

Minimal restsygdom ved maligne blodsygdomme II

Translation og terapeutiske konsekvenser

Professor Peter Hokland, klinisk assistent Hans Beier Ommen, molekylærbiolog Charlotte Guldborg Nyvold, overlæge Jesper Stentoft, bioanalytiker Karin Brændstrup, bioanalytiker Bodil Lind Andersen, bioanalytiker Lone Siig Mikkelsen & molekylærbiolog Mette Østergaard

Århus Universitetshospital, Århus Sygehus, Hæmatologisk Afdeling R

I en ledsagende artikel har vi redegjort for, at der ved en række hæmatologiske maligniteter ses genforandringer, der kan måles med kvantitativ polymerasekædereaktion (RQ-PCR). Denne teknik har de seneste år været igennem en præklinisk validering i multicenterregi, der har godtgjort, at den er klar til overførsel til den kliniske hverdag.

Ved både akut lymfatisk leukæmi (ALL), akut myeloid leukæmi (AML) og ikke mindst kronisk myeloid leukæmi (CML) vinder systematisk anvendelse af RQ-PCR ind, efter den i en periode har været anvendt sporadisk og/eller i undergrupper af patienter. En sådan anvendelse skal selvsagt have en klinisk konsekvens for de testede patienter, og fra metodologiens introduktion stod det klart, at der var adskillige kliniske situationer, hvor den potentielt kunne være gavnlig.

Cytoreduktion vil hos disse patienter have til formål gradvist at nedsætte sygdomsniveauet til et punkt, hvorfra det af den ene eller den anden grund ikke er muligt at udvikle et tilbagefald (recidiv). Det første tidspunkt, hvor *minimal residual disease* (MRD)-måling i teorien kan tænkes at være af værdi, er hos ALL- og AML-patienter ved vurdering af effekten af første kur. Her er en klinisk komplet remission (CR) en vigtig milepæl, men som det vil fremgå nedenfor, er der ofte ved klinisk CR molekylær (RQ-PCR+) restsygdom, hvis mængde kan gøres til genstand for yderligere analyse [1]. Ved efterfølgende kure vil MRD-bestemmelse kunne afsløre kinetikken for sygdomsniveauerne og dermed være en indikator for, hvorvidt patienten fortsat reagerer på behandlingen. Mens få patienter altså kommer i molekylær CR efter en enkelt kur, forventes en stadig større andel af dem - afhængigt også af følsomheden af MRD-markøren - at opnå dette ved afslutningen af de efterfølgende kure. Opnåelse af molekylær CR er ikke ensbetydende med helbredelse, men betyder blot, at patienten har nået den grænse, som i øjeblikket er lavest for MRD (forhåbentlig vil nyere og endnu mere følsomme analyser komme til).

Den måske største forventelige gevinst af RQ-PCR-analyser

ved leukæmi er imidlertid den tidlige erkendelse af recidiv, som desværre ses hos over halvdelen af de patienter med akut leukæmi, som opnår CR. Afhængig af kinetikken for et sådant tilbagefald vil klinikerne så at sige »have et forspring« i diagnosceringen af recidivet og derved et større terapeutisk vindue [2].

Kvantitativ polymerasekædereaktion ved akut lymfatisk leukæmi

De fleste tilfælde med ALL har som gennemgående molekylær signatur, at de gener, der udgør deres antigenspecifikke receptorer, er rearrangerede. For B-celler gælder dette deres immunglobulingener, for præ-B-celler gælder dette både deres immunglobulingener samt komponenter i T-cellerreceptoren, mens det for T-cellerne drejer sig om komponenter i T-cellerreceptoren. Det er uden for denne oversigt at redegøre for forholdene vedrørende MRD-detektion vha. rearrangement-specifikke MRD-*assays*, hvis kliniske konsekvens behandles af Nyvold *et al* [3].

