lymphoma with t(1;19)(q23;p13.3) TCF3-PBX1

T lymphoblastic leukemia/lymphoma

ALL z prekursorów limfocytów B - dobre rokowanie

- **t(12;21)(p13;q22) lub ETV6-RUNX1 (dawniej TEL-AML1)**
(20-25% przypadków)
- **Hyperdiploidy (>50 chromosomes/cell) (25% cases)**
związana z trisomią X, 4, 6, 10, 14, 17, 18 i 21.

ALL z prekursorów limfocytów B c. d. - złe rokowanie

- **hipodiploidia < 44 chromosomów/komórce (1% przypadków)**
 - near-haploid ALL (24–31 chromosomów)
 - low-hypodiploid ALL (32–39 chromosomów)
- **Philadelphia chromosome positivity t(9;22)(q34;q11) (3%)**
- **Internal amplification of chromosome 21 (iAMP 21) (2%)**

"Ph-like" ALL

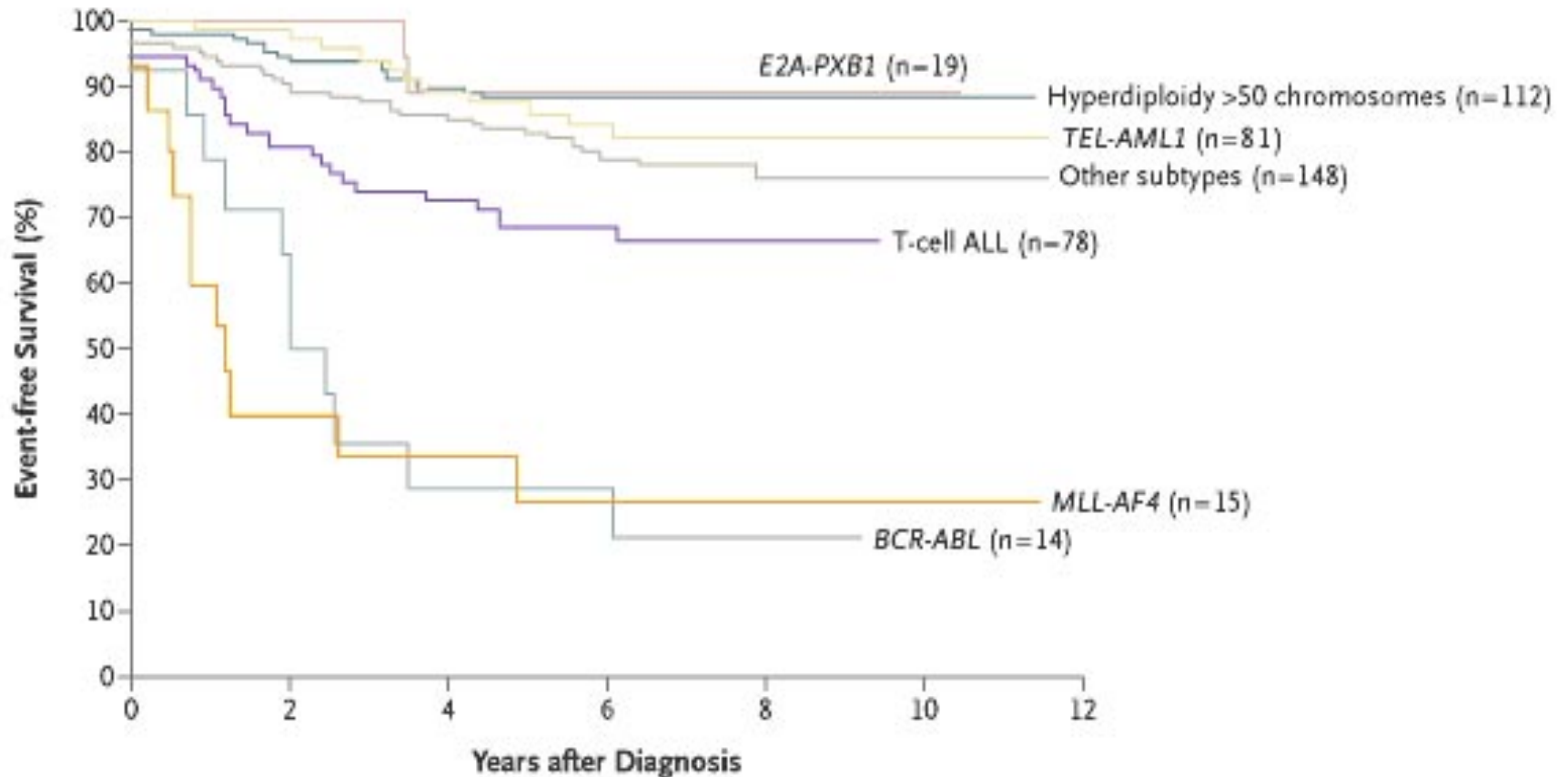
"Ph-like" ALL (10-15% przypadków) z ekspresją genów podobną do Ph+ ALL:

