

**Univerzita Karlova**

**2. lékařská fakulta**

Doktorský studijní program: Imunologie



**MUDr. Barbora Vagrmanová**

## **LINIOVÁ PLASTICITA LEUKEMICKÝCH BUNĚK**

*Význam pro detekci minimální reziduální nemoci a studium normální krvinev tvorby*

## **LINEAGE PLASTICITY OF LEUKEMIC BLASTS**

*Importance for detection of minimal residual disease and study of hematopoiesis*

Disertační práce

**Školitel:** MUDr. Ester Mejstříková, Ph.D.

**Konzultant:** prof. MUDr. Ondřej Hrušák, Ph.D.

Praha, 2022

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem disertační 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, 30. května 2022

Barbora Vakrmanová

.....

Podpis autora

## Poděkování

---

Mé největší poděkování patří především mé školitelce MUDr. Ester Mejstříkové, Ph.D. za její vedení v projektech a cenné znalosti, zkušenosti a také za neocenitelné rady v průběhu celého studia. Mé další poděkování patří mému konzultantovi prof. MUDr. Ondřeji Hrušákovi, Ph.D. za umožnění práce v prestižním vědeckém týmu a pomoc a nápady při práci na vědeckých projektech. Dále bych chtěla poděkovat mým spolupracovníkům, MUDr. Michaele Novákové, Ph.D., Mgr. Daniele Kužílkové, Ph.D., RNDr. Martině Váškové, Ph.D., prof. MUDr. Tomášovi Kalinovi, Ph.D, doc. MUDr. Evě Froňkové, Ph.D. a dalším spolupracovníkům za jejich trpělivost a sdílení jejich cenných zkušeností. Mé další poděkování patří prof. MUDr. Jana Trkovi, Ph.D., prof. MUDr. Janu Starému, Ph.D., doc. MUDr. Lucii Šrámkové, Ph.D. za možnost pracovat v laboratořích CLIP při Klinice dětské hematologie a onkologie 2. lékařské fakulty. Na závěr bych ráda poděkovala svojí rodině za podporu a trpělivost při mém studiu.

## Abstrakt

---

Akutní leukémie patří mezi nejčastější nádorové onemocnění u dětí. Rozeznáváme dva základní typy onemocnění dle linie, ze které leukemické blasty pochází – lymfoidní (ALL) a myeloidní (AML). Hlavním zaměřením této práce jsou leukémie ležící na pomezí těchto dvou skupin. Asi 2-5% leukémií v diagnóze nese znaky obou linií a nelze je přesně zařadit. V retrospektivní mezinárodní studii jsme zjistili lepší celkové přežití u pacientů léčených dle lymfoidního typu protokolu v porovnání s pacienty léčenými myeloidním typem protokolu, především pokud byl na blastech přítomný znak CD19.

Další příklad plasticity leukemických buněk jsou ALL s časným přesmykem do monocytární linie. V konsektivní kohortě jsme prokázali tento fenomén u 8% s B-prekursorovou ALL. Objasnili jsme, že tento jev se nejčastěji vyskytuje u leukémií s aberacemi *DUX4r*, *PAX5-P80R* a *ZNR384r*. Z důvodu ztráty B lymfoidních znaků dochází k diskrepanci mezi minimální reziduální nemocí (MRN) vyšetřovaných dle průtokové cytometrie a dle přestaveb imunoreceptorových genů pomocí PCR. Transdiferenciaci do monocytární linie jsme zkoumali i pomocí hmotnostní cytometrie a určili sekvenci změn povrchových proteinů a transkripčních faktorů u jednotlivých genetických subtypů pomocí nového algoritmu tviblini.

V současné době se postupně do léčebných protokolů dostávají cílená léčiva včetně monoklonálních protilátek. Daratumumab je nový nadějný lék používaný experimentálně u relabovaných ALL. Tento lék byl použit u pěti pacientů s relapsem ALL. U dvou pacientů s nedostatečnou odpovědí jsme zjistili zdánlivou ztrátu CD38 na blastech, kdy došlo k zablokování vazebného místa pro fluorescenční protilátku daratumumabem, který zůstává navázán na leukemických buňkách.

Zhodnotili jsme MRN v den 8 v kostní dřeni u 290 pacientů léčeným protokolem ALL IC BFM 2002. Pacienti s  $\geq 60\%$  blastů ve dřeni měli horší prognózu než pacienti s  $<60\%$  blastů. Nicméně lze tento časový bod nahradit odběrem v den 15.

**Klíčová slova:** akutní leukémie, hmotnostní cytometrie, imunoterapie, liniová plasticita leukemických buněk, minimální reziduální nemoc, průtoková cytometrie, přesmyk do monocytární linie

## Abstract

---

Acute leukemia is the most common malignancy in children. According to the origin of the leukemic blasts, two types of leukemia are distinguished – lymphoid (ALL) and myeloid (AML). The focus of this thesis is lineage plasticity of the leukemic blasts. In about 2-5% of leukemias, blasts share immunophenotypic features of both lymphoid and myeloid lineages. In international retrospective study we showed superior overall survival in patients treated according to lymphoid type of protocol compared to patients treated to myeloid type of protocol, especially in cases with CD19 positivity on the blasts.

Another type of the plasticity and diagnostic uncertainty in leukemia is ALL with early switch to monocytic lineage. About 8% of B cell precursor ALL underwent monocytic switch in our consecutive cohort. This phenomenon is more common among *DUX4r*, *PAX5-P80R* and *ZNF384r* leukemias. Discrepancy between minimal residual disease (MRD) measured by flow cytometry and quantitative assessment of immunoreceptor rearrangements method occurs because of the loss of B-lymphoid markers. We investigated transdifferentiation process by mass cytometry. By the multilabel panel we were able to determine the sequence of changes in proteins and transcription factors by new tvibindi algorithm.

Targeted treatment, such as monoclonal antibodies, are becoming part of the treatment protocols, recently. Daratumumab is a new promising drug targeting CD38 molecule used experimentally in relapsed ALL. We treated five patients with relapsed ALL with daratumumab. In patients with resistant disease the apparent loss of the surface CD38 can be observed due to daratumumab binding to CD38 protein causing steric hindrance for diagnostic anti-CD38 antibody.

We evaluated MRD at day 8 in bone marrow in 290 patients treated by ALL IC BFM 2002 protocol. The survival of patients having more than 60% of blasts was inferior compared to those with <60%. Nevertheless, aspiration at day 8 can be substituted with day 15 aspiration.

**Keywords:** acute leukemia, flow cytometry, immunotherapy, lineage plasticity of leukemic cells, mass cytometry, minimal residual disease, switch to monocytic lineage

## Seznam použitých zkratk

---

**AIEOP BFM** - Associazione Italiana di Ematologia e Oncologia Pediatrica Berlin-Frankfurt-Munster

**ALAL** – akutní leukémie z nejasné linie (ambiguous lineage acute leukemia)

**ALL** – akutní lymfoblastická leukémie

**AML** – akutní myeloidní leukémie

**BCP ALL** – B prekurzorová leukémie (B cell lymphoblastic ALL)

**CAR** - Chimerní antigenní receptor (chimeric antigen receptor)

**CD** – diferenciační skupina (cluster of differentiation)

**CytoF** – cytometrie dle času letu (cytometry by time of flight)

**DNA** - deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)

**DRP** – profilování lékové odpovědi (drug response profiling)

**EFS** – přežití bez události (event free survival)

**EGIL** – Evropská skupina pro imunofenotypizaci leukémií (European Group for Immunophenotypic characterization of Leukemias)

**EsPhALL** - Evropská studie pro leukémie s philadelpským chromosomem (European intergroup study of post-induction treatment of Philadelphia-chromosome-positive ALL)

**HHD** - vysoká hyperdiploidie (high hyperdiploidy)

**Ig/TR** – imunoglobulin/ T buněčný receptor (Immunoglobulin/ T cell receptor)

**KD** – kostní dřev

**MedFI** – medián fluorescenční intenzity (median fluorescence intensity)

**MRN** – minimální residuální nemoc

**NGS** – sekvenování nové generace (next generation sequencing)

**n.s.** – non significant

**PK** - periferní krev

**RNA/RNAseq**– ribonukleová kyselina (ribonucleic acid)/ sekvenování RNA

**RQ PCR** – polymerázová řetězová reakce v reálném čase (real-time quantitative polymerase chain reaction)

**SNP** – Jednonukleotidový polymorfismus (single-nucleotide polymorphism)

**T ALL** – T akutní lymfoblastická leukémie

**TP1/TP2** – standardizovaný časový bod (timepoint) odběru kostní dřevě

**WES** – celoexomové sekvenování (whole exom sequencing)

**WHO** - Světová zdravotnická organizace (World Health Organization)

# Obsah

---

Prohlášení .....	1
Poděkování .....	2
Abstrakt .....	3
Abstract .....	4
Seznam použitých zkratk .....	5
1 Úvod.....	8
1.1 Akutní lymfoblastické leukémie.....	8
1.2 Akutní myeloidní leukémie .....	10
1.3 Akutní leukémie z buněk z nejasné linie.....	10
1.4 Detekce minimální reziduální nemoci u ALL.....	12
2 Cíle .....	15
2.1 Leukémie z buněk z nejasné linie.....	15
2.2 Leukémie s časným přesmykem do monocytární linie.....	15
2.3 Léčba relapsu akutní lymfoblastické leukémie pomocí daratumumabu.....	15
2.4 Význam měření minimální reziduální nemoci v den 8 v kostní dřeni.....	15
2.5 Určení kvality aspirátu kostní dřene .....	15
3 Metody .....	16
3.1 Průtoková cytometrie .....	16
3.1.1 Konvenční průtoková cytometrie.....	16
3.1.2 Spektrální cytometrie.....	16
3.2 Hmotnostní cytometrie.....	17
3.3 Metody analýzy multidimenzionální dat .....	17
3.3.1 Vaevictis .....	17
3.3.2 Tivibindi .....	18
3.4 Genetické metody.....	18
3.4.1 Molekulárně genetické metody pro měření MRN – RQ PCR a NGS .....	18
3.4.2 Sekvenování RNA a další genetické metody .....	18
3.5 Statistické metody .....	19
4 Výsledky.....	20
4.1 Optimalizace a vytvoření algoritmu pro léčbu ALAL.....	20
4.1.1 Studie iBFM-AMBI2012 .....	20

4.1.2	Registr iBFM-AMBI2018 .....	22
4.1.3	Role žadatele na popsané publikaci a nové mezinárodní studii .....	25
4.2	Fenomén přesmyku do monocytární linie.....	25
4.2.1	Role žadatele na popsané publikaci.....	27
4.2.2	Využití hmotnostní cytometrie u leukémií s přesmykem do monocytární linie.....	27
4.3	Použití daratumumabu u relabovaných ALL.....	31
4.4	Hodnocení MRN u pacientů s ALL v den 8 od zahájení léčby v kostní dřeni .....	34
4.4.1	Role žadatele v popsané publikaci .....	36
4.5	Určení míry naředění aspirátu kostní dřene.....	36
4.5.1	Role žadatele v popsaném připravovaném rukopise.....	39
5	Diskuze.....	40
6	Shrnutí .....	51
7	Použitá literatura .....	52
8	Seznam příloh .....	58



# 1 Úvod

---

Akutní leukémie představují nejčastější maligní onemocnění v dětském věku. Akutní leukémie rozdělujeme dle jejich původu na akutní lymfoblastickou (ALL), vznikající z prekurzorů lymfoidní linie a myeloidní (AML), vznikající z prekurzorů myeloidní linie. Tyto dva typy se liší nejen původem, ale také léčbou a to jak užívanými léky, tak také intenzitou léčby a mírou toxicity, která bývá u AML větší vzhledem k horší prognóze tohoto druhu akutní leukémie. Léčebné výsledky tohoto onemocnění s dříve infaustní prognózou jsou považované za jeden z největších úspěchů moderní medicíny a nyní toto onemocnění přežije přes 80% dětí s ALL a 70% s AML. Pro rozlišení těchto dvou základních typů je vedle mikroskopické diagnostiky důležitá především imunofenotypizace pomocí průtokové cytometrie, ke které se používají mezinárodní klasifikace, nejčastěji EGIL (European Group for the Immunological Characterization of Leukemias) či WHO<sup>1</sup>.

## 1.1 Akutní lymfoblastické leukémie

ALL je nejčastějším podtypem akutních leukémií u dětí a ročně jí onemocní v České republice 70-90 dětí. Onemocnění je v současné době v České republice léčeno dle protokolu AIEOP BFM 2017. Toto onemocnění dělíme dále podle původu atypických buněk na B prekurzorové (B cell precursor ALL, BCP ALL, cca 60-70 pacientů ročně), a vzácnější ALL z prekurzorů T lymfocytů (T ALL) tvořících v České republice 5-15 pacientů ročně. Nejčastěji postihuje děti předškolního věku. Jen vzácně nalezneme vrozené genetické onemocnění predisponující k častějšímu vzniku leukémií jako je Downův syndrom, Li-Fraumeniho syndrom, Nijmegen- Breakage syndrom, ataxia teleangiectazia, Fanconiho anémie a další). Většina ALL vzniká na podkladě získaných genetických aberací<sup>2,3</sup>. Ty dělíme na primární, které vedou ke vzniku tzv. preleukemického klonu (např. chromozomální translokace) a sekundární, které vedou ke vzniku samotné leukémie<sup>4</sup>. ALL je heterogenní onemocnění, různé genetické aberace se mimo jiné liší také prognózou onemocnění. Mezi aberaci s nejlepší prognózou patří především *ETV6-RUNX1* (dříve *TEL-AML1*) a vysoce hyperdiploidní leukémie (high hyperdiploidy, HHD), které tvoří přibližně polovinu dětských ALL. Mezi aberace s horší prognózou patří například translokace genu *KMT2A* (dříve *MLL*), které jsou typické pro kojenecký věk, či leukémie s hypodiploidním počtem chromozomů (tento typ leukemie může být jedním z projevů syndromu Li-Fraumeni). Vzácná translokace *TCF3-HLF* má velmi špatnou prognózu a specifické klinické

projevy (například hyperkalcémii), naštěstí je tato translokace mezi dětskými leukémiemi vzácná. Některé tyto aberace automaticky zařazují pacienty do vyššího rizika a tito pacienti jsou pak léčeni intenzivnější chemoterapií. Zvláštní postavení má translokace *BCR-ABL1*, který zařazuje pacienty do speciálního protokolu EsPhALL (European intergroup study of post-induction treatment of Philadelphia-chromosome-positive ALL), který využívá mimo klasických chemoterapeutik inhibitor tyrozinkinázové aktivity Imatinib<sup>5</sup>. Také pro další fúzní partnery genu ABL jsou nyní tyto inhibitory tyrozinkinázové aktivity využívány. BCP ALL, u kterých nenalezneme žádný ze známých fúzních genů, nazýváme B other. Tato skupina je nyní velmi intenzivně zkoumána a pomocí nových genetických metod jako je RNA sekvenování (RNAseq) se daří i v této skupině nalézt nové subtypy jako jsou leukémie s přestavbou genu *ZNF384* či *DUX4* nebo tzv. *BCR-ABL-like* leukémie<sup>6</sup>.

Většina léků používaných v současné době k léčbě ALL jsou známy již od 80. let, za významným zlepšením stojí tedy především mezinárodní spolupráce založená na randomizovaných studiích a přesné stratifikaci pacientů podle jejich rizika. Dnes je nejdůležitějším stratifikačním faktorem především hladina minimální reziduální nemoci (MRN)<sup>7</sup>. Nejčastějším selháním léčby zůstává relaps onemocnění, který postihuje 10-15% dětí. U těchto pacientů nacházíme často menší citlivost k původní chemoterapii. V posledních letech se na trhu objevila řada nových léčiv, především na bázi imunoterapie, které lze u pacientů s refrakterní či relabovanou ALL využít. U BCP ALL existuje léků více, mezi nejslibnější patří zejména blinatumomab<sup>8,9</sup>, bispecifický konstrukt namířený proti hlavnímu znaku BCP ALL – CD19 a proti molekule CD3 přítomné na T lymfocytech. Tento lék, využívaný dříve především pro leukémie refrakterní na léčbu či leukémie relabované, je nyní součástí léků první linie v novém protokolu pro léčbu ALL. U relapsu T-ALL jsou možnosti biologické léčby velmi omezené a prognóza těchto pacientů je tristní. Mezi potenciálně slibné cílené léky patří daratumumab – monoklonální protilátka zaměřená proti CD38. Tento lék se již osvědčil v léčbě mnohočetného myelomu<sup>10</sup> a nyní se testuje v léčbě relabované (T) ALL<sup>11</sup>, spolehlivá data o účinnosti a trvání léčebného efektu ale chybí. Jedním z možných selhání léčby u monoklonálních protilátek je ztráta cílové molekuly. Tento proces je již dobře popsán u ztráty CD19 po použití blinatumomabu<sup>12</sup>. U daratumumabu jsou popsány pouze vzácné kazuistiky ztráty CD38 u mnohočetného myelomu, zde k této ztrátě dochází i u ALL není známé<sup>13,14</sup>.

## 1.2 Akutní myeloidní leukémie

Akutní myeloidní leukémie představuje 15 – 20 % akutních leukémií u dětí. Stejně jako u ALL, můžeme vzácně rozeznat leukémie asociované s vrozeným genetickým onemocněním (Downův syndrom, familiární myelodysplastický syndrom s mutací *GATA2*, dyskeratosis congenita a další)<sup>15</sup>. Významnou skupinu také tvoří pacienti se sekundární AML po intenzivní chemoterapii<sup>16</sup> či radioterapii pro jiné primární maligní onemocnění. Podobně jako ALL, je i AML velmi heterogenní onemocnění a jednotlivé genetické aberace se prognosticky liší a pacienti jsou dle nich stratifikováni. I u AML došlo k výraznému zlepšení výsledků léčby, které nyní dosahují okolo 65-70% přežití bez události. Za úspěchem této léčby ovšem stojí velmi agresivní chemoterapie, které vede i k vyšší morbiditě a k častějšímu úmrtí z důvodu toxicity léčby. Detekce MRN u AML je obtížnější, lze ji hodnotit průtokovou cytometrií či na základě různých fúzních genů podle genotypu dané leukémie. Hodnocení MRN ovšem není v řadě léčebných protokolů pevně definováno a není vždy klíčové pro stratifikaci pacientů.

## 1.3 Akutní leukémie z buněk z nejasné linie

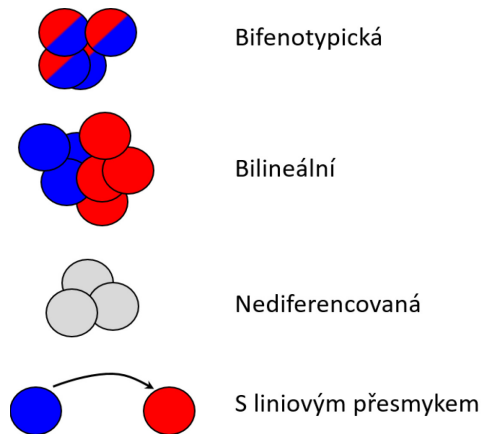
Na pomezí mezi ALL a AML stojí leukémie z buněk z nejasné linie (acute leukemia of ambiguous lineage, ALAL). Tyto vzácné leukémie tvoří 2 - 6% dětských akutních leukémií. Dělíme je do několika typů (*Obr. 1*).

**1. Bifenotypické (hybridní)** – leukémie, u nichž na leukemických buňkách nacházíme znaky obou linií

**2. Bilineální leukémie** – leukémie, u nichž nacházíme dvě (či více) oddělených populací atypických buněk, které patří do odlišných linií

**3. Nediferencované leukémie** – jedná se o velmi nezralý typ leukémie, která kvůli absenci znaků typických pro lymfoidní či myeloidní vývoj nesplní diagnostická kritéria ani pro jednu linii.

**4. Leukémie s časným přesmykem do jiné linie** – jedná se o typ leukémie, která při diagnóze splní kritéria jedné z linií, ale v průběhu léčby atypické buňky mění svůj fenotyp, ztrácí znaky původní linie a získávají znaky opačné linie. Nejčastější a nejlépe popsany je přesmyk z BCP ALL do buněk fenotypu zralých monocytů<sup>17</sup>.



Obr. 1 Typy leukémií z buněk z nejasné linie

Pro diagnózu ALAL se používají především dvě mezinárodní klasifikace. Kritéria EGIL, založená na širší sadě CD znaků a kritéria WHO<sup>1</sup> využívající menší počet znaků. Obecně lze říci, že průtoková cytometrie je základní metodou pro diagnózu ALAL.

Kromě diagnostického problému tvoří ALAL především problém z hlediska klinického – a to jak tyto leukémie léčit. Přístupy k tomuto problému bývají různé a dosud neexistoval sjednocený postup, jak se k těmto leukémiím postavit a rozhodnutí a spočívalo na daném klinickém pracovišti či na konkrétním lékaři. Někteří se přikláněli k léčbě lymfoblastického typu, jiní naopak volili protokoly pro léčbu myeloidní leukémie, především, aby zacílili na tu část atypických buněk s horší prognózou. Některé druhy protokolů dokonce oba typy léčby kombinovali<sup>18</sup>. Spektrum genetických aberací u těchto leukémií je široké – nalezneme zde aberace typické pro lymfoidní (*ETV6-RUNX1*) či myeloidní (*RUNX-RUNX1*) linii, či fúzní geny *KMT2A*, která se může vyskytovat u ALL i AML v závislosti na fúzním partnerovi. Většina ALAL však bývá z genetického pohledu heterogenní<sup>19</sup> a nejsou určující pro výběr léčebného protokolu. Vytvoření algoritmu pro léčbu těchto vzácných akutních leukémií byl jeden z našich cílů.