For både præ-B-ALL, der er den hyppigste undertype, som for de øvrige gælder, at balancerede translokationer kan forekomme. Den hyppigste er t(12;21) (hos ca. 20% af patienterne), hvor fusionstranskriptet *TEL-AML1* kan anvendes til MRD-detektion. I denne situation kan recidiv påvises over seks måneder før klinisk fremkomst [2].

Kvantitativ polymerasekædereaktion ved akut myeloid leukæmi

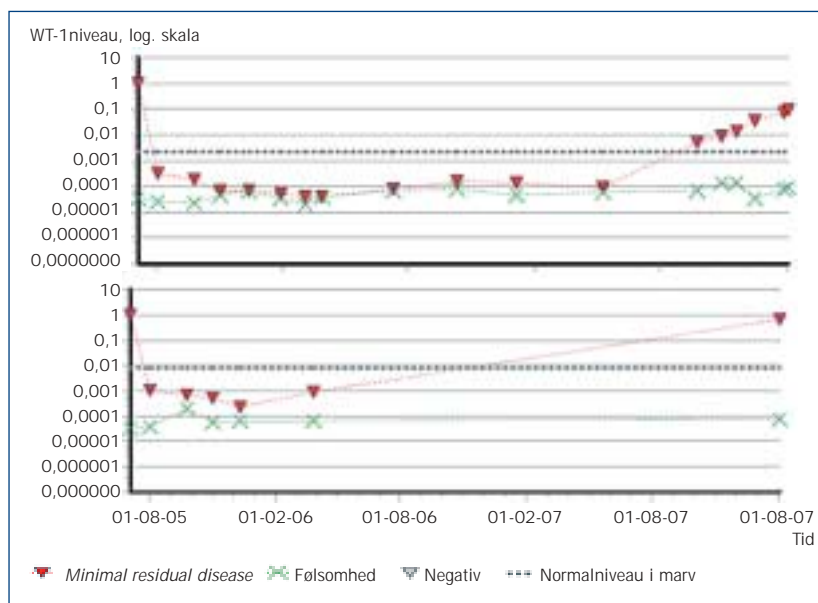
Ved denne sygdom kan op mod 40% af patienterne have fusionstranskripter, som kan gøres til mål for RQ-PCR, og disse indarbejdes i stigende grad i protokollerede behandlinger. Det har her vist sig, at kinetikken for recidiv i høj grad er afhængig af den molekylære undertype. Således forekommer

Forkortelser

RQ-PCR	= kvantitativ polymerasekædereaktion
ALL	= akut lymfatisk leukæmi
AML	= akut myeloid leukæmi
CML	= kronisk myeloid leukæmi
MRD	= <i>minimal residual disease</i>
CR	= komplet remission
NOPHO	= <i>Nordic Society for Pediatric Hematology and Oncology</i>

VIDENSKAB OG PRAKSIS | STATUSARTIKEL

Figur 1. Grafisk repræsentation af sygdomsforløb hos en 32-årig mand med akut myeloid leukæmi. Eneste molekylære markør var Wilms tumorgen 1 (*WT1*). Øverste panel viser *WT1*-niveauer i perifert blod; nederste panel viser *WT1*-niveauer i knoglemarv. På begge grafer viser den stiplede linje det relative niveau hos normale donorer i marv (*WT1* udtrykkes kun i ubetydelig grad i leukocytter fra perifert blod). Dag til dag-følsomheden af reaktionen ses af den nederste linje at variere mellem 1:10.000 og 1:20.000 (y-aksen er fraktionen af sygdom i forhold til diagnoseprøver). Det ses, at patienten hurtigt kommer i *WT1*-remission i blod og marv. Herefter overgår han – efter yderligere tre cytoreduktioner i december 2005 til ambulante blodprøvekontroller. Da disse ultimo september 2007 bliver positive, intensiveres de, og da der ved marvprøve primo februar 2008 ses recidiv ved flowcytometrisk analyse, genopstartes kemoterapi.



recidiv relativt hurtigt for de fleste fusionstranskript-negative leukæmier [4]. For de fusionstranskript-positive leukæmier er billedet lidt mere heterogent. Selv inden for den gruppe af leukæmier, der på baggrund af deres karyotype betragtes som havende en god prognose, ses der forskelle, idet de t(15;17)-positive promyelocyt-leukæmier og de t(8;21)-positive såkaldte *core binding factor*-leukæmier ligner de fusionstranskript-negative, hvorimod det for den anden undergruppe af *core binding factor*-leukæmier – de inv(16)-positive – gælder, at recidiv kan ses molekylært helt op til over et år før det kan observeres klinisk [5].