- IKZF1
- CRLF2 (cytokine receptor like factor 2)
- mutacje punktowe JAK

Klasyfikacja Ph-like ALL na podstawie zmian genetycznych

Typ i częstość występowania	Rodzaj kinazy objetejrearanżacją	Inhibitor kinazy tyrozynowej (TKI) wykazujący aktywność w danej rearanżacji
Typ I – 22%	ABL1 ABL2 CSF1R PDGFRB	Desatinib
Typ II – 18%	EPOR JAK2	Inhibitor JAK2
Typ III – 20%	CRLF2 JAK2	Inhibitor JAK2
TYP IV – 20%	JAK1 JAK3 IL2RB TYK2 TSLP IL7R FLT3	Inhibitor JAK1/JAK3 Inhibitor TYK2 Inhibitor JAK2 Nieznane
Typ V – 1%	Inne kinazy	Nieznane
Typ VI – 10%	Ras	Nieznane
Typ VII – 9%	Zmiany nieobejmujące kinaz	Nieznane

Kaplan-Meier Analysis of Event-free Survival According to the Subtype of Leukemia in 467 Children with ALL Who Were Enrolled in Three Consecutive Treatment Protocols at St



Leczenie ALL

Grupa ryzyka

- standardowego 60% pacjentów
- pośredniego 30% pacjentów
- wysokiego 10% pacjentów

Czynniki ryzyka w ALL

Cecha kliniczna lub biologiczna	Rokowanie dobre	Rokowanie złe
Leukocytoza	<20000/ μ l	>20000/ μ l
Immunofenotyp	c-ALL	T-ALL
Wiek	2-6 lat	Niemowlęta i dzieci starsze
Cytogenetyka	Hiperdiploidia t(12;21)	t(9;22), rearanżacje 11q23
Odpowiedź na sterydy	Dobra	Zła
Remisja w 33 dobie	Tak	Nie
Choroba resztkowa po indukcji	ujemna	dodatnia

MRD

Wykrywanie:

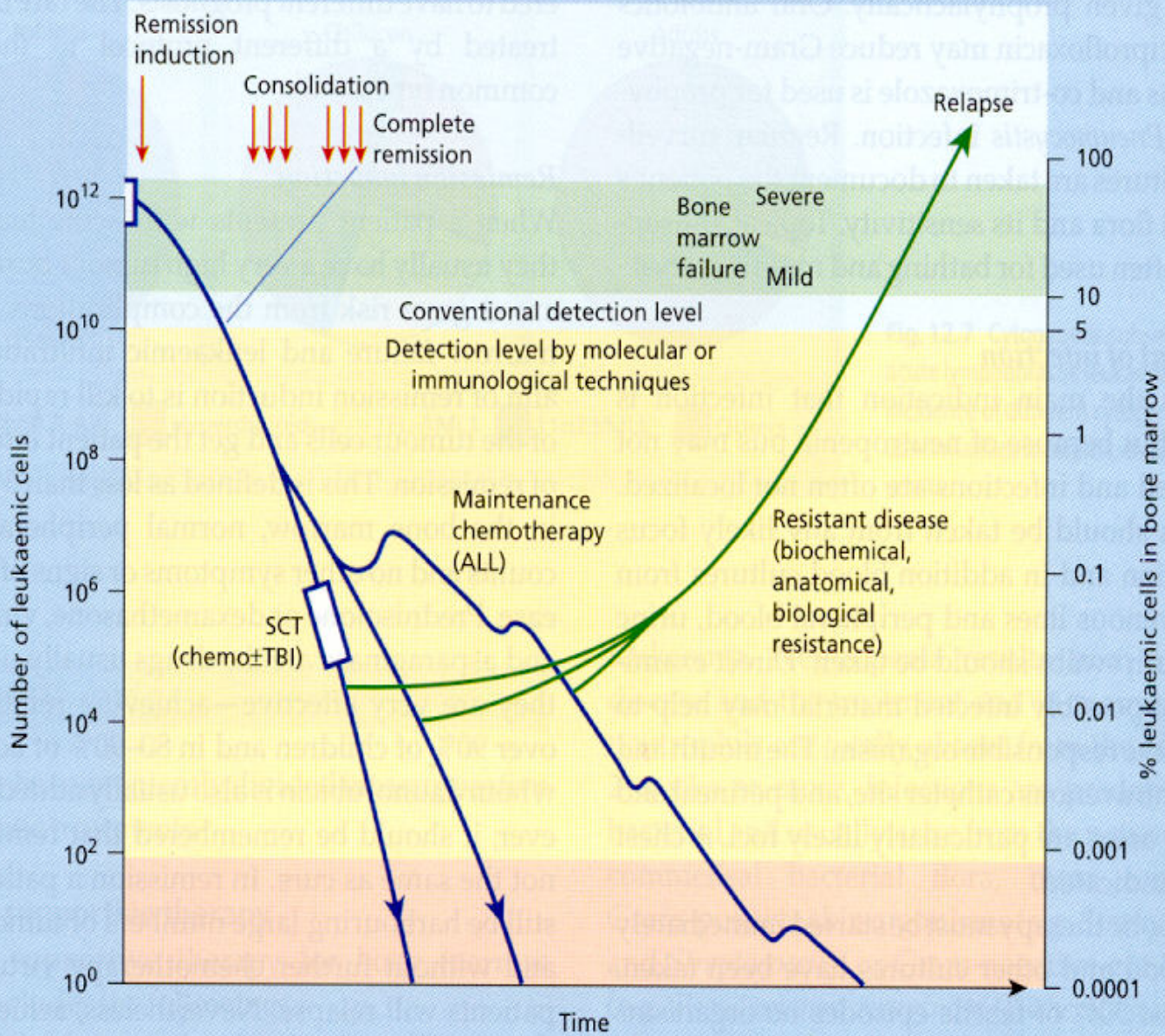
- Transkryptów powstałych w wyniku fuzji genów,
- Klonalnych zaburzeń obejmujących rearanżacje genów TCR i immunoglobulin (IgH)
- Identyfikacja swoistego dla blastów immunofenotypu