Samostatnou zmínku si zaslouží leukémie s liniovým přesmykem do monocytární linie. Tyto leukémie nejčastěji začínají jako typické BCP ALL, často s absencí jakýkoliv znaků typických pro myeloidní linii. Velmi časně, během několika prvních dnů léčby, tyto leukémie ztrácí své původní B-lymfoidní znaky (především CD19, dále CD34, CD10 a další) a získávají znaky typické pro monocytární buňky (především CD33 a CD14). I přes výraznou fenotypickou změnu si tyto buňky ponechávají své Ig/TR přestavby. Populaci buněk, která si ještě ponechává znaky B linie, ale již získala znaky monocytární linie, nazýváme interpopulací, přeměněné atypické buňky monocytárního fenotypu nazýváme

monocytoidy. Tato fenotypická změna představuje především problém pro detekci MRN. Zatímco pomocí PCR, založeného na detekci konkrétních Ig/TR přestaveb, jsou tyto buňky stále jednoduše detekovatelné, pomocí průtokové cytometrie, která je založená na detekci pomocí imunofenotypu je tato diagnostika obtížná a mezi oběma metodami dochází k výrazné diskrepanci. V současně používaných protokolech je hodnota MRN zásadním kritériem pro stratifikaci pacientů do různých rizikových ramen. Podcenění MRN pomocí průtokové cytometrie tak představuje zásadní problém, při němž může dojít k chybné stratifikaci pacienta do ramene s nižší intenzitou léčby a pozdějšímu relapsu jeho onemocnění. Rozpoznání znaků odlišujících zdravé monocytární buňky od monocytoidů je proto klíčové. Genetický podklad vedoucí ke spontánnímu přesmyku do monocytární linie nebyl doposud popsán. Většina těchto leukémií však byla popsána ve skupině spadající do B other (bez známé genetické aberace). Podobný jev se v poslední době začal objevovat po zařazení imunoterapie do léčby akutních leukémií, především po použití bispecifické protilátky proti znaku CD19 – blinatumomabu. Po tomto léku byly popsány jak izolované ztráty antigenu CD19<sup>12</sup> s ponecháním ostatních lymfoidních znaků (CD22, iCD79, CD34), tak i případy přesmyku do monocytární linie<sup>20,21</sup>.

#### 1.4 Detekce minimální reziduální nemoci u ALL

Moment, kdy nemoc není detekovatelná pomocí světelného mikroskopu, hodnotíme jako dosažení kompletní remise. Možnosti detekce leukemických buněk pomocí světelného mikroskopu jsou ovšem limitované a senzitivita této metody se pohybuje mezi 1-5%. I pod touto hladinou se ale v těle pacienta může nacházet velké množství leukemických buněk, které mohou vést k relapsu onemocnění. Proto je přítomnost leukemických buněk v těle pacienta, především v kostní dřeni, monitorována pomocí citlivějších metod, které dosahují v běžné praxi citlivosti 0,1 % - 0,001 %. Hovoříme pak o MRN<sup>7,22</sup>. V České republice léčíme pacienty pomocí protokolů BFM (Berlin-Munich-Frankfurt). První protokoly této skupiny vznikly v 60. letech v Berlíně a postupně se k nim přidala další německá města. Nyní se pomocí BFM protokolů léčí nejen ve velké části evropských zemí, ale také například i Izraeli, části Austrálie či státech Jižní Ameriky. Protokoly prošly značným vývojem, z počátku byla MRN pouze vědeckou otázkou, nyní již se standartní součástí protokolů. V současně používaném protokolu AIEOP BFM 2017 hodnotíme MRN v den 8 léčby v periferní krvi a dále v kostní dřeni – v den 15, v timepoint 1 (TP1, časový bod 33 dní od zahájení léčby) a TP2 (časový bod 12

týdnů od zahájení léčby) a případně dalších časových bodech. Od dříve vyšetřované kostní dřeně v den 8 od zahájení léčby se již ustoupilo. Hladina MRN je pak hlavním faktorem pro stratifikaci pacientů do jednotlivých rizikových ramen – standardního, středního a vysokého rizika. U pacientů s dobrou odpovědí dochází k redukci intenzity chemoterapie a naopak pacienty s vysokými hladinami MRN stratifikujeme do vysokého rizika a dostávají intenzivnější bloky chemoterapie a část je indikována k transplantaci kostní dřeně v první remisi onemocnění. V současné době jsou využívány především dvě metody – průtoková cytometrie, založená na specifickém fenotypu leukemických buněk, a metoda PCR, která sleduje Ig/TR přestavby specifické pro daný leukemický klon. V den 15 léčby průtoková cytometrie rozděluje pacienty dle jejich odpovědi v kostní dřeni do tří rizikových skupin. Pacienti s < 0,1% řadíme do standardního rizika, pacienty s MRN 0,1 – 10 % řadíme do středního a pacienty s více než 10 % leukemických buněk do vysokého rizika. Výhoda průtokové cytometrie spočívá především v její rychlosti a je méně ekonomicky náročná než metoda PCR. Je proto v řadě zemí průtoková cytometrie využívána pro hodnocení MRN po celou dobu léčby pacienta. V prvních dnech léčby, kdy je regenerace kostní dřeně utlumena z důvodu intenzivní chemoterapie, lze detekovat nezralé leukemické buňky většinou bez větších obtíží. Problém nastává u pozdějších časových bodů, kdy se leukemické buňky mohou fenotypově překrývat se zdravými regenerujícími buňkami. Proto je důležitá detekce takzvaných aberantních znaků – znaků, které na fyziologických progenitorech nejsou přítomny.

Detekce MRN pomocí Ig/TR využívá specifických klonálních přestaveb genů pro imunoglobuliny (Ig) a T buněčné receptory (TR). Na základě specifických přestaveb v těchto genech u klonální leukemické buňky jsou nejprve navrženy specifické primery. Pomocí primerů je poté hladina MRN detekovaná metodou real time quantitative PCR (RQ PCR). Touto metodou jsme schopni detekovat leukemické buňky i ve velmi nízkých hladinách MRN a to i v situacích, kdy je již plně obnovena regenerace kostní dřeně. Nevýhodou je především ekonomická a časová náročnost. Navržení a optimalizace primerů trvá několik týdnů. Z tohoto důvodu je výhodné kombinovat obě metody. Průtoková cytometrie je nezastupitelná v časných časových bodech, kdy metoda PCR není k dispozici a naopak metoda PCR je přesnější a senzitivnější v pozdějších časových bodech nebo u pacientů, kde se nepodaří identifikovat vhodné Ig/TR cíle<sup>23</sup>.

Stratifikace pediatrických pacientů je založena na MRN měřené v kostní dřeni. Atypické buňky lze detekovat i v periferní krvi, ale jejich hladina bývá řádově nižší, především u BCP ALL<sup>24</sup>. Pro přesné hodnocení hladiny MRN je proto důležité stanovovat ji v aspirátu kostní dřeně, který není naředěný periferní krví. Při větším naředění kostní dřeně může dojít k podcenění hladiny MRN a k chybnému zařazení pacienta do ramene s nižším rizikem. Většina metod pro určení kvality aspirátu kostní dřeně je založena na přítomnosti nezralých prekurzorů krvetvorných buněk<sup>25-27</sup>. Problém tohoto přístupu nastává u kostních dřeni ovlivněných antileukemickou léčbou. Tyto aspiráty dřeně bývají často, především v den 15, hypoplastické s absencí regenerace a tedy i prekurzorů. Se stejným problémem se setkáváme i u jiných onemocnění, jako jsou selhání kostní dřeně. U těchto specifických situací je hodnocení kvality aspirátu obtížné a je třeba najít nové přístupy, jak u nich kvalitu hodnotit.

## 2 Cíle

---

### 2.1 Leukémie z buněk z nejasné linie

Jaká je optimální léčba pro pacienty s akutní leukémií z buněk nejasné linie? Lze vytvořit algoritmus určující jaký typ léčby zvolit u dané leukémie?

### 2.2 Leukémie s časným přesmykem do monocytární linie

Jak častý je fenomén přesmyku do monocytární linie? Lze u těchto pacientů najít společné genetické pozadí? Jaká je dynamika jednotlivých znaků B a myeloidní linie? Lze nalézt vzorce jednotlivých změn exprese?

### 2.3 Léčba relapsu akutní lymfoblastické leukémie pomocí daratumumabu

Jaká je efektivita léčby pacientů s relapsem ALL pomocí monoklonální protilátky daratumumabu? Dochází zde k plasticitě leukemických buněk a ztráty cílové molekuly jako tomu vidíme po použití blinatumomabu u léčby BCP ALL?

### 2.4 Význam měření minimální reziduální nemoci v den 8 v kostní dřeni

Je hodnocení MRN v den 8 v kostní dřeni prognosticky relevantní? Lze jej nahradit časovými body, které jsou v současnosti součástí protokolu?

### 2.5 Určení kvality aspirátu kostní dřene

Lze vytvořit nový způsob určování kvality aspirátu kostní dřene, který je nezávislý na progenitorech?



## 3 Metody

---

### 3.1 Průtoková cytometrie

#### 3.1.1 Konvenční průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie je v hematologii/imunologii především imunofenotypizační metoda, která pomocí monoklonálních protilátek konjugovaných s fluorochromem hodnotí přítomnost proteinu na úrovni buňky. Touto metodou lze rychle měřit velké množství buněk, metoda má tudíž široké využití - od rutinní diagnostiky po výzkumné účely. Buňky nacházející se ve stavu suspenze jsou inkubovány s fluorescenčně značenými protilátkami a při přítomnosti daného proteinu na povrchu nebo uvnitř buňky dojde k vazbě antigen – protilátka. Po následném promytí je vzorek měřen na průtokovém cytometru, kde je po excitaci laserovým paprskem emitován světelný signál o vlnové délce specifické pro použitý fluorochrom. Tento signál je následně přeměněn na elektronický záznam, který je možné analyzovat. Počet změřených parametrů v jednom vzorku závisí na vybavení jednotlivých cytometrů, hlavní limitací však zůstává překryv emisních spekter jednotlivých fluorochromů. Na novějších přístrojích se v běžné praxi měří až 12 znaků najednou. Průtokovou cytometrii lze i využít pro hodnocení buněčného cyklu, případně i aneuploidie.

Průtoková cytometrie je základní metodou většiny popsaných prací – zařazení leukémií do skupiny leukémií z nejasné linie, určení přesmyku do monocytární linie, hodnocení minimální reziduální nemoci, určení imunofenotypových změn po použití imunoterapie, či pro hodnocení jednotlivých populací při posuzování naředění aspirátu kostní dřeně. Bližší použití této metody a jednotlivé panely jsou uvedeny u jednotlivých výsledků a v přílohách.

#### 3.1.2 Spektrální cytometrie

Problematiku překryvu emisních spekter fluorochromů lze částečně vyřešit při použití hyperspektrálního cytometru. Tento druh cytometru detekuje celé emisní spektrum analyzovaného vzorku (tedy smíšený signál z více fluorochromů najednou) pomocí multi-anodového fotomultiplikátoru. Pro každou buňku tak vzniká vlastní spektrální profil. Tato metoda umožňuje využití více znaků než v konvenční cytometrii. Metodu jsem využila pro experimenty k výpočtu naředění aspirátu kostní dřeně.

## 3.2 Hmotnostní cytometrie

Změření vyššího počtu parametrů simultánně pomocí průtokové cytometrie je limitováno především překryvem emisních spekter fluorescenčních protilátek, dále počtem laserů a detektorů jednotlivých cytometrů. Hmotnostní cytometrie kombinuje monoklonální protilátky s izotopy purifikovaných těžkých kovů, což umožňuje výrazně zvýšit počet simultánně měřených parametrů (teoreticky lze měřit až 100 parametrů současně, v běžné praxi se využívají až 40 znakové panely). Jednotlivé buňky označené těmito protilátkami jsou následně vaporizované a atomy na nich navázaných kovů ionizované pomocí argonové plasmy. Signály kovů jsou poté analyzované pomocí principu hmotnostní spektrometrie s průletovým analyzátozem.

Vzhledem k vysokým nárokům na materiál a dlouhé době samotného měření a finanční náročnosti tato metoda není vhodná pro rutinní diagnostické měření a využívá se především pro výzkumné účely.

Pro detailní popsání přesmyku z B-lymfoidní do monocytární linie jsme vytvořila dva panely (včetně konjugace a titrace řady protilátek) – první pouze s povrchovými znaky a druhý včetně intracelulárních znaků. Panely detekují současně vývojové znaky monocytární a B-lymfocytární linie, včetně transkripčních faktorů *PAX5* a *PU.1*. Těmito panely jsem změřila jak vzorky pacientů s přesmykem do monocytární linie, tak BCP ALL bez přesmyku a vzorky zdravých kontrol. Vzorky byly měřeny na CyTOF 2, od roku 2018 poté na CyTOF Helios. Panely blíže popisujeme v příloze 3.

## 3.3 Metody analýzy multidimenzionální dat

### 3.3.1 Vaevictis

Vaevictis je volně dostupný (open access) deep-learning algoritmus vytvořený pro redukci multidimenzionálních dat (<https://github.com/stuchly/vaevictis#vaevictis---this-is-a-playground>). Tato metoda vychází z dvou jiných algoritmů – *ivis*<sup>28</sup> a *scvis*<sup>29</sup>. Algoritmus *vaevictis* klastruje buňky k sobě na základě podobnosti proteinového profilu, navíc respektuje příbuznost jednotlivých populací a buňky s podobným profilem zobrazuje následně blíže k sobě než buňky s odlišným proteinovým profilem.

Algoritmus jsem využila při analýze dat získaných pomocí hmotnostní cytometrie. Všechny změřené buňky z více vzorků byly analyzovány společně a na základě podobnosti exprese jednotlivých znaků byl určen jejich vztah.

### 3.3.2 Tviblindi

Tviblindi je nový deep-learning algoritmus (<https://github.com/stuchly/tviblindi>), který lze využít k určení vývoje jednotlivých buněčných populací. Po určení počátku vývoje (tedy například skupiny buněk s nejméně zralým fenotypem) následně algoritmus určí její nejbližší sousedy (50 sousedů pro každou buňku) na základě podobnosti proteinového profilu v mnohorozměrném prostoru. Ke každému z těchto nejbližších sousedů určí na základě stejného principu další sousedy, až analýza dospěje k buňce, která nemá dalšího souseda (například zralá forma buňky) a tímto se utvoří konec dané trajektorie. Algoritmus tviblindi určí z daného počátku okolo 5 000 trajektorií. Při následné analýze jsou poté z těchto trajektorií interpretované cesty popisující vývoj dané buněčné populace. Vývoj lze následně sledovat pomocí tzv. pseudočasové osy, na kterém lze pozorovat změny exprese jednotlivých znaků při vývoji.

Algoritmus jsem využila pro určení vývoje buněk v rámci leukémií s monocytárním přesmykem. Blasty z diagnózy a z časových bodů z průběhu léčby byly analyzovány společně. Diagnostické blasty s původních B-lymfoidním fenotypem byly označeny jako počátek dráhy.

## 3.4 Genetické metody

### 3.4.1 Molekulárně genetické metody pro měření MRN – RQ PCR a NGS

Pro určení hladiny MRN se využívá specifických přestaveb v genech pro imunoglobuliny a T-buněčné receptory (Ig/TR). Pro RQ PCR (quantitative polymerase chain reaction) je nejprve nutné navrhnout specifické primery pro daný leukemický klon, tedy tento proces optimalizovat pro každého pacienta zvlášť. Tyto přestavby jsou poté využívány k monitoraci hladiny MRN a metoda běžně dosahuje citlivost  $10^{-4} - 10^{-5}$ <sup>30</sup>. Next generation sequencing (NGS) umožňuje měření všech přestaveb daného typu najednou a měření umožňuje vyšší specifitu v porovnání s RQ PCR<sup>31</sup>. Měření MRN pomocí genetických metod bylo používáno pro porovnání míry shody s MRN pomocí průtokové cytometrie u leukémií s přesmykem do monocytární linie a kontrolních BCP ALL

### 3.4.2 Sekvenování RNA a další genetické metody

Sekvenování RNA (RNA sequencing, RNAseq), whole exon sequencing (WES), single nucleotide polymorphism (SNParray) bylo provedeno podle dříve publikovaných dat<sup>32</sup>.

Jednou z nejzásadnějších metod bylo RNAseq. Data z RNAseq byla využita k určení jednotlivých subtypů v rámci BCP ALL (*DUX4r*, *PAX5-P80R*, *ZNRF384r* a další) na základě jejich expresních profilů. Metoda byla dále využita k vytipování vhodných znaků k určení rozdílu mezi zdravými monocyty a monocytoidy (které vznikly při přesmyku so monocytární linie). Tyto znaky byly následně měřeny pomocí průtokové cytometrie. Dále jsme tuto metodu využili při určení exprese CD38 u pacienta po použití daratumumabu.

Podrobné využití dalších genetických metod je uvedeno v jednotlivých přílohách.

### 3.5 Statistické metody

Jednotlivé statistické metody jsou popsány v přílohách. Statistické analýzy byly provedeny v programu GraphPad a StatView verze 5.0. Výsledky byly považovány za signifikantní při  $p = 0,05$ .

## 4 Výsledky

---

### 4.1 Optimalizace a vytvoření algoritmu pro léčbu ALAL

#### 4.1.1 Studie iBFM-AMBI2012

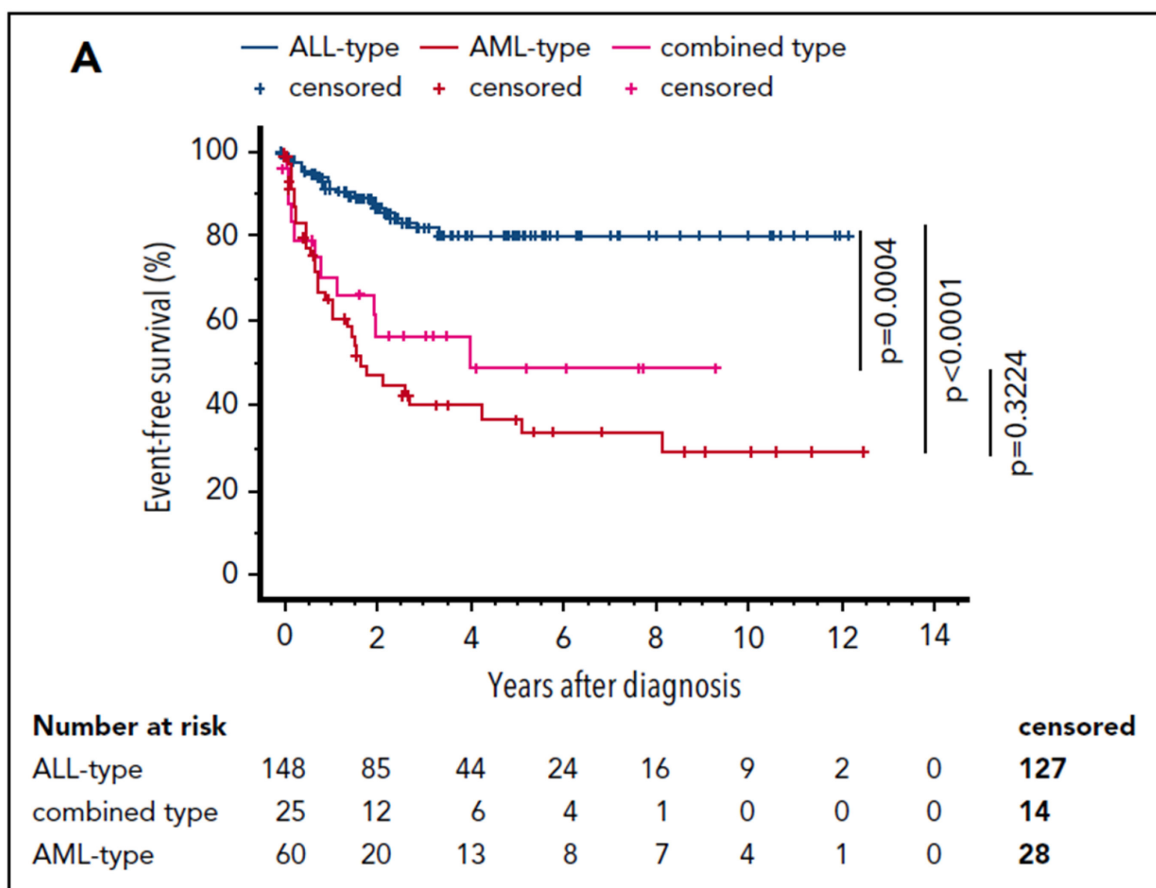
I přes snahy vylepšit definici akutních leukémií z buněk nejasného původu (ALAL), doposud chyběla doporučení jaký protokol zvolit pro jejich léčbu. Jeden z hlavních důvodů bylo především to, o jak vzácné onemocnění se jedná. Například v České republice je u dětí ročně diagnostikováno okolo 3-5 případů ALAL a k jejich léčbě se využívali jak protokoly pro ALL a AML, tak i kombinovaný protokol Interfant, původně vytvořený pro kojenecké leukémie. Na takto omezeném počtu pacientů lze jen stěží provést statistické výpočty a vytvořit validní algoritmus léčby.

