

Univerzita Karlova

2. lékařská fakulta

Studijní program: Imunologie



MUDr. Michaela Nováková

**Imunopatologické mechanismy selhání
kostní dřeně**

**Immunopathological mechanisms of bone
marrow failure**

Dizertační práce

Školitel: MUDr. Ester Mejstříková, Ph.D.

Praha, 2017

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 19.5.2017

Michaela Nováková

Poděkování

Mé největší poděkování patří mé školitelce MUDr. Ester Mejstříkové, Ph.D., nejen za profesionální vedení, její nevyčerpatelné znalosti a cenné zkušenosti, umožnění podílet se na zahraničních projektech, ale i za osobní podporu v průběhu celého studia. Děkuji doc. MUDr. Ondřeji Hrušákovi, Ph.D., a prof. MUDr. Janu Trkovi, Ph.D., za možnost pracovat laboratořích CLIP s výborným zázemím. Dále děkuji doc. MUDr. Tomáši Kalinovi, Ph.D., za předání jeho neocenitelných zkušeností a znalostí v oboru průtokové cytometrie. Děkuji RNDr. Martině Váškové, Ph.D., MUDr. Evě Froňkové, Ph.D., RNDr. Veronice Kanderové, Ph.D., a ostatním kolegům z laboratoří CLIP za velmi přátelskou atmosféru. Na závěr bych ráda poděkovala své rodině za podporu v průběhu celého studia.

Předmluva

Předkládaná dizertační práce se věnuje problematice selhání kostní dřeně v terénu poruchy imunity a maligního onemocnění. Stěžejní část práce se věnuje myelodysplastickému syndromu a aplastické anémii u dětí jako nejčastějším získaným formám selhání kostní dřeně, jejich charakterizaci včetně identifikace genetického pozadí a popisu jednotlivých podskupin. Onemocnění jsme se věnovali jak v rámci národní studie, tak i v rámci zahraniční spolupráce Evropské pracovní skupiny pro myelodysplastický syndrom (EWOG-MDS).

Důležitou součástí je rozvoj moderních metodik a jejich úlohy pro diagnostiku a sledování zmíněných onemocnění. V rámci zahraniční spolupráce konsorcia Euroflow jsme se věnovali standardizaci průtokové cytometrie a aplikaci nových analyzačních metod pro studium vývoje jednotlivých krevních linií, v rámci naší laboratoře jsme rozvíjeli metodu sekvenování nové generace. Získaná data jsou perspektivní pro hodnocení odpovědi na léčbu u akutní lymfoblastické leukémie. Hodnocení excizních kroužků B a T buněčného receptoru je pomocným nástrojem především pro studium poruch imunity.

Součástí práce je 9 příloh, z toho 8 publikací přijatých a 1 publikace v recenzním řízení. V těchto přílohách jsou podrobně popsány použité metodiky a studovaní pacienti, samotná dizertační práce se věnuje především úvodu do problematiky, cílům práce a jejím výsledkům.

Identifikační záznam

NOVÁKOVÁ, Michaela. *Imunopatologické mechanismy selhání kostní dřeně. [Immunopathological mechanisms of bone marrow failure]*. Praha, 2017. 44 s., 9 příl. Dizertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta, Klinika dětské hematologie a onkologie. Vedoucí práce MUDr. Ester Mejstříková, Ph.D.

Abstrakt

Selhání kostní dřeně vzniká na podkladě poruchy imunity i maligního onemocnění. Studium těchto onemocnění pomocí nových metodik přináší nejen nové informace o patogenezi, ale i napomáhá v jejich diagnostice a sledování odpovědi na léčbu.

Myelodysplastický syndrom (MDS) a aplastická anémie jsou nejčastější formy získaného selhání kostní dřeně u dětí. Vyšetřili jsme prevalenci mutací v transkripčním faktoru GATA-2 v kohortě českých dětských pacientů. Prevalence je 17 % u refrakterní cytopenie dětského věku, 14 % u pokročilých forem MDS, žádný pacient nebyl nalezen ve skupině pacientů s aplastickou anémií. Pacienti s deficitem GATA-2 měli specifický nález zahrnující celkové snížení B lymfocytů v kostní dřeni a periferní krvi, snížení naivních forem a hladiny excizních kroužků B buněčného receptoru (KREC). Další specifickou skupinu tvoří pacienti s předcházející hepatitidou, u kterých nacházíme zvýšené zastoupení aktivovaných T lymfocytů.

Základem pro použití nových metodik je jejich standardizace a porovnání s referenčními metodami. V rámci standardizace dat průtokové cytometrie jsme vyvinuli systém kontroly kvality a hodnotili použitelnost zavedeného systému v rámci zahraniční spolupráce několika center. Vyvinuli jsme rovněž postup k získání standardizovaných dat pomocí přístrojů od jiných výrobců, který zohledňuje variabilitu použitých reagensů a technického vybavení nových přístrojů. Na takto získaná standardizovaná data jsme aplikovali nové analyzační metody pro studium vývoje B lymfocytů ve zdravé kostní dřeni i v průběhu regenerace při antileukemické terapii. Definovali jsme jednotlivá stádia a znalosti využili při hodnocení hladiny minimální reziduální nemoci (MRN) akutní lymfoblastické leukémie. Pro detekci MRN jsme optimalizovali postup vedoucí k maximalizaci senzitivity a dosáhli vysoké shody mezi výsledky získanými průtokovou cytometrií a kvantitativní polymerázovou řetězovou reakcí (qPCR). Postup je perspektivní pro centra s nemožností použití qPCR. Další slibnou metodou v detekci MRN je sekvenování nové generace (NGS). Dokáže odhalit nescifické nálezy PCR a rovněž může přesněji stanovit riziko relapsu akutní lymfoblastické leukémie u dětských pacientů.

Klíčová slova: myelodysplastický syndrom, deficit GATA-2, aplastická anémie, průtoková cytometrie, minimální reziduální nemoc, akutní lymfoblastická leukémie

Abstract

Bone marrow failure may occur in both immune disorder and malignant disease. Current techniques are promising for uncovering pathogenesis, and also for diagnostics and treatment response evaluation.

We focused on two most common forms of acquired bone marrow failure syndrome in childhood: myelodysplastic syndrome (MDS) and aplastic anemia. We analyzed mutations in *GATA2* gene in a consecutive cohort of Czech pediatric patients. While *GATA2* mutations accounted for 17 % of refractory cytopenia of childhood and 14 % of advanced forms of MDS, no such patient was identified within aplastic anemia patients. Patients with *GATA2* deficiency had characteristic findings in blood and bone marrow: decrease of total B cell count, lower proportion of naïve B cells and decreased level of KREC excision circles. Among both MDS and aplastic anemia, a specific subgroup was represented by patients with preceding hepatitis. These patients were characterized by increased T cell activation.

When introducing new methods, it is vital to standardize them and compare with reference methods. Within flow cytometry data standardization, we introduced system of quality assessment and evaluated its usefulness in several international centers. Furthermore, we developed a protocol for obtaining standardized data from cytometers of different manufacturers. This approach also takes into account differences in cytometer technical parameters (e.g. filters) and fluorochromes used. After the initial standardization we could then apply novel analytical approaches for studying B cell differentiation in control samples and in samples with regeneration during antileukemic therapy, which may help in minimal residual disease analysis. We developed a new flow cytometry approach to leukemic samples, leading to an increase of sensitivity in minimal residual disease assessment, which then showed comparable results with those gained by quantitative polymerase chain reaction (qPCR) examination. This approach is perspective in routine diagnostics especially in centers with no available qPCR measurement. Another promising method for MRD detection is next generation sequencing (NGS). It showed the ability to clarify discordant results of qPCR due to nonspecific amplification and seemed to better identify acute lymphoblastic leukemia patients with higher relapse risk.

Keywords: myelodysplastic syndrome, *GATA2* deficiency, aplastic anemia, flow cytometry, minimal residual disease, acute lymphoblastic leukemia

Obsah

Prohlášení.....	- 1 -
Poděkování.....	- 2 -
Předmluva	- 3 -
Identifikační záznam.....	- 4 -
Abstrakt	- 5 -
Abstract	- 6 -
Obsah.....	- 7 -
Úvod	- 9 -
1. Myelodysplastický syndrom u dětí.....	- 9 -
Definice a klasifikace	- 9 -
Etiopatogeneze	- 9 -
Diagnostika a diferenciální diagnóza	- 10 -
Terapeutické přístupy	- 11 -
2. Akutní leukémie	- 12 -
Akutní lymfoblastická leukémie	- 12 -
Akutní myeloidní leukémie	- 13 -
3. Minimální reziduální nemoc u ALL	- 14 -
Cíle.....	- 15 -
Metody	- 16 -
1. Imunofenotypizace buněčných populací a sortování	- 16 -
2. Sekvenování <i>GATA2</i>	- 16 -
3. Detekce excizních kroužků	- 16 -
4. Vyšetření cytokinů.....	- 17 -
5. Stanovení MRN pomocí qPCR a NGS.....	- 17 -
6. Stanovení exprese <i>WT1</i>	- 17 -
7. Analýza a statistické metody	- 17 -
Výsledky.....	- 18 -
1. Jak se liší jednotlivé formy selhání kostní dřeně u dětí? Jaká je jejich imunologická charakteristika a genetické pozadí? (<i>přílohy 1, 2, 9</i>)	- 18 -
Charakteristika myelodysplastického syndromu a aplastické anémie pomocí průtokové cytometrie.....	- 18 -

Deficit GATA-2 jako podskupina dětského MDS.....	- 19 -
Selhání kostní dřeně asociované s hepatitidou	- 22 -
Další podskupiny pacientů (tzv. GATA-2-like).....	- 23 -
Cytokinové prostředí u pacientů se selháním kostní dřeně	- 23 -
Význam exprese genu <i>WT1</i>	- 24 -
2. Jak optimalizovat průtokovou cytometrii pro využití v hematologii a imunologii? (přílohy 3, 8).....	- 26 -
Průtoková cytometrie v hematologii a imunologii	- 26 -
Zdroje variability v průtokové cytometrii	- 26 -
Standardizace průtokové cytometrie	- 27 -
Standardizace cytometrů od jiných výrobců	- 29 -
3. Jaká je úloha nových moderních metod v monitoraci akutní lymfoblastické leukémie (např. průtokové cytometrie a sekvenování nové generace)? (přílohy 4, 5, 6)	- 30 -
Analýza regenerace B lymfocytů v kostní dřeni pomocí moderních metod.....	- 30 -
Vysoká senzitivita a standardizované měření MRN u B prekurzorové ALL	- 31 -
NGS pro hodnocení MRN	- 32 -
4. Jaké je využití vyšetření excizních kroužků (KREC, TREC) u vybraných imunodeficitů (např. DiGeorgův syndrom, deficit GATA-2)? (přílohy 1, 7).....	- 33 -
Pacienti s deficitem GATA-2.....	- 33 -
Pacienti se selháním kostní dřeně asociovaném s hepatitidou	- 34 -
Pacienti s DiGeorgovým syndromem (DGS).....	- 34 -
Diskuze	- 35 -
Seznam zkratk.....	- 37 -
Použitá literatura.....	- 39 -
Seznam příloh.....	- 44 -
Publikace s impact faktorem	- 44 -
Publikace v recenzním řízení	- 44 -
Publikace bez impact faktoru	- 44 -

Úvod

1. Myelodysplastický syndrom u dětí

Definice a klasifikace

Myelodysplastický syndrom (MDS) je vzácné onemocnění v dětském věku. Postihuje přibližně 0,8-1,8/10⁶ dětí ročně¹. Jedná se o onemocnění krvetvorby vedoucí zpravidla ke snížené produkci některých krevních buněk. Nejčastějším subtypem je refrakterní cytopenie dětského věku (refractory cytopenia of childhood, RCC), která byla zařazena do klasifikace Světové zdravotnické organizace (World Health Organisation, WHO) v roce 2008 jako provizorní jednotka². Název vystihuje odlišnost od dospělé kategorie tzv. refrakterní anémie, kdy u dětských pacientů nacházíme častěji snížené zastoupení především neutrofilních granulocytů a destiček v periferní krvi³. Pacienti s RCC se vyznačují nezvýšeným počtem nezralých prekurzorů v kostní dřeni (<5 %) i periferní krvi. Typická je snížená buněčnost kostní dřene³. U části pacientů nacházíme cytogenetické změny, nejčastějším nálezem je monosomie 7. chromozomu (dále označováno jako monosomie 7). Pacienti s touto aberací mají zvýšené riziko progresu onemocnění do pokročilých forem MDS⁴. Dalšími subtypy jsou refrakterní anémie s excesem blastů (refractory anemia with excess blasts, RAEB) a refrakterní anémie s excesem blastů v transformaci (RAEB in transformation, RAEBt)³. Obě jednotky se vyznačují zvýšeným počtem nezralých buněk (blastů) v kostní dřeni: u RAEB 5-20 %, u RAEBt 20-30 %. Při nálezů více než 30 % blastů je onemocnění klasifikováno jako akutní myeloidní leukémie (AML), která může na podkladě MDS vzniknout (tzv. myelodysplasia related acute myeloid leukemia, MDR-AML). Nálezy u dětí s RAEB jsou podobné nálezům u dospělých pacientů⁵. Pro odlišení RAEBt a AML je však použití samotného procenta blastů nepřesné a mělo by být více založeno na klinických nálezech a genetických změnách⁶.

