

# Årsagen til uforklaret cytopeni kan ofte findes med fokuseret DNA-sekventering

Jakob Werner Hansen, Simon Husby & Kirsten Grønbæk

## STATUSARTIKEL

Hæmatologisk Klinik,  
Rigshospitalet

Ugeskr Læger  
2017;179:V03170179

Teknologiske fremskridt forbedrer diagnostikken i hæmatologisk regi, og i denne artikel vil vi gennemgå, hvordan nye molekylærgenetiske metoder har betydet, at vi tidligt i forløbet kan identificere patienter med forstadier til myelodysplastisk syndrom (MDS) og akut myeloid leukæmi (AML).

De fleste patienter, som henvises til en hæmatologisk afdeling, har et abnormt blodbillede. Inden en sådan henvisning kræves der oftest en bred blodprøve-screening for at fastslå, om videre udredning for hæmatologisk sygdom er primært indiceret (**Tabel 1**). I denne artikel har vi fokus på patienter, som har cytopeni og er henvist til videreudredning på en hæmatologisk afdeling. Hos disse patienter vil der typisk blive foretaget yderligere blodprøver, knoglemarvsbiopsi, cytogenetisk undersøgelse og evt. en flowcytometrisk markørundersøgelse. Ofte er dette tilstrækkeligt til at stille en korrekt diagnose, som kan variere fra et bredt spektrum af hæmatologiske sygdomme til andre tilstande såsom karcinomatose i knoglemarven eller en benign tilstand.

Efter den indledende udredning er der stadig patienter, hos hvem det ikke har været muligt at finde en årsag til den persisterende cytopeni, og disse patienter får oftest prædikatet »cytopeni af ukendt årsag«. De følges som regel i en periode i et hæmatologisk ambulatorium. Herefter vil en del blive overført til egen læge, hvis tilstanden er stationær og ikke behandlingskrævende.

Inden for de seneste par år er der kommet nye diag-

nostiske muligheder i form af *next generation sequencing* (NGS), hvor et stort antal gener kan undersøges for mutationer på samme tid. Dette har generelt medført en bedre molekylærbiolegisk klassificering af de hæmatologiske sygdomme.

MDS er kendetegnet ved cytopeni af en eller flere af blodets primære cellelinjer ledsaget af dysplasi af mere end 10% af cellerne i knoglemarven [1]. MDS kan have et indolent forløb, som kun hos 10-15% vil udvikles til leukæmi [2], mens en del af patienterne har en aggressiv type med en forventet medianlevetid på under et år [2]. Behandlingen varierer fra understøttende behandling med erythropoietinstimulation til behandling med regelret kemoterapi eller stamcelletransplantation, som er den eneste mulighed for helbredelse. Inden for de seneste fem år har man DNA-sekventeret blod og/eller knoglemarv fra store kohorter af patienter med MDS. Dette har medført identifikationen af 20-30 gener, som hyppigt er muterede ved MDS [3, 4].

Via disse sekventeringsundersøgelser har det været muligt at afdække et klonalt hierarki, hvor mutationer i de epigenetiske regulatorer (bl.a. *TET2* og *DNMT3A*) ser ud til at være de første mutationer, der opstår i de hæmatopoietiske stamceller. Senere kan der tilkomme nye mutationer i klassiske tumorsuppressor- og onkogener herunder *TP53* og *NRAS* [5], dvs. en klonal udvikling, der typisk er associeret med progression til en mere aggressiv form for MDS eller AML [6].

## MOLEKYLÆRE FORANDRINGER VED CYTOPENI AF UKENDT ÅRSAG OG MYELODYSPLASTISK SYNDROM

Cytogenetiske forandringer har været brugt til risikostratificering af patienter gennem de seneste 20 år, men kun ca. 50% af patienterne med MDS har cytogenetiske forandringer [7, 8]. Især hos patienter med lavrisiko-MDS ses der sjældent cytogenetiske forandringer. Ved hjælp af NGS er det muligt at identificere mutationer hos mere end 80% af patienterne og hos næsten alle højrisikopatienter findes der en og oftest flere mutationer i et MDS-associeret gen [4]. Patienter, der har persisterende uforklaret cytopeni og ikke opfylder de konventionelle krav til MDS-diagnosen, defineres ud fra kriterierne i **Tabel 2** som lidende af idiopatisk cytopeni af ukendt signifikans (ICUS). Blandt disse