Z tohoto důvodu jsme vytvořili mezinárodní studii iBFM-AMBI2012, jejíž výsledky shrnuje v **příloze 1** (*Blood*, 2018<sup>33</sup>). Této retrospektivní studii se zúčastnilo 18 center a celkem bylo registrováno 274 dětí léčených mezi lety 2002 - 2015, z nichž 233 splnilo vstupní kritéria (věk 0 - 18, leukémie splňující kritéria ALAL dle kritérií EGIL nebo/a WHO, pacienti bez genetického onemocnění predisponujícího k leukémiím, pacienti se známou informací o typu zvoleného léčebného protokolu). Jedná se dosud o největší publikovanou kohortu dětských pacientů s tímto typem leukémie.

Mezi sledované parametry patřil biologický charakter leukémie jako je imunofenotyp dané leukémie, její případné genetické fúze a typ ALAL (bilineární, bifenotypický či nediferencovaný) a zvolený typ protokolu (ALL, AML či kombinovaný protokol). Hlavní otázkou byl vliv zvoleného protokolu na výsledek léčby, tedy přežití jednotlivých pacientů v čase bez další události (úmrť, sekundární malignita či relaps onemocnění, EFS). Mezi další otázky patřilo zhodnocení benefitu transplantace, rozdíly v přežití dle typu protokolu mezi jednotlivými typy ALAL nebo dle odpovědi na prednison.

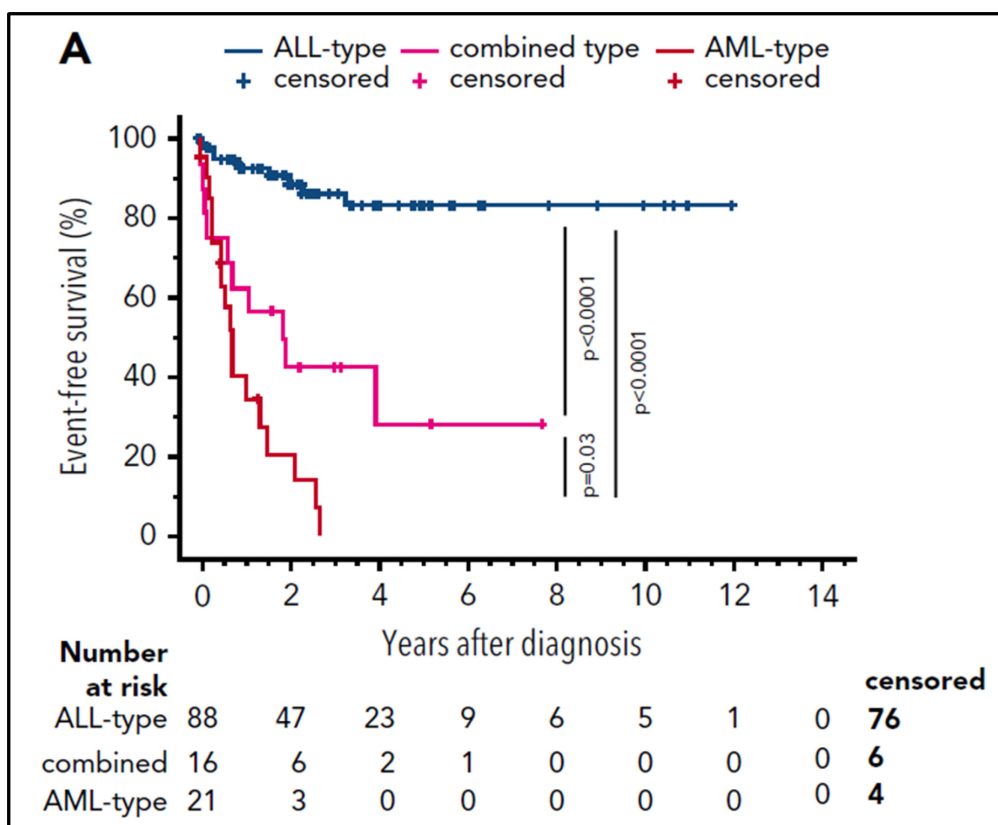
##### 4.1.1.1 Lepší přežití u pacientů léčených dle protokolu typu ALL

Pětileté přežití bez události bylo signifikantně lepší u pacientů s ALAL léčených dle protokolu typu ALL (EFS  $80 \pm 4$  %) oproti pacientům léčených dle protokolu AML (EFS  $36 \pm 7,2$  %) či kombinovaným protokolem ( $50 \pm 12$  %) (*Obr. 2*). Po vyřazení leukémií s fúzními geny typickými pro ALL či AML jsme se snažili určit parametr, který nejvíce odlišuje přežití dle zvoleného typu protokolu. Jako parametr s největším rozdílem v přežití byla určena



Obr. 2 Přežití bez události u pacientů s ALAL dle vybraného typu léčebného protokolu

positivita exprese znaku CD19 (znak typický pro B lymfocytární linii) na leukemických buňkách. U pacientů, jejichž leukemické buňky v diagnóze exprimovaly znak CD19 a byli léčeni dle protokolu typu ALL, bylo přežití bez události  $83 \pm 5,3 \%$  v porovnání s těmi, co byli léčeni dle protokolu typu AML ( $0\% \pm 0\%$ ) či dle kombinovaného protokolu ( $28 \pm 14\%$ ) (Obr. 3). Stejně tak bylo signifikantně výhodnější léčit dle protokolu typu ALL pacienty, jejichž leukemické buňky exprimovaly jiné lymfoidní znaky (CD7, intracelulární (i)CD3 nebo iCD79, iCD22 a CD10). Pacienti, jejichž leukemické buňky tyto znaky neexprimovaly, měli většinou nediferencovaný typ leukémie a jejich prognóza byla nepříznivá.



Obr. 3 Přežití u pacientů s ALAL s CD19 pozitivními blasty dle vybraného typu protokolu.

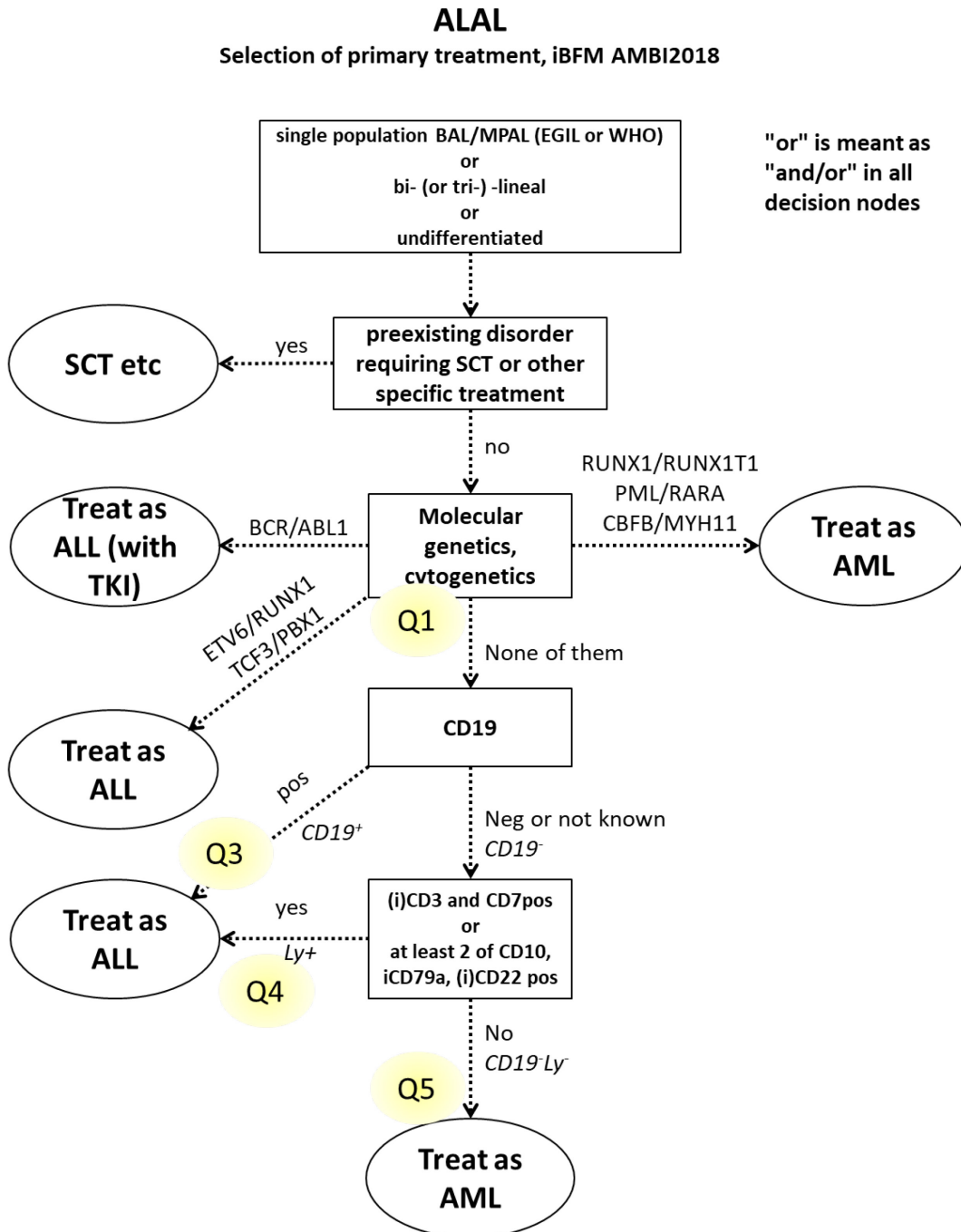
#### 4.1.1.2 Vliv transplantace a změny léčebného protokolu na přežití pacientů s ALAL

U 29 pacientů došlo ke změně vybraného typu protokolu v průběhu léčby. Hlavním důvodem byla špatná odpověď na původní protokol. Očekávatelně, přežití těchto pacientů bylo signifikantně horší než u pacientů, u nichž ke změně typu protokolu nedošlo. Dále jsme se zaměřili na potenciální benefit transplantace krvetvorných buněk. Transplantaci celkem podstoupilo 69 pacientů. Nenašli jsme žádný rozdíl v přežití u pacientů, kteří podstoupili, a kteří nepodstoupili transplantaci, a to ani mezi jednotlivými typy protokolů.

#### 4.1.2 Registr iBFM-AMBI2018

Dle našich výše popsaných výsledků jsme sestavili algoritmus pro léčbu pacientů s ALAL (Obr. 4). Dle tohoto algoritmu, lze pro pacienty s ALAL zvolit typ protokolu, na němž mají statisticky největší šanci na přežití bez události. Jestli se při používání našeho algoritmu zlepšila prognóza pacientů s ALAL je hlavní výzkumnou otázkou v prospektivním registru iBFM-AMBI2018.

Námi vytvořený algoritmus se nyní testuje prospektivně. Centra zapojená do registru iBMF-AMBI2018 léčí pacienty dle vytvořeného algoritmu a výsledky léčby se poté porovnají s předchozí studií iBFM-AMBI2012.

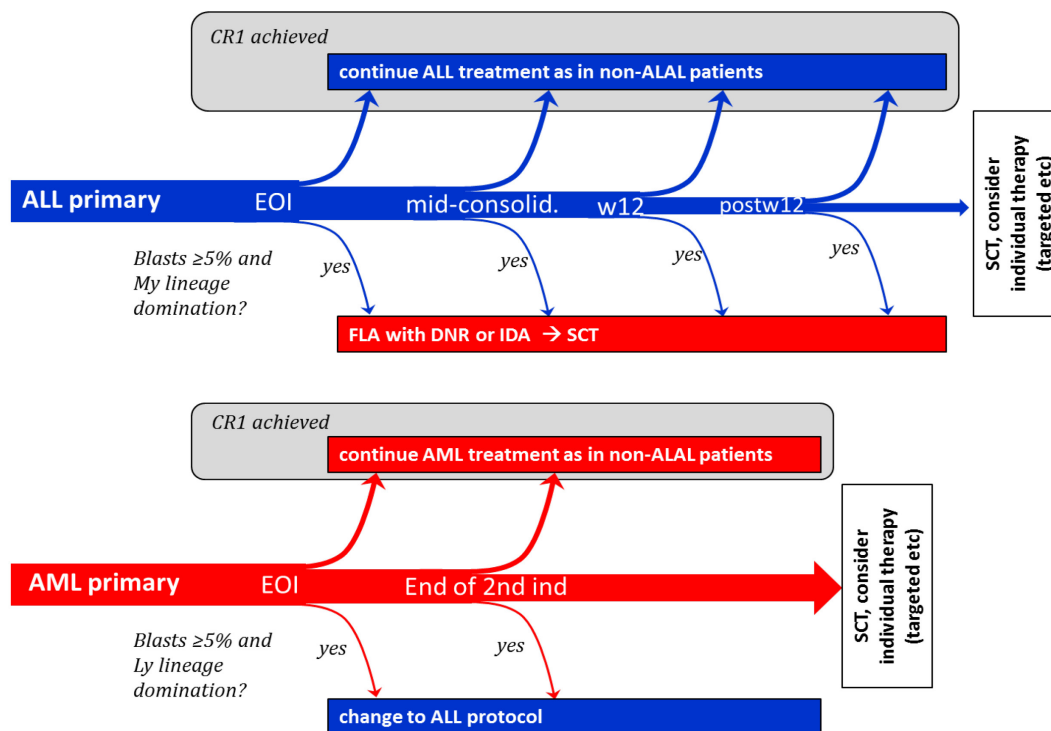


Obr. 4 Algoritmus určující vhodný léčebný protokol pro pacienty s ALAL

Kromě přesného algoritmu léčby jsme vytvořili algoritmus, kdy a jak změnit daný protokol a přiklonit se k léčebnému protokolu pro opačný druh leukémie (tedy



z protokolu typu ALL k protokolu typu AML a naopak, Obr. 5). Změny protokolu nejsou doporučované před ukončením indukční léčby. Po ukončení indukce jsou možné změny v protokolu, pokud v kostní dřeni pacienta nacházíme více než 5 % leukemických buněk a pokud se vyskytuje predominance znaků typických pro opačný typ leukémie než je primárně zvolený protokol.



Obr. 5 Pravidla pro změnu léčebného protokolu

#### 4.1.2.1 Rozšířené genetické vyšetření

U pacientů, u kterých se nezjistí fúzní gen či nesplní kritéria pro hyperdiploidii či hypodiploidii, plánujeme provést rozšířené genetické vyšetření. Většina genetických vyšetření bude probíhat v daných centrech. U center, která nejsou schopni daná genetická vyšetření zajistit, bude možnost provést vyšetření v našem laboratorním centru CLIP. Jedná se především o RNAseq, WES a SNParray.

#### 4.1.2.2 Drug response profiling

I pokud dojde k zlepšení výsledků léčby, nejsme schopni říci, jaké léky, a tedy i jaký typ protokolu, by měl nejlepší efekt na konkrétní leukémie. Na tuto otázku se nyní snaží zodpovědět takzvané „drug response profiling“ (DRP). Pomocí DRP jsme schopni otestovat léky na patientských leukemických buňkách in vitro a určit poté léky s největší účinností. Vzhledem finanční a především časové náročnosti nelze tento způsob aplikovat u všech pacientů, ale lze jej využít pro pacienty, kteří neodpovídají na primární léčbu.

Tento mechanismus nyní plánujeme použít i pro vybrané pacienty s ALAL, u kterých selže primární léčba.

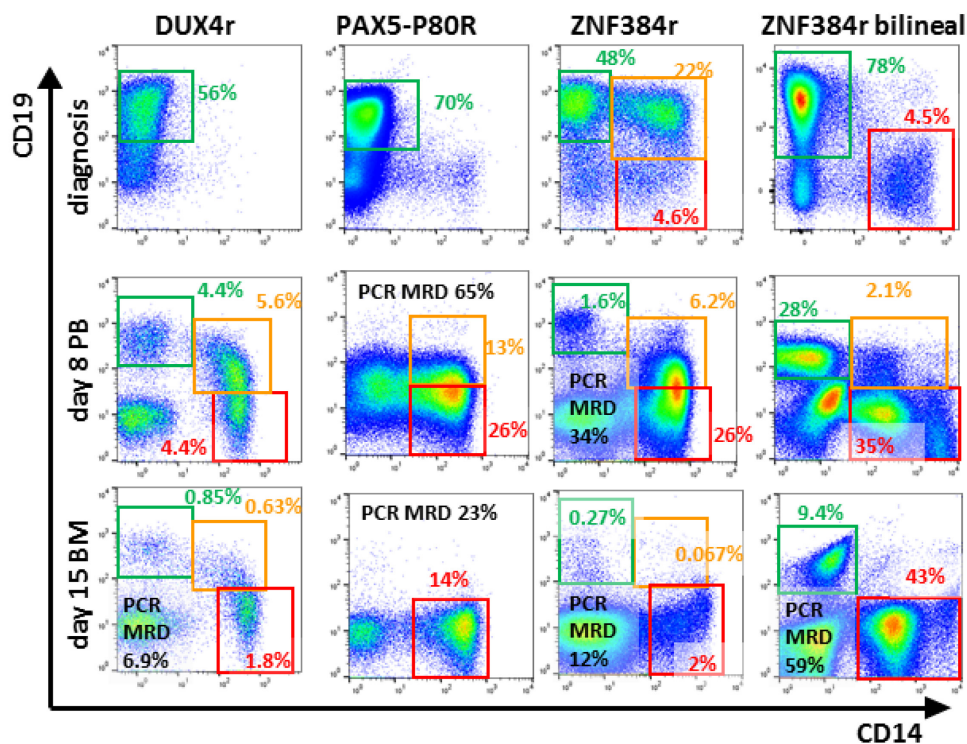
#### 4.1.3 Role žadatele na popsané publikaci a nové mezinárodní studii

V mezinárodní studii jsem se podílela na sběru a statistické analýze dat získaných retrospektivní studii iBFM AMBI-2012. Dále jsem vytvářela grafy a obrázky pro publikaci, podílela se na textu publikace. Dále jsem se podílela na vytváření nové prospektivní studie a jsem jednou z kontaktních osob pro získávání dat do databáze nových případů ALAL. Podílím se na cytometrickém hodnocení nových případů ALAL v České republice, jejich zařazení a ukládání do mezinárodní databáze.

## 4.2 Fenomén přesmyku do monocytární linie

Zabývala jsem se genetickým podkladem BCP ALL s časným přesmykem do monocytární linie. U většiny těchto leukémií nebyla nalezena žádná z nejčastějších genetických aberací a byly zařazeny do tzv. skupiny B other. Vzhledem k nově objeveným podskupinám v rámci B other byl náš cíl zjistit, jestli se leukémie s monocytárním přesmykem budou překrývat s některou z těchto nově objevených podskupin. Dále jsme se snažili o určení četnosti fenoménu a určení charakteristických fenotypových znaků u leukémií s monocytárním přesmykem již v diagnóze. Naše výsledky shrnuji v **příloze 2** (*Haematologica*, 2021<sup>34</sup>).

Sestavili jsme konsekutivní kohortu 726 pacientů s BCP ALL diagnostikovaných a léčených v období (od 9/2007 do 2/2019). Mezi těmito pacienty bylo 61 (8%) pacientů s leukémií s přesmykem do monocytární linie detekovaným pomocí průtokové cytometrie. Za použití RNAseq a WES jsme zjistili, že tyto leukémie se často vyskytují v rámci nově popsaných genetických skupin a to *DUX4r* (u 73% všech *DUX4r* leukémií nacházíme přesmyk do monocytární linie), *ZNF384r* (přesmyk u 40% všech *ZNF384r*) a *PAX5-P80R* (přesmyk u 100 % leukémií s touto aberací).