Korelacja między MRD a ryzykiem niepowodzenia leczenia

Choroba resztkowa jako czynnik rokowniczy

Ujemna choroba resztkowa po indukcji remisji i przed konsolidacją = ryzyko wznowy < 2%

Choroba resztkowa obecna po indukcji remisji i przed konsolidacją = 75% wznow



Leczenie ALL

- Indukcja remisji
- Faza konsolidacji/intensyfikacji
- Leczenie / profilaktyka białaczki OUN
- Leczenie podtrzymujące

Leczenie ALL

Indukcja remisji

SR

chemioterapia

IR

chemioterapia

HR

chemioterapia

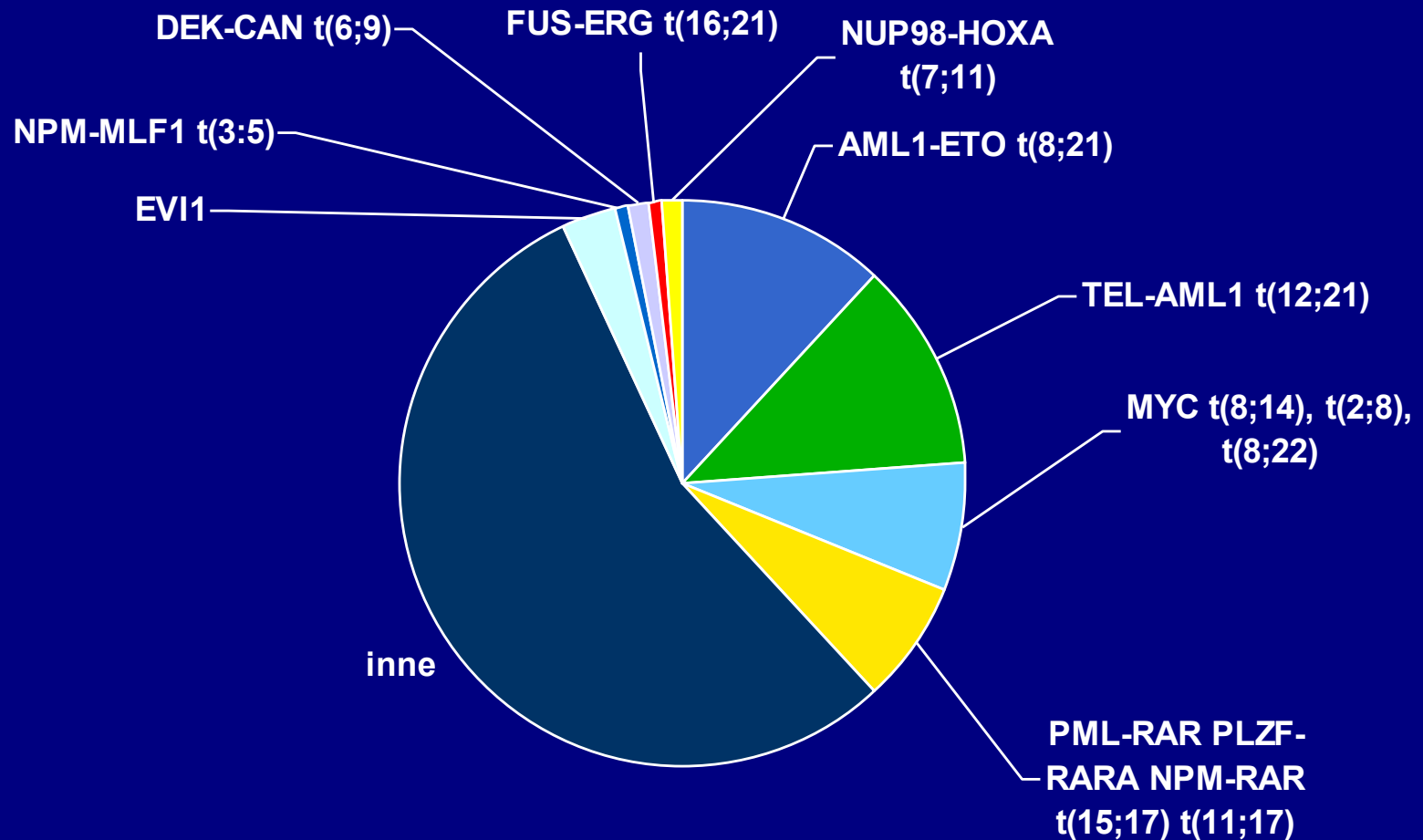
HSCT

SR- gr.ryzyka
standardowego

IR- pośredniego

HR- wysokiego

Aberracje chromosomalne w AML u dzieci



AML- klasyfikacja FAB

M0 - Undifferentiated acute myeloblastic leukemia	5%
M1 - Acute myeloblastic leukemia with minimal maturation	15%
M2 - Acute myeloblastic leukemia with maturation	25%
M3 - Acute promyelocytic leukemia	10%
M4 - Acute myelomonocytic leukemia	20%
M4eos - Acute myelomonocytic leukemia with eosinophilia	5%
M5 - Acute monocytic leukemia	10%
M6 - Acute erythroid leukemia	5%
M7 - Acute megakaryocytic leukemia	5%

Klasyfikacja AML wg WHO