Etiopatogeneze

Etiopatogeneze MDS není v současné době zcela zřejmá. Studium repertoáru T lymfocytů naznačuje, že u části pacientů (zejména s RCC) se na útlumu podílí i vlastní imunitní systém⁷, nicméně ne u všech pacientů je imunosupresivní léčba úspěšná.

U části pacientů může vzniknout MDS na podkladě zárodečných mutací vedoucích ke vzniku tzv. vrozeného selhání kostní dřene (inherited bone marrow failure syndromes,

IBMF), kam patří například Fanconiho anémie, ataxia teleangiectasia, dyskeratosis congenita, Diamond-Shwachmannův syndrom⁸.

Významným nálezem byla identifikace zárodečných mutací v transkripčním faktoru GATA-2, které byly popsány u pacientů s imunodeficitem, MDS i AML⁹⁻¹¹, a jak ukazují v přílohách 1 a 9.

Další nově identifikované zárodečné mutace vedoucí ke vzniku MDS jsou mutace genů *SAMD9*¹² a *SAMD9L*¹³.

U dospělých pacientů s MDS byly dále popsány somatické mutace v genech důležitých pro RNA sestřih (např. *SF3B1*, *SRSF2*, *U2AF1* a *ZRSR2*) a epigenetické modifikace (např. *TET2*, *ASXL1*, *DNMT3A*)¹⁴. U dětí však byly mutace *TET2* a mutace spliceozomu popsány vzácně^{15,16}.

Diagnostika a diferenciální diagnóza

Do diagnostického algoritmu patří kromě histopatologického vyšetření morfologické hodnocení nátěru kostní dřeně, cytogenetické vyšetření, v rámci diferenciální diagnostiky rovněž antropologie, vyšetření chromozomálních zlomů a stanovení fetálního hemoglobinu. Úloha průtokové cytometrie není zcela ustanovená, ačkoli má svoje místo v diagnóze MDS u dospělých pacientů^{17,18}. Hodnotí se především množství aberací u jednotlivých populací¹⁷⁻¹⁹. Zjednodušenou variantou tohoto hodnocení je tzv. Ogata skóre zahrnující pouze 4 parametry²⁰, které ale u dětských forem MDS neprokázalo přínos²¹.

Při hledání kauzálních mutací nyní vzrůstá význam nových metodik, jako je sekvenování nové generace (NGS), především ve formě tzv. celoexomového sekvenování²².

Pro terapeutický přístup je především důležité identifikovat pacienty s vrozeným selháním kostní dřeně.

Významnou diferenciálně diagnostickou jednotkou je aplastická anémie (AA)^{2,3} (přílohy 1, 2). Toto onemocnění je považováno za imunitně podmíněné, kdy dochází k selhání kostní dřeně na podkladě autoimunitní reakce T lymfocytů proti kmenovým buňkám krvetvorby²³. Za terapii volby se proto považuje imunosupresivní terapie, nicméně v případě shody hlavního histokompatibilního komplexu (HLA) u sourozence je volena transplantace krvetvorných buněk (hematopoietic stem cell transplantation, HSCT)²⁴. Obě onemocnění,

RCC i AA, tedy mají velice podobný klinický i laboratorní obraz: hypocelularitu kostní dřeně a pancytopenii v periferní krvi. Zatímco u dospělých pacientů s MDS jsou často v kostní dřeni přítomné dysplastické rysy, u dětských pacientů mohou být méně nápadné²⁵. V rámci Evropské pracovní skupiny pro MDS u dětí (European Working Group of Myelodysplastic Syndromes in Childhood, EWOG-MDS) byl vyvinut algoritmus pro histopatologické hodnocení biopsie kostní dřeně. Všechny vzorky jsou tak vyšetřeny jedním z referenčních patologů skupiny EWOG-MDS. Mezi nálezy charakteristické pro RCC (tzv. RCC pattern) patří nález mikromegakaryocytů a skupin nezralých buněk červené řady. Tyto nálezy odlišují RCC od AA. Mezi referenčními patologi EWOG MDS byla ověřena vysoká shoda v diferenciální diagnostice mezi RCC a AA²⁶.

Expresí genu *WT1* (Wilms' tumor gene 1) je vysoká u řady myeloidních malignit, rozdílná exprese byla nalezena i u jednotlivých forem MDS²⁷. Je tak perspektivním znakem pro rozlišení imunitně podmíněné AA a MDS.

U dětských pacientů je dále v diferenciální diagnostice potřeba vždy vyloučit akutní leukemii, která u části pacientů může začínat aplastickou fází, případně probíhat jako fokální proces a leukemické blasty tak mohou uniknout pozornosti^{28,29}.

Mezi další onemocnění projevující se zpravidla tranzitním selháním kostní dřeně patří útlumy krvetvorby nastávající po virové infekci či při deficitu vitamínů³.

Terapeutické přístupy

Terapie MDS u dětí je volena především dle závažnosti onemocnění. Pacienti s RCC, kteří nevyžadují podporu krevními deriváty, jsou sledováni (tzv. watch and wait strategie) bez další léčby. Naopak pacienti, kteří progredují, nebo mají zvýšené riziko progresu, jako je tomu u nálezů monosomie 7, jsou indikováni k HSCT, a to i od nepříbuzného dárce³. Pacienti, kteří léčbu potřebují, avšak nejsou indikováni k HSCT, nebo není nalezen dárce, jsou léčeni imunosupresivními preparáty protokolem, který je shodný s protokolem používaným pro léčbu AA. Obecně se ale preferuje transplantace před imunosupresivní léčbou, pokud je v rodině přítomen HLA identický sourozenec^{30,31}. U pacientů s pokročilými formami MDS je volena transplantace krvetvorných buněk s redukováným přípravným režimem. Klinický stav některých pacientů může vyžadovat před vlastní HSCT chemoterapii, paušálně se k ní ale nepřistupuje³².

2. Akutní leukémie

Akutní leukémie patří do diferenciální diagnostiky MDS a může rovněž na podkladě MDS vzniknout. Jedná se o nejčastější maligní onemocnění v dětském věku. Rozlišujeme dva základní subtypy: akutní lymfoblastickou leukémii (ALL) a akutní myeloidní leukémii (AML). V České republice je diagnostikováno ročně přibližně 80-120 nových případů. Léčba probíhá dle německých protokolů skupiny Berlin-Franfurt-Münster (BFM). Klinické projevy zpravidla zahrnují kombinaci příznaků vzniklých na podkladě selhání krvetvorby (anémie, trombocytopenie, infekce) a případné leukocytózy.

Akutní lymfoblastická leukémie

Akutní lymfoblastická leukémie je častější formou, představuje přibližně 80 % akutních leukémií u dětí. Dále se dělí na B prekurzorovou a T prekurzorovou leukémii. Nejčastěji postihuje děti ve věku 2-5 let. ALL je heterogenní onemocnění, které vzniká na podkladě získaných genetických aberací^{33,34}. Ty dělíme na primární a sekundární, přičemž primární jsou zodpovědné za vznik tzv. preleukemického klonu (např. chromosomální translokace) a sekundární za vznik samotné leukémie (častěji menší změny typu bodových mutací či mikrodelece)³⁵. Rozlišujeme několik základních subtypů dle genetických změn. Mezi subtypy s dobrou prognózou patří ALL s fúzním genem *ETV6-RUNX1*/translokací *t(12;21)* a vysoká hyperdiploidie s 51-65 chromozomy. Tyto dva subtypy představují asi 60 % všech dětských ALL. Mezi subtypy se špatnou prognózou patří ALL s přestavbou genu *MLL*, fúzním genem *BCR-ABL/t(9;22)*, *TCF3-HLF/t(17;19)*, haploidní leukémie a leukémie s nízkou hypodiploidií. Do skupiny s nejasným prognostickým významem patří fúze *TCF3-PBX1/t(1;19)* a translokace zahrnující lokus pro těžký řetězec imunoglobulinu *IGH*³⁵. Špatný prognostický význam má nález nověji popsané intrachromozomální amplifikace chromozomu 21 (*iAMP21*)^{36,37}, nicméně data jiných skupin zpochybňují zařazení *iAMP21* jako zvláštního rizikového faktoru, protože při zohlednění odpovědi na terapii samotný nález nezvyšuje riziko relapsu³⁸. Zatím zvláště stojí delece genu *IKZF1* a genu *ERG*, které mohou být jedinou nalezenou abnormalitou nebo doplňovat jiné genetické aberace, a jejich prognostický význam se může lišit v kontextu komplexního nálezu³⁹.

V diagnostice akutní leukémie je významnou metodou průtoková cytometrie. Jedná se o metodu hodnotící expresi jednotlivých molekul na povrchu i uvnitř buňky, které dohromady tvoří tzv. imunofenotyp. Dle imunofenotypu jsou pak rozlišovány základní typy

akutní leukémie, ale i jednotlivé podtypy dle různých klasifikací (WHO, European Group for the Immunological Characterization of Leukemias, EGIL, aj.).

Léčba ALL dosáhla vysoké úspěšnosti s přežitím přesahujícím 90 %. Toho bylo dosaženo optimalizací užívání poměrně malého počtu léků, lepší podpůrnou péčí a zavedením stratifikace, která u pacientů zohledňuje rizikové faktory a na jejich základě přizpůsobuje léčbu. Mezi tradiční rizikové faktory patří například pohlaví, věk a počet bílých krvinek. Jedním z nejdůležitějších prognostických faktorů je pak odpověď na léčbu, vyjádřená jako hladina minimální reziduální nemoci (MRN)⁴⁰.

Akutní myeloidní leukémie

Akutní myeloidní leukémie představuje 15-20 % všech akutních leukémií u dětí. Zatímco u dospělých pacientů často AML předchází MDS, u dětí je vznik na podkladě MDS spíše vzácný⁴¹. Zvýšené riziko vzniku AML však mají pacienti s Fanconiho anémií⁴², Bloomovým syndromem⁴³, a germinálními mutacemi v genech *TP53*⁴⁴, *RUNX1*⁴⁵, *GATA2*⁴⁶ a *CEPBA*⁴⁷. Zvláštní skupinu tvoří pacienti s Downovým syndromem, kteří vyvinou nejčastěji přechodnou myeloproliferaci, na niž může navazovat megakaryoblastický subtyp AML, obojí na podkladě mutace v genu *GATA1*^{48,49}. Podobně jako ALL je i AML heterogenní onemocnění co se týká imunofenotypu, morfologického obrazu a genetického nálezu. Klasifikace WHO rozlišuje v rámci AML a příbuzných malignit skupinu AML s rekurentním genetickým nálezem, AML s myelodysplastickými změnami, AML vznikající v souvislosti s chemoterapií, dále nespecifikovanou AML, myeloidní sarkom, myeloidní proliferaci u Downova syndromu a malignitu z blastických plazmacytoidních dendritických buněk⁵⁰.

I u AML bylo dosaženo významného zlepšení přežití dosahující v současnosti až 70 %^{41,51}. Stratifikace je založena především na genetických subtypech a odpovědi na terapii. Průtoková cytometrie zatím není do hodnocení MRN v rámci dětských protokolů používaných v ČR standardně zařazena.

3. Minimální reziduální nemoc u ALL

Odpověď na léčbu je důležitým rizikovým faktorem a byla zařazena do protokolů skupiny BFM jako jedno z kritérií určující další postup terapie. Dle odpovědi na léčbu jsou pacienti rozřazováni do jednotlivých léčebných ramen (tzv. stratifikace), které představují pro danou skupinu pacientů optimální poměr mezi potřebnou intenzitou léčby a toxicitou.

Hodnocení odpovědi na léčbu se vyjadřuje, jak již bylo zmíněno výše, stanovením MRN, tj. počtu nádorových buněk, které jsou ještě ve vyšetřovaném materiálu detekovány. Používá se především průtoková cytometrie a polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction, PCR). V současné době v České republice používaném protokolu ALL BFM 2009 probíhá hodnocení MRN v kostní dřeni v 15. den terapie (tzv. den 15) pomocí průtokové cytometrie, v den 33 a 78 pak pomocí PCR.