## HOVEDBUDSKABER

- ▶ Myelodysplastisk syndrom er kendetegnet ved cytopeni og dysplasi af knoglemarvens celler, men det kan være svært at stille en korrekt diagnose hos patienter, der ikke har øget antal blaster i knoglemarven.
- ▶ *Next generation sequencing* har vist sig at være en lovende metode til forbedring af diagnostikken ved myelodysplastisk syndrom (MDS) og hos patienter med uforklaret cytopeni.
- ▶ I fremtiden vil mutationsscreening formentlig blive en del af udredningen af patienter med vedvarende cytopeni, og med den vil man kunne identificere patienter, der har risiko for at få MDS eller akut myeloid leukæmi. Fra januar 2017 er der indført specifikke diagnosekoder for idiopatisk cytopeni af ukendt signifikans = DD758C og klonal cytopeni af ukendt signifikans = DD758D.

patienter er det muligt at identificere mutationer hos 40-60% [9, 10]. Hvis der hos en patient med ICUS findes en mutation i et eller flere sygdomsassocierede gener, betegnes tilstanden klonal cytopeni af ukendt signifikans (CCUS) (Figur 1) [11]. Mutationerne er oftest til stede i et af de 20 hyppigst muterede gener ved manifest MDS, og vi ved, at nogle gener, f.eks. *FLT3*, udelukkende findes muteret ved højrisiko-MDS og -AML. Derimod er mutationer i f.eks. *TET2* associeret med et tidligt stadie af sygdommen og findes hyppigt ved lavrisiko-MDS, men kan persistere sammen med nye mutationer, hvis sygdommen udvikles til en mere aggressiv form [3, 4]. Hvis mutationer i *TET2* findes hos patienter med AML er det således oftest tegn på, at sygdommen er progredieret fra MDS og har en ugunstig prognose [12, 13]. Således ser det ud til, at molekylær-genetikken er af afgørende betydning for både diagnostik og valg af behandling af MDS. Senest har man i et stort studie påvist, at patienter med MDS med mutationer i *TP53* har lige så god gavn af epigenetisk behandling med demetylerende stoffer som af behandling med induktionskemoterapi [14]. Den store forskel er, at den epigenetiske behandling har betydeligt færre bivirkninger end behandling med induktionskemoterapi, som tidligere har været førstevalg. Man kan derved øge livskvaliteten for patienterne i den relativt korte restlevetid ved at vælge den rette behandling på baggrund af molekylær-genetiske undersøgelser.

### MUTATIONER, KLONAL HÆMATOPOIESE OG ALDRING

Mutationer i MDS-associerede gener kan også findes hos tilsyneladende raske ældre. Dette kaldes klonal hæmatopoiese, og prævalensen stiger med alderen (Figur 2). Således har ca. 10% af befolkningen på 70 år mutation i en af de gener, som oftest er muteret i MDS [15, 16]. Hvis man har klonal hæmatopoiese øger det risikoen med en faktor 12 for senere at få myeloid eller lymfoid hæmatologisk cancer. Sygdomsudviklingen er på ca. 1% pr. år ved disse mutationer, hvilket er omtrent det samme som risikoen for at få myelomatose, hvis man har en monoklonal gammopati af ukendt signifikans. Pga. den lave årlige incidens af hæmatologisk cancer hos tilsyneladende raske personer med disse mutationer og manglende vidende om behandlingseffekter kan det i øjeblikket ikke anbefales at anvende mutationsanalyse som screening hos den raske befolkning uden cytopeni. Det er desuden ukendt, hvilke risikofaktorer der er for at få manifest hæmatologisk sygdom, hvis man har mutation i et af disse gener. Klonal hæmatopoiese, altså en tilfældigt opdaget mutation uden tilhørende cytopeni, betegnes internationalt *clonal haematopoiesis of indetermined potential* (CHIP) og er forskellig fra CCUS, hvor de muterede stamceller ikke formår at opretholde et normalt blodcelleniveau.

TABEL 1

Blodprøver, der bør vurderes inden henvisning til hæmatologisk udredning for cytopeni: hæmatologisk basispakke. Specifik mistanke om sygdom, f.eks. hiv, hepatitis eller mangeltilstand, bør afkræftes inden henvisning.

Hæmoglobin
Middelcellevolumen
Gennemsnitlig erythrocythæmoglobinkoncentration
Hæmatokrit
Ferritin
Jern
Transferrin
B <sub>12</sub> -vitamin
Folat
Trombocytter
Leukocytter
Differentialtælling
Kreatinin
Na <sup>+</sup>
K <sup>+</sup>
C-reaktivt protein
Urat
Calcium
Laktadehydrogenase
Albumin
Basisk fosfatase
Bilirubin
Alaninaminotransferase
International normaliseret ratio, koagulation

TABEL 2

Kriterier for idiopatisk cytopeni af ukendt signifikans.