AML with recurrent genetic abnormalities

AML with t(8;21)(q22;q22); RUNX1-RUNX1T1

AML with inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22); CBEB-MYH11

Acute promyelocytic leukemia (APL) with t(15;17)(q22;q12); PML-RARA

AML with t(9;11)(p22;q23); MLLT3-MLL

AML with t(6;9)(p23;q34); DEK-NUP214

AML with inv(3)(q21q26.2) or t(3;3)(q21;q26.2); RPN1-EVI1

AML (megakaryoblastic) with t(1;22)(p13;q13); RBM15-MKL1

Provisional entity: AML with mutated NPM1

Provisional entity: AML with mutated CEBPA

AML with myelodysplasia-related change

Therapy-related myeloid neoplasms

Klasyfikacja AML wg WHO c.d.

AML, not otherwise specified:

Undifferentiated AML

AML with minimal differentiation

AML without maturation

AML with maturation

Acute myelomonocytic leukemia

Acute monoblastic/monocytic leukemia

Acute erythroid leukemia

Pure erythroid leukemia

Erythroleukemia, erythroid/myeloid

Acute megakaryoblastic leukemia

Acute basophilic leukemia

Acute panmyelosis with myelofibrosis

Myeloid sarcoma

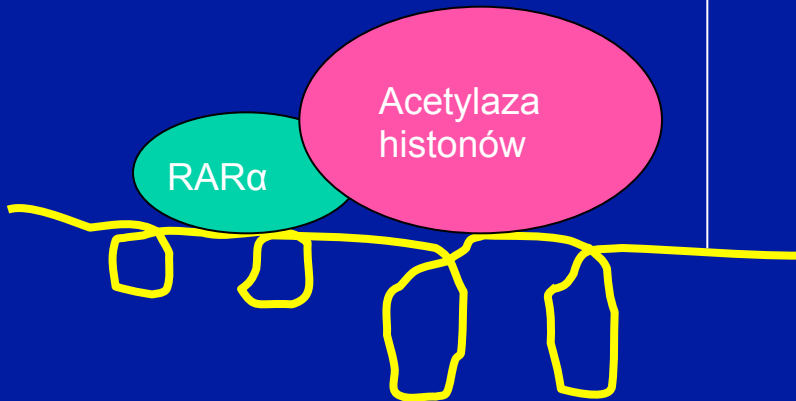
Klasyfikacja AML wg WHO c.d.