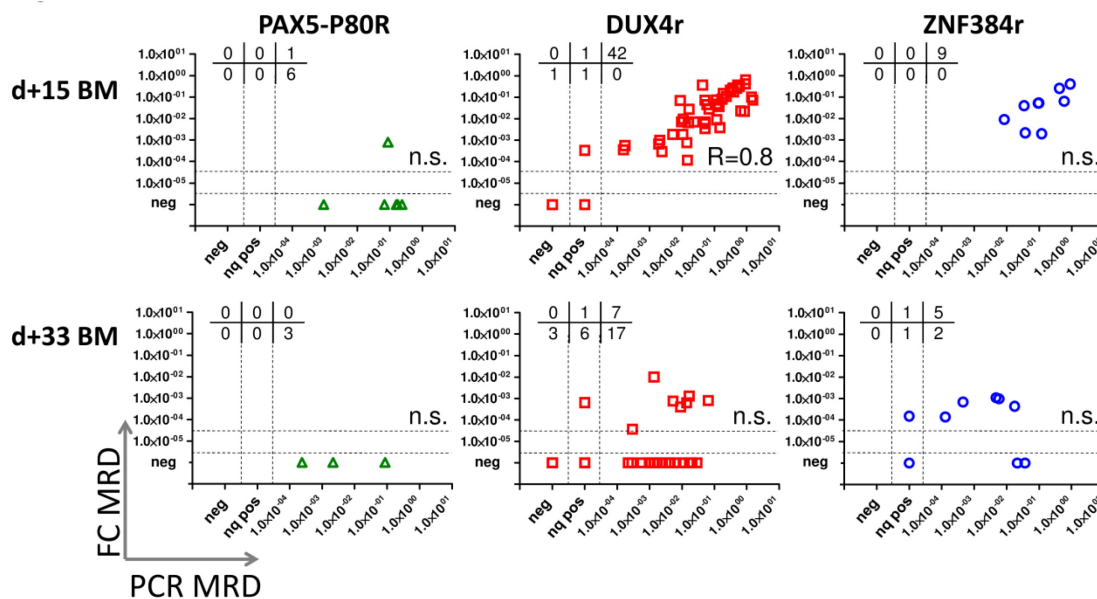


**Obr. 6** Ukázka přesmyku do monocytární linie u jednotlivých genetických subtypů. Obrázek ukazuje ztrátu CD19 a zvýšení exprese CD14 na blastech v průběhu léčby. U pacientů s PAX5-P80R dochází k přesmyku časněji. Pacienti se ZNF384r mají často již v diagnóze bifenotypický charakter

U těchto tří genetických skupin jsem se snažila o popsání a určení rozdílu v charakteru přesmyku mezi jednotlivými genetickými skupinami. U leukémií se ZNF384r mutací často nacházíme myeloidní znaky již v diagnóze a tyto leukémie byly často zařazeny jako ALAL. Leukémie s DUX4r aberací často exprimují v diagnóze znak CD371 (= CLL1, 100% DUX4r). Oba tyto podtypy si v den 15 léčby často uchovávají svůj původní B lymfoidní znak CD19 i když už koexprimují znaky monocytárních buněk, zejména CD33. Pro zachovalou expresi znaku CD19 lze v tento časový bod stále určit populaci atypických buněk v kostní dřeni. U leukémií s PAX5-P80R mutací dochází k přesmyku velmi časně a rychleji než u zbývajících subtypů (Obr. 6). V den 15 již nacházíme kompletní ztrátu původních B lymfoidních znaků a atypické buňky lze jen obtížně detekovat a odlišit od zdravých monocytárních buněk. Může tak dojít k výraznému podcenění MRN a chybné stratifikaci pacienta do ramene s méně intenzivní léčbou. U všech tří subtypů pak dochází k vyšší diskrepanci v den 33 léčby, kdy již nejsou B-lymfoidní znaky exprimovány a nejsou tak dle průtokové cytometrie detekovatelné (Obr. 7).

Osm z 80 pacientů s leukémií s monocytárním přesmykem relabovalo, šest z nich s fenotypem BCP ALL a zbylí dva pacienti s fenotypem monocytární AML. U těchto pacientů jsme prokázali identické Ig/TR přestavby s původním BCP ALL klonem.

Neprokázali jsme rozdíl v přežití bez události (EFS) mezi pacienty s monocytárním přesmykem a ostatními BCP ALL.



**Obr. 7** Pacienti s monocytárním přesmykem, diskrepance MRN v den 15 a den 33. U pacientů s PAX5-P80R mutací dohází k diskrepanci již v den 15, u ostatních subtypů je diskrepance nejvýraznější v den 33

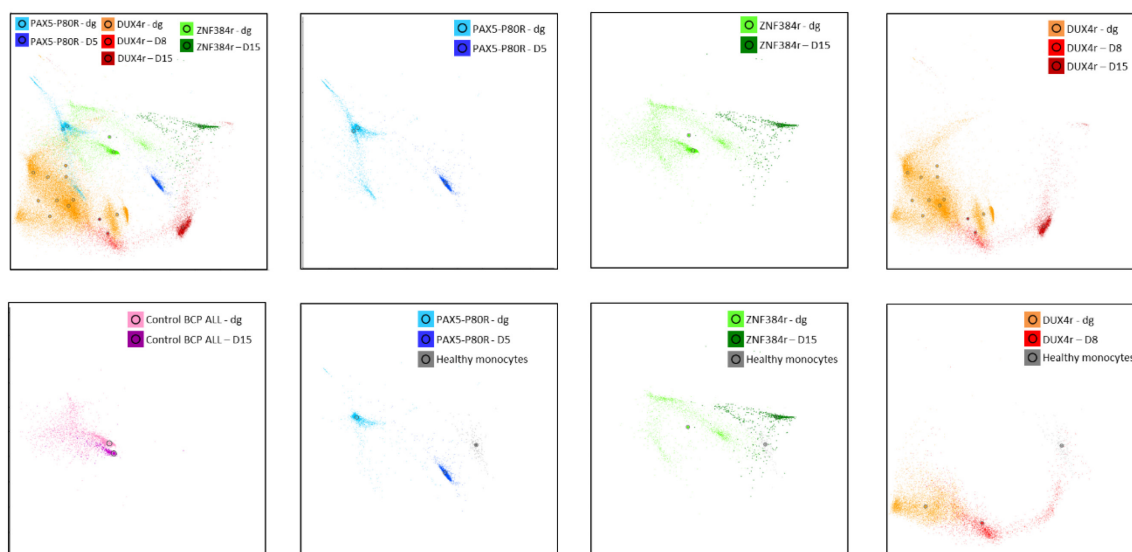
#### 4.2.1 Role žadatele na popsané publikaci

U této publikace jsem hodnotila přítomnost CD19+CD14+ interpopulace k určení přítomnosti přesmyku u 726 pacientů a tím určila četnost fenoménu v námi stanovené konsektivní kohortě. U pacientů s přesmykem a kontrolních leukémií jsem hodnotila MRN pomocí průtokové cytometrie, které jsem následně srovnávala s hodnotami MRN získanými dle Ig/TR přestaveb. Analyzovala jsem imunofenotyp leukémií v diagnóze pomocí hierarchického klastrování. Podílela jsem se na statistické analýze dat, vytvářela křivky přežití, obrázky pro publikaci a podílela se sepsiváním rukopisu.

#### 4.2.2 Využití hmotnostní cytometrie u leukémií s přesmykem do monocytární linie

Vybrané pacienty s leukémií s přesmykem do monocytární linie jsem změřila pomocí hmotnostní cytometrie (**příloha 3**, rukopis v přípravě). Spolu s vzorky leukémií s přesmykem (v době diagnózy i průběhu léčby) jsem změřila kontrolní BCP ALL a vzorky zdravých kostních dření a periferních krví. Vzorky byly měřeny pomocí 2 panelů - komplexnějšího povrchového a zjednodušeného intracelulárního, který byl doplněn o transkripční faktory *PU.1* a *PAX5*. Získaná data byla následně analyzována pomocí deep-learningových algoritmů Vaevictis a Tviblini.

#### 4.2.2.1 Analýza pacientů pomocí algoritmu vaevictis



**Obr. 8** Ukázka analýzy Vaevictis. Všechny buňky (včetně nemaligních populací) ze vzorků měřených pomocí intracelulárního panelu byly analyzovány dohromady. Buňky s podobným proteinovým profilem jsou klastrovány k sobě.

Pomocí algoritmu vaevictis jsem analyzovala všechny vzorky měřené stejným panelem naráz (včetně nemaligních populací). Na výsledném 2D plotu (Obr. 8) můžeme pozorovat oddělené jednotlivé nemaligní subpopulace od maligních blastů. Dle mnou změřených dat navíc můžeme pozorovat rozdíly mezi jednotlivými genetickými subtypy. Leukémie s *DUX4r* aberací klastrují k sobě, stejně tak pacienti s *PAX5-P80R*. U *DUX4r* pacientů tvoří jedinou výjimku pacient s duální expresí *PAX5* na jeho blastech. Nicméně se nám touto analýzou nepodařilo oddělit pacienty s *DUX4r* na základě toho, jestli později rozvinou monocytární přesmyk či nikoliv. Při analýze pacientů s *DUX4r* v průběhu přesmyku můžeme pozorovat kontinuální přechod buněk od původního fenotypu k buňkám monocytárního typu. Tyto výsledky potvrzují naši teorii, že se jedná o skutečný případ transdiferenciace a ne o selekci původní minoritní subpopulace s monocytárním fenotypem. Pacienti s *PAX5-P80R* tvoří dva klastry nacházející se v prostoru blízko sebe. Tyto klastry jsou rozděleny především na základě exprese CD34. Dle našich pozorování jsou vždy přítomné CD34<sup>pos</sup> i CD34<sup>neg</sup> blasty, ale jedna z populací je vždy dominantnější. Ačkoliv je vzorek v průběhu léčby pacienta s *PAX5-P80R* mutací odebrán pouze 5 dní po zahájení léčby, můžeme již pozorovat významný imunologický shift a buňky již neklastrují k původním buňkám odebraným v diagnóze. Pacient se *ZNF384r* se prezentuje velmi heterogenně již v diagnóze pro jeho hybridní fenotyp a část buněk se již v tento časový bod promítá k buňkám monocytárního fenotypu. Následný časový bod (den 15) již

postrádá úplně lymfoidní složku a promítají se do stejného prostoru jako nemaligní monocyty a nelze je pomocí měřeného panelu odlišit.

#### 4.2.2.2 Role transkripčních faktorů *PAX* a *PU.1* při přesmyku

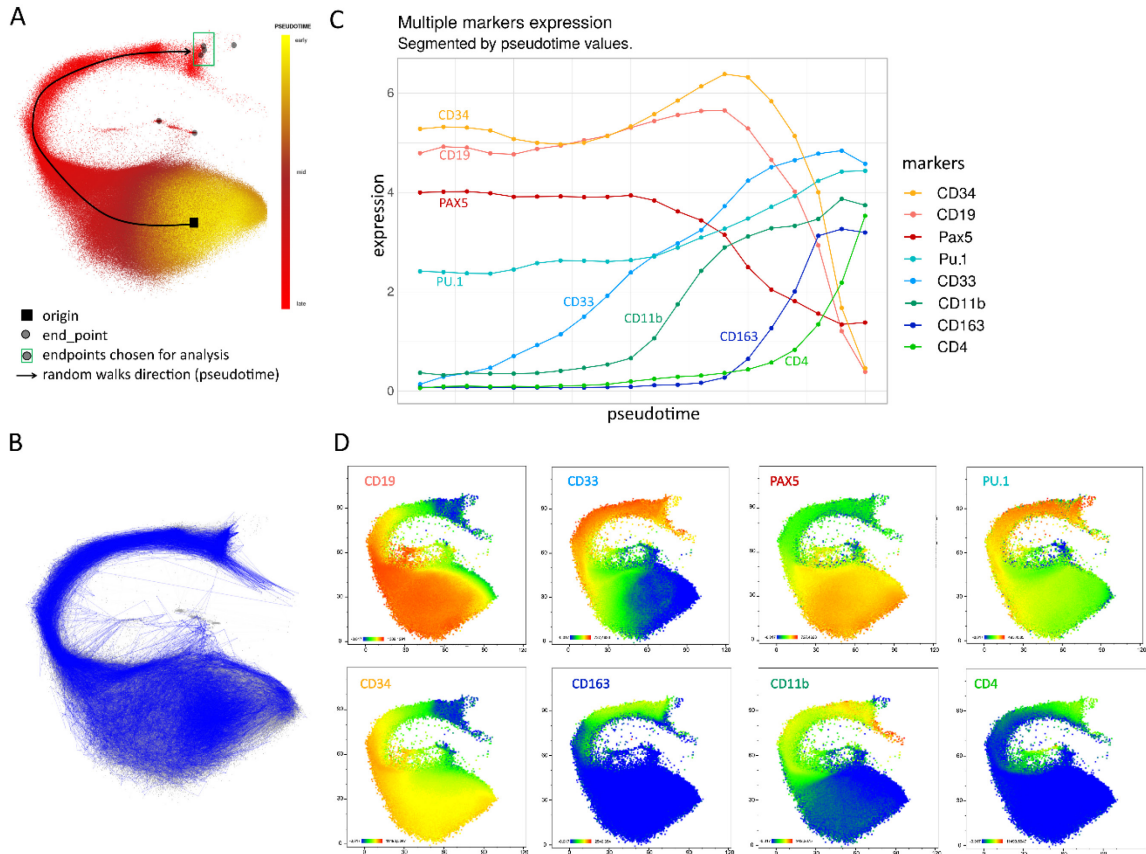
Transkripční faktory *PAX5* a *PU.1* hrají klíčovou roli ve vývoji krvetvorných buněk. Transkripční faktor *PAX5* je zásadní pro vývoj B-lymfocytů. Transkripční faktor *PU.1*, důležitý pro vývoj myeloidní linie, je pozitivně regulovaný pomocí genu *CEBP $\alpha$* , který je upregulovaný u leukémií s monocytárním přesmykem. Tyto dva faktory jsem proto zařadila do našeho panelu a měřila u leukémií s přesmykem a u kontrolních vzorků.

Median exprese (Median fluorescence intensity – MedFI) *PAX5* a *PU.1* v diagnóze se neliší mezi leukémiemi s přesmykem (n=9) a kontrolními leukémiemi bez přesmyku (n=10) (Pro *PAX5*: medián MedFI 128 vs 131 leukémie s přesmykem vs kontrolní leukémie, p=n.s. Mann-Whitney; pro *PU.1*: medián MedFI 33 vs 25 leukémie s přesmykem vs kontrolní leukémie; p=n.s. Mann-Whitney). U leukémií s přesmykem pozorujeme signifikantní pokles mediánu exprese *PAX5* ve vzorcích z průběhu léčby oproti diagnóze (Medián MedFI 128 vs 20, diagnóza vs v průběhu léčby, p=0.018, Mann-Whitney), U *PU.1* pozorujeme vzestup mediánu exprese (Medián MedFI 33 vs 97, diagnóza vs v průběhu léčby, p=n.s. Mann-Whitney), tento vzestup je ale nesignifikantní, pravděpodobně pro vysokou expresi *PU.1* u některých pacientů se swALL již v diagnóze (především u pacienta se *ZNF384r* s hybridním fenotypem) a nízký počet změřených vzorků. U pacientů bez přesmyku není rozdíl v expresi mezi diagnózu a vzorkem z průběhu léčby (*PAX5* medián MedFI 131 vs 122, p=n.s.; *PU.1* median MedFI 25 vs 28, p=n.s., Mann-Whitney).

Většina pacientů s monocytárním přesmykem měla v diagnóze blasty fenotypu *PAX5*<sup>pos</sup>*PU.1*<sup>dim</sup>. Výjimku tvořili dva pacienti. U jednoho pacienta s *DUX4r* leukémií jsem pozorovala duální expresi *PAX5* v diagnóze s 56% blasty fenotypu *PAX5*<sup>pos</sup> a 44% blastů *PAX5*<sup>neg</sup>. Oba fenotypy blastů se neodlišovali žádným jiným znakem. U pacienta se *ZNF384r* jsme pozorovali blasty fenotypu *PAX5*<sup>pos</sup>*PU.1*<sup>pos</sup> (44% všech blastů) a blasty *PAX5*<sup>neg</sup>*PU.1*<sup>pos</sup>. Blasty s fenotypem *PAX5*<sup>pos</sup>*PU.1*<sup>pos</sup> měli vyšší expresi B-lymfoidních znaků (*CD19*<sup>pos</sup>*CD34*<sup>pos</sup>) oproti blastům *PAX5*<sup>neg</sup>*PU.1*<sup>pos</sup> s více myeloidním fenotypem (*CD33*<sup>pos</sup>*CD11b*<sup>pos</sup>), ale stále přítomnou expresí *CD19*. MedFI<sup>*PAX5*</sup> a MedFI<sup>*PU.1*</sup> se signifikantně nelišili mezi jednotlivými genetickými subtypy (p=n.s., *Kruskal-Wallis*). Při přesmyku docházelo k snížení exprese *PAX5* a zvýšení exprese *PU.1* až k buňkám

PAX5<sup>neg</sup>PU.1<sup>pos</sup>. MedFI<sup>PAX5</sup> a MedFI<sup>PU.1</sup> u přesmyknutých monocytoidů se nelišila mezi jednotlivými genetickými subtypy ( $p=n.s.$ , *Kruskal-Wallis*).

#### 4.2.2.3 Transdiferenciace analyzovaná dle algoritmu tviblini



**Obr. 9** Ukázka analýzy pomocí algoritmu tviblini. A – označení počátku a vybraných konců. B – cesty vybrané pro analýzu. C – ukázka změny exprese jednotlivých znaků (osa y), pseudočas na ose x. Tímto způsobem lze určit posloupnost jednotlivých změn. D – ukázka pozitivitu vybraných znaků na 2D plotu. Modrá barva značí negativitu znaku, červená pozitivitu.

Pomocí algoritmu Tviblini jsem u leukemického přesmyku podrobně popsala proces transdiferenciace z B-lymfoidní do monocytární linie a popsala rozdíly mezi jednotlivými pacienty. U *DUX4r* (Obr. 9) dochází nejprve k zvýšení exprese CD33, poté následuje zvýšení CD11b, *PU.1* a až v závěru transdiferenciace ke zvýšení exprese monocytárních znaků CD14, CD4 a CD163. Vysoká exprese CD19 zůstává zachována i v době zvýšení exprese CD33 což vytváří interpopulaci s vysokou expresí CD19 i CD33. Změny exprese *PAX5* a *PU.1* nepředchází změnám exprese CD33 a CD19. U *PAX5-P80R* můžeme pozorovat změnu fenotypu dříve v porovnání s *DUX4r* leukémiemi a ke ztrátě CD19 začíná docházet velmi časně, ještě před zvýšením CD33, proto je výsledná interpopulace charakteristická již slabou expresí CD19 – CD19<sup>dim</sup>CD33<sup>pos</sup>. U *ZNF384r*

leukémie jsem pozorovala vysokou expresi *PU.1* již v diagnóze a oproti *DUX4r* pacientům jsme pozorovali velmi časně snížení exprese CD34.

#### 4.2.2.4 Role žadatele v popsané části práce (rukopis v přípravě)

V této práci vytvářela oba panely pro hmotnostní cytometrii, dále prováděla kompletní experimentální část práce (příprava vzorku pro měření na hmotnostním cytometru), včetně výběru vhodných pacientů pro potřeby rukopisu. Analyzovala jsem jak změřená data, tak analýzy vzniklé pomocí multidimenzionální redukce. Prováděla jsem veškerou statistickou analýzu, interpretaci dat a vytváření veškerých obrázků a grafů pro publikaci a vytvářela text připravované publikace.

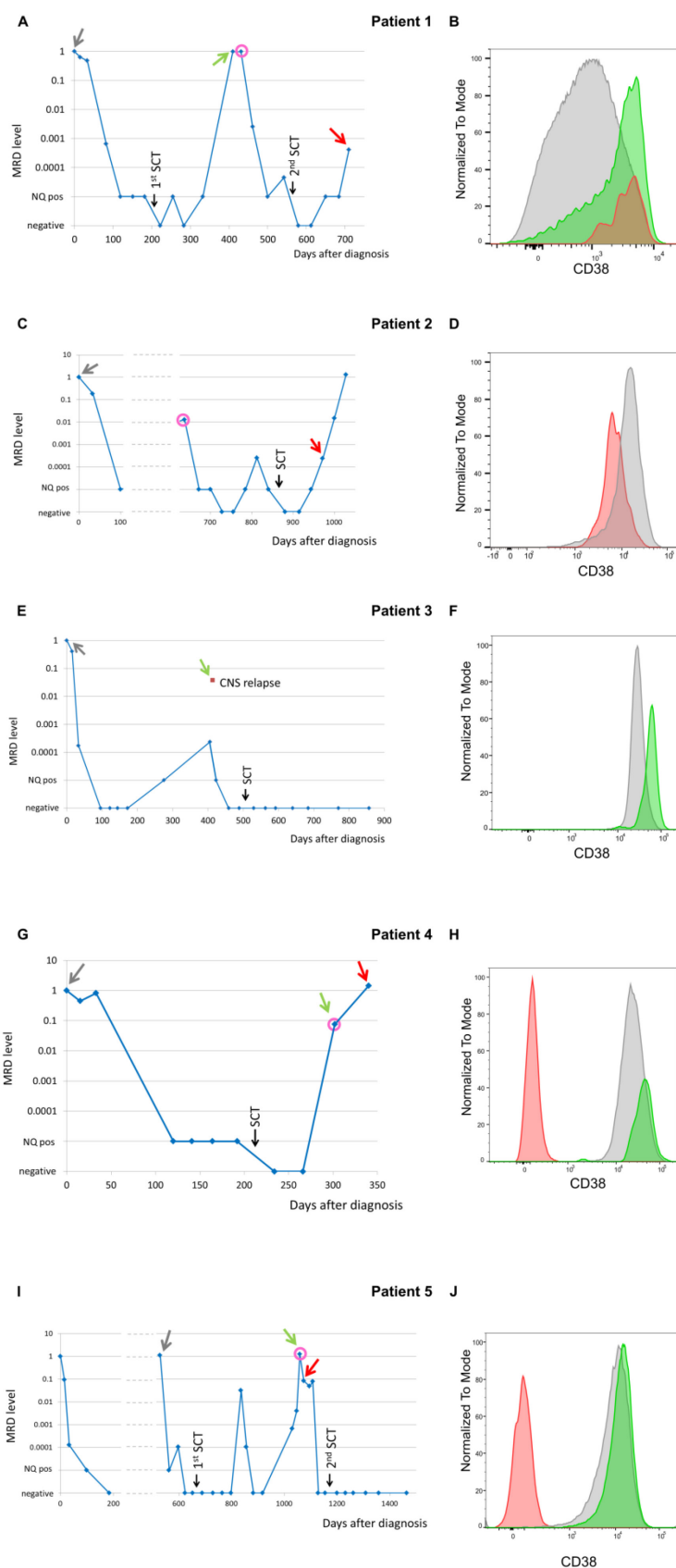
### 4.3 Použití daratumumabu u relabovaných ALL

I přes zlepšující se prognózu ALL, se přibližně u 15 % pacientů nemoc vrátí. Daratumumab je monoklonální kapa protilátka používaná především u mnohočetného myelomu, nyní experimentálně používaná pro relabující ALL<sup>11</sup>. Informace o efektivitě této léčby u ALL jsou ale nedostatečné. Výsledky léčby pomocí daratumumabu v našem centru jsou shrnuty v **příloze 4** (*Pediatric Blood & Cancer, 2022*<sup>35</sup>).