Průtoková cytometrie je založena na identifikaci nádorových buněk pomocí imunofenotypu blastů⁵². Základem pro hodnocení MRN průtokovou cytometrií je znalost nemaligních populací v kostní dřeni. Právě odlišení maligních a vyvíjejících se nemaligních B buněk u B prekurzorové ALL komplikuje stanovení MRN⁵³. Tuto problematiku shrnuji v příloze 4.

Standardizovaná a univerzálně použitelná metoda kvantitativní PCR (qPCR) hodnotí MRN pomocí kvantifikace přestaveb genů pro imunoglobuliny (Ig) a T buněčné receptory (TCR)⁵⁴. Vyžaduje však optimalizaci specifického systému pro každého pacienta. Pouze u menší části pacientů lze použít jiné metody, například detekci fúzního genu obsahující gen *MLL* na DNA úrovni⁵⁵. Novou metodikou vstupující na pole hodnocení MRN je NGS⁵⁶. Výsledky studie hodnotící hladinu MRN pomocí detekce přestaveb genu těžkého řetězce imunoglobulinu (*IgH*) metodou NGS shrnuji v příloze 6. Oproti detekci Ig/TCR metodou PCR je to metoda rychlejší a méně náročná. Před jejím zavedením do praxe je ale potřeba definovat klinicky relevantní prognostickou kategorizaci hladin MRN v jednotlivých léčebných protokolech.

Cíle

- 1. Jak se liší jednotlivé formy selhání kostní dřeně u dětí? Jaká je jejich imunologická charakteristika a genetické pozadí?**
- 2. Jak optimalizovat průtokovou cytometrii pro využití v hematologii a imunologii?**
- 3. Jaká je úloha nových moderních metod v monitoraci akutní lymfoblastické leukémie (např. průtokové cytometrie a sekvenování nové generace)?**
- 4. Jaké je využití vyšetření excizních kroužků (KREC, TREC) u vybraných imunodeficitů (např. DiGeorgův syndrom, deficit GATA-2)?**

Metody

1. Imunofenotypizace buněčných populací a sortování

Průtoková cytometrie je metoda hodnotící přítomnost molekul na úrovni buňky na základě detekce monoklonálními protilátkami konjugovanými s fluorochromem. Po smíchání této protilátky se studovaným vzorkem (tzv. značení) pak v přítomnosti a dostupnosti epitopu, pro který je daná protilátka specifická, dochází k vytvoření vazby protilátka-antigen, která přetrvává i po odstranění nenavázané protilátky (při tzv. promývání, tj. naředění promývacím roztokem, centrifugací a odstranění supernatantu) a po excitaci koherentním světlem laseru v potřebné vlnové délce je emitován signál o vlnové délce specifické pro použitý fluorochrom. Signál je dále detekován na fotonásobiči a přeměněn na elektronický signál.

V naší studii jsme používali různé kombinace fluorescenčně značených protilátek, které detailně popisujeme v jednotlivých publikacích (přílohy 1-6, 8). Charakteristiku průtokových cytometrů blíže popisujeme v příloze 8.

Pro analýzu specifických buněčných populací jsme použili sortování, které popisujeme v příloze 4.

2. Sekvenování *GATA2*

Vyšetření mutace *GATA2* bylo provedeno pomocí amplifikace PCR a dále Sangerovým sekvenováním. Metodu blíže popisují v příloze 1.

3. Detekce excizních kroužků

V průběhu přestaveb genů pro imunoglobuliny a T buněčný receptor dochází k vystřížení a cirkularizaci části DNA těchto genů. Množství takto vzniklých kroužků (v případě B receptoru tzv. kappa-deleting recombination excision circle, KREC; v případě T buněčného receptoru tzv. T-cell receptor excision circle, TREC) lze kvantifikovat pomocí PCR. Tyto kroužky již dále nejsou replikovány a jejich množství ve vyšetřovaném vzorku tak klesá s každým dělením buněk, naopak počet vzrůstá s produkcí nových naivních T či B lymfocytů. Počet kroužků jsme vztahovali k množství DNA, které jsme stanovili pomocí vyšetření kontrolního genu (v naší studii genu pro albumin). Výsledná hodnota pak odráží produkci T či B lymfocytů⁵⁷. Metodu blíže popisujeme v přílohách 1 a 7.

4. Vyšetření cytokinů

V plazmě kostní dřeně a periferní krve pacientů s různými formami selhání kostní dřeně jsme vyšetřili hladinu cytokinů. Cytokinový profil lze měřit pomocí několika metod, perspektivní je tzv. kuličková eseje (dále nazývám bead array), kdy se používá detekce cytokinů pomocí protilátek navázaných na kuličkách. Výhodou je změření více cytokinů najednou v poměrně malém množství materiálu. Pomocí bead array jsme vyšetřili 12 cytokinů (IFN γ , IL-1, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-17, IL-1b, TGF β , TNF α) v 94 vzorcích (zahrnovalo 7 pacientů s mutací *GATA2*, 6 AA, 11 RCC, 3 pacienty se selháním kostní dřeně asociovaném s hepatitidou [hepatitis associated bone marrow failure, HA-BMF], 3 RAEB/RAEBt, 1 sekundární MDS, 8 pacientů s eosinofilií, 1 pacienta s autoimunitním lymfoproliferativním syndromem [ALPS], 1 pacienta s Evansovým syndromem).

Pro změření hladiny trombopoetinu (TPO) jsme dále použili metodu ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Vyšetření jsme provedli u 52 pacientů (6 AA, 11 RCC, 3 HA-BMF, 7 *GATA-2*, 3 RAEB/RAEBt, 1 pacient s ALPS, a 21 kontrolních pacientů).

5. Stanovení MRN pomocí qPCR a NGS

Hladina MRN byla změřena pomocí qPCR a NGS. Metody jsou blíže popsány v přílohách 5 a 6.

6. Stanovení exprese *WT1*

Vyšetřili jsme hladinu exprese genu *WT1* (Wilms tumor gene 1) u 65 pacientů (1 pacient s juvenilní myelomonocytární leukémií [JMML], 6 pacientů s pokročilou formou MDS, 25 pacientů s RCC, 31 pacientů s AA, 2 pacienty se sekundární formou MDS). Z izolovaných mononukleárních buněk byla získána RNA a po reverzní transkripci byla stanovena hladina exprese *WT1* pomocí qPCR. Hladina byla vztažena k expresi kontrolního genu pro albumin a vyjádřena jako normalizovaný počet kopií (normalized copy number, NCN). Metoda je blíže popsána v publikaci Boublikova et al⁵⁸.

7. Analýza a statistické metody

Jednotlivé použité metody pro analýzu a statistické hodnocení jsou popsány v přílohách 1-8.

Výsledky

1. Jak se liší jednotlivé formy selhání kostní dřeně u dětí? Jaká je jejich imunologická charakteristika a genetické pozadí? (přílohy 1, 2, 9)

Charakteristika myelodysplastického syndromu a aplastické anémie pomocí průtokové cytometrie

Studiem získaných forem selhání kostní dřeně u dětí se zabýváme od roku 1998. Jsme součástí mezinárodního konsorcia EWOG (European working group of MDS and JMML in childhood) a pravidelně se účastníme pracovních schůzek a konferencí pořádaných touto společností na téma dětského MDS.

V rámci této evropské skupiny jsme publikovali práci zabývající se charakteristikou dětského MDS pomocí průtokové cytometrie, výsledky shrnuji v příloze 2. V příloze ukazují vyzrávání jednotlivých buněčných linií (granulocyty, monocyty, erytroidní buňky) u pacientů diagnostikovaných v letech 2005-2011. U většiny dětských pacientů s MDS (81 %) je kostní dřeň hypocelulární. U překvapivě velkého množství pacientů nebyly nalezeny cytogenetické změny – celkem u 61 z 71 hodnocených pacientů. Ve srovnání s kontrolní skupinou, kterou představovali dospělí pacienti, měli pacienti s MDS snížené zastoupení myeloidní řady a lymfoidních progenitorů. Monocyty byly většinou zastoupeny v normálním počtu, někdy ale byly snižené. Na sníženou myeloidní řadu jsme poukázali již v předcházejících pracích, jako bylo např. posterové sdělení na mezinárodní konferenci americké hematologické společnosti⁵⁹. Naopak u RCC byly více zastoupeny T lymfocyty. U pacientů s AA jsme našli ještě významnější relativní snížení myeloidní řady, monocytů a granulocytů, zvýšeny byly naopak B lymfocyty a NK buňky.

Ne zcela překvapivým nálezem bylo vyšší množství CD117^{pos} buněk u pacientů s pokročilými formami MDS (RAEB, RAEBt) – u většiny pacientů se jednalo především o atypické blasty. U těchto pacientů byla naopak častá lymfopenie v kostní dřeni.

Z aberací detekovatelných pomocí průtokové cytometrie prokazujeme dyserythropoézu a aberantní vyzrávání granulocytární řady dle vyšetřené kombinace znaků CD16 a CD13 (u 14 % RCC, ale i u 15 % AA). U RCC jsme prokázali více abnormalit než u AA a kontrol, ale naopak méně než u pokročilých forem MDS.

U studií tohoto typu může být limitem některých výsledků výběr vhodné kontrolní skupiny. V článku Aalbers et al. (příloha 2) jsme do kontrolní skupiny zařadili pouze dospělé

pacienty a v jistém smyslu byla za kontrolní skupinu považována skupina pacientů s AA. Výběrem optimálních kontrolních vzorků jsme se pak dále zabývali a srovnávali jednotlivé typy dostupných vzorků. Nejvhodnější typ vzorků, jakým je štěp kostní dřeně od dítěte získaný v případě sourozenecké transplantace, je poměrně vzácný materiál, který je navíc často dostupný pouze v omezeném množství nedostatečným pro vyšetření všech sledovaných parametrů. Navíc čím větší objem štěpu je třeba odebrat, tím je vyšší riziko naředení periferní krvi. Do kontrolní skupiny, kterou jsme použili v článku Novakova et al. (příloha 1), proto kromě štěpů zařazujeme i pacienty vyšetřované v rámci stagingu nehematopoetického nádoru bez zjevné infiltrace kostní dřeně.

Deficit GATA-2 jako podskupina dětského MDS

Jako nová podskupina v rámci MDS byli v roce 2011 popsáni pacienti s mutacemi v transkripčním faktoru GATA-2. Mutace v genu *GATA2* byly nalezeny u několika podskupin pacientů: u pacientů se syndromem MonoMAC (zkratka zahrnuje častý nález monocytopenie a mykobakteriálních infekcí), DCLM deficiencí (deficit dendritických buněk, B a NK lymfocytů a monocytů), Embergerovým syndromem (s typickou přítomností lymfedémů a často přítomnou hluchotou) a u rodin s familiárním výskytem MDS/AML. U pacientů s MDS byla proto postupně zahájena analýza mutací genu *GATA2*: nejprve u pacientů s cytogenetickým nálezem, jako je monosomie 7 a trisomie 8 (jednoho pacienta již referujeme v příloze 2). Naše skupina pak sama i ve spolupráci s evropskou skupinou EWOG vyšetřila všechny pacienty s dostupným materiálem: pacienty s pokročilými formami MDS diagnostikovanými v letech 1998-2014 (z celkem 25 pacientů bylo vyšetřeno 22), dále pak pacienty s RCC diagnostikovaným v letech 2005-2014 (z celkem 31 pacientů bylo vyšetřeno 30) a ve stejném období pacienty s AA (z celkem 41 pacientů vyšetřeno 38). Pacienty s RCC a AA diagnostikované před rokem 2005 jsme do studie nezařadili, protože v této době ještě neprobíhalo centralizované histopatologické vyšetření. Zahájili jsme rovněž prospektivní vyšetřování všech pacientů s MDS a AA v naší laboratoři.

V příloze 1 se zaměřuji jednak na stanovení prevalence deficitu GATA-2 u dětského MDS a AA, a dále na charakteristiku těchto pacientů pomocí průtokové cytometrie a vyšetření excizních kroužků B a T buněčného receptoru. Naše data porovnáváme s publikovanými pracemi a nálezy, především s publikací Spinnera et al.⁶⁰ a

Ganapathiho et al.⁶¹ Obě práce však vycházely především z dospělé kohorty pacientů s dominujícím imunodeficientem (v práci Ganapathiho et al. již byli vybráni pouze pacienti s MDS, ačkoli původně vycházeli z kohorty pacientů v práci Spinnera et al., kteří byli vybráni na základě přítomného imunodeficitu). U pacientů s deficitem GATA-2 byly jako nejčastější aberace popsány: monocytopenie, B a NK lymfopenie, přítomnost velkých granulárních lymfocytů (large granular lymphocytes, LGL), aberace plazmatických buněk (aberrantní exprese CD56, absence CD19), snížený poměr CD4/CD8 T lymfocytů.