Myeloid proliferations related to Down syndrome:

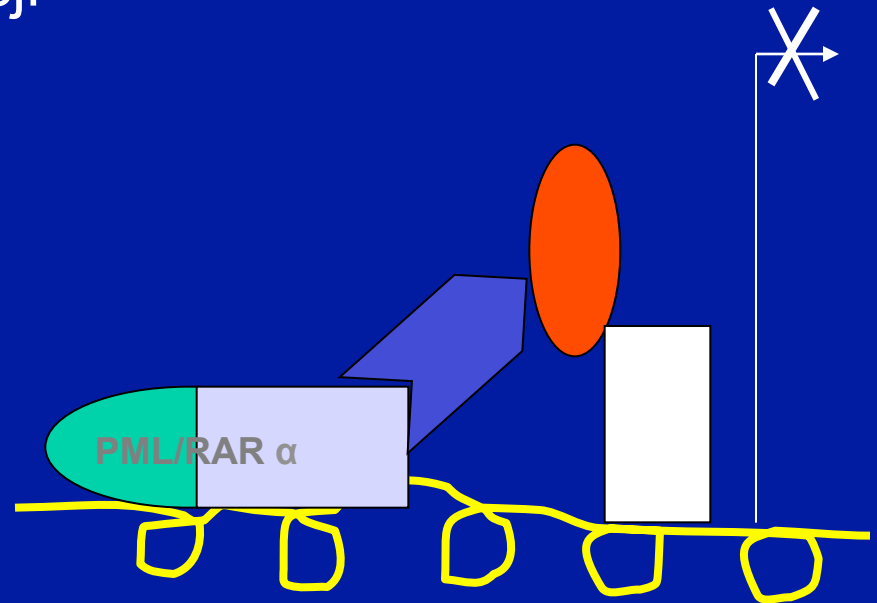
- Transient abnormal myelopoiesis
- Myeloid leukemia associated with Down syndrome

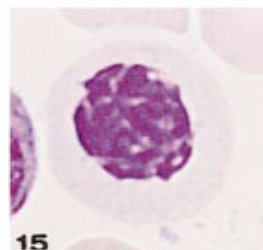
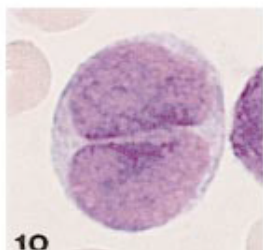
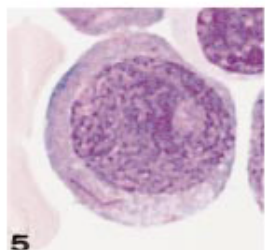
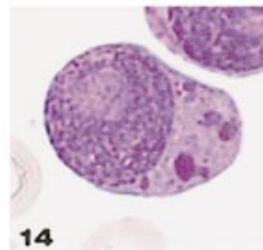
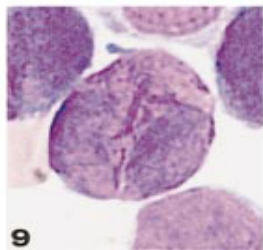
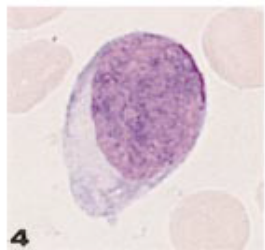
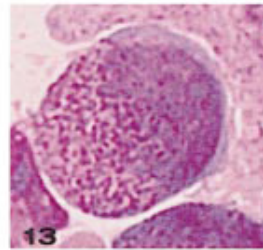
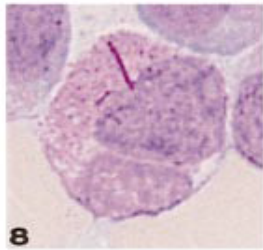
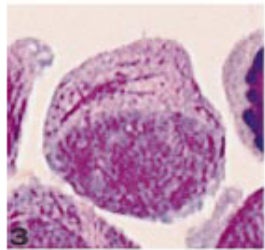
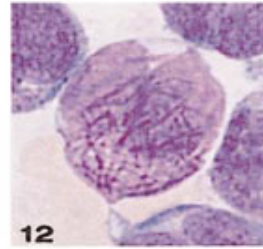
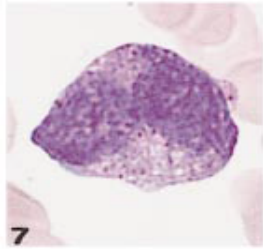
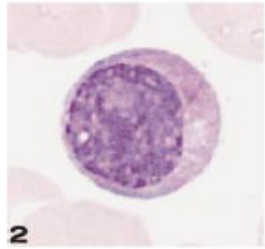
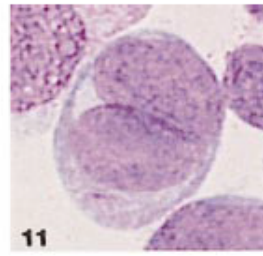
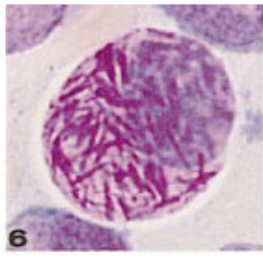
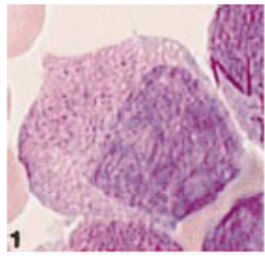
Wpływ PML/RAR α na zaburzenie transkrypcji w APL