Som nævnt er det kun under halvdelen af alle AML-patienter, der bærer en balanceret translokation i deres celler, hvilket på sin side indebærer, at der ikke for nærværende er fusionstranskript-*assays* for de resterende patienter. En væsentlig del af disse har dog vist sig at have en punktmutation i *NPM1*-genet, som koder et kernetransportprotein, der på grund af mutationen displaceres fra kernen til cytoplasmaet [6]. Dette gen er så højt udtrykt, at præliminære undersøgelser tyder på, at det – til trods for, at det kun er en punktmutation – kan anvendes som en MRD-markør. Ydermere har det vist sig, at Wilms tumorgen 1 (*WT1*) er overudtrykt blandt andet ved myeloide maligniteter og kan anvendes som MRD-markør [7]. Da sidstnævnte således ikke er et ændret gen, skal ekspression i en patient ses på baggrund af niveauet hos normale donorer [8]. På trods af dette har internationale erfaringer med *WT1* været positive, og det har endog vist sig, at dets udtryk kan anvendes til at adskille patienter i høj og lav risiko, selv hos patienter der har opnået første CR. Med andre ord kan denne MRD-bestemmelse stratificere patienter i klinisk remission på et meget tidligt tidspunkt [4]. Et typisk eksempel på anvendelse af *WT1* til sygdomsopfølgning ses på **Figur 1**.

Kvantitativ polymerasekædereaktion ved kronisk myeloid leukæmi

Ved CML gælder, at RQ-PCR har vundet meget hurtigt indpas i den kliniske beslutningstagning. Dette har sin baggrund dels i den homogene molekylærbiologi, der ligger bag sygdommen (se foregående artikel), men også i, at behandlingen af denne leukæmi adskiller sig fra de øvrige derved, at næsten alle patienter nu tilbydes målrettet (»targeteret«) behandling med tyrosinkinasehæmmere, hvoraf imatinib var den første og stadig er den mest specifikke.

Tidlige studier over kinetikken i faldet af *BCR-ABL*-fusionstranskripter viste, at de var meget mere gradvise end de, der sås ved de akutte leukæmier [9]. Ydermere viste det sig, at opnåelse af et 1.000-fold fald i transkriptniveau ofte var et prognostisk stærkt tegn på opnåelse af komplet molekylært respons. Omvendt er stigninger i transkriptniveauer på mere en 100-fold næsten altid ensbetydende med behandlingssvigt, hvis baggrund kan være erhvervelse af andre cytogenetiske forandringer (f.eks. et ekstra Ph1+-kromosom) eller udvikling af tyrosinkinaseresistens med baggrund i punktmutationer i forskellige dele af den cellulære receptor.

Mens standardkaryotypering således er helt nødvendig i den primære diagnostik af CML, har RQ-PCR således nu de facto afløst både denne og fluorescens in situ-hybridisering i opfølgningen og behandlingsstyringen af disse patienter [10].

Translation af teknikken kvantitativ polymerasekædereaktion fra laboratorium til individualiseret klinisk anvendelse

Det vil være klart ud fra ovenstående, at MRD-måling i mange tilfælde har biologisk værdi i adskillige situationer. Ydermere har erfaringer med et hastigt stigende antal patienter

VIDENSKAB OG PRAKSIS | STATUSARTIKEL

ter vist, at konsistente stigninger i MRD-markører næsten altid er ensbetydende med klinisk recidiv. Ikke desto mindre udgør faren for den modsatte situation – at en falsk stigning i en MRD-markør medfører, at en patient unødigt modtager yderligere cytoreduktion – et scenarium, der må undgås. Af denne grund vil en måling, som viser stigning i MRD-værdien altid skulle gentages på en separat prøvedato hurtigt efter den første iagttagelse.