Do naší kohorty pacientů jsme zahrnuli kromě českých pacientů ještě 3 pacienty ze Slovenska a 1 pacienta z Německa, a dále 3 pacienty s deficitem GATA-2, kteří MDS zatím nevyvinuli nebo vyvinuli až v dospělosti. V naší kohortě byla monocytopenie a NK lymfopenie méně častým nálezem, naopak nejcharakterističtější nálezem bylo snížení B lymfocytů v periferní krvi i kostní dřeni. Snížení bylo přítomno u 10 z 12 pacientů. Zajímavý nález přineslo vyšetření excizních kroužků B buněčného receptoru (KREC)⁵⁷. Výsledky ukazují níže (viz cíl 4).

Jak již bylo zmíněno, monocytopenii jsme v naší kohortě dětských pacientů pozorovali méně často. V mnoha případech je přítomno snížení absolutního počtu monocytů, které je však vysvětlitelné celkovou leukopenií u pacientů s deficitem GATA-2. Stabilní snížení relativního zastoupení monocytů jsme pozorovali především u dvou pacientů. Oba dva byli rovněž sledováni pro plicní intersticiální onemocnění a imunodeficit. Společný nález monocytopenie a plicního onemocnění není zcela překvapivým nálezem – právě porucha funkce monocytů/makrofágů ve fagocytóze plicního surfaktantu je považována za patogenetický mechanismus vzniku plicního postižení. Jeden z těchto dvou pacientů byl popsán v publikaci Svobodova et al. se zaměřením na plicní onemocnění, která vznikla ve spolupráci s naším pracovištěm⁶². Dalším zdůvodněním méně časté monocytopenie v naší kohortě je přítomnost pacientů s pokročilou formou MDS. U těchto pacientů je často přítomná monocytóza, jak již bylo zmíněno v pracích Spinnera⁶⁰ et al. a Wlodarskiho et al.⁶³ a je ukázáno i v naší publikaci (Novakova et al., příloha 1).

Na základě získaných dat jsme definovali nejcharakterističtější nálezy u dětských pacientů s deficitem GATA-2, a to celkové snížení B řady, snížení naivních B lymfocytů v periferní krvi a B lymfoidních progenitorů v kostní dřeni, a snížení hladiny KREC ve dřeni

i v krvi. Pacienty s tímto nálezem (i bez diagnózy MDS) nyní v naší laboratoři přednostně vyšetřujeme pro případnou přítomnost mutace *GATA2*. Vyšetřování mutace *GATA2* u všech pacientů s MDS a AA bylo zařazeno do standardního diagnostického algoritmu v naší laboratoři, což je důležitým výsledkem naší práce.

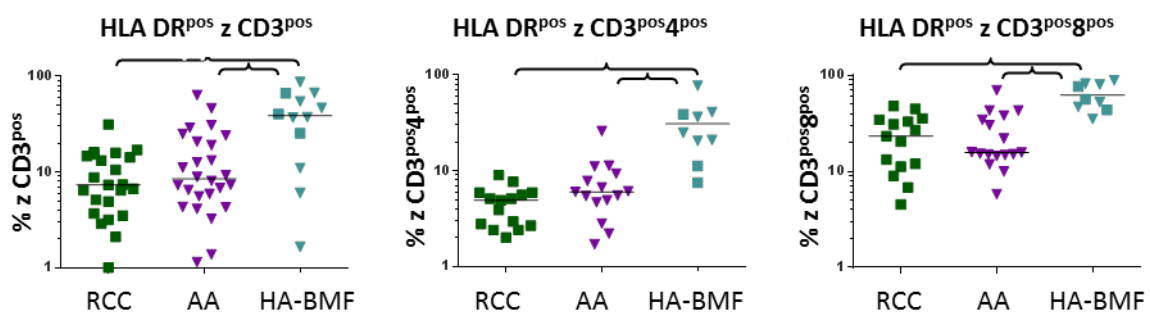
Snížení B řady bylo v minulosti často parametrem rozlišujícím pacienty s RCC a AA. Pacienti s deficitem *GATA-2*, přítomni výhradně ve skupině pacientů s RCC, tak byli příčinou tohoto rozdílu, a po jejich vyloučení z analýzy je rozdíl mezi pacienty s RCC a AA méně výrazný.

Dalším výstupem naší práce byla analýza prevalence mutací *GATA2* u dětských pacientů s MDS a AA. V časově ohraničených kohortách (1998-2014 pro pokročilé formy MDS a 2005-2014 pro MDS a AA) jsme po vyšetření mutace *GATA2* našli prevalenci 17 % u MDS RCC, 14 % u pokročilých forem MDS a 0 % u AA. Tyto výsledky jsou v rozporu především s americkými daty Ganapathiho et al.⁶¹, kteří našli mutaci *GATA2* u velké části pacientů s AA. Vysvětlením je především rozdílná klasifikace AA a MDS ve Spojených státech amerických a v Evropě – především u dětských pacientů. Je však nutné podotknout, že i jeden námi popsáný pacient, který byl zařazený jako RCC, měl histopatologický nález odpovídající AA bez charakteristik RCC. Jeho finální zařazení ovlivnil především klinický průběh choroby, který byl dlouhý (u AA se jedná většinou o selhání krvetvorby v rámci dnů či týdnů) a cytogenetický nález, kterým byl fluktuující výskyt monosomie 7. Pouze u jediné pacientky s AA ze Slovenska jsme pozorovali klonální evoluci ve smyslu získání trisomie 8 v průběhu imunopresivní terapie.

Klinický nález a průběh onemocnění u dvou pacientů s deficitem *GATA-2* ukazují v příloze 9. Jednalo se o pacientku s dlouhotrvajícím imunodeficitem, která vyvinula MDS ve věku 21 let, a pacienta s plicním postižením, který byl rovněž popsán v publikaci Svobodové et al.

Selhání kostní dřeně asociované s hepatitidou

Další specifickou podskupinou jsou pacienti, u nichž selhání kostní dřeně předchází hepatitida (hepatitis associated bone marrow failure, HA-BMF). Jedná se o postižení jater s elevovanými jaterními enzymy, u něhož však není prokázáno etiologické agens a proto se tato hepatitida označuje jako séronegativní. Naši kohortu tvořilo 12 takových pacientů. Dříve se tito pacienti automaticky zařazovali do skupiny AA, později byl však i u těchto pacientů často nalezen tzv. RCC pattern, a dnes se tedy dle histopatologického nálezu zařazují do obou skupin. Pomocí průtokové cytometrie jsme u těchto pacientů našli tyto charakteristické změny: vysokou aktivaci T lymfocytů dle exprese HLA DR (obrázek 1) a snížený poměr CD4/8. Celkově tedy nálezy svědčí pro expanzi a aktivaci CD3^{pos}8^{pos} T lymfocytů neznámým agens. Tito pacienti představují další podskupinu v rámci MDS a AA a po jejich vyloučení z analýzy se stírají další rozdíly původně popsané mezi oběma jednotkami (v době, kdy ještě byli pacienti s hepatitidou přednostně zařazováni do podskupiny AA) – v tomto případě především významná aktivace T lymfocytů. Výsledky nyní připravujeme k separátní publikaci. U některých pacientů jsme pozorovali vyšší zastoupení granulocytární řady, které může být důsledkem aplikace kortikosteroidů v rámci léčby jaterního postižení nebo časnějším záchytem selhání krvevotvorby při pravidelné laboratorní monitoraci pacienta.



Obrázek 1. Aktivace T lymfocytů u pacientů HA-BMF. Na obrázku ukazujeme aktivaci T lymfocytů vyšetřenou pomocí exprese HLA DR u pacientů s RCC, AA a pacientů s asociovanou hepatitidou (HA-BMF). Aktivace je významně vyšší u pacientů s HA-BMF, a to u celkové populace T lymfocytů i u zvlášť analyzovaných subpopulací CD4^{pos} a CD8^{pos} T lymfocytů.

Další podskupiny pacientů (tzv. GATA-2-like)

V průběhu analýzy pacientů bez mutace *GATA2* jsme identifikovali několik pacientů s GATA-2 fenotypem, kteří měli především sníženou B lymfocytární řadu a nízkou hladinou excizních kroužků KREC. Celkem se jednalo o 3 pacienty s RCC: první pacientka měla suspektní rodinnou anamnézu (matka po transplantaci pro MDS s monosomií 7), druhá pacientka je dlouhodobě sledována pro imunodeficit, třetí pacient měl intermitentní cytogenetický nález monosomie 7. Dva z těchto pacientů jsme vyšetřili pomocí sekvenování nové generace a v současné době probíhá verifikace nálezů v germinálním materiálu. Dalším zajímavým pacientem, který byl podrobně vyšetřován, je 4letý pacient s primárním imunodefitem, generalizovanou CMV infekcí a gastrokolidou, u kterého jsme identifikovali nedávno popsanou mutaci v genu *SAMD9*. Publikace o pacientech s touto mutací ukazuje, že u pacientů dochází poměrně často k reverzní mutaci odstraněním mutované alely delecí v hematopoetických buňkách a stanovení mutace v době diagnózy MDS tak může být falešně negativní¹². Stejný mechanismus byl popsán i u mutace v genu *SAMD9* tvořícího konzervovaný genový pár s genem *SAMD9*¹³. Domníváme se, že v rámci celé skupiny MDS bude více podskupin s germinálními genetickými aberacemi, z nichž první takto početně zastoupená je popsaná mutace v genu *GATA2*.

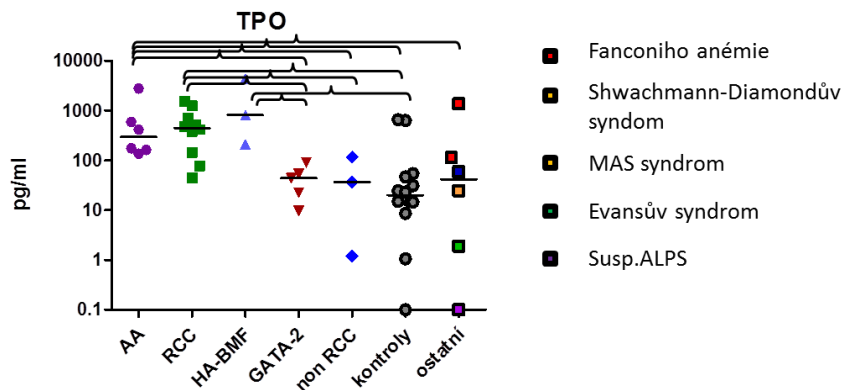
Cytokinové prostředí u pacientů se selháním kostní dřeně

Kromě cytotoxických mechanismů používají T lymfocyty v patogenezi selhání kostní dřeně produkci cytokinů. Cytokinového prostředí kostní dřeně je rovněž předmětem studií jako jeden z možných parametrů pomáhající rozlišit AA a hypoplastický MDS. Publikovaná data uvádí především vyšší koncentraci trombopoetinu (TPO) a G-CSF u pacientů s AA ve srovnání s hypoplastickým MDS, kohorta MDS zahrnovala pouze dospělé pacienty⁶⁴.

Pomocí bead array jsme u pacientů se selháním kostní dřeně neidentifikovali významně zvýšenou hladinu žádného z 12 vyšetřených cytokinů v kostní dřeni.

Pomocí ELISA metody jsme dále vyšetřili hladinu TPO v plazmě kostní dřeně (obrázek 2). Pacienti s mutací *GATA2* mají nižší hladinu TPO v plazmě kostní dřeně než ostatní pacienti s AA, RCC a HA-BMF. Nízké hladiny jsou i u pacientů s pokročilými formami MDS („non RCC“). Kontroly zahrnují vzorky pacientů bez diagnózy MDS. Dva pacienti se zvýšenou hladinou TPO jsou sledováni pro bicytopenii (u obou je přítomna trombocytopenie). Výsledek podporuje podobnost obou jednotek, RCC a AA. U obou očekáváme spoluúčast imunitní destrukce

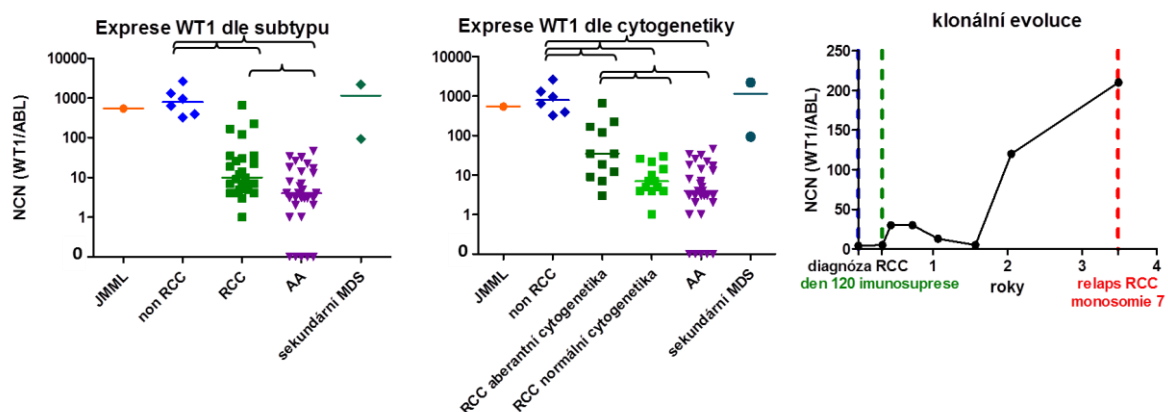
kostní dřeně a po vymezení definovaných podskupin, jako jsou pacienti s mutacemi *GATA2* nebo pacienti s HA-BMF, se obě onemocnění ve svých charakteristikách překrývají.