V našem centru jsme pomocí daratumumabu léčili celkem pět pacientů, 4 pacienty s relapsem T-ALL a jednoho pacienta s již druhým relapsem BCP ALL. Tento pacient byl již v prvním relapsu léčen pomocí blinatumomabu a následně rozvinul druhý relaps, kde došlo k úplné ztrátě exprese antigenu CD19. Dva pacienti byli vzhledem k toxicitě předchozí léčby či rozvoji relapsu krátce po transplantaci kostní dřeně léčení pouze monoterapií, zbylí tři pacienti dostávali daratumumab v kombinaci s chemoterapií. Všechny pacienty jsme v průběhu léčby monitorovali pomocí průtokové cytometrie a to jak jejich vlastní hladinu MRN, tak imunofenotypové změny v expresi CD38 po použití daratumumabu. U všech pacientů byla potvrzena exprese CD38 před zahájením léčby relapsu.

U třech pacientů (pacienti 1 - 3) došlo po léčbě daratumumabem (s chemoterapií či v monoterapii) k remisi onemocnění a pacienty bylo možné dovést k transplantaci kostní dřeně (*Obr. 10*). U dvou pacientů však s odstupem několika měsíců (pěti a sedmi) došlo k rozvoji relapsu onemocnění. U obou pacientů jsme prokázali v relapsu expresi antigenu CD38 na leukemických buňkách a oba následně nemoci bohužel podlehli. U posledního pacienta došlo na léčbě daratumumabem k remisi onemocnění a pacient nyní žije 15 měsíců od transplantace kostní dřeně.





**Obr. 10** A,C,E,G,I – hladina MRN pomocí Ig/TR u jednotlivých pacientů. Zahájení léčby daratumumabem je označeno v růžovém kolečku, jednotlivé šipky pak ukazují časové body, kdy se hodnotila exprese CD38; B,D,F,H,J – histogram ukazující expresi CD38 pomocí monoklonálních protilátek proti CD38 (klon HIT2, T16) pomocí průtokové cytometrie, barva histogramu odpovídá barvě šipky na grafu s MRN.

U zbylých dvou pacientů (pacienti 4 a 5) k remisi onemocnění na léčbě daratumumabem nedošlo a blasty byly stále detekovatelné. U pacienta 4 leukémie na léčbě daratumumabem progredovala a pacient zemřel časně po zjištění relapsu. U pacienta 5 (pacient s CD19 negativním relapsem BCP ALL po předchozí léčbě blinatumomabem), došlo ke snížení leukemické nálože, nicméně pacient nedosáhl na léčbě remise. Pro nedostatečnou odpověď byla léčba daratumumabem přerušena a pacient zahájil léčbu pomocí inotuzumab ozogamicinu (protilátka proti CD22 v kombinaci s cytostatikem kalicheamicinem), na které dosáhl remise onemocnění a nyní žije v třetí remisi po druhé transplantaci kostní dřeně.

Monitorace exprese CD38 po zahájení léčby daratumumabem je zásadní, neboť ztráta či snížení exprese na maligních buňkách je asociovaná s rezistencí na léčbu<sup>36</sup>. Tato monitorace je však komplikovaná navázáním daratumumabu na stejný epitop molekuly CD38, na který se váží standardně používané monoklonální protilátky pro CD38. I v našem případě jsme u pacienta 4 a 5 nebyli schopni detekovat povrchovou expresi CD38 pomocí standardních monoklonálních protilátek proti CD38 (klon HIT2 a T16), a to velmi časně od zahájení léčby (v den 38 od zahájení u pacienta 4 a v den 15 u pacienta 5). Tuto překážku můžeme obejít použitím polyklonální multi-epitopové protilátky. Část protilátek sice sdílí vazebné místo s daratumumabem, ale část se váže na jiné epitopy. Exprese CD38 je tak detekovatelná i po použití daratumumabu, jen s nižší silou exprese.

Pro potvrzení této teorie jsem vyšetřila zamražené buňky pacienta 4 ze dne 38 léčby relapsu (tedy v časovém bodě s již nedetekovatelnou CD38 monoklonálními protilátkami), kde jsme prokázali jak přítomnost CD38 na úrovni mRNA, tak její expresi intracelulárně. Nález kapa řetězce na blastech T-lymfoblastického původu dokazuje, že daratumumab (tvořený kapa řetězcem), je stále navázaný na leukemických buňkách. Při vyšetření těchto buněk pomocí polyklonální protilátky CYT-38F2 jsem na buňkách prokázala jasně pozitivní expresi, však s nižší intenzitou v porovnání s expresí před zahájením léčby.

Pro zjištění, jak rychle dojde ke ztrátě exprese CD38 pomocí monoklonální protilátek jsem změřila vzorek běžné BCP ALL v diagnóze s leukemickými blasty CD38 pozitivními a kapa negativními. Tyto buňky jsem nechala inkubovat s daratumumabem a poté znovu změřila pomocí průtokové cytometrie. Po této inkubaci jsem na blastech

detekovala kapa řetězec a exprese pomocí monoklonální protilátky proti CD38 (klon T16) nebyla detekovatelná.

Časná detekce negativity povrchové CD38 na blastech tedy neindikuje ztrátu proteinu a selhání léčby pomocí tohoto léku je způsobeno jiným mechanismem než je ztráta cílové molekuly. Tento fenomén lze obejít použitím speciálních multi-epitopových protilátek, které se váží i na jiná vazebná místa. Při použití konvenčních monoklonálních protilátek je třeba mít tento fenomén na paměti, aby nedošlo k předčasné změně či ukončení léčby daratumumabem. Problém nastává u měření intenzity exprese, neboť po použití polyklonální protilátky může dojít k jejímu snížení, neboť část protilátek, která se váže na stejné vazebné místo jako daratumumab, se po léčbě nenaváže. Ztrátu detekovatelnosti je třeba zohlednit i v interpretaci zejména MRN u BCP ALL, neboť „negativita“ CD38 na fyziologických B prekurzorech by mohla být mylně interpretována jako důkaz leukemického původu.

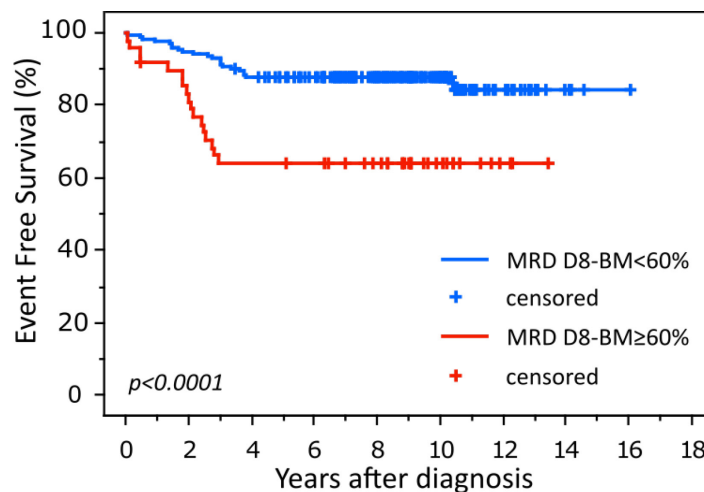
#### 4.4 Hodnocení MRN u pacientů s ALL v den 8 od zahájení léčby v kostní dřeni

Časná odpověď na léčbu je všeobecně uznávaný prognostický znak. V mezinárodních BFM protokolech, používaných i v České republice, tvoří první týden léčby pouze perorální kortikosteroidy a intrathékální methotrexát. Ke zjištění odpovědi v den 8 od zahájení léčby se používá periferní krev (PK). Odpověď na kortikoidy tedy nezohledňuje možné nerovnoměrnou odpověď v kostní dřeni (KD) a PK a odpověď v KD takto časně na léčbě po použití pouze systémových kortikosteroidů nebyla dosud popsána. Naše výsledky jsou shrnuty v **příloze 5** (*Leukemia & Lymphoma*, 2021)

V letech 11/2002 až 11/2007 byla výzkumně měřena KD v den 8 u 290 pacientů léčených dle protokolů EsPhALL a ALL-IC BFM 2002. Tyto data jsem následně retrospektivně hodnotila.

Medián zastoupení blastů v KD byl 24%. Nejistili jsme rozdíl v zastoupení blastů mezi BCP a T ALL, ale prokázali jsme rozdílnou infiltraci blasty mezi jednotlivými subtypy BCP ALL s nejhorší odpovědí u pacientů s *BCR-ABL1*. U některých pacientů s BCP ALL jsme našli vysokou diskrepanci mezi poměrem blastů s KD a PK. Pacienty s počtem blastů v KD  $\geq 10\%$  a vyšším počtem blastů v KD oproti PK aspoň o dva řády jsme označili jako nejvíce diskrepanční (celkem 37/263 pacientů). Tento jev byl signifikantně častěji pozorován u pacientů s hyperdiploidním typem leukémie (celkem u 34% těchto pacientů). Prokázali jsme, že infiltrace blasty v D8 KD je prognosticky významná. Pacienti s MRN  $\geq$

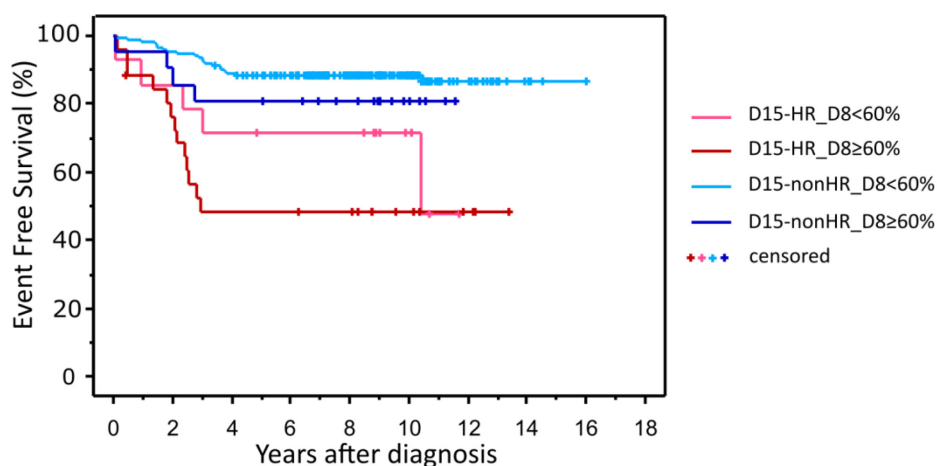
60% mají signifikantně horší prognózu s porovnání s pacienty s MRN < 60% (Obr. 11). Tento rozdíl byl signifikantní pouze u pacientů s BCP ALL, u pacientů s T-ALL hodnota hladiny blastů v kostní dřeni nebyla prognosticky významná.



Number at risk											censored
D8-BM<60%	234	222	205	190	139	74	21	4	1	0	<b>203</b>
D8-BM≥60%	48	39	30	29	24	11	3	0	0	0	<b>31</b>

Obr. 11 EFS u pacientů s <60% a ≥60% v kostní dřeni v den 8, BM – bone marrow – kostní dřeň

Nicméně jsme neprokázali žádnou přidanou hodnotu měření MRN v den 8 v KD oproti současně používanému dni 15 (Obr. 12), který určuje prognózu pacientů lépe.



Number at risk											censored
D15-HR_D8<60%	14	12	10	9	9	4	0	0	0	0	<b>9</b>
D15-HR_D8≥60%	26	19	12	12	11	6	3	0	0	0	<b>13</b>
D15-nonHR_D8<60%	218	208	193	179	129	69	21	4	1	0	<b>26</b>
D15-nonHR_D8≥60%	21	19	17	16	13	5	0	0	0	0	<b>4</b>

Obr. 12 EFS u pacientů na protokolu ALL-IC. Pacienti jsou rozděleni dle odpovědi v den 8 a den 15. Z Kaplan-Meierových křivek lze vyčíst, že MRN v den 15 lépe určuje prognózu pacientů než den 8

Prokázala jsem tedy, že již odpověď v D8 léčby, tedy po podávání pouze kortikosteroidů a jedné dávky intrathékálního methotrexátu (tedy bez systémové chemoterapie) může predikovat prognózu pacienta. Také jsem prokázala, že pacienti se špatnou odpovědí v den 8 budou s vyšší pravděpodobností zařazeni do ramene s vysokým rizikem v následující časové body. Přidání odběru KD v den 8 tedy nepřináší žádnou další výhodu oproti v současnosti používaným časovým bodům.

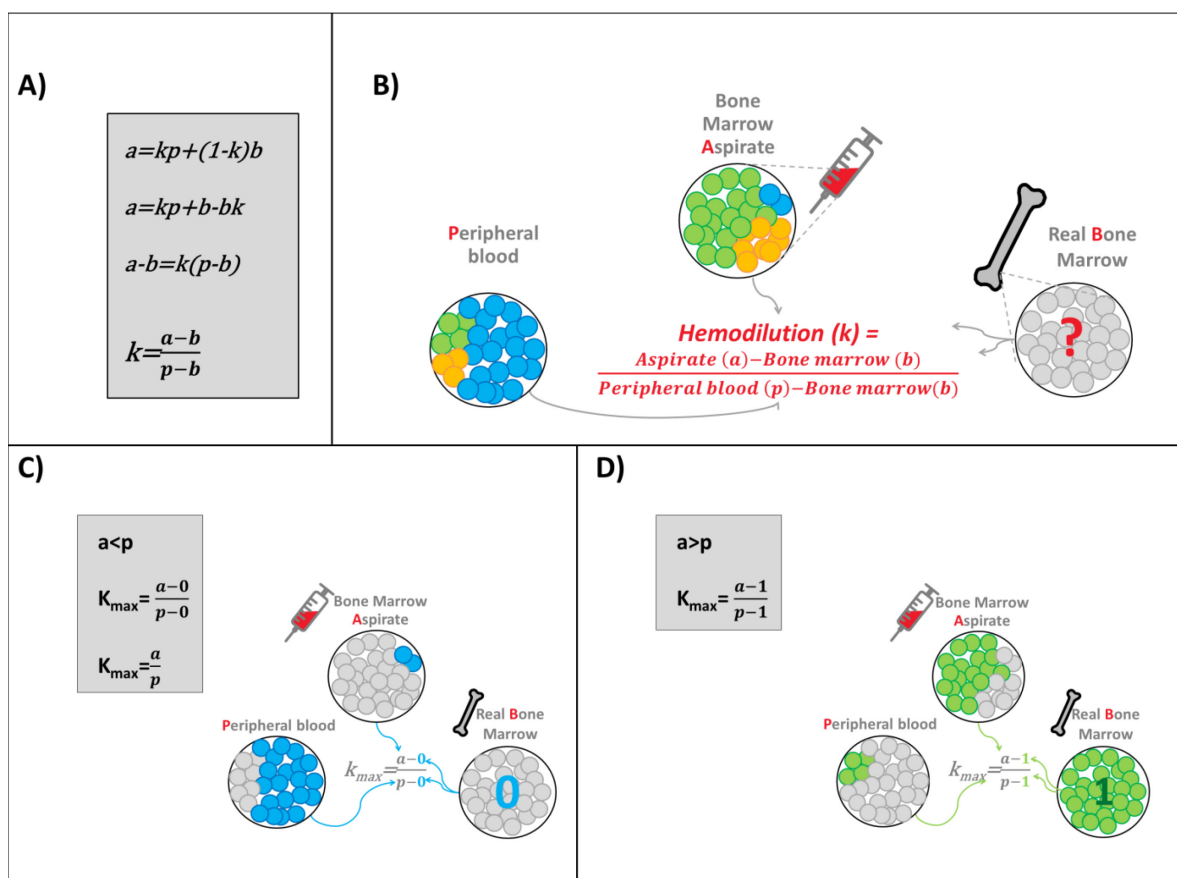
#### 4.4.1 Role žadatele v popsané publikaci

V této práci jsem retrospektivně zhodnotila veškerou MRN v den 8 v kostní dřeni a periferní krvi u 290 pacientů. Provedla jsem statistické analýzy, vytvořila veškeré obrázky a grafy použité v publikaci a připravovala text publikace.

### 4.5 Určení míry naředení aspirátu kostní dřeně

MRN se hodnotí zpravidla v KD, kde je hodnota řádově vyšší v porovnání s PK, především u BCP ALL. Pro správné určení MRN je nutné hodnotit kvalitní aspirát KD. Při odběru KD může dojít k naředení aspirátu PK a výsledný aspirát tedy může podhodnotit hodnotu MRN. Popsali jsme (**rukopis v přípravě**) nový přístup hodnocení míry naředení aspirátu KD, který na rozdíl o jiných standardně používaných metod není založen na přítomnosti progenitorů v aspirátu. Tento přístup lze tudíž využít i u pacientů po intenzivní chemoterapii či pacientů s útlumem kostní dřeně, kdy progenitory jsou snižené či nejsou v kostní dřeni přítomny vůbec. Přístup je založený na porovnání aspirátu KD s paralelně změřeným vzorkem PK. Dle naší teorie, buňky v aspirátu pochází buď z KD jako takové anebo část buněk (dle míry naředení) pochází z PK. Dle tohoto principu lze tedy říci, že aspiráty KD, které jsou výrazně odlišné od paralelně změřené PK, jsou naředené s menší pravděpodobností než aspiráty, které jsou s PK shodné. Podobnost aspirátu s PK jsme hodnotili pomocí jednotlivých buněčných subpopulací určených dle průtokové cytometrie. Pokud výslednou hemodiluci označíme konstantou  $k$  (rozmezí hemodiluce 0-1, 1 znamená 100% naředení, tedy kompletní hemodiluci), hodnotu konkrétní subpopulace v aspirátu KD konstantou  $a$ , hodnotu v PK konstantou  $p$  a KD konstantou  $b$ , můžeme tuto myšlenku zapsat jako vzorec  $a=kp+(1-k)b$ , což lze zjednodušit na  $k=\frac{(a-b)}{(p-b)}$  (Obr. 13). Protože zastoupení subpopulací v KD je neznámé, pracujeme s tzv. maximálním možným naředením ( $k_{max}$ ), které pracuje s nejhorším možným scénářem. Existují dvě možnosti. Zaprvé, když je hodnota zastoupení dané populace v aspirátu nižší, než

zastoupení dané populace v PK (tedy  $a < p$ ), pak v tomto případě je nejhorší možný scénář, že všechny sledované buňky daného subtypu v aspirátu pochází ve skutečnosti z PK, tedy tato skupina buněk ve skutečné KD úplně chybí ( $b=0$ ). V tomto případě lze vzorec  $k_{max}$  zapsat jako  $k_{max} = \frac{a}{p}$ . Zadruhé, když je zastoupení dané populace v aspirátu KD vyšší než v PK ( $a > p$ ), je nejhorší možný scénář to, že skutečnou KD tvoří pouze dané buňky ( $b=1$ ), tedy ostatní buněčné subpopulace jsou v aspirátu přítomny díky naředění. Toto lze zjednodušeně zapsat jako  $k_{max} = \frac{a-1}{p-1}$ .



**Obr. 13** Vzorec pro určení naředění aspirátu KD. A – základní vzorec. B – princip vzorce – buňky v aspirátu pochází v různé míře ze skutečné KD (bone marrow, BM) nebo z PK (peripheral blood, PB). C, D – výpočet  $k_{max}$  – výpočet pracuje s nehorším možným scénářem C – případ výpočtu, kdy zastoupení dané subpopulace v aspirátu je nižší než v PK. D - případ výpočtu, kdy zastoupení dané subpopulace v aspirátu je vyšší než v PK

Daný vzorec platí pouze pro počítání jedné populace ve vzorku najednou. Obvykle jsme ale schopni spočítat několik subpopulací v rámci jednoho vzorku. Pro počítání všech subpopulací najednou, jejíž výpočet vychází z daného principu, jsme vytvořili algoritmus, který ve výpočtu kombinuje jednotlivé vzorce pro dané subpopulace najednou a vypočítává následné  $k_{max-final}$ .