Knoglemarv er ikke diagnostisk for hæmatologisk sygdom eller anden cancer
Persisterende cytopeni i > 6 mdr. i henhold til laboratorieværdier
Ingen cytogenetiske forandringer fraset tab af kromosom Y
Andre hyppige årsager til cytopeni er udelukket, herunder vitaminmangel, hiv, hepatitis og primær immunbetinget cytopeni
Medikamentel udløst cytopeni bør udelukkes

### NYE MULIGHEDER FOR BEDRE DIAGNOSTIK OG IDENTIFIKATION AF PATIENTER MED RISIKO FOR AT FÅ MYELOID SYGDOM

Vi har for nyligt påvist, at det kan være svært at afgøre, om patienter med cytopeni har lavrisiko-MDS eller ej [9]. Diagnosen af MDS er bl.a. fastlagt ved dysplasi af mere end 10% af cellerne i knoglemarven [1, 17], men den morfologiske vurdering har stor interobservervarians [18]. I gruppen af patienter, der har cytopeni med mindre end 5% blaster i knoglemarven, kan screening for mutationer i MDS-associerede gener derfor være et godt supplement til den almindelige diagnostik. Nogle

FIGUR 1

Skematisk opdeling af patienter med cytopeni og/eller klonal sygdom.

	Raske personer	Patienter med persisterende cytopeni i mere end 6 mdr. (ICUS)		Myelodysplastisk syndrom	
	Klonal hæmatopoiese (CHIP)	Ikkeklonal	Klonal (CCUS)	Lav-risiko	Høj-risiko
Klonalitet	Ja	Nej	Ja	Oftest	Ja
Dysplasi	Nej	Nej	Nej	Ja	Ja
Cytopeni	Nej	Ja	Ja	Ja	Ja
Blaster i %	<5%	<5%	<5%	<5%	>5%
SKS-kode	Ingen	DD758C	DD758D	DD46	DD46

ICUS = idiopatisk cytopeni af ukendt signifikans; CCUS = klonal cytopeni af ukendt signifikans; CHIP = *clonal haematopoiesis of indeterminate potential*.

patienter vil have genmutationer, der er associeret med en dårlig prognose, uden at have de klassiske negative prognostiske markører som cytogenetiske forandringer eller overskud af blaster i knoglemarven [5, 9, 10]. Patienter med mutationer i MDS-associerede gener er i risiko for at progrediere til mere aggressiv sygdom over en årrække. Derimod ser det ud til, at patienter uden mutationer, men med persisterende cytopeni sjældent har risiko for at få malign hæmatologisk sygdom [9, 19]. I denne sygdomsgruppe skal man i stedet undersøge grundigt for andre årsager til persisterende cytopeni, f.eks. alkoholmisbrug, reumatologisk lidelse, anden cancer, autoimmune cytopenier eller arvelig disposition.

Det er særligt vigtigt, at patienter med persisterende cytopeni henvises tidligt til en hæmatologisk afdeling, og at molekylærgenetisk undersøgelse overvejes som led i den diagnostiske proces. Dette kan have stor betydning for behandlingsvalg, som kan være knogle-

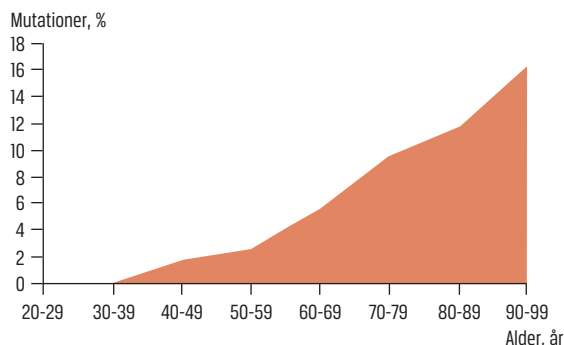
marvstransplantation, hvor alder har afgørende betydning [20].