I individualiseret cancerbehandling siger det sig selv, at det er op til den enkelte behandlende læge at afgøre, hvilken konsekvens der skal tages af et MRD-svar. Patienten, hvis MRD-niveaukurve ses i Figur 1, blev fulgt uden, at der blev reageret klinisk i forhold til det molekylære recidiv. Hvis ikke der reageres på dette, kan det diskuteres, om det er etisk korrekt at teste patienten. Den nye engelske AML-protokol (AML17) er planlagt til at randomisere patienter til handling vs. vent-og-se med henblik på evidensbaseret vurdering af denne problemstilling.

Inden for ALL har *Nordic Society for Pediatric Hematology and Oncology* (NOPHO) hos børn vist vejen ved systematisk MRD-måling (ved de omtalte rearrangementer af immunoglobulin og T-celleceptorgener), og en ganske ny tysk undersøgelse hos voksne patienter har haft som konsekvens, at den næste protokol også indebærer »tvungen« MRD-intervention. Når hertil lægges den integrerede anvendelse af RQ-PCR ved CML (i øjeblikket ved anvendelse af nye tyrosinkinasehæmmere), kan det konkluderes, at RQ-PCR anvendes systematisk ved ALL og CML og testes i multicenterundersøgelser ved AML.

Der kan selvfølgelig stilles spørgsmål ved, om patienter, der ikke behandles med kurativt sigte, også skal tilbydes MRD-bestemmelse. Et rationale herfor er, at patienter i pallierende behandling om nogen har brug for en biologisk relevant sygdomsmarkering, ikke blot for at confirmere en eventuel behandlingsresistens, men i lige så høj grad for at udpege stadigt aktive behandlingsregimener.

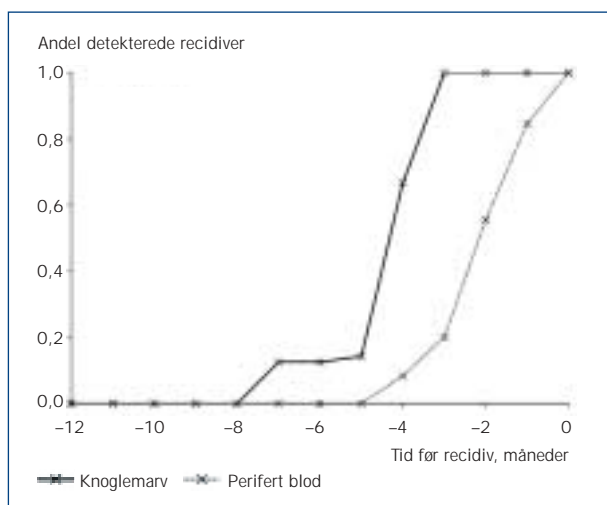
Faktaboks

Måling af restsygdom ved hjælp af kvantitativ polymerasekædereaktion (RQ-PCR) vinder indpas ved opfølgning og terapistyring af patienter med hæmatologiske maligniteter.

Ved akut myeloid leukæmi måles typisk mængden af RNA-transkript for balancerede translokationer, men for patienter uden sådanne kan gener med punktmutationer eller overekspression anvendes.

Følsomheden af RQ-PCR-analysen er rutinemæssigt så høj, at recidiver opdages, måneder før de ses klinisk.

Det forudses, at RQ-PCR bliver guldstandarden for opfølgning af disse patienter.



Figur 2. Forudsigt af klinisk recidiv hos 29 patienter med akut myeloid leukæmi, der var behandlet med kurativt sigte til remission. Recidiv er sat til tiden 0, og fraktionen af patienter med målbare recidiver i henholdsvis blod og marvmateriale fremgår af y-aksen. Det ses, at recidiver ses først i marv, oftest mellem to og tre måneder før de fremkommer i blod. På den anden side kunne vi matematisk vise, at ved blodprøvetagning hver anden måned vil over 80% af recidiverne opdages, og der vil medianen være halvanden måned fra det molekylære til det kliniske recidiv (se [4]).