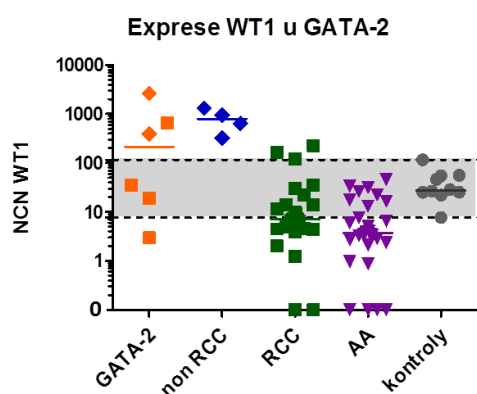
Obrázek 2. Hladina trombopoetinu v plazmě kostní dřeně u pacientů se selháním kostní dřeně. Na obrázku ukazují hladinu trombopoetinu v plazmě kostní dřeně u pacientů s různými formami selhání kostní dřeně vyšetřenou pomocí metody ELISA. U pacientů s mutacemi *GATA2* je patrná nižší hladina než u pacientů s RCC, AA a HA-BMF. AA, aplastická anémie; RCC, refrakterní cytopenie dětského věku; HA-BMF, selhání kostní dřeně asociované s hepatitidou; non RCC, pokročilé formy MDS zahrnující RAEB, RAEBt, MDR-AML.

Význam exprese genu *WT1*

U pacientů s RCC a AA nacházíme nižší hladinu exprese *WT1* ve srovnání s pacienty s pokročilými formami MDS („non RCC“) (obrázek 3). Vzájemně se významně liší především díky vyšší hladině exprese *WT1* u pacientů RCC s aberantní cytogenetikou (monosomie 7, trisomie 8). Pacienti s mutacemi *GATA2* mají vysokou hladinu exprese *WT1* současně s aberantním cytogenetickým nálezem nebo diagnózou pokročilého subtypu MDS. Pacienti s RCC s normální cytogenetikou a pacienti s AA se významně neliší. U jednoho pacienta s RCC jsme pozorovali nárůst exprese *WT1* v čase s maximální hodnotou při získání cytogenetické aberace (monosomie 7). Při analýze pacientů s mutací *GATA2* jako separátní skupiny (obrázek 4) je zřejmé, že u těchto pacientů hladina exprese *WT1* spíše koreluje s pokročilostí MDS a cytogenetickými aberacemi než se samotnou mutací v genu *GATA2*. Toto pozorování je však limitované nízkým počtem vyšetřených pacientů.



Obrázek 3. Hladina exprese WT1 u pacientů s MDS a AA. Zvýšená hladina exprese WT1 je patrná u pacientů s pokročilou formou MDS (RAEB, RAEBt, MDR-AML) a u pacientů s aberantním cytogenetickým nálezem. Nárůst hladiny WT1 jsme pozorovali i v čase u pacienta, který získal aberantní cytogenetický nále. JMML, juvenilní myelomonocytární leukémie, non RCC, pokročilé formy MDS zahrnující RAEB, RAEBt, MDR-AML; RCC, refrakterní cypenie dětského věku; AA, aplastická anémie.



Obrázek 4. Hladina WT1 u pacientů s mutacemi GATA2. Vyšetření pacienti s mutacemi genu GATA2 nemají jednotný nále v expresi WT1. Vysokou hladinu nacházíme především u pacientů s pokročilou formou MDS (odlišeno v rámci pacientů s deficitem GATA-2 znakem pootočeného čtverce). non RCC, pokročilé formy MDS zahrnující RAEB, RAEBt, MDR-AML; RCC, refrakterní cypenie dětského věku; AA, aplastická anémie.

2. Jak optimalizovat průtokovou cytometrii pro využití v hematologii a imunologii? (přílohy 3, 8)

Průtoková cytometrie v hematologii a imunologii

V hematologii je průtoková cytometrie stěžejní metodou pro diagnostiku ALL a má svou významnou úlohu v detekci MRN, v imunologii je nenahraditelná mimo jiné v kvantifikaci lymfocytárních populací a diagnostice imunodeficitů. Pro tyto druhy analýz je nezbytný správný postup vedoucí k detekci signálu, který bude hodnocen nejen jako pozitivní či negativní (v případě přítomnosti či nepřítomnosti exprese antigenu na sledované populaci), avšak velmi záleží i na intenzitě exprese, tj. jestli je znak exprimován silně (ve velkém množství přítomen v dané buněčné populaci), slabě či vůbec. Předpokladem správné analýzy je tedy jistota správného zpracování vzorku a samotná detekce signálu, která odpovídá skutečné expresi.

Zdroje variability v průtokové cytometrii

Pokud opomineme samotné preanalytické zdroje variability, výsledek měření průtokovou cytometrií v hematologii a imunologii je významně ovlivněn především:

- 1) Přípravou vzorku (např. nutnost odstranění plazmatických imunoglobulinů před detekcí imunoglobulinů exprimovaných na povrchu či uvnitř buňky)
- 2) Výběrem monoklonálních protilátek
 - a. Výběr klonu – produkující protilátku dané afinity proti určité antigení determinantě
 - b. Výběr fluorochromu – např. pro málo exprimované molekuly nutnost výběru fluorochromu s vysokým poměrem signálu a pozadí signálu (tzv. staining index)
- 3) Postupem zpracování vzorku
 - a. Výběr činidel pro odstranění erytrocytů či permeabilizaci buněk v případě intracelulárního značení
 - b. Délka inkubace a trvání jednotlivých kroků
 - c. Centrifugace vzorku – relativní centrifugační síla, délka – vedoucí k minimalizaci ztrát buněk a jejich minimálnímu poškození
- 4) Změřením na průtokovém cytometru

- a. Nastavení přístroje – nastavení napětí na jednotlivých detektorech
 - b. Správná kompenzace mezi jednotlivými fluorochromy
- 5) Interpretací
- a. Výběr softwaru s nástroji usnadňujícími analýzu
 - b. Analyzační strategie a potřebná zkušenost

Standardizace průtokové cytometrie

Jsme součástí mezinárodního konsorcia Euroflow, které se zabývá cytometrickou diagnostikou hematologických malignit, sledováním MRN a poruchami imunity. Cílem tohoto konsorcia bylo zavedení jednotných postupů ve všech fázích zpracování vzorků, které jsou vyjmenovány výše, k získání srovnatelných dat, z nichž bude možné v budoucnu vytvořit databázi napomáhající vzájemnému srovnávání vzorků a diagnostice vzácných onemocnění. Byly zavedeny, testovány a optimalizovány panely vyšetření pro jednotlivé hematologické malignity (akutní leukémie, chronické lymfoproliferace, lymfomy)⁶⁵. Každý panel zahrnuje jasně definované monoklonální protilátky (co se týče výrobce, klonu, množství protilátky potřebné pro jeden vzorek), případně povolené alternativní varianty. Samotný postup značení těmito kombinacemi protilátek pak bylo popsáno v publikaci Kaliny et al⁶⁶. Nastavení přístrojů bylo podrobně popsáno rovněž v této publikaci. Jednalo se o nastavení v té době používaných přístrojů od výrobce BD Biosciences (San Jose, CA, USA) – především typ BD Canto II, případně BD LSR II. Princip spočívá v nastavení voltáží jednotlivých detektorů tak, aby cílová populace referenčního materiálu, kterou byla zvolena 7. populace směsi kuliček (Rainbow 8-peak beads) dle vzrůstající intenzity (tzv. 7th peak), měla jasně definovanou intenzitu fluorescence (MedFI, median fluorescent intensity) s tolerancí 15 % celkové hodnoty. V případě použití přístrojů se stejným vybavením filtrů, které jsou umístěny před detektorem, tak dosáhneme i stejné intenzity fluorescence fluorochromů používaných při značení jednotlivými kombinacemi protilátek.

Tato plná standardizace (používání shodného nastavení přístrojů, reagensů, pracovních postupů a rovněž používání shodného analyzačního programu) pak zajišťuje získání porovnatelných dat napříč různými laboratořemi, které mohou být analyzovány novými softwarovými nástroji. Paralelně však musela být vyvinuta vhodná kontrola kvality (Quality Assessment, QA), která je odlišná od ostatních kontrol kvality testujících například pouze správnou kvantifikaci cílových buněk (např. CD34^{POS} kmenových buněk krvetvorby

v rámci hodnocení štěpů před transplantací, populaci nádorových buněk ALL v rámci programu UK Neqas^{67,68}). Podrobně jsme námi vyvinutý systém kontroly kvality popsali v publikaci Kaliny et al⁶⁶. Principem je sledování mediánu intenzity fluorescence protilátek detekující znaky, které jsou stabilně exprimovány na buňkách periferní krve. To umožňuje srovnat výsledky změřené na jakékoli zdravé periferní krvi v různých laboratořích. Výhodou je ztráta nutnosti distribuce vzorku.

Kombinace monoklonálních protilátek vycházela z dříve publikované kombinace tzv. Lymphocyte Screening Tube (LST), která byla mírně modifikována do podoby finální kombinace nazývané LST-QA. Změřeny a hodnoceny byly znaky exprimované na T lymfocytech (CD3, CD4, CD5, CD8, CD45, CD81), B lymfocytech (CD19, Ig Kappa, Ig Lambda) a NK buňkách (CD56). Variabilita exprese některých znaků je větší (kappa, lambda, CD56), nicméně v tomto případě je hodnocen především správný postup přípravy vzorku. Získaná data byla analyzována lokálně předdefinovaným postupem, což umožňuje rovněž kontrolu správné analýzy jako další možný zdroj variability výsledků.

Výsledky 4 kol tohoto testování ukazují v příloze 3. Celkem bylo hodnoceno 123 vzorků periferní krve z 11 laboratoří v 9 zemích Evropy. Pro hodnocení byl zaveden parametr tzv. performance score (p-score) popsáný dříve⁶⁸. Toto hodnocení zahrnuje porovnání s maximálně tolerovanou odchylkou a daty získanými v minulých kolech kontroly kvality. V roce 2013 byla v některých laboratořích značena krev lyofilizovanou 8barevnou kombinací vyvinutou speciálně pro tento účel společností Cytognos SL.

Vyskytly se různé druhy chyb:

- Při odchylce v triplicátu, tj. ve všech třech vzorcích měřených v laboratoři, byla chyba způsobená pravděpodobně chybným nastavením přístroje, používáním odlišené šarže kuliček Rainbow, odlišnou reagentií nebo špatnou titrací protilátek.
- Při odlišnosti pouze v jednom vzorku ze tří se nejčastěji jednalo o ojedinělou chybu nebo interindividuální variabilitu v expresi lehkých imunoglobulinových řetězců kappa, lambda.
- Při odchylce intenzity signálu negativní populace, která je podobná ve všech třech vzorcích, je naopak výsledkem suspektní z chybně nastavené kompenzace.

V roce 2013 byl do analyzačního programu Infinicyt začleněn modul pro analýzu dat, který dále umožnil 1) okamžitou analýzu naměřených dat a 2) ověření schopnosti manuální analýzy jednotlivých osob porovnáním se standardem automatické analýzy. Použití lyofilizované kombinace protilátek snížilo výskyt odlehlých hodnot z 11 na 4, nicméně tyto odlehlé hodnoty byly získány především v jedné laboratoři.

Ukázaná kontrola kvality je inovativní z pohledu:

- 1) Použití lokálních vzorků bez nutnosti fixace a transportu
- 2) Kontroly celého procesu včetně analýzy a nikoli pouze výsledné hodnoty
- 3) Použitelnost mediánu intenzity fluorescence jako parametru s výpovědní hodnotou pro kontrolu celého procesu

Další data ukazují v příložené publikaci (příloha 3).