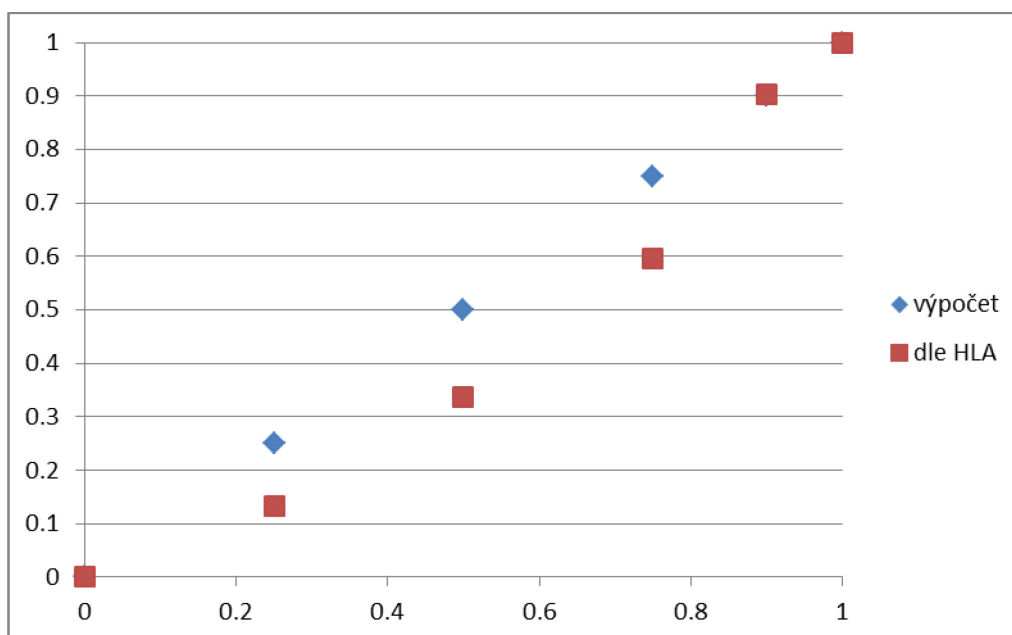
Protože daná metoda je založena na přesných rozdílech mezi aspirátem KD a PK, je nutné vyloučit variabilitu způsobenou jiným mechanismem než je skutečný rozdíl mezi aspirátem a PK. Variabilita způsobená chybovostí může být způsobená několika mechanismy – při samotném pipetování vzorků, chybovostí cytometru při měření vzorků, či rozdílném gatování buněčných subpopulací. Abychom kvantifikovali míru této variability, retrospektivně jsem zhodnotila základní subpopulace (lymfocyty, granulocyty, monocyty) u pacientů v den 15 léčby ALL ve dvou různých zkumavkách v aspirátu KD (n=100) a v PK (n=100). Následně jsem vzájemně porovnála obě zkumavky ze stejného materiálu mezi sebou. Ideálně by změřené subpopulace měly být mezi těmito dvěma zkumavkami zcela shodné, míra rozdílu mezi subpopulacemi tudíž odráží chybovost v rámci zpracování a analýzy vzorku. Tuto chybovost jsme následně zohlednili v algoritmu pro počítání  $k_{max}$ .

Pro ověření vzorce jsem provedla sérii hemodilučních experimentů (n=5). Vzorky PK a aspirátu KD jsem barcovala pomocí HLA-I v odlišných fluorochromech (FITC, PE). Poté jsme oba vzorky smíchali dohromady v několika různých poměrech a následně naznačili pomocí monoklonálních protilátek k odlišení bazálních buněčných subpopulací (granulocyty, lymfocyty, monocyty, zralé B lymfocyty, T lymfocyty, NK buňky a erytroidní prekurzory). Vzorky byly následně změřeny pomocí průtokové či spektrální cytometrie. Po určení subpopulací bylo vypočítáno dané  $K_{max-final}$  a tuto hodnotu jsem porovnála s hodnotami přesného nařazení určeného pomocí barcodu HLA-I. Hodnoty vypočítaného nařazení korelovali s hodnotami dle HLA-I (*Obr. 14*). U některých vzorků vycházelo nařazení pomocí algoritmu vyšší než pomocí HLA-I, což je dané tím, že algoritmus počítá s nejvyšším možným nařazením.

Pro jednoduché využití daného algoritmu (vycházejícího z daného vzorce, který počítá paralelně s více populacemi najednou a zároveň počítá s variabilitou měření) připravujeme webovou aplikaci. Tato aplikace počítá až s pěti různými subpopulacemi a bude veřejně přístupná. Nyní je aplikace ve fázi vývoje, přístupná pouze pro výzkumné účely.

Pomocí aplikace jsem retrospektivně zhodnotila maximální možné nařazení u 342 vzorků aspirátů kostní dřeně v den 15 léčby pacientů s ALL. K porovnání jsem využila následující populace: granulocyty, lymfocyty, erytroidní prekurzory a monocyty a následně v rámci lymfocytárních populací CD4 a CD8 T-lymfocyty, B-lymfocyty a NK

buňky. Maximální možné naředění se pohybovalo mezi 0-100%, 14% vzorků touto metodou byly označeny za výrazně naředěné, tedy nehodnotitelné pro potřeby MRN.



**Obr. 14** Graf ukazuje korelaci skutečného (červeně) a vypočítaného (modře) naředění. Vzorek periferní krve a aspirátu byly označeny pomocí HLA-I, následně smíchány v různých poměrech.

#### 4.5.1 Role žadatele v popsaném připravovaném rukopise

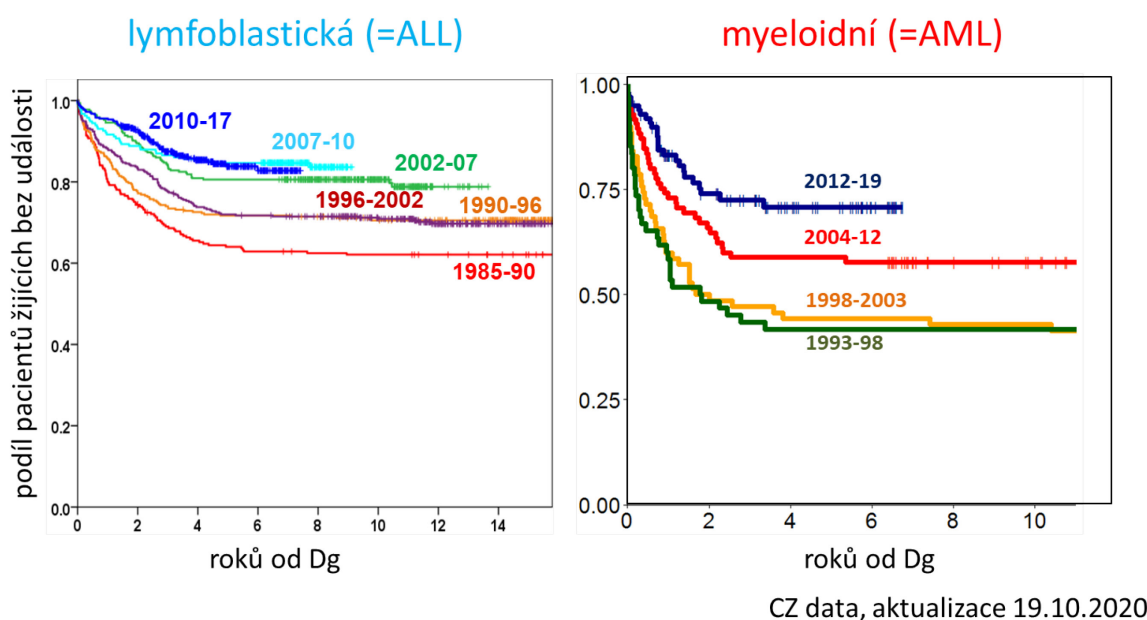
V příloženém rukopise jsem se podílela na vytváření základního vzorce pro určení naředění kostní dřeně. Hodnotila jsem subpopulace u paralelně změřených dvou zkumavek ve stejném materiálu (celkem 200 párových zkumavek) pro určení variability měření a analýzy. Dále jsem analyzovala základní populace v aspirátu kostní dřeně a periferní krvi u pacientů v den 15 léčby ALL a určila pomocí vzorce maximální možné naředění (n=342). Prováděla jsem experimentální část potvrzující správnost vzorce.



## 5 Diskuze

Prognóza dětí s akutní leukémií, a to jak ALL, tak AML, se v několika posledních dekádách výrazně zlepšila (Obr. 15)<sup>37,38</sup>. Například u ALL se z dříve téměř neléčitelného onemocnění se stalo onemocnění s excelentní prognózou a je právem považováno za jeden z největších úspěchů moderní medicíny. Prognóza AML se i přes zlepšení v posledních dekádách pohybuje okolo 70%. Obecně lze říci, že i přes zlepšující se prognózu zůstává v léčbě akutní leukémie mnoho nezodpovězených otázek.

K takto výraznému zlepšení léčby došlo za použití stejné škály chemoterapeutik a pokrok souvisí především se zlepšením stratifikace pacientů. Kromě celkové prognózy je u dětí nutné brát v potaz také případné poškození léčbou a její trvalé následky. Pro léčbu je proto zásadní určit ty pacienty, jejichž prognóza bude i při snížení intenzity léčby dobrá a naopak ty pacienty, jejichž léčba se bez velmi intenzivní chemoterapie neobejde. K tomuto dělení pacientů přispívá hned několik klíčových faktorů, které se neustále vyvíjí (podrobněji popsáno níže). Teprve v posledních letech dochází v léčbě akutní leukémie k zapojení nových léků, především imunoterapie. Mezi tyto léky patří například léky na bázi monoklonálních protilátek, ať již samotných, které pouze opsonizují dané leukemické



Obr. 15 Zlepšení prognózy ALL a AML u pacientů léčených v ČR na jednotlivých protokolech.

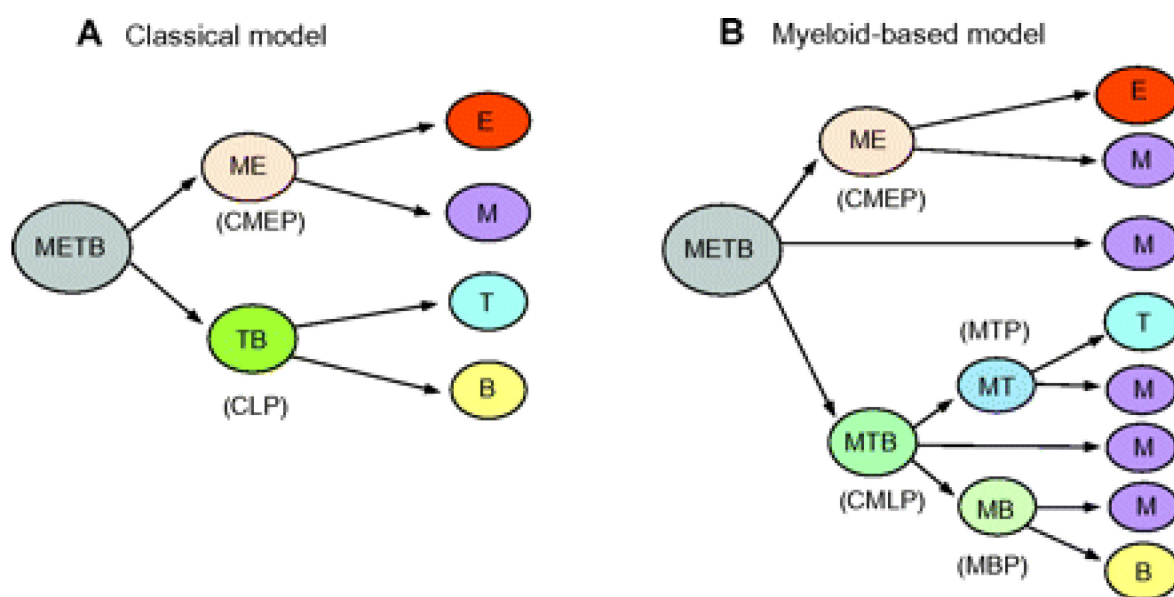
buňky (daratumumab) nebo s navázanou toxickou látkou (gemtuzumab-ozogamicin), či bispecifické konstrukty propojující T-lymfocyty s leukemickou buňkou (blinatumomab). Mezi další skupinu nadějných nových léků patří buněčná terapie – buňky s chimerickým

antigenním receptorem (CAR T buňky). Tyto nové léky jsou zatím používány především u relabovaných či refrakterních leukemií, nově se například blinatumomab zařazuje i jako lék první linie pro léčbu BCP ALL. Nabízí se otázka, jaký přínos mohou přinést tyto léky, když vezmeme v potaz excelentní prognózu i na klasické léčbě pomocí chemoterapie. Z dat pacientů s relapsem vyplývá, že hlavní přínos by mohlo být především snížení toxicity při zachované efektivitě léčby. Toto se ukázalo u použití blinatumomabu u relabovaných či refrakterních BCP ALL <sup>8,9</sup>.

Pro léčbu akutní leukémie u dětí se používají základní typy protokolů – protokol pro léčbu akutní lymfoblastickou a akutní myeloidní leukémií, případně vzácněji protokol, který obsahuje prvky obou předchozích protokolů, používaný například u kojenců do 1 roku věku. Nově se v některých protokolech dále rozlišuje léčba pro BCP a T ALL. Protokoly pro ALL a AML kombinují jiné druhy chemoterapeutik, liší se svou intenzitou i délkou léčby. Protože akutní leukémie u dětí je rychle se vyvíjející život ohrožující stav, je nutné zahájit léčbu co nejdříve. Dříve toto rozhodnutí spočívalo pouze na morfologickém hodnocení. Určit takto typ leukémie může být obtížné a spoléhá především na zkušenosti daného morfologa. Nyní existují přesnější metody, jak danou leukémií zařadit. Jedním z nejzásadnějších metod k určení typu leukémie je imunofenotypizace pomocí průtokové cytometrie. Výhodou této metody je především možnost rychlého zpracování vzorku z poměrně malého množství vzorku a dobrá dostupnost metody. U většiny pacientů lze takto jednoduše určit původ buňky - z lymfoidní nebo z myeloidní linie a navíc rozlišit i mezi B a T lymfoidním původem daného leukemického klonu. Mezi další metody pomáhající určit původ blastů jsou genetické metody. Některé genetické aberace se pojí výhradně s určitým fenotypem (např. *RUNX1-RUNX1T1* u AML) nebo se pojí s linií a znamenají specifickou léčbu (*PML-RARA* u AML M3) nebo nejsou liniově zcela specifické, ale umožňují cílenou léčbu (např. *BCR-ABL1* a možnost léčby tyrosinkinázovými inhibitory). Tyto metody bývají velmi přesné, jejich nevýhodou zůstává především to, že jsou časově více náročné a výsledky často nejsou k dispozici v době, kdy je potřeba rozhodnout o zařazení pacienta do léčebného protokolu. Identifikace fúzních genů typických pro ALL či AML probíhá pomocí metody FISH či RQ-PCR. Takto je možné určit základní a nejčastější subtypy. Některé nové subtypy jsou identifikovány na základě komplexnějších metod, jako je sekvenování RNA či NGS. Kromě výrazné časové náročnosti jsou tyto metody náročné i finančně, proto nejsou zatím široce dostupné. Základní

přiřazení linie původu leukémie tedy spoléhá především na vyšetření průtokovou cytometrií.

U 2% až 5% akutních leukémií není původ leukémie jasný. Tyto leukémie označujeme jako akutní leukémie z nejasné linie. Tedy leukemické buňky nesou znaky více linií – B, T lymfoidní či myeloidní. I přes společnou vývojovou větev B a T lymfocytů při hematopoéze, výskyt ALL kombinující B a T znaky je extrémně vzácný i v rámci této skupiny leukémií a většina leukémií z nejasné linie kombinuje znaky B/myelo či T/myelo linie. Tento jev bývá vysvětlován zachováním myeloidního potenciálu u lymfoidních prekurzorů (Obr. 16)<sup>39</sup>. Například u paprskoploutvých ryb je u B lymfocytů zachována



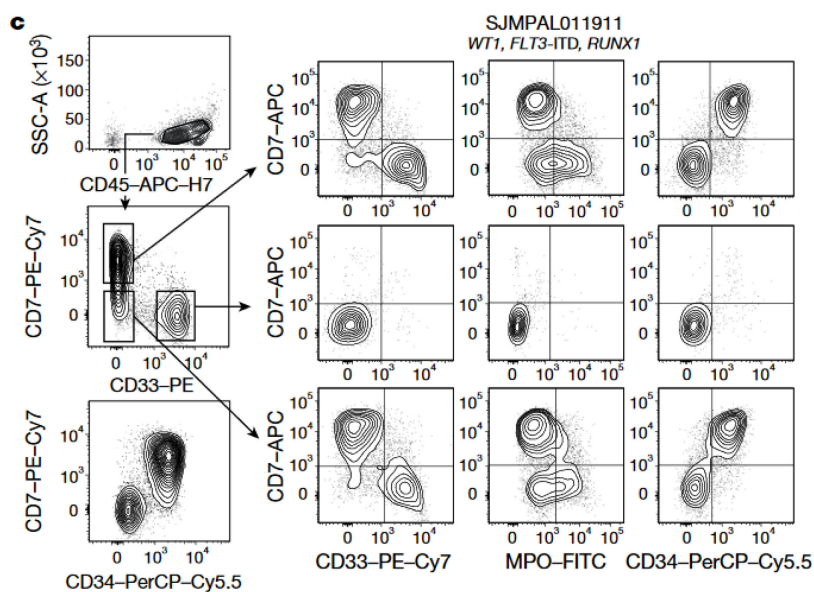
**Obr. 16** Modely hematopoézy. A – klasický model s časným oddělením lymfoidní a myeloidní linie. B – model zohledňující zachování myeloidního potenciálu u lymfoidních prekurzorů. E, M, T, B - erytrocytní, myeloidní, T-lymfoidní, B-lymfoidní potenciál progenitorů, C – společný prekurzor. Katsura a Kawamoto, 2001

schopnost fagocytózy, což ukazuje na možný vývoj B lymfocytů z fagocytujících buněk<sup>40</sup>. Dále bylo popsáno, že zvýšení exprese *CEBPβ* vede u B lymfocytů k transdiferenciaci v progenitory granulocytů a makrofágů<sup>41</sup> a bylo prokázáno zachování myeloidního potenciálu u časných progenitorů T lymfocytů v thymu<sup>42</sup>.

U akutních leukémií z nejasné linie je popsáno několik prací snažících se zpřesnit jejich diagnostiku a objasnit jejich původ. Kotrova et al.<sup>43</sup> popsali shodné genetické pozadí a zachování plasticity mezi jednotlivými subpopulacemi u dvou pacientů s bilineární leukémií. Ke stejnému závěru, ale na větší kohortě pacientů dospěl Alexander et al.<sup>19</sup>, kdy popsal odlišné spektrum genetických mutací mezi B/myeloidními a T/myeloidními leukémiemi, s častějším zastoupením *ZNF384r* mezi B/myeloidními a *WT1* mezi T/myeloidními leukémiemi. Při rozdělení bilineárních leukémií do více populací na

základě fenotypu opět ukázalo shodné genetické pozadí a stejné zastoupení jednotlivých mutací. Na myším modelu poté dokázali, že plasticita buněk je zachována v každé subpopulaci, kdy po transplantaci dané subpopulace získala leukémie svůj původní fenotyp se všemi fenotypovými subpopulacemi (Obr. 17).

V naší práci jsme se více než na původ leukémií z nejasné linie zaměřili na způsob jejich léčby (Příloha 1). Algoritmus léčby těchto pacientů se často spoléhal na úsudek daného pracoviště, případné studie byly založeny na menším počtu pacientů či popsány u



**Obr. 17** Zachování bifenotypického charakteru leukémie po transplantaci různých leukemických subpopulací do myšího modelu, Alexander, 2018

dospělých pacientů a jednoznačná pravidla dosud chyběla<sup>44–47</sup>. Naše práce představuje unikátní studii na velké kohortě dětských pacientů. V naší kohortě jsme prokázali jednoznačně lepší přežití u pacientů léčených dle protokolů pro ALL. Tyto výsledky nelze ovšem zjednodušit a všechny leukémie léčit dle ALL protokolu. Část pacientů může profitovat z léčby typu AML a tyto pacienty jsme se snažili určit v našem algoritmu. U leukémií z nejasné linie se nabízí myšlenka, že použití protokolu, kombinující oba typy protokolu bude pro tyto leukémie nejvhodnější. V naší studii se tato teorie ovšem neprokázala jako správná. Nyní probíhající prospektivní studie vycházející z našich dat přiřazuje vhodný protokol léčby pouze na základě fenotypu dané leukémie, pacientům je tudíž možné přiřadit vhodný protokol rychle po stanovení diagnózy.