Sidstnævnte overvejelser rejser det generelle spørgsmål, hvor ofte patienter skal testes for MRD. Den gode nyhed er her, at blodprøver hos en meget stor del af patienterne er nok til at forudsige et recidiv i god tid, således at tidligere tiders marvpunkturer, der ofte generede patienterne betydeligt, kan undgås. Den dårlige nyhed er, at patienter kan føle sig sygeliggjorte ved ekstra prøvetagning. I praksis vil patienterne dog ofte have et meget realistisk forhold til deres sygdom, og det er snarere reglen end undtagelsen, at de spørger til resultatet af den seneste MRD-analyse. For i alle tilfælde at holde antallet af prøvetagningstidspunkter nede, har vi her i afdelingen udviklet en matematisk model for optimale tidsintervaller ved analyse af recidiver hos *WT1+*-AML-patienter, og vi er i gang med at afgøre optimale prøvetagningskadencer for de hyppigste MRD-markører. Vi har kunnet gøre dette til genstand for matematisk modellering, og et eksempel herpå fremgår af data i Figur 2 og i [4].

Konklusion

Den prækliniske validering af RQ-PCR til bestemmelse af MRD på baggrund af genforandringer og overekspressioner ved hæmatologiske maligniteter er nu afløst af en fase, hvor teknikken vinder stadig mere indpas i den kliniske hverdag. Først og fremmest anvendes den systematisk i kliniske protokoller, hvor individuel terapeutisk intervention sker på baggrund af stigning i MRD-værdier. Desuden forventes den at vinde stigende indpas ved behandling af patienter uden for protokollerede behandlinger til individuel behandlingsstyring.

VIDENSKAB OG PRAKSIS | ORIGINALARTIKEL

Korrespondance: Peter Hokland, Immunhæmatologisk Laboratorium, Hæmatologisk Afdeling R, Århus Universitetshospital, Århus Sygehus, DK-8000 Århus C. E-mail: phokland@ki.au.dk

Antaget: 9. september 2008
Interessekonflikter: Ingen

Litteratur

1. Schnittger S, Weisser M, Schoch C et al. New score predicting for prognosis in PML-RARA+, AML1-ETO+, or CBFBMYH11+ acute myeloid leukemia based on quantification of fusion transcripts. *Blood* 2003;102:2746-55.
2. Pallisgaard N, Clausen N, Schroder H et al. Rapid and sensitive minimal residual disease detection in acute leukemia by quantitative real-time RT-PCR exemplified by t(12;21) TEL-AML1 fusion transcript. *Genes Chromosomes Cancer* 1999;26:355-65.
3. Nyvold C, Madsen HO, Ryder LP et al. Precise quantification of minimal residual disease at day 29 allows identification of children with acute lymphoblastic leukemia and an excellent outcome. *Blood*. 2002;99:1253-8.
4. Ommen HB, Nyvold. CG, Brændstrup K et al. Relapse prediction in acute myeloid leukemia patients in complete remission using wt1 as a molecular marker: Development of a mathematical model to predict time from molecular to clinical relapse and define optimal sampling intervals. *Br J Haematol*; 2008;141:782-91.
5. Stentoft J, Hokland P, Ostergaard M et al. Minimal residual core binding factor AMLs by real time quantitative PCR-initial response to chemotherapy predicts event free survival and close monitoring of peripheral blood unravels the kinetics of relapse. *Leuk Res* 2006;30:389-95.
6. Falini B, Mecucci C, Tiacci E et al. Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *N Engl J Med* 2005;352:254-66.
7. Inoue K, Sugiyama H, Ogawa H et al. WT1 as a new prognostic factor and a new marker for the detection of minimal residual disease in acute leukemia. *Blood* 1994;84:3071-9.
8. Ostergaard M, Olesen LH, Hasle H et al. WT1 gene expression: an excellent tool for monitoring minimal residual disease in 70% of acute myeloid leukaemia patients – results from a single-centre study. *Br J Haematol* 2004;125:590-600.
9. Stentoft J, Pallisgaard N, Kjeldsen E et al. Kinetics of BCR-ABL fusion transcript levels in chronic myeloid leukemia patients treated with STI571 measured by quantitative real-time polymerase chain reaction. *Eur J Haematol* 2001;67:302-8.
10. Branford S, Cross NC, Hochhaus A et al. Rationale for the recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts in patients with chronic myeloid leukaemia. *Leukemia* 2006;20:1925-30.