Standardizace cytometrů od jiných výrobců

V další práci jsme se zaměřili na nastavení cytometrů od jiných výrobců, které se odlišují od přístrojů Becton Dickinson, nicméně mohou měřit 8barevné kombinace protilátek zavedené konsorciem Euroflow. Rozdíly se týkají především:

- 1) Rozlišení (resolution)
- 2) Použitých filtrů omezujících vlnovou délku signálu zachycovaném na jednotlivých detektorech

Naopak předpoklady pro měření Euroflow kombinací protilátek zahrnují:

- 1) Vybavení třemi lasery (emitujícími koherentní světlo o vlnových délkách 405nm, 488nm a 633nm)
- 2) Vybavení minimálně 8 detektory pro měření 8barevných kombinací v konfiguraci 2-4-2 (pro lasery v pořadí uvedeném výše)
- 3) Podporu datového formátu FCS, který je analyzovatelný dalšími analyzačními programy bez skrytých vlastností

V práci, která je nyní v recenzním řízení (příloha 8), ukazujeme na příkladu cytometrů Navios od společnosti Beckman Coulter (Miami, FL, USA) a MACSQuant od společnosti

Miltenyi (Bergisch Gladbach, Německo), jak je možné přístroje správně nastavit pro získání standardizovaných dat.

Odlišné rozlišení dat získaných na přístroji Navios lze přepočítat v softwaru Infinicyt, avšak větší obtíž nastává se samotným nastavením napětí jednotlivých detektorů. Toto se totiž dle Euroflow postupů nastavuje pomocí tzv. hard dyed beads, tj. kuliček s pevně navázanými fluorochromy, které nejsou známé. Použijeme-li tedy fluorochrom s odlišným spektrem a současně filtr propouštějící jinou část spektra dopadající na detektor, signál získaný na obou přístrojích může být různý. Princip ukazují v příloze 8 na datech získaných pomocí spektrálního cytometru Sony SP6800. Nastavení je tedy potřeba udělat pomocí tzv. capture beads – tyto kuličky můžeme značit pomocí cílového fluorochromu a napětí nastavit na takovou hodnotu, která vede k získání signálu stejné intenzity na cytometru referenčním a studovaném. Po nastavení cílových voltáží změříme znovu hard dyed beads (v tomto případě kuličky Rainbow) a odečteme MedFI cílové populace (7th peak) – toto bude do budoucna cílová hodnota nastavení pro kombinaci fluorochrom-filtr na novém cytometru. Ideálním nástrojem by byly hard dyed beads obsahující fluorochromy použité v měřených kombinacích protilátek, tyto však nejsou dostupné a musely by se vyrobit na objednávku.

3. Jaká je úloha nových moderních metod v monitoraci akutní lymfoblastické leukémie (např. průtokové cytometrie a sekvenování nové generace)? (přílohy 4, 5, 6)

Analýza regenerace B lymfocytů v kostní dřeni pomocí moderních metod

Pro správné hodnocení MRN je potřeba dokonalá znalost vývoje B buněk v kostní dřeni a změn očekávaných v průběhu regenerace, ke které dochází v určitých fázích terapie ALL. Samotné porovnání se zdravou kostní dření, jejíž studium je možné u dárců kostní dřene, není dostatečné, protože největším problémem detekce MRN zůstává odlišení regenerující krvetvorby poznamenané chemoterapií od maligních buněk. Studovali jsme proto vývoj B lymfocytární řady v kostní dřeni pomocí 8barevné kombinace protilátek používané současně pro detekci MRN, a použili nové softwarové nástroje pro analýzu.

Výsledky ukazují v příloze 4. Definovali jsme vývojová stádia a našli odlišnosti v regenerující kostní dřeni. Výsledky jsme porovnali s nálezy u zdravých dárců.

V kostní dřeni tři a pět měsíců po zahájení antileukemické terapie nacházíme zvýšené zastoupení populace imunofenotypu CD34^{neg/slabě}19^{pos}TdT^{pos}cytoplazmatické IgM^{neg}, která je ve zdravé kostní dřeni zastoupena minimálně. Tyto buňky svým původem patří ke stádiu pre-B-I buněk vzhledem ke kompletní přestavbě genu pro těžký řetězec imunoglobulinu (*IGH*), avšak s chybějící inframer přestavbou umožňující vznik proteinu.

Z uvedené studie vyplývají dva závěry. Zdravá kostní dřeň není optimální referenční materiál pro hodnocení MRN u pacientů léčených pro ALL, a zvýšené zastoupení buněk uvedeného fenotypu může být falešně hodnoceno jako přítomnost MRN. Na druhé straně u pacientů, u nichž je fenotyp blastů identický s touto populací (v naší studii u 6 z 26 pacientů) může být výsledek falešně negativní. V tomto případě je pro správné hodnocení nutné analyzovat další znaky odlišující maligní a nemaligní lymfoblasty.

Vysoká senzitivita a standardizované měření MRN u B prekurzorové ALL

Pro detekci MRN je důležitý výběr znaků pomáhajících odlišit maligní blasty od nemaligní, resp. regenerující B řady, a dostatečná senzitivita měření. V současných léčebných protokolech BFM je stratifikace pacientů prováděna v den 15 po zahájení terapie na základě vyšetření MRN s potřebnou senzitivitou $1e^{-3}$. Vyšší senzitivity bylo tradičně dosaženo pomocí molekulárně genetických metod. Průtoková cytometrie je však z hlediska času i nákladů výhodnější a pro některá centra bez dostatečného vybavení a zkušeností může zvýšení senzitivity průtokové cytometrie umožnit náhradu molekulárně genetických metod. Zaměřili jsme se proto na vývoj panelu (kombinace protilátek) a pracovního postupu vedoucího ke zvýšení senzitivity cytometrického vyšetření MRN u B prekurzorové ALL a výsledky porovnali s dalšími molekulárně genetickými metodami. Výsledky ukazují v příloze 5.

Po celkem pěti kolech výběru vhodných znaků pro odlišení maligní a nemaligní B řady jsme dosáhli odlišení maligních a nemaligních B prekurzorů u 99 % pacientů. Optimalizace pracovního postupu navyšující senzitivitu průtokové cytometrie vedla k dosažení shodných výsledků s molekulárními metodami u 93 % pacientů. Vzorky, u kterých nebylo dosaženo shody, byly znovu analyzovány, případně vyšetřeny pomocí NGS. Konečná shoda mezi

oběma typy metod byla 98 %, což je doposud nejlepší publikovaný výsledek. Omezením metodiky je nutnost zpracování dostatečného množství buněk, což může být limitem zejména v časových bodech léčby s aplázií kostní dřeně. Tento limit však platí pro všechny zmíněné metody.

NGS pro hodnocení MRN

NGS vstoupilo na pole genetických metod jako slibná metoda nejen pro detekci nových mutací, ale i pro detekci přestaveb imunoreceptorových genů. Ty se používají pro detekci MRN u dětské ALL v rámci protokolů skupiny Berlin-Münster-Franfurkt, a to metodou qPCR. Úloha průtokové cytometrie byla v této studii především v propojení obou metod, kdy qPCR hodnotí přestavby Ig/TCR v rámci všech buněk, ale NGS pouze v rámci B, respektive T buněk. Porovnali jsme hladinu MRN pomocí NGS a qPCR u 210 vzorků od pacientů s ALL v průběhu terapie. Výsledky ukazují v příloze 6. Výsledky obou metod spolu korelují, nicméně u 32 vzorků jedna či druhá metoda vedla k jinému výsledku, což by vedlo ke změně stratifikace u celkem 25 pacientů. Hodnocení MRN v den 33 pomocí NGS pak v naší limitované kohortě přesněji stanovilo riziko relapsu. Kromě hodnocení MRN navíc zároveň poskytuje informaci o složení repertoáru IgH, který se jeví jako nezávislý prognostický faktor. Pro náhradu qPCR perspektivním NGS je potřeba další validace na širší kohortě pacientů s definicí nových stratifikačních kritérií a standardizace metody mezi jednotlivými centry, nicméně metoda může být pro řadu center dostupnější než dosud používaná qPCR.

4. Jaké je využití vyšetření excizních kroužků (KREC, TREC) u vybraných imunodeficitů (např. DiGeorgův syndrom, deficit GATA-2)? *(přílohy 1, 7)*

Průtoková cytometrie je významnou metodou pro diagnostiku imunodeficitů pomocí kvantifikace jednotlivých lymfocytárních subpopulací. Kromě základního rozlišení T, B a NK lymfocytů umožňuje bližší analýzu naivních a paměťových forem pomocí rozdílné exprese některých molekul, například přítomnosti CD27 u paměťových B lymfocytů v periferní krvi, či naopak ztráty CD27 u paměťových CD4 T lymfocytů. Tato analýza je stěžejní pro diagnostiku některých typů primárního imunodeficitu, např. těžké kombinované poruchy imunity (severe combined immunodeficiency, SCID), kdy zcela chybí T buňky. Ne vždy je však možné získat vzorek periferní krve od novorozenců, proto bylo v některých zemích (v ČR dosud ne) zavedeno screeningové vyšetření excizních kroužků T a B buněčného receptoru z kapky krve získané po narození (v České republice tzv. Guthrieho kartičky). V České republice jsou tyto kartičky určené zatím primárně pro screening převážně metabolických vad, nicméně díky jejich uchování lze zpětně vyšetřit DNA získanou těsně po porodu.

Naším cílem bylo nejprve zavést tuto metodu, dále definovat referenční meze a zjistit přínos pro další typy imunodeficitů, včetně deficitu GATA-2. V rámci tohoto projektu jsme vyšetřili velké množství kontrolních vzorků kostní dřeně, periferní krve a Guthrieho kartiček. Výsledky ukazují v příloze 7.

Pacienti s deficitem GATA-2

Ačkoli jsme prokázali, že B lymfopenie je nejvíce senzitivní a specifický parametr pro identifikaci pacientů s deficitem GATA-2, u 2 z 12 vyšetřovaných pacientů bylo množství B lymfocytů v periferní krvi v mezích normy. Hladina KREC však byla významně snížena až nedetekovatelná u všech pacientů s deficitem GATA-2. Tento nález tedy ukazuje na významnou poruchu produkce B lymfocytů u pacientů s deficitem GATA-2. Se sníženou hladinou KREC souvisí charakteristický úbytek naivních B lymfocytů v periferní krvi a absence B lymfoidních progenitorů v kostní dřeni.

Vyšetření KREC v periferní krvi u pacientů s B lymfopenií ještě před odběrem kostní dřeně může identifikovat pacienty s poruchou produkce B lymfocytů s podezřením na poruchu imunity typu deficitu GATA-2.

Měli jsme možnost vyšetřit 4 Guthrieho kartičky pacientů s deficitem GATA-2. Překvapivě byla u 3 pacientů hladina KREC normální, snížená byla pouze u jednoho pacienta. Tento pacient se sníženou hladinou KREC byl diagnostikován s MDS ve věku 4 let – ve srovnání s ostatními pacienty v kohortě tedy významně brzy a dosud se jedná o nejmladšího publikovaného pacienta (ostatní pacienti v naší kohortě byli diagnostikováni ve věku vyšším než 10 let).

Pacienti s deficitem GATA-2 měli rovněž mírně sníženou hladinu excizních kroužků T buněčného receptoru. Usuzujeme na zvýšenou proliferaci T lymfocytů v důsledku zvýšeného výskytu infekcí, kterými pacienti s deficitem GATA-2 trpí.

Blíže nálezy ukazují v příloze 1.

Pacienti se selháním kostní dřeně asociovaném s hepatitidou

U 4 z 12 vyšetřených pacientů s HA-BMF jsme našli sníženou hladinu excizních kroužků TREC. Nález byl v korelaci se snížením naivních T lymfocytů fenotypu CD27^{pos}28^{pos}45RA^{pos} a expanzí efektorových a paměťových forem spolu se zvýšenou aktivací. U dvou pacientů jsme porovnali hodnotu TREC s hladinou po imunosupresivní terapii, kde došlo ke zvýšení hladiny TREC i naivních T lymfocytů.

Pacienti s DiGeorgovým syndromem (DGS)

DGS zahrnuje široké spektrum poruch thymu. Naším cílem bylo u těchto pacientů zjistit význam vyšetření hladin KREC a TREC z Guthrieho kartičky a v následných vzorcích periferní krve. Z celkem 13 vyšetřených DGS pacientů měl pouze jeden abnormální hodnoty KREC/TREC při narození. Zajímavá však byla dynamika dalšího vývoje, kdy hladina TREC klesala s věkem rychleji než u kontrolních vzorků. Výsledky dále ukazují v příloze 7.