Jiným příkladem plasticity leukemických buněk je změna jejich fenotypu po zahájení léčby. Může se jednat o prostou ztrátu proteinu, což je často pozorováno po imunoterapii či buněčné léčbě pomocí CAR T, nebo může jít o kompletní změnu

imunofenotypu<sup>48,49</sup>. Kompletní změnu imunofenotypu jsme popsali u zvláštní skupiny BCP ALL, u kterých na léčbě dojde ke kompletní transdiferenciaci v buňky připomínající svým fenotypem monocytu (**Příloha 2**)<sup>34,17</sup>. V naší práci jsme popsali četnost tohoto jevu, jeho genetické pozadí, vliv na hodnocení MRN a prognózu na konsektivní kohortě pacientů. Zatímco u některých pacientů se jedná o diskretní fenomén, u některých dochází časně k monocytóze a morfologicky lze pozorovat až obraz připomínající AML. Nabízí se tedy otázka případné změny léčby k myeloidnímu typu protokolu. V naší kohortě všichni pacienti až na jednoho dosáhli remise při použití protokolu typu ALL. Navíc jsme neshledali horší prognózu u pacientů s přesmykem v porovnání s ostatními BCP ALL. Maligní potenciál přesmyknutých monocytoidních buněk není dosud znám, nicméně dva pacienti s leukémií s monocytárním přesmykem z naší kohorty relabovali jako monocytární AML. Tato změna linie při relapsu byla popsána již v několika případech, především u pacientů s *KMT2Ar* leukémiemi<sup>50,51</sup>. V novém protokolu AIEOP BFM 2017 dochází u pacientů s vysokým rizikem k randomizaci do ramena s blinatumomabem či klasickou chemoterapií. Vzhledem k tomu, že pacienti s monocytárním přesmykem mají často pomalejší odpověď na léčbu, část z nich bude spadat do vysokého rizika, tudíž může být randomizována do ramene s blinatumomabem. Vzhledem k tomu, že k této randomizaci dochází v protokolu až velmi pozdně (zhruba po 3 měsících od zahájení léčby), kdy leukemická nálož je již často pod hladinou detekce pomocí průtokové cytometrie, není rutinní přezkoumání cílových molekul (v tomto případě přítomnosti CD19) vždy možné. Data o účinnosti této léčby u těchto pacientů zatím nejsou dostupná.

Co přesně je spouštěčem této imunofenotypové změny není dosud známo. Potenciál k transdiferenciaci zůstává zachován i po transplantaci leukemických buněk do myších modelů<sup>17</sup>. Z našich dat víme, že u pacientů s monocytárním přesmykem je upregulovaná exprese *CEBP $\alpha$* . Jak jsme již popsáno výše, zvýšená exprese *CEBP* genu může vést k transdiferenciaci B lymfocytů v makrofágy in vitro<sup>52</sup>, v této studii ovšem byla za transdiferenciaci zodpovědná zvýšená exprese *CEBP $\beta$*  a *CEBP $\epsilon$*  a role *CEBP $\alpha$*  v této souvislosti nebyla prokázána. Vývoj B lymfocytů je dále ovlivněno transkripčními faktory *PAX5* a *PU.1*. *PU.1* je zásadní při myeloidním vývoji a jeho exprese je částečně exprimovaná u B lymfocytů a vysoce exprimovaná u myeloidních buněk. Exprese *CEBP $\alpha$*  navíc zvyšuje expresi *PU.1*<sup>53</sup>. Na základě těchto poznatků jsme se proto rozhodli tyto dva faktory změřit u pacientů s monocytárním přesmykem (**Příloha 3**). *PAX5* a *PU.1* jsme

zařadili do panelu pro hmotnostní cytometrii. Pomocí algoritmu tvisblindi lze navíc určit časovou posloupnost jednotlivých změn. Z našich pozorování lze říci, že změny exprese *PAX5* a *PU.1* u většiny změřených pacientů nepředcházely změnám jiných měřených znaků jako je CD33, CD19 a CD34. Zvýšení exprese proteinu CD33 přichází v transdiferenciaci jako první změna. Z publikovaných dat víme, že indukce exprese *CEBP $\alpha$*  v CD33<sup>neg</sup> buněčné linii zvyšuje expresi CD33 v dané linii<sup>54</sup>, a tedy že zvýšení exprese CD33 je asociováno se zvýšením exprese *CEBP $\alpha$* . Hmotnostní cytometrie v kombinaci s algoritmem tvisblindi nám umožnila podrobněji popsat imunofenotypové změny při transdiferenciaci. I přes široký panel myeloidních znaků se nepodařilo určit znak, respektive kombinaci znaků, která by jednoznačně odlišila zdravé monocyty od přesmyknutých monocytoidů. K tomuto účelu jsme provedli sort monocytoidních leukemických buněk a zdravých monocytů a pomocí RNAseq porovnali expresi jednotlivých CD znaků na úrovni mRNA. Při testování těchto znaků pomocí průtokové cytometrie se ovšem celá řada nadějných CD znaků s odlišnou mRNA expresí ukázala jako nespolehlivá. Jedním z nadějných znaků je CD135. Tento znak je u části pacientů exprimován již v diagnóze a udržuje se i na přesmyknutých monocytoidech. Zdá se ovšem, že i tento znak na blastech klesá a v pozdějších časových bodech se na něj leze spolehnout. Dále bývá často zachována exprese CD45RA, která je typická pro lymfoidní progenitory. Sortováním buněk monocytárního fenotypu (CD33<sup>pos</sup>CD14<sup>pos</sup>) jsme prokázali leukemické přestavby Ig/TR v subpopulaci CD33<sup>pos</sup>CD14<sup>pos</sup>CD45RA<sup>pos</sup> a naopak, leukemické přestavby jsme nenašli v subpopulaci CD33<sup>pos</sup>CD14<sup>pos</sup>CD45RA<sup>neg</sup>. V pozdějších časových bodech (den 33 či týden 12 od zahájení léčby) jsme našli i případy, kdy jsme prokázali přestavby v buňkách CD33<sup>pos</sup>CD34<sup>pos</sup>, odpovídající myeloidním progenitorům. Další osud přesmyknutých leukemických buněk je tedy stále předmětem zkoumání. Tento výzkum je limitován především často nedostatečným množstvím materiálu a leukemických buněk v pozdějších stádiích léčby díky dobré odpovědi pacientů.

Kromě kompletní změny imunofenotypu na léčbě je další ukázkou plasticity leukemických buněk pouhá ztráta určitého proteinu. Toto je nejčastěji pozorováno po použití imunoterapie. Byly již popsány případy CD19<sup>neg</sup> relapsů po použití blinatumomabu<sup>12</sup> či CAR T buněk<sup>55</sup>. Tento mechanismus úniku lze částečně obejít použitím imunoterapie proti více antigenům najednou, nyní se například testují CAR T-lymfocyty namířené proti CD19 i CD22<sup>56</sup>. Na tuto možnou změnu imunofenotypu je nutné

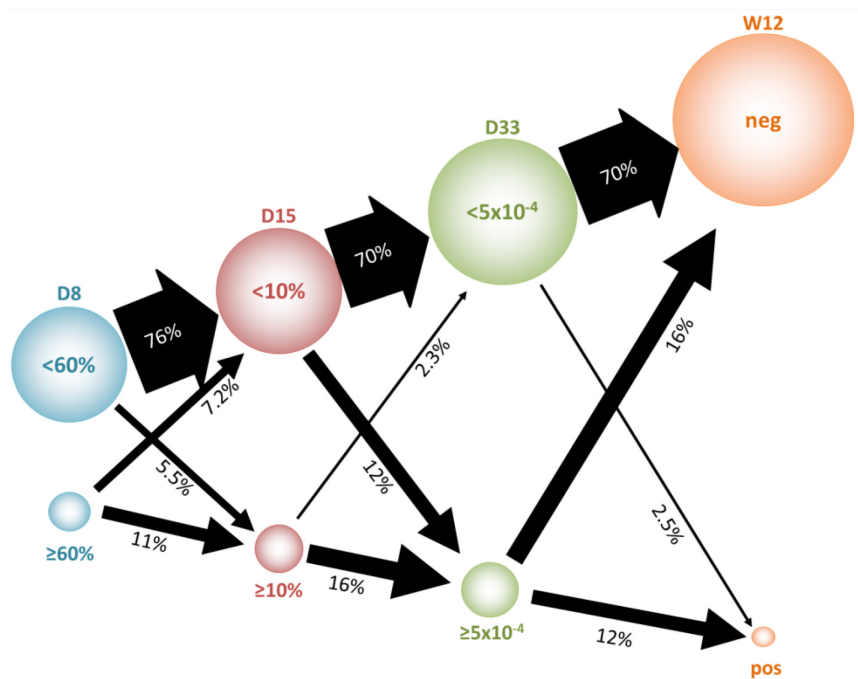
myslet při hodnocení MRN dle průtokové cytometrie. Určení ztráty daného antigenu po imunoterapii nemusí být vždy jednoduché. V naší práci jsme popsali nedetekovatelnou expresi CD38 po použití daratumumabu dle průtokové cytometrie u relabovaných ALL (**Příloha 4**). CD38<sup>neg</sup> relapsy již byly popsány po použití daratumumabu v léčbě mnohočetného myelomu<sup>13</sup>. U jednoho pacienta jsme prokázali, že v jeho případě nešlo o skutečnou ztrátu proteinu na povrchu buněk, ale o pouhé zablokování vazebného místa samotným daratumumabem. Způsob monitorace exprese CD38 při léčbě daratumumabem musí zohledňovat tuto skutečnost. Při falešné negativitě exprese by mohla být indikována změna léčby, která v daném případě nemusí být potřeba. Proto je nutné monitorovat expresi jiným způsobem, například protilátkou s jiným vazebným místem. Na naší klinice byl daratumumab použit u pěti pacientů s relapsem ALL a pouze jeden pacient díky této léčbě dosáhl trvalé remise a po léčbě dosud nezrelaboval.

Relaps T-ALL má extrémně špatnou prognózu a výzkum nových léků pro tyto pacienty je klíčový. Zatímco u BCP ALL se vkládá velká naděje do CAR T-lymfocytů (zatím používané v klinických výzkumech CD22 a CD19, případně duální CD19-CD22 CAR T<sup>56</sup>), výroba CAR T-lymfocytů proti T-lymfoblastickým buňkám je výrazně komplikovanější. Jedním z problémů je sebedestrukce vytvořených CAR T buněk, protože antigen, proti kterému jsou namířeny, se vyskytuje na jejich vlastním povrchu. Cooper et. al. popsali CD7 CAR T-lymfocyty s knock-outem antigenu CD7 na jejich povrchu, čímž obešli tuto překážku<sup>57</sup>. Využití knock-outu při výrobě CAR T lze využít i u CAR T buněk určených k léčbě AML, které jsou namířeny proti nejběžnějšímu antigenu AML – CD33<sup>58</sup>. Problém CD33 CAR T nespočívá v sebedestrukci, jako je tomu u CD7 CAR T buněk, ale především ve velké myeloidní toxicitě s dlouhým obdobím neutropenie, které by bylo fatální. Kim et. al. popsali knock-out CD33 fyziologických progenitorů a následnou aplikaci CAR T buňky určené proti CD33. Tento přístup by mohl vést k bezpečnému použití CAR T u AML při zachované fyziologické krevetvorbě.

Jak je již zmíněno v úvodu diskuze, ke zlepšení léčby pacientů s akutní leukémií přispěla především zlepšená stratifikace pacientů. Tato stratifikace se postupně vyvíjela na jednotlivých protokolech. Například pro ALL, na protokolu ALL—IC 2002 byla k stratifikaci pacientů použita následující kritéria: leukocytóza, věk, odpověď na prednison v den 8 léčby v periferní krvi a morfologická odpověď v den 15 a den 33 léčby a přítomnosti fúzních genů *BCR-ABL1* a *KMT2A-AFF1*. Protokol tedy stál na jednoduchých

metodách, spoléhal především na morfologické hodnocení a nevyžíval měření MRN<sup>59</sup>. V porovnání současně používaný protokol AIEOP BFM 2017 využívá mnohem více kritérií a spoléhá i na časově a finančně náročnější metody. Základem stratifikace je hodnocení MRN a to jak pomocí průtokové cytometrie (využíváno v den 15 a u pacientů bez zjištěných přestaveb Ig/TR), tak dle RQ-PCR pomocí Ig/TR (ostatní časové body). Mezi další stratifikační kritéria patří přítomnost určitých fúzních genů či delecí a hypodiploidie. Hodnocení MRN v průběhu léčby je nyní klíčové pro stratifikaci pacientů do jednotlivých rizikových ramen či k indikaci pacientů k transplantaci kostní dřeně. Nejzásadnější pro stratifikaci jsou v současné době tři časové body – den 15, den 33 a týden 12 od zahájení léčby. Na protokolu ALL-IC 2002 sice nesloužilo hodnocení MRN ke stratifikaci pacientů, bylo ovšem měřeno výzkumně<sup>59</sup>. Kromě výše zmíněných časových bodů jsme měli unikátní možnost měřit na tomto protokolu i další časový bod – den 8 (**Příloha 5**). Do toho časového bodu jsou pacienti léčeni pouze kortikoidy a jednou dávkou intrathékálního methotrexátu. Tím, že tento protokol nebyl založený na hodnocení MRN lze z hodnocení MRN v tomto časovém bodě zjistit jeho prognostický přínos. Z našich pozorování lze říci, že již v den 8 léčby lze na základě hladiny MRN predikovat prognózu onemocnění (*Obr. 18*). Přesto, že jsme neprokázali žádnou přidanou hodnotu měření MRN v den 8 oproti nyní používaným MRN bodům, lze říci, že už v tento časový bod platí vzor, že pacienti s vyšší MRN v jednom bodě mají trend zařadit se do skupiny s vyšším MRN v dalším bodě. Jedná se o první práci zkoumající odpověď v kostní dřeni bez použití systémové chemoterapie, tedy s použitím pouze kortikoidů a intrathékální chemoterapie. Odpověď po použití chemoterapie v den 8 je součástí protokolů The Children's Oncology Group, používaných například v USA, které ale již od prvního dne používají systémovou chemoterapii k léčbě ALL a odpověď je navíc hodnocená pouze pomocí morfologie<sup>60</sup>.





**Obr. 18** Pacienti s vyšší MRN náloží v předchozím časovém bodu mají tendenci být stratifikováni do skupiny s vyšším MRN v následujícím časovém bodě. Šířka čáry ukazuje, kolik procent pacientů s předchozího časového bodu spadá do skupiny s vyšším či nižším MRN v dalším časovém bodu. Data ukázaná pro pacienty léčené dle ALL-IC BFM 2002 v ČR.

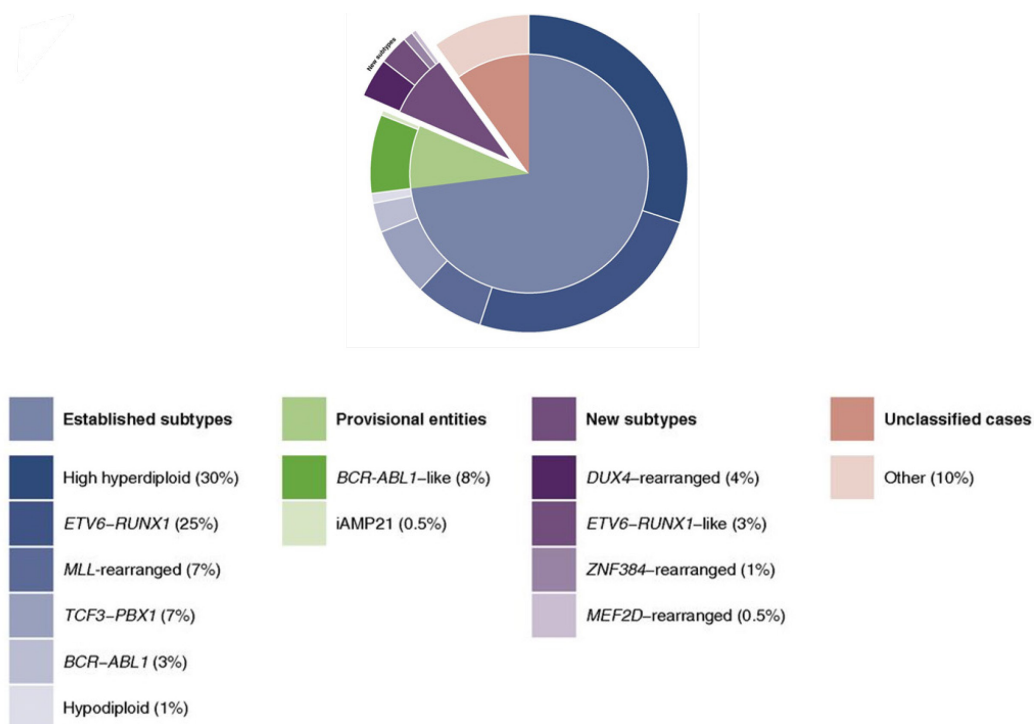
Zatímco hodnocení MRN u ALL je součástí již několika posledních protokolů, hodnocení MRN u AML není dosud v současném AML protokolu ukotveno. U ALL lze MRN sledovat geneticky pomocí Ig/TR přestaveb, u AML se musíme spolehnout na měření pomocí průtokové cytometrie či pomocí přítomných fúzních genů na úrovni mRNA. Hodnocení MRN u AML dle průtokové cytometrie má být již součástí nově připravovaného protokolu. Vyšetření je limitováno především úvodním fenotypem blastů a pokud se jejich fenotyp překrývá s fyziologickými progenitory či jinými zdravými myeloidními buňkami, bývá detekce obtížná. Měření MRN na úrovni mRNA lze použít pouze u pacientů s detekovatelným fúzním genem, navíc tím, že v jedné buňce může být variabilní množství kopií mRNA, není toto měření přesné. Proto se nyní vyvíjí metody, jak měřit fúzní geny i na úrovni DNA<sup>61</sup>.

I přes rutinní používání MRN u ALL dochází s rozvojem nových metod k dalšímu posunu. Zlatý standart hodnocení MRN dle Ig/TR RQ PCR může být nahrazen hodnocením Ig/TR pomocí NGS. Tato metoda umožňuje přesnější měření MRN s menší tendencí k falešně pozitivním výsledkům<sup>62,63</sup>.

Trend k vyšším MRN v kostní dřeni v porovnání s periferní krví je znám především u BCP ALL a dohaduje se, že hodnota MRN ve dřeni je asi o jeden řád vyšší než v periferní krvi<sup>24</sup>. Z tohoto důvodu, je nutné vyšetřovat MRN pouze v nenařazeném vzorku kostního

aspirátu. Metod k posouzení kvality aspirátu kostní dřeně je několik a většina z nich se zakládá na posouzení přítomnosti prekurzorů v aspirátu<sup>25–27,64,65</sup>. Tyto metody lze použít u aspirátu odebraných od zdravých jedinců. Problém nastává u pacientů na léčbě akutní leukémie či například s primárním selháním kostní dřeně, kde prekurzory přirozeně chybí nebo jsou zastoupeny pouze v nízkém počtu. Tyto aspiráty by pak byly považované za nařaděné i při kvalitním odběru. Námí vytvořená metoda (**rukopis v přípravě**), založená na porovnání aspirátu s paralelně měřenou periferní krví, lze využít i u pacientů s aplázií kostní dřeně. Mezi nevýhody této metody patří především to, že lze pouze určit největší možné nařazení, které se může od skutečného lišit. Tato metoda tedy zřejmě značně nadhodnocuje množství nařazených aspirátů. Vzhledem k tomu, že stratifikace MRN probíhá především na úrovni jednotlivých řádů, největším problémem činí pouze aspiráty, kde by případné nařazení o celý řád ovlivnilo hodnotu MRN. Aplikaci lze tedy použít k vyloučení významného nařazení.

Mezi další aspekty ovlivňující prognózu patří genetické pozadí dané leukémie. U déle známých fúzních genů či aberací již známe jejich vliv na prognózu, a zatímco některé fúzní geny jako *ETV6-RUNX1* jsou asociovány s dobrou prognózou, jiné jako *KMT2Ar* či *BCR-ABL1* jsou asociovány s horší prognózou, což bývá zohledněno v léčebných protokolech. Pomocí nových genetických metod jako je RNAseq došlo v posledních letech



Obr. 19 Nové subtypy BCP ALL, Lilljebjörn H 2017

k objevu dalších genetických skupin, které byly označovány jako B-other (*Obr. 19*)<sup>6,66–68</sup> – *DUX4r*, *ZNF384r*, *BCR-ABL-like*, *PAX5-P80R* či *ZEB2*. Vzhledem k menšímu zastoupení těchto mutací mezi ALL je obtížnější určit jejich prognostický význam a výzkum vyžaduje mezinárodní spolupráci. Pokud se některá z těchto skupin ukáže jako významně prognosticky nepříznivá či naopak příznivá je možné že v budoucích protokolech budou i tyto skupiny zohledněny ve stratifikaci pacientů. U *BCR-ABL-like* skupiny se navíc nabízí otázka léčebného benefitu tyrozinkinázových inhibitorů<sup>69</sup>. Určení těchto nových subtypů, stejně jako nové metody hodnocení MRN, jsou ovšem finančně náročnější vzhledem k potřebě rozsáhlejších genetických metod. Proto zůstává otázkou, jestli zohlednění prognostického významu nových aberací či hodnocení MRN dle NGS bude možno uplatnit v širším měřítku nebo zůstane vyšetřováno pouze ve vybraných zemích.

## 6 Shrnutí

---

Předložená práce se zabývá liniovou plasticitou leukemických buněk, jejich léčbou a problematikou vzniklou nestálostí imunofenotypu leukemických buněk. U leukemií z nejasné linie se nám podařilo určit vhodný typ léčebného protokolu na základě znaků exprimovaných na povrchu leukemických buněk. Je to dosud nejrozsáhlejší práce zabývající se léčbou leukemií z nejasné linie u dětí. Na základě poznatků získaných retrospektivní studií jsme vytvořili algoritmus k určení typu léčebného protokolu u těchto leukemií. Námi navrhovaný algoritmus nyní testujeme v nové prospektivní studii.