Blødende peptisk ulcus

Helicobacter pylori-prævalens og forbrug af non-steroide antiinflammatoriske stoffer/acetylsalicylsyre

Stud.med. Anders Vestergård, stud.med. Kim Bredahl, professor Ove B. Schaffalitzky de Muckadell, læge Ole Birger Pedersen & overlæge Jane Møller Hansen

Odense Universitetshospital,
Medicinsk Gastroenterologisk Afdeling S

Resume

Introduktion: Infektion med *Helicobacter pylori* (HP) og non-steroide antiinflammatoriske stoffer (NSAID)/acetylsalicylsyre (ASA) er risikofaktorer for blødende peptisk ulcus. HP-eradikation nedsætter risikoen for reblødning. Antibiotika, protonpump hæmmer (PPI) og blod i ventriklen kan påvirke HP-testen. Formålene med dette studie var at opgøre HP-prævalensen samt NSAID/ASA-forbruget og andelen af idiopatisk ulcus blandt patienter med blødende ulcus i et HP-lav-prævalensområde samt at bestemme andelen af initialt falsk negative HP-tests. Desuden var formålet at bestemme ændringer i risikomønstret for patienter med blødende peptisk ulcus over de sidste to årtier.

Materiale og metoder: Retrospektiv gennemgang af journaler for konsekutive patienter, der var indlagt med blødende ulcus i perioden 2003-2006 på Medicinsk Gastroenterologisk Afdeling S, Odense Universitetshospital. Patienter, der initialt testede HP-negative, eller som ikke var HP-testede, blev tilbudt *urea breath*-test. Populationen er sammenlignet med prospektivt registrerede opgørelser for perioderne 1990-1992 og 2000.

Resultater: I alt 264 patienter med en gennemsnitsalder på 72 år blev indlagt i perioden 2003-2006. HP-prævalensen var 34%, NSAID/ASA-brugere udgjorde 81% i 2003-2006 mod 55% i 1990-1992. Henholdsvis 19% og 17% af patienterne var i behandling med PPI og antibiotika ved indlæggelsen. I alt 13% havde initialt en falsk negativ HP-test. Andelen af idiopatisk ulcus var 6,6%.

Konklusion: Sammenlignet med tidligere opgørelser var HP-prævalensen lavere og NSAID/ASA-forbruget højere i 2003 til 2006. Andelen med falsk negativ HP-test var 13%, hvorfor vi anbefaler kontroltest for HP ved forudgående PPI-, antibiotikabehandling eller blod i ventriklen (biopsibaseret ureasetest).

Hvert år rammes 4.000-5.000 danskere af peptisk ulcus. Andelen af disse, der har blødende ulcus, udgør 40% [1]. Tidligere undersøgelser har vist, at de primære risikofaktorer for blødende ulcus er NSAID/ASA-forbrug og infektion med *Helicobacter pylori* (HP) [2]. HP-prævalensen er faldende, og andelen af idiopatiske peptiske ulcera (IPUD: HP- og NSAID/ASA-negative) er muligvis stigende. En tredjedel af de patienter, der tidligere har haft ulcusblødning, vil få recidivblødning inden for 1-2 år, hvis ikke de modtager forebyggende behandling efter den primære ulcusbehandling [3]. Det er tid-