Diskuze

Myelodysplastický syndrom v dětském věku je onemocnění odlišné od dospělých forem. Objevením mutací v genu *GATA2* byla identifikována doposud největší podskupina pacientů se společným patogenetickým mechanismem vzniku onemocnění. Další definovanou skupinou pacientů se selháním kostní dřeně jsou pacienti po proběhlé hepatitidě. Po vyloučení těchto podskupin se již pacienti s AA a RCC významně neliší ve studovaných parametrech. Předpokládáme, že u všech pacientů se více či méně imunitní mechanismy podílí na destrukci kostní dřeně (např. v návaznosti na proběhlou infekci), nicméně proces vzniká v terénu genetické predispozice, která vede k selhání krvetvorby. Významný podíl imunitních mechanismů na selhání kostní dřeně jsme pozorovali u pacientů s předcházející hepatitidou na základě imunofenotypizace T lymfocytů, nicméně pacienti se nelišili ve vyšetřených cytokinových hladinách. Ty však mohou být ovlivněny i aplikací kortikosteroidních léků při probíhající hepatitidě. Genetická predispozice, která je podkladem selhání kostní dřeně, pak může zahrnovat polymorfismy či mutace v genech důležitých pro imunitní reakce nebo hematopoézu. Dalším postupem pro odкрытие patogeneze u zbývajících pacientů pak bude nejspíše aplikace nových metod typu celoexomového sekvenování vedoucí k identifikaci mutací u podobných pacientů. Tímto způsobem jsme již definovali skupinu pacientů tzv. GATA-2-like, kteří svým nálezem připomínají pacienty s mutací *GATA2*, ale mutaci mají vyloučenou. Výsledkem tak může být identifikace AA/MDS spíše jako obrazu selhání kostní dřeně, než jako samostatných diagnostických jednotek. Rozlišení obou nemocí v současnosti probíhá při histopatologickém hodnocení biopsie kostní dřeně s cílem nalézt charakteristický RCC pattern. Nelze vyloučit, že i při absenci nálezu typického pro RCC v jednom vzorku od pacienta, by při odběru vzorku z jiného místa (např. sternum, lopata kyčelní) RCC pattern nalezen byl a diagnóza AA tak pouze znamená v jistém slova smyslu nereprezentativní vzorek. Vzhledem k podobnému terapeutickému přístupu pak klademe důraz spíše na odhalení patogeneze než na samotné odlišení obou jednotek. Odhalení patogeneze je důležité především pro další terapeutický postup a vyšetření rodiny, ať již z důvodu zjištění predispozice k onemocnění, či pro identifikaci potenciálních dárců kostní dřeně. Samotná role průtokové cytometrie v diagnostice MDS dětského věku či AA pak může být v identifikaci pacientů jednotlivých genetických podskupin, pokud budou mít jedinečnou charakteristiku, jako je tomu u pacientů s deficitem *GATA-2* či tzv. GATA-2-like pacientů.

Zabývali jsme se aplikací a použitelností nových metod v hematologii a imunologii. U průtokové cytometrie je jednou z perspektivních otázek automatizace analýzy vedoucí ke snížení nároků na expertní analýzu a k omezení subjektivity hodnocení. Všechny typy automatických analýz by však měly být založeny na kvalitních datech, k jejichž získání vede standardizace metody. Kromě získání porovnatelných dat je poté rovněž možné aplikovat kontroly kvality s identifikací chyb, jak jsme ukázali v přiložené publikaci. Výhoda databáze porovnatelných dat je pak v edukaci například při zavádění metody v novém centru, dále pak přináší možnost vývoje výše zmíněných automatických analýz. Ukázali jsme standardizaci i pro přístroje od jiných výrobců, nicméně v budoucnu se budeme stále častěji setkávat s daty odlišného typu, jako jsou například data ze spektrálního cytometru. Tam již detekovaný signál nelze ovlivnit jednoduše pouze změnou napětí na detektoru, ale porovnatelná data získáme pouze následnou bioinformatickou úpravou. Tento zásah do dat pak ale může znemožnit identifikaci chyb na základní úrovni.

Porovnávání dat získaných pomocí různých metodik je rovněž komplikováno omezením a chybami použitých metod. Ve své práci jsem ukázala porovnávání hladin MRN získaných měření průtokovou cytometrií a kvantitativní PCR s nalezením diskrepancí, které byly způsobeny subjektivitou hodnocení cytometrických dat a nespecifickou amplifikací v případě qPCR. U cytometrických dat jsme problém vyřešili pomocí opakované expertní analýzy, do budoucna pak toto může vyřešit automatická analýza, kterou zmiňuji výše. V případě PCR je perspektivní alternativou sekvenování nové generace, které jednak odhalilo chyby a případy falešné positivity PCR, jednak se v naší další práci ukázalo jako možný přesnější ukazatel rizika relapsu ALL u dětských pacientů. Začlenění metody do rutinního postupu však obnáší nutnost validace na prospektivních větších kohortách pacientů a pravděpodobně rovněž zavedením nových kategorií s vlastními hranicemi (cut-off) nálezů, které se mohou odlišovat od původní metody. Celému náročnému procesu tak významně napomáhá mezinárodní spolupráce.

Seznam zkratk

ALL	Akutní lymfoblastická leukémie
AML	Akutní myeloidní leukémie
BFM	Pracovní skupina Berlin-Frankfurt-Münster
DGS	DiGeorgův syndrom
DNA	Deoxyribonukleová kyselina (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
EGIL	Evropská skupina pro imunologickou charakterizaci leukémií (<i>European Group for the Immunological Characterization of Leukemias</i>)
ELISA	Imunochemická metoda využívaná ke kvantitativnímu stanovení antigenů (<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>)
EWOG-MDS	Evropská pracovní skupina pro myelodysplastický syndrom u dětí (<i>European Working Group of MDS and JMML in Childhood</i>)
FCS	Standardní formát dat průtokové cytometrie (<i>flow cytometry standard</i>)
HA-BMF	Selhání kostní dřeně asociované s hepatitidou (<i>hepatitis associated bone marrow failure</i>)
HLA	Hlavní histokompatibilní komplex (<i>human leukocyte antigen</i>)
HSCT	Transplantace kmenových buněk krvetvorby (<i>hematopoietic stem cell transplantation</i>)
iAMP21	Intrachromozomální amplifikace chromozomu 21
IBMF	Vrozené selhání kostní dřeně (<i>Inherited bone marrow failure</i>)
Ig	Imunoglobulin
KREC	Excizní kroužek B buněčného receptoru (<i>kappa-deleting recombination excision circle</i>)
LGL	velké granulární lymfocyty
MDR-AML	Akutní myeloidní leukémie asociovaná s myelodysplázií (<i>myelodysplasia related acute myeloid leukemia</i>)
MDS	Myelodysplastický syndrom
MedFI	Medián intenzity fluorescence (<i>median fluorescent intensity</i>)
MRN	Minimální reziduální nemoc
NCN	Normalizovaný počet kopií (<i>normalized copy number</i>)
NGS	Sekvenování nové generace (<i>next generation sequencing</i>)
PCR	Polymerázová řetězová reakce (<i>polymerase chain reaction</i>)
QA	Kontrola kvality (<i>quality assessment</i>)
qPCR	Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (<i>quantitative polymerase chain reaction</i>)
RAEB	Refrakterní anémie s excesem blastů

RAEBt	Refrakterní anémie s excesem blastů v transformaci
RCC	Refrakterní cytopenie dětského věku (<i>Refractory cytopenia of childhood</i>)
RNA	Ribonukleová kyselina (<i>ribonucleic acid</i>)
SCID	Těžký kombinovaný imunodeficit (<i>severe combined immunodeficiency</i>)
TCR	T buněčný receptor (<i>T cell receptor</i>)
TdT	Terminální deoxynukleotidyltransferáza
TREC	Excizní kroužek T buněčného receptoru (<i>T-cell receptor excision circle</i>)
WHO	Světová zdravotnická organizace (<i>World health organisation</i>)
WT1	Gen kódující protein Wilmsova tumoru (<i>Wilms Tumor 1</i>)

Použitá literatura

1. Hasle H, Wadsworth LD, Massing BG, McBride M, Schultz KR. A population-based study of childhood myelodysplastic syndrome in British Columbia, Canada. *Br J Haematol.* 1999 Sep;106(4):1027–32.
2. Baumann I, Niemeyer CM, Bennett JM, Shannon K. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al., editors. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues.* Lyon: International Agency for Research on Cancer (IARC); 2008. p. 104–7.
3. Niemeyer CM, Baumann I. Classification of childhood aplastic anemia and myelodysplastic syndrome. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2011 Jan;2011:84–9.
4. Kardos G, Baumann I, Passmore SJ, et al. Refractory anemia in childhood: a retrospective analysis of 67 patients with particular reference to monosomy 7. *Blood.* 2003;102(6):1997–2003.
5. Strahm B, Nöllke P, Zecca M, et al. Hematopoietic stem cell transplantation for advanced myelodysplastic syndrome in children: results of the EWOG-MDS 98 study. *Leukemia.* 2011 Mar;25(3):455–62.
6. Hasle H, Niemeyer CM, Chessells JM, et al. A pediatric approach to the WHO classification of myelodysplastic and myeloproliferative diseases. *Leuk Off J Leuk Soc Am Leuk Res Fund UK.* 2003;17(2):277–82.
7. Aalbers AM, van den Heuvel-Eibrink MM, Baumann I, et al. T-cell receptor V β skewing frequently occurs in refractory cytopenia of childhood and is associated with an expansion of effector cytotoxic T cells: a prospective study by EWOG-MDS. *Blood Cancer J.* 2014 May;4:e209.
8. Shimamura A, Alter BP. Pathophysiology and management of inherited bone marrow failure syndromes. *Blood Rev.* 2010 May;24(3):101–22.
9. Hsu AP, Johnson KD, Falcone EL, et al. GATA2 haploinsufficiency caused by mutations in a conserved intronic element leads to MonoMAC syndrome. *Blood.* 2013 May 9;121(19):3830–7, S1-7.
10. Ostergaard P, Simpson MA, Connell FC, et al. Mutations in GATA2 cause primary lymphedema associated with a predisposition to acute myeloid leukemia (Emberger syndrome). *Nat Genet.* 2011 Oct;43(10):929–31.
11. Hahn CN, Chong C-E, Carmichael CL, et al. Heritable GATA2 mutations associated with familial myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. *Nat Genet.* 2011 Oct;43(10):1012–7.
12. Narumi S, Amano N, Ishii T, et al. SAMD9 mutations cause a novel multisystem disorder, MIRAGE syndrome, and are associated with loss of chromosome 7. *Nat Genet.* 2016 May 16;48(7):792–7.
13. Tesi B, Davidsson J, Voss M, et al. Gain-of-function SAMD9L mutations cause a syndrome of cytopenia, immunodeficiency, MDS, and neurological symptoms. *Blood.* 2017 Apr 20;129(16):2266–79.
14. Hasle H. Myelodysplastic and myeloproliferative disorders of childhood. *Hematology.*

2016 Dec 1;2016(1):598–604.

15. Hirabayashi S, Flotho C, Moetter J, et al. Spliceosomal gene aberrations are rare, coexist with oncogenic mutations, and are unlikely to exert a driver effect in childhood MDS and JMML. *Blood*. 2012 Mar 15;119(11):e96-9.
16. Coutinho DF, Monte-Mór BCR, Vianna DT, et al. TET2 expression level and 5-hydroxymethylcytosine are decreased in refractory cytopenia of childhood. *Leuk Res*. 2015 Oct;39(10):1103–8.
17. Westers TM, Ireland R, Kern W, et al. Standardization of flow cytometry in myelodysplastic syndromes: a report from an international consortium and the European LeukemiaNet Working Group. *Leukemia*. 2012 Jul;26(7):1730–41.
18. Van De Loosdrecht AA, Ireland R, Kern W, et al. Rationale for the clinical application of flow cytometry in patients with myelodysplastic syndromes: position paper of an International Consortium and the European LeukemiaNet Working Group. *Leuk lymphoma*. 2013 Mar;54(3):472-5.
19. Della Porta MG, Picone C, Pascutto C, et al. Multicenter validation of a reproducible flow cytometric score for the diagnosis of low-grade myelodysplastic syndromes: results of a European LeukemiaNET study. *Haematologica*. 2012 Aug;97(8):1209–17.
20. Ogata K, Della Porta MG, Malcovati L, et al. Diagnostic utility of flow cytometry in low-grade myelodysplastic syndromes: a prospective validation study. *Haematologica*. 2009 Aug;94(8):1066–74.
21. Aalbers a M, van den Heuvel-Eibrink MM, de Haas V, et al. Applicability of a reproducible flow cytometry scoring system in the diagnosis of refractory cytopenia of childhood. *Leukemia*. 2013 Mar 15;1–3.
22. Rabbani B, Tekin M, Mahdieh N. The promise of whole-exome sequencing in medical genetics. *J Hum Genet*. 2014 Jan 7;59(1):5–15.
23. Young NS. Hematopoietic cell destruction by immune mechanisms in acquired aplastic anemia. *Semin Hematol*. 2000;37(1):3–14.
24. Passweg JR, Marsh JCW. Aplastic anemia: first-line treatment by immunosuppression and sibling marrow transplantation. *Hematol Am Soc Hematol Educ Progr*. 2010;2010(1):36–42.
25. Aalbers a M, van den Heuvel-Eibrink MM, de Haas V, et al. Applicability of a reproducible flow cytometry scoring system in the diagnosis of refractory cytopenia of childhood. *Leukemia*. 2013 Sep;27(9):1923-5.
26. Baumann I, Führer M, Behrendt S, et al. Morphological differentiation of severe aplastic anaemia from hypocellular refractory cytopenia of childhood: reproducibility of histopathological diagnostic criteria. *Histopathology*. 2012;61(1):10–7.
27. Bader P, Niemeyer C, Weber G, et al. WT1 gene expression: useful marker for minimal residual disease in childhood myelodysplastic syndromes and juvenile myelomonocytic leukemia? *Eur J Haematol*. 2004 Jul;73(1):25–8.
28. Zimmermannova O, Zaliova M, Moorman A V., et al. Acute lymphoblastic leukemia with aleukemic prodrome: preleukemic dynamics and possible mechanisms of immunosurveillance. *Haematologica*. 2017 Mar 2;haematol.2016.161380.