Objasnili jsme genetické pozadí leukemií s časným přesmykem do monocytární linie. Pomocí RNAseq jsme odhalili vyšší frekvenci tohoto fenoménu mezi pacienty s *PAX5-P80R*, *ZNF384r* a *DUX4r* leukémiemi. Ztráta B lymfoidních znaků vede k diskrepanci měření MRN mezi průtokovou cytometrií a RQ-PCR. U většiny pacientů nastává podcenění MRN v den 33, kdy již nejsou B lymfoidní znaky exprimovány, ale u pacientů s *PAX5-P80R* dochází ke ztrátě již v den 15. Podhodnocení MRN může vést k chybnému zařazení pacienta do ramene s nižším rizikem. Vybrané pacienty s přesmykem jsme změřili pomocí hmotnostní cytometrie. Pomocí algoritmu tviblini jsme sestavili pseudočasovou osu, na které lze pozorovat sekvenci jednotlivých imunofenotypových změn. Změny exprese transkripčních faktorů *PAX5* a *PU.1* nepředchází změnám jiných proteinů jako je CD19 a CD33.

Tři z pěti pacientů léčených pomocí daratumumabu dosáhli po léčbě remise, dva z nich relabovali s odstupem několika měsíců s CD38 pozitivními blasty. U zbylých dvou pacientů jsme pozorovali zdánlivou ztrátu exprese povrchové CD38 na blastech. U těchto pacientů jsme prokázali přítomnost daratumumabu na leukemických buňkách, který blokuje vazebné místo pro fluorescenční protilátku.

I přes prognostickou relevanci jsme neprokázali žádnou přidanou hodnotu MRN v den 8 v kostní dřeni oproti současně používaným časovým bodům.

## 7 Použitá literatura

---

1. 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(20):2391-2406. doi:10.1182/blood-2016-03-643544.
2. Inaba H, Greaves M, Mullighan CG. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*. 2013;381(9881):1943-1955. doi:10.1016/S0140-6736(12)62187-4
3. Moorman A V. The clinical relevance of chromosomal and genomic abnormalities in B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Blood Rev*. 2012;26(3):123-135. doi:10.1016/J.BLRE.2012.01.001
4. Storti F, Moorman A V. New and emerging prognostic and predictive genetic biomarkers in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2016;101(4):407-416. doi:10.3324/HAEMATOL.2015.141101
5. Schultz KR, Bowman WP, Aledo A, et al. Improved early event-free survival with imatinib in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: a children's oncology group study. *J Clin Oncol*. 2009;27(31):5175-5181. doi:10.1200/JCO.2008.21.2514
6. Lilljebjörn H, Fioretos T. New oncogenic subtypes in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2017;130(12):1395-1401. doi:10.1182/BLOOD-2017-05-742643
7. Cavé H, van der Werff ten Bosch J, Suci S, et al. Clinical Significance of Minimal Residual Disease in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM199808273390904>. 2009;339(9):591-598. doi:10.1056/NEJM199808273390904
8. Locatelli F, Zugmaier G, Rizzari C, et al. Effect of Blinatumomab vs Chemotherapy on Event-Free Survival Among Children With High-risk First-Relapse B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2021;325(9):843-854. doi:10.1001/JAMA.2021.0987
9. Brown PA, Ji L, Xu X, et al. Effect of Postreinduction Therapy Consolidation With Blinatumomab vs Chemotherapy on Disease-Free Survival in Children, Adolescents, and Young Adults With First Relapse of B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2021;325(9):833-842. doi:10.1001/JAMA.2021.0669
10. Usmani SZ, Nahi H, Plesner T, et al. Daratumumab monotherapy in patients with heavily pretreated relapsed or refractory multiple myeloma: final results from the phase 2 GEN501 and SIRIUS trials. *Lancet Haematol*. 2020;7(6):e447-e455. doi:10.1016/S2352-3026(20)30081-8
11. Cerrano M, Bonifacio M, Olivi M, et al. Daratumumab with or without chemotherapy in relapsed and refractory acute lymphoblastic leukemia. A retrospective observational Campus Acute Lymphoblastic Leukemia study. *Haematologica*. Published online January 13, 2022. doi:10.3324/HAEMATOL.2021.279851
12. Mejstříková E, Hrusak O, Borowitz MJ, et al. CD19-negative relapse of pediatric B-

- cell precursor acute lymphoblastic leukemia following blinatumomab treatment. *Blood Cancer J.* 2017;7(12). doi:10.1038/S41408-017-0023-X
13. Minarik J, Novak M, Flodr P, et al. CD38-negative relapse in multiple myeloma after daratumumab-based chemotherapy. *Eur J Haematol.* 2017;99(2):186-189. doi:10.1111/EJH.12902
  14. Patiño-Escobar B, Ramos R, Linares M, Mejía A, Alcalá S. CD38: From Positive to Negative Expression after Daratumumab Treatment. *Cureus.* 2020;12(4). doi:10.7759/CUREUS.7627
  15. Seif AE. Pediatric leukemia predisposition syndromes: clues to understanding leukemogenesis. *Cancer Genet.* 2011;204(5):227-244. doi:10.1016/J.CANCERGEN.2011.04.005
  16. Link DC, Schuettpelz LG, Shen D, et al. The identification of a novel TP53 cancer susceptibility mutation through whole genome sequencing of a patient with therapy-related AML. *JAMA.* 2011;305(15):1568. doi:10.1001/JAMA.2011.473
  17. Slamova L, Starkova J, Fronkova E, et al. CD2-positive B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia with an early switch to the monocytic lineage. *Leuk 2014* 283. 2013;28(3):609-620. doi:10.1038/leu.2013.354
  18. Pieters R, De Lorenzo P, Ancliffe P, et al. Outcome of infants younger than 1 year with acute lymphoblastic leukemia treated with the interfant-06 protocol: Results from an international phase III randomized study. *J Clin Oncol.* 2019;37(25):2246-2256. doi:10.1200/JCO.19.00261
  19. Alexander TB, Gu Z, Iacobucci I, et al. The genetic basis and cell of origin of mixed phenotype acute leukaemia. *Nat 2018 5627727.* 2018;562(7727):373-379. doi:10.1038/s41586-018-0436-0
  20. Rayes A, McMasters RL, O'Brien MM. Lineage Switch in MLL-Rearranged Infant Leukemia Following CD19-Directed Therapy. *Pediatr Blood Cancer.* 2016;63(6):1113-1115. doi:10.1002/PBC.25953
  21. Wöfl M, Rasche M, Eyrich M, Schmid R, Reinhardt D, Schlegel PG. Spontaneous reversion of a lineage switch following an initial blinatumomab-induced ALL-to-AML switch in MLL-rearranged infant ALL. *Blood Adv.* 2018;2(12):1382. doi:10.1182/BLOODADVANCES.2018018093
  22. Coustan-Smith E, Sancho J, Hancock ML, et al. Clinical importance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2000;96(8):2691-2696. doi:10.1182/BLOOD.V96.8.2691
  23. Basso G, Veltroni M, Valsecchi MG, et al. Risk of relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia is predicted by flow cytometric measurement of residual disease on day 15 bone marrow. *J Clin Oncol.* 2009;27(31):5168-5174. doi:10.1200/JCO.2008.20.8934
  24. Schumich A, Maurer-Granofszky M, Attarbaschi A, et al. Flow-cytometric minimal residual disease monitoring in blood predicts relapse risk in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia in trial AIEOP-BFM-ALL 2000. *Pediatr Blood Cancer.* 2019;66(5):e27590. doi:10.1002/PBC.27590
  25. Delgado JA, Guillén-Grima F, Moreno C, et al. A simple flow-cytometry method to

- evaluate peripheral blood contamination of bone marrow aspirates. *J Immunol Methods*. 2017;442:54-58. doi:10.1016/j.jim.2016.12.006
26. Holdrinet RS, von Egmond J, Wessels JM, Haanen C. A method for quantification of peripheral blood admixture in bone marrow aspirates. *Exp Hematol*. 1980;8(1):103-107.
  27. Brooimans RA, Kraan J, van Putten W, Cornelissen JJ, Löwenberg B, Gratama JW. Flow cytometric differential of leukocyte populations in normal bone marrow: Influence of peripheral blood contamination. *Cytom Part B - Clin Cytom*. 2009;76(1):18-26. doi:10.1002/cyto.b.20439
  28. Szubert B, Cole JE, Monaco C, Drozdov I. Structure-preserving visualisation of high dimensional single-cell datasets. *Sci Reports* 2019 91. 2019;9(1):1-10. doi:10.1038/s41598-019-45301-0
  29. Ding J, Condon A, Shah SP. Interpretable dimensionality reduction of single cell transcriptome data with deep generative models. *Nat Commun* 2018 91. 2018;9(1):1-13. doi:10.1038/s41467-018-04368-5
  30. Langerak AW, Groenen PJTA, Brüggemann M, et al. EuroClonality/BIOMED-2 guidelines for interpretation and reporting of Ig/TCR clonality testing in suspected lymphoproliferations. *Leuk* 2012 2610. 2012;26(10):2159-2171. doi:10.1038/leu.2012.246
  31. Brüggemann M, Kotrová M, Knecht H, et al. Standardized next-generation sequencing of immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations for MRD marker identification in acute lymphoblastic leukaemia; a EuroClonality-NGS validation study. *Leukemia*. 2019;33(9):2241-2253. doi:10.1038/S41375-019-0496-7
  32. Zaliouva M, Stuchly J, Winkowska L, et al. Genomic landscape of pediatric B-other acute lymphoblastic leukemia in a consecutive European cohort. *Haematologica*. 2019;104(7):1396. doi:10.3324/HAEMATOL.2018.204974
  33. Hrusak O, de Haas V, Stancikova J, et al. International cooperative study identifies treatment strategy in childhood ambiguous lineage leukemia. *Blood*. 2018;132(3):264-276. doi:10.1182/blood-2017-12-821363
  34. Novakova M, Zaliouva M, Fiser K, et al. *DUX4r*, *ZNF384r* and *PAX5-P80R* mutated B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia frequently undergo monocytic switch. *Haematologica*. 2021;106(8):2066-2075. doi:10.3324/HAEMATOL.2020.250423
  35. Barbora V, Michaela N, Petr Ř, et al. CD38: A target in relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia—Limitations in treatment and diagnostics. *Pediatr Blood Cancer*. Published online May 20, 2022:e29779. doi:10.1002/PBC.29779
  36. Krejcik J, Frerichs KA, Nijhof IS, et al. Monocytes and granulocytes reduce CD38 expression levels on myeloma cells in patients treated with daratumumab. *Clin Cancer Res*. 2017;23(24):7498-7511. doi:10.1158/1078-0432.CCR-17-2027
  37. Möricke A, Zimmermann M, Reiter A, et al. Long-term results of five consecutive trials in childhood acute lymphoblastic leukemia performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 2000. *Leuk* 2010 242. 2009;24(2):265-284. doi:10.1038/leu.2009.257

38. Zwaan CM, Kolb EA, Reinhardt D, et al. Collaborative efforts driving progress in pediatric acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 2015;33(27):2949-2962. doi:10.1200/JCO.2015.62.8289
39. Kawamoto H, Ikawa T, Masuda K, Wada H, Katsura Y. A map for lineage restriction of progenitors during hematopoiesis: the essence of the myeloid-based model. *Immunol Rev*. 2010;238(1):23-36. doi:10.1111/J.1600-065X.2010.00959.X
40. Li J, Barreda DR, Zhang YA, et al. B lymphocytes from early vertebrates have potent phagocytic and microbicidal abilities. *Nat Immunol* 2006 710. 2006;7(10):1116-1124. doi:10.1038/ni1389
41. Pulikkan JA, Tenen DG, Behre G. C/EBP $\alpha$  deregulation as a paradigm for leukemogenesis. *Leukemia*. 2017;31(11):2279-2285. doi:10.1038/leu.2017.229
42. Luc S, Luis TC, Boukarabila H, et al. The earliest thymic T cell progenitors sustain B cell and myeloid lineage potential. *Nat Immunol* 2012 134. 2012;13(4):412-419. doi:10.1038/ni.2255
43. Kotrova M, Musilova A, Stuchly J, et al. Distinct bilineal leukemia immunophenotypes are not genetically determined. *Blood*. 2016;128(18):2263-2266. doi:10.1182/BLOOD-2016-07-725861
44. Mejstrikova E, Volejnikova J, Fronkova E, et al. Prognosis of children with mixed phenotype acute leukemia treated on the basis of consistent immunophenotypic criteria. *Haematologica*. 2010;95(6):928-935. doi:10.3324/haematol.2009.014506
45. Gerr H, Zimmermann M, Schrappe M, et al. Acute leukaemias of ambiguous lineage in children: characterization, prognosis and therapy recommendations. *Br J Haematol*. 2010;149(1):84-92. doi:10.1111/J.1365-2141.2009.08058.X
46. Matutes E, Pickl WF, Veer MVNT, et al. Mixed-phenotype acute leukemia: clinical and laboratory features and outcome in 100 patients defined according to the WHO 2008 classification. *Blood*. 2011;117(11):3163-3171. doi:10.1182/BLOOD-2010-10-314682
47. Heesch S, Neumann M, Schwartz S, et al. Acute leukemias of ambiguous lineage in adults: Molecular and clinical characterization. *Ann Hematol*. 2013;92(6):747-758. doi:10.1007/s00277-013-1694-4
48. Pagni F, Fazio G, Zannella S, et al. The role of PAX5 and C/EBP  $\alpha/\beta$  in atypical non-Langerhans cell histiocytic tumor post acute lymphoblastic leukemia. *Leuk* 2014 286. 2014;28(6):1377-1379. doi:10.1038/leu.2014.87
49. Waanders E, Hebeda KM, Kamping EJ, et al. Independent development of lymphoid and histiocytic malignancies from a shared early precursor. *Leukemia*. 2016;30(4):955-958. doi:10.1038/LEU.2015.193
50. Rossi JG, Bernasconi AR, Alonso CN, et al. Lineage switch in childhood acute leukemia: An unusual event with poor outcome. *Am J Hematol*. 2012;87(9):890-897. doi:10.1002/AJH.23266
51. Grammatico S, Vitale A, La Starza R, et al. Lineage switch from pro-B acute lymphoid leukemia to acute myeloid leukemia in a case with t(12;17)(p13;q11)/TAF15-ZNF384 rearrangement. *Leuk Lymphoma*. 2013;54(8):1802-1805.



doi:10.3109/10428194.2012.753450/SUPPL\_FILE/DISCLOSURE.ZIP

52. Cirovic B, Schönheit J, Kowenz-Leutz E, et al. C/EBP-Induced Transdifferentiation Reveals Granulocyte-Macrophage Precursor-like Plasticity of B Cells. *Stem Cell Reports*. 2017;8(2):346-359. doi:10.1016/J.STEMCR.2016.12.015
53. Wang X, Scott E, Sawyers CL, Friedman AD. C/EBP $\alpha$  Bypasses Granulocyte Colony-Stimulating Factor Signals to Rapidly Induce PU.1 Gene Expression, Stimulate Granulocytic Differentiation, and Limit Proliferation in 32D cl3 Myeloblasts. *Blood*. 1999;94(2):560-571. doi:10.1182/BLOOD.V94.2.560
54. Shamsasenjan K, Otsuyama KI, Abroun S, et al. IL-6-induced activation of MYC is responsible for the down-regulation of CD33 expression in CD33(+) myeloma cells. *Int J Hematol* 2009 893. 2009;89(3):310-318. doi:10.1007/S12185-009-0256-Y
55. Pan J, Tan Y, Deng B, et al. Frequent occurrence of CD19-negative relapse after CD19 CAR T and consolidation therapy in 14 TP53-mutated r/r B-ALL children. *Leuk* 2020 3412. 2020;34(12):3382-3387. doi:10.1038/s41375-020-0831-z
56. Cordoba S, Onuoha S, Thomas S, et al. CAR T cells with dual targeting of CD19 and CD22 in pediatric and young adult patients with relapsed or refractory B cell acute lymphoblastic leukemia: a phase 1 trial. *Nat Med* 2021 2710. 2021;27(10):1797-1805. doi:10.1038/s41591-021-01497-1
57. Cooper ML, Choi J, Staser K, et al. An “off-the-shelf” fratricide-resistant CAR-T for the treatment of T cell hematologic malignancies. *Leuk* 2018 329. 2018;32(9):1970-1983. doi:10.1038/s41375-018-0065-5
58. Kim MY, Yu KR, Kenderian SS, et al. Genetic Inactivation of CD33 in Hematopoietic Stem Cells to Enable CAR T Cell Immunotherapy for Acute Myeloid Leukemia. *Cell*. 2018;173(6):1439-1453.e19. doi:10.1016/J.CELL.2018.05.013
59. Fronkova E, Mejstrikova E, Avigad S, et al. Minimal residual disease (MRD) analysis in the non-MRD-based ALL IC-BFM 2002 protocol for childhood ALL: is it possible to avoid MRD testing? *Leukemia*. 2008;22(5):989-997. doi:10.1038/LEU.2008.22
60. Steinherz PG, Gaynon PS, Breneman JC, et al. Cytoreduction and prognosis in acute lymphoblastic leukemia--the importance of early marrow response: report from the Childrens Cancer Group. <https://doi.org/10.1200/JCO1996142389>. 2016;14(2):389-398. doi:10.1200/JCO.1996.14.2.389
61. Lukes JJ, Winkowska L, Zwyrtkova M, et al. Identification of Fusion Gene Breakpoints is Feasible and Facilitates Accurate Sensitive Minimal Residual Disease Monitoring on Genomic Level in Patients With PML-RARA, CBFM-MYH11, and RUNX1-RUNX1T1. *HemaSphere*. 2020;4(6):e489. doi:10.1097/HS9.0000000000000489
62. Kotrova M, Van Der Velden VHJ, Van Dongen JJM, et al. Next-generation sequencing indicates false-positive MRD results and better predicts prognosis after SCT in patients with childhood ALL. *Bone Marrow Transplant* 2017 527. 2017;52(7):962-968. doi:10.1038/bmt.2017.16
63. Kotrova M, Muzikova K, Mejstrikova E, et al. The predictive strength of next-generation sequencing MRD detection for relapse compared with current methods in childhood ALL. *Blood*. 2015;126(8):1045-1047. doi:10.1182/BLOOD-2015-07-

655159

64. Gener G, Espasa A, Raya M, Vergara S, Juncà J, Sorigue M. Brief communication: Distribution of bone marrow cell subsets and hemodilution in patients with acute leukemia. *Int J Lab Hematol*. 2020;42(4):e192-e195. doi:10.1111/ijlh.13243
65. Loken MR, Chu SC, Fritschle W, Kalnoski M, Wells DA. Normalization of bone marrow aspirates for hemodilution in flow cytometric analyses. *Cytom Part B - Clin Cytom*. 2009;76(1):27-36. doi:10.1002/cyto.b.20429
66. Yasuda T, Tsuzuki S, Kawazu M, et al. Recurrent DUX4 fusions in B cell acute lymphoblastic leukemia of adolescents and young adults. *Nat Genet* 2016 485. 2016;48(5):569-574. doi:10.1038/ng.3535
67. Passet M, (GRAALL) on behalf of the G for R on AA, Boissel N, et al. PAX5 P80R mutation identifies a novel subtype of B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia with favorable outcome. *Blood*. 2019;133(3):280-284. doi:10.1182/BLOOD-2018-10-882142
68. Zaliova M, Potuckova E, Lukes J, et al. Frequency and prognostic impact of ZEB2 H1038 and Q1072 mutations in childhood B-other acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2021;106(3):886-890. doi:10.3324/HAEMATOL.2020.249094
69. Tasian SK, Loh ML, Hunger SP. Philadelphia chromosome–like acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2017;130(19):2064-2072. doi:10.1182/BLOOD-2017-06-743252

## 8 Seznam příloh

---

### 8.1 Příloha 1

Ondrej Hrusak, Valerie de Haas, Jitka Stancikova, **Barbora Vkrmanova** et. al.; International cooperative study identifies treatment strategy in childhood ambiguous lineage leukemia. *Blood* 2018; 132 (3): 264–276. doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2017-12-821363>

**IF<sub>2018</sub> = 16.601**

### 8.2 Příloha 2

Novakova M, Zaliova M, Fiser K, **Vkrmanova B.** et al. *DUX4r*, *ZNF384r* and *PAX5-P80R* mutated B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia frequently undergo monocytic switch. *Haematologica*. 2021;106(8):2066-2075. doi:10.3324/HAEMATOL.2020.250423

**IF<sub>2020</sub> = 9.941**

### 8.3 Příloha 3

**Vkrmanova** et. al. *Profiling by mass cytometry of DUX4r, PAX5-P80R and ZNF384r subsets identifies unique pattern of lineage switch.*

**Rukopis v přípravě**

### 8.4 Příloha 4

**Vkrmanova B.**, Novakova M., Riha P., et al. CD38: A target in relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia—Limitations in treatment and diagnostics. *Pediatr Blood Cancer*. Published online May 20, 2022:e29779. doi:10.1002/PBC.29779

**IF<sub>2022</sub> = 3.167**

### 8.5 Příloha 5

**Vkrmanova B**, Fronkova E, Zuna J, et al. Blast clearance after one week of corticosteroids correlates with outcome and genetics but does not justify adding a residual disease time point in acute lymphoblastic leukemia treatment. *Leuk Lymphoma*. 2021;62(3):752-754. doi:10.1080/10428194.2020.1839659

**IF<sub>2020</sub> = 3.280**