#### KLONAL HÆMATOPOIESE OG RISIKO FOR UDVIKLING AF TERAPIRELATERET LEUKÆMI VED BEHANDLING AF SOLID CANCER

Alle patienter, som behandles med kemoterapi, er i risiko for at få terapirelateret MDS/leukæmi, og et større antal behandlinger og højere dosisstørrelse øger risikoen markant [21]. Tilstanden er oftest behandlingsresistent og har en særdeles dårlig prognose [13]. Det er netop påvist, at visse patienter med solide cancers, inden påbegyndelse af behandling med kemoterapi, har klonal hæmatopoiese med forekomst af de typiske mutationer i blodets celler. Hvis patienterne flere år senere får terapirelateret MDS/AML genfindes de samme mutationer i de maligne celler, oftest med øget frekvens [22]. Man antager, at behandlingen med kemoterapi inducerer en klonal selektion med øget risiko for malign transformation. En analogi til dette scenarie er selektion af resistente bakteriestammer ved behandling med antibiotika. Dette er en ny ætiologi for terapirelateret MDS/AML, som adskiller sig fra den, man ser efter behandling med topoisomerase II-hæmmere, som typisk opstår 1-3 år efter kemoterapien og er kendetegnet ved en balanceret translokation, der involverer kromosomerne 11q23 eller 21q22 [23]. I januar 2017 blev der publiceret to case-kontrol-studier med patienter med/uden udvikling af terapirelateret MDS/AML efter kemoterapi for solid cancer. Resultaterne af disse studier bekræfter, at klonale mutationer før behandling med kemoterapi er en risikofaktor for terapirelateret MDS/AML [24, 25]. Dog er den prognostiske betydning usikker, og anvendeligheden af disse mutationer som biomarkører forud for kemoterapi bør valideres i prospektive studier. Risikoen for terapirelateret malignitet er forsat meget lille for patienter, som ikke tidligere har fået kemoterapi, men hos patienter, der har

FIGUR 2

Klonal hæmatopoiese i baggrundsbefolkningen. Prævalensen af somatiske mutationer i baggrundsbefolkningen. Såfremt der findes en mutation i en af de undersøgte gener, er risikoen ~1% pr. år for at der udvikles hæmatologisk cancer. Frit efter [15, 16].



fået mange tidligere behandlinger med kemoterapi, vil det muligvis fremover være nyttigt at screene for klonal hæmatopoiese, inden yderligere behandling iværksættes, specielt hvis der findes et alternativ til kemoterapi.

## KONKLUSION

Der er ingen tvivl om, at NGS-baseret mutationscreening får stor betydning ved mange sygdomme, også uden for hæmatologien. Det er endnu ikke en rutineundersøgelse i hæmatologisk regi, men tilbydes på flere hospitaler i Danmark og vil blive mere udbredt inden for de kommende år. Det har tidligere været vanskeligt at stille en præcis diagnose hos mange patienter med cytopeni, og vi forventer, at den targeterede sekventering af MDS-associerede gener kan være et værdifuldt redskab, når man skal finde årsagen til uforklaret anæmi, leukopeni og/eller trombocytopeni. Patienter med cytopeni bør stadig henvises til en hæmatologisk afdeling og gennemgå et standardudredningsprogram med knoglemarvsbiopsi, inden mutationscreening overvejes. Den største behandlingsmæssige konsekvens vil være hos de patienter, hvor allogene knoglemarvstransplantation kan være en mulighed. Her ser det ud til, at mutationscreening kan få afgørende betydning for, om patienten er kandidat til knoglemarvstransplantation. Blandt de ældste og mest skrøbelige patienter vil den primære behandling stadig være understøttende med f.eks. erythropoietin og transfusioner, men graden af opfølgning og yderligere udredning kan påvirkes af eventuelt påviste mutationer. Endelig er vores forståelse af den basale biologi ved disse sygdomme inde i en hastig udvikling, og man kan håbe, at der om få år udvikles specifik behandling som kan targetere de sygdomsfremkaldende mutationer i CCUS, således at man undgår eller bremser udvikling af MDS og AML.

## SUMMARY

Jakob Werner Hansen, Simon Husby & Kirsten Grønbæk:

The cause of cytopenia of undetermined significance can often be found by using next generation sequencing  
Ugeskr Læger 2017;179:V03170179

Patients with persistent cytopenia are frequently referred to the haematological departments, and a diagnosis of myelodysplastic syndrome is often suspected. After routine assessment including a broad range of blood tests, bone marrow biopsy, and cytogenetics, a definite diagnosis can still not be found for some patients, although they have symptomatic cytopenia. In these cases, next generation sequencing is a valuable supplement in identifying patients with early stages of myeloid cancer.