29. Hasle H, Heim S, Schroeder H, et al. Transient pancytopenia preceding acute lymphoblastic leukemia (pre-ALL). *Leukemia*. 1995 Apr;9(4):605–8.
30. Niemeyer CM, Baumann I. Myelodysplastic syndrome in children and adolescents. *Semin Hematol*. 2008 Jan;45(1):60–70.
31. Strahm B, Locatelli F, Bader P, et al. Reduced intensity conditioning in unrelated donor transplantation for refractory cytopenia in childhood. *Bone Marrow Transplant*. 2007 Aug 25;40(4):329–33.
32. Strahm B, Nöllke P, Zecca M, et al. Hematopoietic stem cell transplantation for advanced myelodysplastic syndrome in children: results of the EWOG-MDS 98 study. *Leukemia*. 2011 Mar;25(3):455–62.
33. Moorman A V. The clinical relevance of chromosomal and genomic abnormalities in B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Blood Rev*. 2012 May;26(3):123–35.
34. Inaba H, Greaves M, Mullighan CG. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*. 2013 Jun 1;381(9881):1943–55.
35. Moorman A V. New and emerging prognostic and predictive genetic biomarkers in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2016;101(4).
36. Moorman A V, Robinson H, Schwab C, et al. Risk-directed treatment intensification significantly reduces the risk of relapse among children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia and intrachromosomal amplification of chromosome 21: a comparison of the MRC ALL97/99 and UKALL2003 trials. *J Clin Oncol*. 2013 Sep 20;31(27):3389–96.
37. Heerema NA, Carroll AJ, Devidas M, et al. Intrachromosomal amplification of chromosome 21 is associated with inferior outcomes in children with acute lymphoblastic leukemia treated in contemporary standard-risk children’s oncology group studies: a report from the children’s oncology group. *J Clin Oncol*. 2013 Sep 20;31(27):3397–402.
38. Attarbaschi A, Panzer-Grümayer R, Mann G, et al. Minimal Residual Disease–based Treatment is Adequate for Relapse-prone Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia with an intrachromosomal amplification of chromosome 21: The experience of the ALL-BFM 2000 trial. *Klin Pädiatrie*. 2014 Nov 28;226(06/07):338–43.
39. Zaliouva M, Zimmermannova O, Dörge P, et al. ERG deletion is associated with CD2 and attenuates the negative impact of IKZF1 deletion in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2015 May;29(5):1222–1222.
40. Coustan-Smith E, Sancho J, Hancock ML, et al. Clinical importance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2000 Oct 15;96(8):2691–6.
41. de Rooij J, Zwaan C, van den Heuvel-Eibrink M. Pediatric AML: From Biology to Clinical Management. *J Clin Med*. 2015 Jan 9;4(1):127–49.
42. Tönnies H, Huber S, Kuhl J-S, et al. Clonal chromosomal aberrations in bone marrow cells of Fanconi anemia patients: gains of the chromosomal segment 3q26q29 as an adverse risk factor. *Blood*. 2003 May 15;101(10):3872–4.
43. Seif AE. Pediatric leukemia predisposition syndromes: clues to understanding leukemogenesis. *Cancer Genet*. 2011 May;204(5):227–44.

44. Link DC, Schuettpelez LG, Shen D, et al. Identification of a Novel *TP53* Cancer Susceptibility Mutation Through Whole-Genome Sequencing of a Patient With Therapy-Related AML. *JAMA*. 2011 Apr 20;305(15):1568.
45. Liew E, Owen CJ. Familial myelodysplastic syndromes - a review of the literature. *Haematologica*. 2011 Oct;96(10):1536-42.
46. Hahn CN, Chong C-E, Carmichael CL, et al. Heritable GATA2 mutations associated with familial myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. *Nat Genet*. 2011 Oct;43(10):1012-7.
47. Smith ML, Cavenagh JD, Lister TA, Fitzgibbon J. Mutation of *CEBPA* in Familial Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2004 Dec 2;351(23):2403-7.
48. Wechsler J, Greene M, McDevitt MA, et al. Acquired mutations in GATA1 in the megakaryoblastic leukemia of Down syndrome. *Nat Genet*. 2002 Sep 12;32(1):148-52.
49. Hitzler JK, Cheung J, Li Y, Scherer SW, Zipursky A. GATA1 mutations in transient leukemia and acute megakaryoblastic leukemia of Down syndrome. *Blood*. 2003;101(11):4301-4.
50. Vardiman JW, Berenson M, Thiele J, Arber DA, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009 Jul 30;114(5):937-51.
51. Mejstrikova E, Volejnikova J, Fronkova E, et al. Original Articles Prognosis of children with mixed phenotype acute leukemia treated on the basis of consistent immunophenotypic criteria. *Haematologica*. 2010;95(6):928-35.
52. Dworzak MN, Fritsch G, Fleischer C, et al. Comparative phenotype mapping of normal vs. malignant pediatric B-lymphopoiesis unveils leukemia-associated aberrations. *Exp Hematol*. 1998 Apr;26(4):305-13.
53. Karawajew L, Dworzak M, Ratei R, et al. Minimal residual disease analysis by eight-color flow cytometry in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2015 Jul;100(7):935-44.
54. van Dongen JJ, Breit TM, Adriaansen HJ, Beishuizen A, Hooijkaas H. Detection of minimal residual disease in acute leukemia by immunological marker analysis and polymerase chain reaction. *Leukemia*. 1992;6 Suppl 1:47-59.
55. Burmeister T, Marschalek R, Schneider B, et al. Monitoring minimal residual disease by quantification of genomic chromosomal breakpoint sequences in acute leukemias with MLL aberrations. *Leukemia*. 2006 Mar;20(3):451-7.
56. Ladetto M, Brüggemann M, Monitillo L, et al. Next-generation sequencing and real-time quantitative PCR for minimal residual disease detection in B-cell disorders. *Leukemia*. 2014 Jun 17;28(6):1299-307.
57. van Zelm MC, Szczepanski T, van der Burg M, van Dongen JJM. Replication history of B lymphocytes reveals homeostatic proliferation and extensive antigen-induced B cell expansion. *J Exp Med*. 2007 Mar 19;204(3):645-55.
58. Boublikova L, Kalinova M, Ryan J, et al. Wilms' tumor gene 1 (WT1) expression in childhood acute lymphoblastic leukemia: a wide range of WT1 expression levels, its impact on prognosis and minimal residual disease monitoring. *Leukemia*. 2006

Mar;20(2):254–63.

59. Reiterova M, Kramarzova K, Sukova M, et al. Changes Identified by Flow Cytometry and WT1 Expression in Consecutive Bone Marrow Samples in Refractory Cytopenia of Childhood and Aplastic Anemia Before Start of the Therapy. *ASH Annu Meet Abstr.* 2011 Nov 18;118(21):1342.
60. Spinner MA, Sanchez LA, Hsu AP, et al. GATA2 deficiency: a protean disorder of hematopoiesis, lymphatics, and immunity. *Blood.* 2014 Feb 6;123(6):809–21.
61. Ganapathi KA, Townsley DM, Hsu AP, et al. GATA2 deficiency-associated bone marrow disorder differs from idiopathic aplastic anemia. *Blood.* 2015 Jan 1;125(1):56–70.
62. Svobodova T, Mejstrikova E, Salzer U, et al. Diffuse parenchymal lung disease as first clinical manifestation of GATA-2 deficiency in childhood. *BMC Pulm Med.* 2015 Feb 10;15:8.
63. Wlodarski MW, Hirabayashi S, Pastor V, et al. Prevalence, clinical characteristics and prognosis of GATA2-related myelodysplastic syndromes (MDS) in children and adolescents. *Blood.* 2016 Mar 17;127(11):1387–97.
64. Feng X, Scheinberg P, Wu CO, et al. Cytokine signature profiles in acquired aplastic anemia and myelodysplastic syndromes. *Haematologica.* 2011;96(4):602–6.
65. van Dongen JJM, Lhermitte L, Böttcher S, et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia.* 2012 Sep;26(9):1908–75.
66. Kalina T, Flores-Montero J, van der Velden VHJ, et al. EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. *Leukemia.* 2012 Sep;26(9):1986–2010.
67. Barnett D, Granger V, Whitby L, Storie I, Reilly JT. Absolute CD4+ T-lymphocyte and CD34+ stem cell counts by single-platform flow cytometry: the way forward. *Br J Haematol.* 1999 Sep;106(4):1059–62.
68. LYSÁK D, KALINA T, MARTÍNEK J, et al. Interlaboratory variability of CD34+ stem cell enumeration. A pilot study to national external quality assessment within the Czech Republic. *Int J Lab Hematol.* 2010 Dec;32(6p1):e229–36.

Seznam příloh

Publikace s impact faktorem

Příloha 1. **Nováková M**, Žaliová M, Suková M, Wlodarski M, Janda A, Froňková E, et al. Loss of B cells and their precursors is the most constant feature of GATA-2 deficiency in childhood myelodysplastic syndrome. *Haematologica*. 2016 Jun;101(6):707-16. **IF₂₀₁₅= 6,671**

Příloha 2. Aalbers AM, van den Heuvel-Eibrink MM, Baumann I, Dworzak M, Hasle H, Locatelli F, De Moerloose B, Schmutz M, Mejstrikova E, **Novakova M**, et al. Bone marrow immunophenotyping by flow cytometry in refractory cytopenia of childhood. *Haematologica*. 2015 Mar 25;100(3):315–23. **IF₂₀₁₅= 6,671**

Příloha 3. Kalina T, Flores-Montero J, Lecomte Q, Pedreira CE, van der Velden VHJ, **Novakova M**, et al. Quality assessment program for EuroFlow protocols: Summary results of four-year (2010–2013) quality assurance rounds. *Cytom Part A*. 2015 Feb;87(2):145–56. **IF₂₀₁₅= 3,181**

Příloha 4. Theunissen PMJ, Sedek L, De Haas V, Szczepanski T, Van Der Sluijs A, Mejstrikova E, **Nováková M**, et al. Detailed immunophenotyping of B-cell precursors in regenerating bone marrow of acute lymphoblastic leukaemia patients: implications for minimal residual disease detection. *Br J Haematol*. 2017 Apr 17. **IF₂₀₁₅= 5,812**

Příloha 5. Theunissen P, Mejstrikova E, Sedek L, van der Sluijs-Gelling AJ, Gaipa G, Bartels M, Sobral da Costa E, Kotrová M, **Novakova M**, et al. Standardized flow cytometry for highly sensitive MRD measurements in B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2017 Jan 19;129(3):347–57. **IF₂₀₁₅= 11,847**

Příloha 6. Kotrova M, Muzikova K, Mejstrikova E, **Novakova M**, Bakardjieva-Mihaylova V, Fiser K, et al. The predictive strength of next-generation sequencing MRD detection for relapse compared with current methods in childhood ALL. *Blood*. 2015 Aug 20;126(8):1045–7. **IF₂₀₁₅= 11,847**

Příloha 7. Froňková E, Klocperk A, Svatoň M, **Nováková M**, Kotrová M, Kayserová J, et al. The TREC/KREC Assay for the Diagnosis and Monitoring of Patients with DiGeorge Syndrome. *PLoS One*. 2014 Dec 8;9(12):e114514. **IF₂₀₁₄= 3,234**

Publikace v recenzním řízení

Příloha 8. **Nováková M**, Glier H, Brdičková N, Vlková M, Santos AH, Lima M, Roussel M, et al. How to make usage of the standardized EuroFlow 8-color protocols possible for instruments of different manufacturers. Odesláno do *Journal of Immunological Methods*.

Publikace bez impact faktoru

Příloha 9. Janda A, Mejstříková E, Salzer U, Grimová J, Svobodová T, Suková M, **Nováková M**, et al. Deficit transkripčního faktoru GATA-2: nová imunodeficienze se širokým fenotypovým spektrem. První pacienti diagnostikovaní v České republice a přehled literatury. *Česko-slovenská pediatrie*, 2013, sv. 68, s. 112–123. ISSN 0069-2328