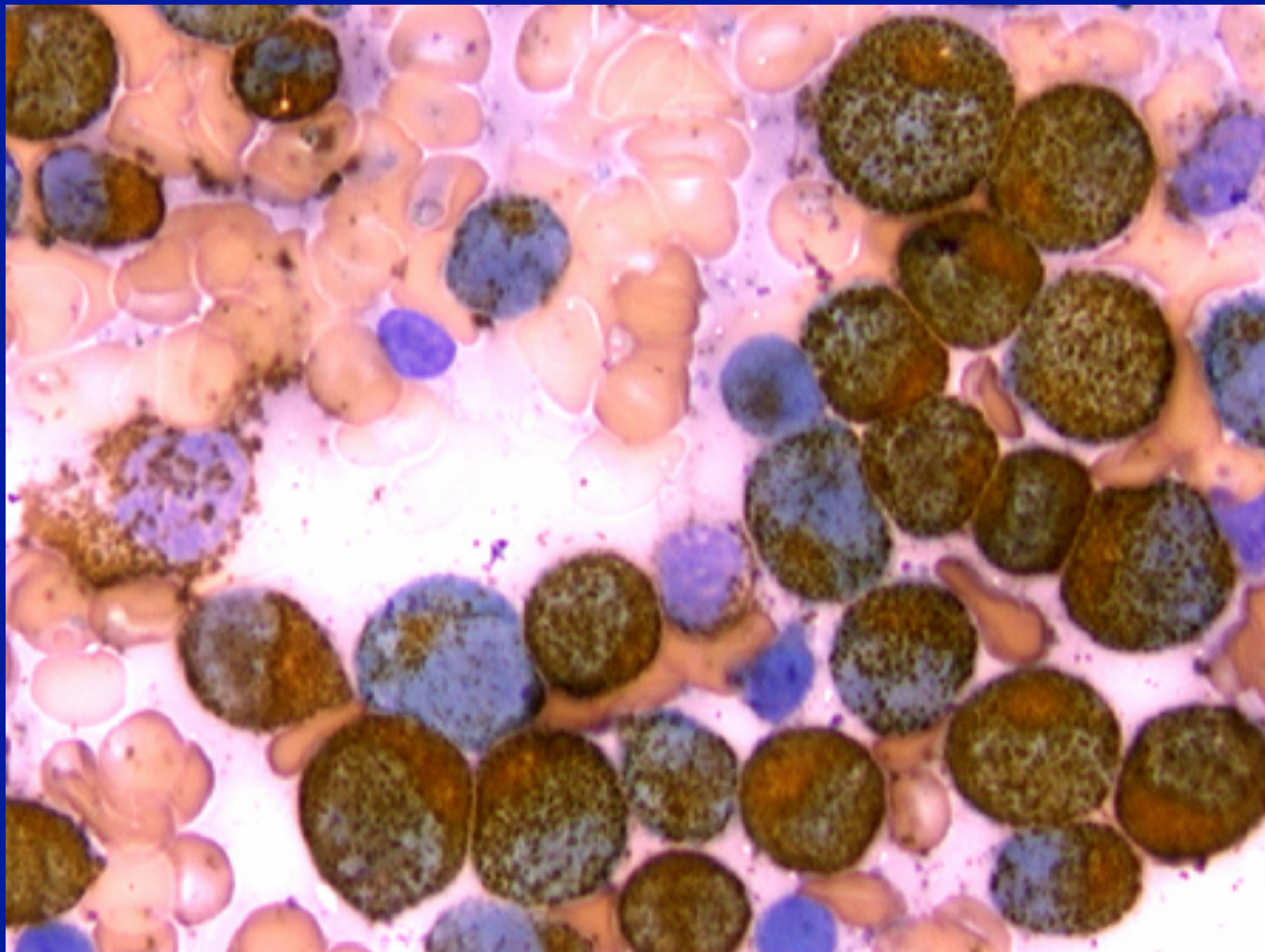
Aktywacja
transkrypcji



Zahamowanie
transkrypcji







Translokacje w APL

t (15;17) (q23;q12);(PML;RAR alfa)

t (11;17) (q23;q12);(PLZF;RAR alfa)

t (11;17) (q23;q12);(NuMA;RAR alfa)

t (5;17) (q23;q12);(NPM;RAR alfa)

Kiedy podejrzewać APL?

- Charakterystyczna morfologia komórek
- Możliwość APL u pacjentów z ciężką koagulopatią
- Podejrzenie APL w oparciu o immunofenotyp
- We wszystkich takich przypadkach ATRA powinna być włączona i kontynuowana do potwierdzenia lub wykluczenia diagnozy