**KORRESPONDANCE:** Kirsten Grønbæk.

E-mail: kirsten.groenbaek@regionh.dk

**ANTAGET:** 11. april 2017

**PUBLICERET PÅ UGESKRIFTET.DK:** 19. juni 2017

**INTERESSEKONFLIKTER:** ingen. Forfatterens ICMJE-formularer er tilgængelige sammen med artiklen på Ugeskriftet.dk

## LITTERATUR

1. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL et al. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. IARC Press, 2008.
2. Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J et al. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood* 2012; 120:2454-65.
3. Papaemmanuil E, Gerstung M, Malcovati L et al. Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. *Blood* 2013;122:3616-27.
4. Haferlach T, Nagata Y, Grossmann V et al. Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 2013;28:241-7.
5. Bejar R, Stevenson KE, Caughey B et al. Somatic mutations predict poor outcome in patients with myelodysplastic syndrome after hematopoietic stem-cell transplantation. *J Clin Oncol* 2014;32:2691-8.
6. Mossner M, Jann J-C, Wittig J et al. Mutational hierarchies in myelodysplastic syndromes dynamically adapt and evolve upon therapy response and failure. *Blood* 2016;128:1246-59.
7. Schanz J, Tüchler H, Solé F et al. New comprehensive cytogenetic scoring system for primary myelodysplastic syndromes (MDS) and oligoblastic acute myeloid leukemia after MDS derived from an international database merge. *J Clin Oncol* 2012;30:820-9.
8. Greenberg P, Cox C, LeBeau MM et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood* 1997;89: 2079-88.
9. Hansen JW, Westman MK, Sjö LD et al. Mutations in idiopathic cytopenia of undetermined significance assist diagnostics and correlate to dysplastic changes. *Am J Hematol* 2016;91:1234-8.
10. Kwok B, Hall JM, Witte JS et al. MDS-associated somatic mutations and clonal hematopoiesis are common in idiopathic cytopenias of undetermined significance. *Blood* 2015;126:2355-61.
11. Steensma DP, Bejar R, Jaiswal S et al. Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes. *Blood* 2015;126:9-16.
12. Kosmider O, Delabesse E, Mansat-De Mas V et al. TET2 mutations in secondary acute myeloid leukemias: a French retrospective study. *Haematologica* 2011;96:1059-63.
13. Granfeldt Ostgard LS, Medeiros BC, Sengelov H et al. Epidemiology and clinical significance of secondary and therapy-related acute myeloid leukemia: a national population-based cohort study. *J Clin Oncol* 2015; 33:3641-9.
14. Welch JS, Petti AA, Miller CA et al. TP53 and decitabine in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med* 2016; 375:2023-36.
15. Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J et al. Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. *N Engl J Med* 2014; 25:2488-98.
16. Genovese G, Köhler AK, Handsaker RE et al. Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence. *N Engl J Med* 2014;371:2477-87.
17. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 2016;127:2391-406.
18. Parmentier S, Schetelig J, Lorenz K et al. Assessment of dysplastic hematopoiesis: lessons from healthy bone marrow donors. *Haematologica* 2012;97:723-30.
19. Malcovati L, Galli A, Travaglino E et al. Predictive value of mutation analysis in the diagnostic approach to patients with unexplained cytopenia. *Blood* 19. apr 2017 (e-pub ahead of print).
20. Della Porta MG, Alessandrino EP, Bacigalupo A et al. Predictive factors for the outcome of allogeneic transplantation in patients with MDS stratified according to the revised IPSS-R. 2014;123:2333-42.
21. Pedersen-Bjergaard J, Andersen MK, Andersen MT et al. Genetics of therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2008;22:240-8.
22. Wong TN, Ramsingh G, Young AL et al. Role of TP53 mutations in the origin and evolution of therapy-related acute myeloid leukaemia. *Nature* 2015;518:552-5.
23. Pedersen-Bjergaard J, Philip P. Balanced translocations involving chromosome bands 11q23 and 21q22 are highly characteristic of myelodysplasia and leukemia following therapy with cytostatic agents targeting at DNA-topoisomerase II. *Blood* 1991;78:1147-8.
24. Takahashi K, Wang F, Kantarjian H et al. Preleukaemic clonal haemopoiesis and risk of therapy-related myeloid neoplasms: a case-control study. *Lancet Oncol* 2017;18:100-11.
25. Gillis NK, Ball M, Zhang Q et al. Clonal haemopoiesis and therapy-related myeloid malignancies in elderly patients: a proof-of-concept, case-control study. *Lancet Oncol* 2017;18:112-21.