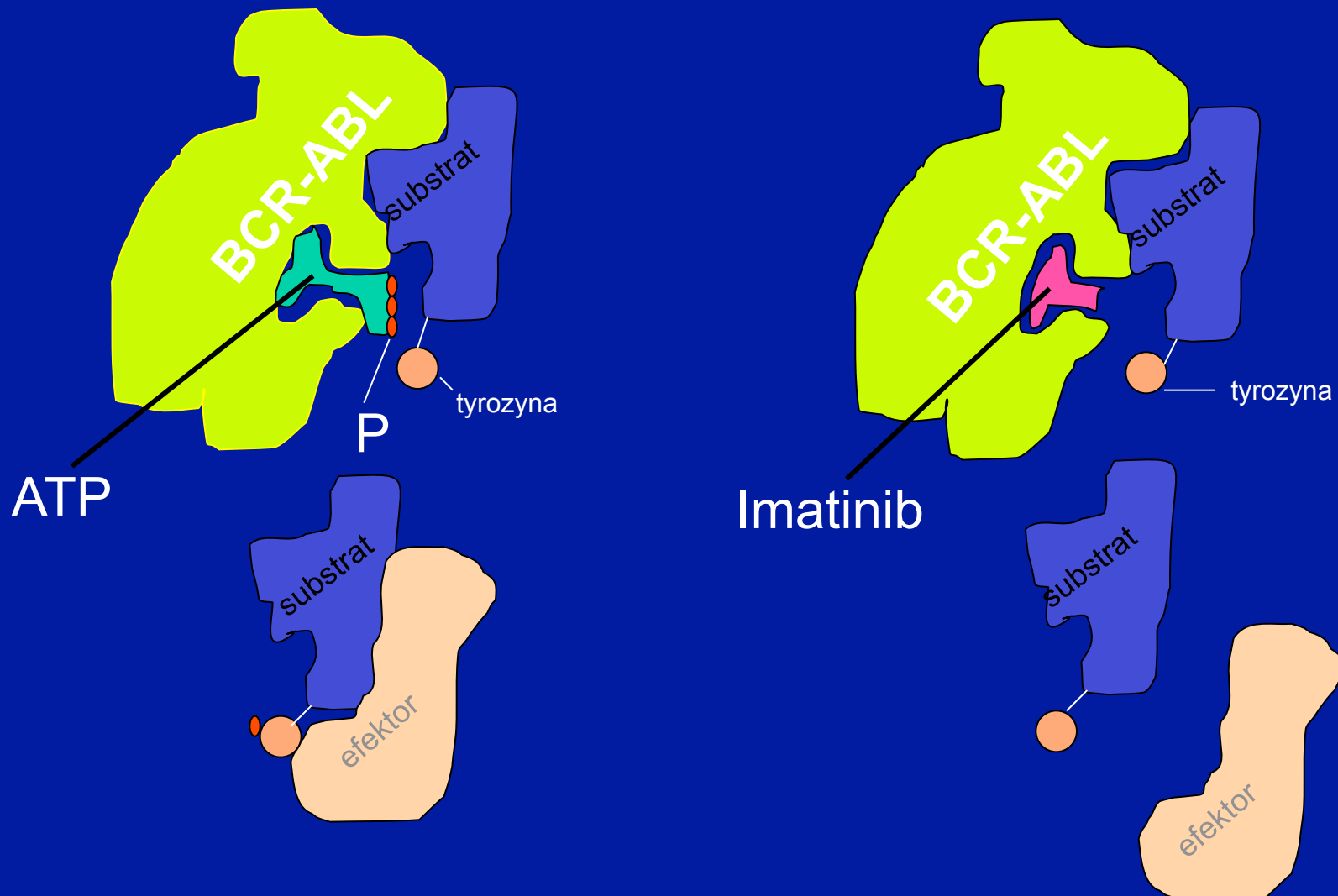
CML – faza przewlekła

- uczucie osłabienia
- uczucie pełności w jamie brzusznej
- bóle brzucha, zaburzenia łaknienia
- utrata masy ciała
- zwiększona potliwość

badanie przedmiotowe

- powiększenie śledziony
- powiększenie wątroby
- braku powiększenia węzłów chłonnych
- zmiany na skórze: głowy, twarzy, tułowia, kończyn

Mechanizm działania Imatinib (Gleevec)



Młdzieńcza białaczka mielomonocykowa JMML

- klonalna choroba występująca głównie u niemowląt i małych dzieci
- 2–3% białaczek dziecięcych
- wykazano związek z neurofibromatozą typu 1 u 10% i w niewielkim odsetku przypadków z zespołem Noonana
- powiększenie wątroby, śledziony i węzłów chłonnych
- plamisto-grudkowa wysypka na skórze twarzy
- gorączka
- zapalenie oskrzeli lub migdałków

JMML

- Charakteryzuje się rozrostem linii granulocytowej i monoidalnej
- leukocytoza $25-30 \times 10^3/\mu\text{l}$
- monocytoza
- małopłytkowość
- niekiedy niedokrwistość.
- promielocyty i mielocyty we krwi obwodowej
- liczba blastów zwykle mniejsza niż 5%

Table 4. Diagnostic criteria for juvenile myelomonocytic leukemia (WHO 2008) (source: [32])

Monocytoza we krwi obwodowej $> 1 \times 10^9/l$

Ponizej 20% blastów (mieloblastów, monoblastów i promonocytów) we krwi i szpiku

Brak chromosomu Ph i genu fuzyjnego *BCR-ABL1*

Spełnienie co najmniej dwóch z następujących kryteriów:

- zwiększone wartości hemoglobiny płodowej w stosunku do wieku
 - niedojrzałe granulocyty we krwi obwodowej
 - liczba WBC $> 10 \times 10^9/l$
 - klonalne nieprawidłowości chromosomalne
 - nadwrażliwość mieloidalnych komórek prekursorowych na GM-CSF *in vitro*
-

Młdzieńcza białaczka mielomonocytna (juvenile myelo-monocytic leukemia, JMML)

- Mutacje germinalne *PTPN11* lub *CBL*-przejściowe zespoły mieloproliferacyjne przypominające JMML
 - obserwacja
 - leczenie cytoredukcyjne
- Mutacje somatyczne *K-RAS*, *N-RAS* i *PTPN-11* lub z chorobą Recklinghausena typu 1
 - wskazana SCT

Leki celowane– przykłady

Inhibitory kinaz tyrozynowych- Imatinib
(Gleevec), Dasatinib, Nilotinib, Bosutinib

Inhibitory Jak/STAT-Ruxolitinib, Fedratinib

Inhibitory FLT3

Inhibitory proteasomów-Bortezomib

inhibitory deacetylazy histonów -Vorinostat

Przeciwciała monoklonalne- Daratumomab,
basiliximab, alemtuzumab

Zaburzenia genetyczne – rola w ostrych białaczkach podsumowanie

Zaburzenia chromosomalne i molekularne określają podtypy białaczki o zróżnicowanym rokowaniu

Translokacje chromosomowe powodują powstanie genów fuzyjnych, które są unikalne dla klonu nowotworowego każdego pacjenta i mogą być użyte do oceny odpowiedzi na leczenie (choroby resztkowej)

Zaburzenia genetyczne – rola w ostrych białaczkach podsumowanie

Translokacje chromosomowe często występujące w białaczkach dziecięcych są czynnikiem inicjującym rozwój choroby i często powstają w życiu płodowym

Dodatkowe zaburzenia genetyczne konieczne są do rozwoju białaczki

Białka kodowane przez geny fuzyjne działają głównie przez wywoływanie zaburzeń różnicowania i stanowią cel dla nowych rodzajów leków