

Teofila Książek<sup>1</sup>, Katarzyna Pawińska-Wąsikowska<sup>1</sup>, Małgorzata Szurgot<sup>1</sup>, Michał Matysiak<sup>2</sup>, Barbara Fic-Sikorska<sup>2</sup>, Elżbieta Adamkiewicz-Drożyńska<sup>3</sup>, Lucyna Maciejka-Kapuścinska<sup>3</sup>, Alicja Chybicka<sup>4</sup>, Kinga Potocka<sup>4</sup>, Jacek Wachowiak<sup>5</sup>, Jolanta Skalska-Sadowska<sup>5</sup>, Jerzy R. Kowalczyk<sup>6</sup>, Beata Wójcik<sup>6</sup>, Mariusz Wysocki<sup>7</sup>, Sylwia Kołtan<sup>7</sup>, Maryna Krawczuk-Rybak<sup>8</sup>, Katarzyna Muszyńska-Roślan<sup>8</sup>, Wojciech Młynarski<sup>9</sup>, Małgorzata Stolarska<sup>9</sup>, Tomasz Urasiński<sup>10</sup>, Elżbieta Kamieńska<sup>10</sup>, Tomasz Szczepański<sup>11</sup>, Renata Tomaszewska<sup>11</sup>, Grażyna Sobol-Milejska<sup>12</sup>, Agnieszka Mizia-Malarz<sup>12</sup>, Grażyna Karolczyk<sup>13</sup>, Jolanta Podhorecka<sup>13</sup>, Maria Wieczorek<sup>14</sup>, Irena Karpińska-Derda<sup>14</sup>, \*Walentyna Balwierz<sup>1</sup>

## Nieprawidłowości genetyczne w ostrej białaczce szpikowej u dzieci w Polsce

### Genetic abnormalities in children with acute myeloid leukemia in Poland

<sup>1</sup>Klinika Onkologii i Hematologii Dziecięcej, Polsko-Amerykański Instytut Pediatrii, Collegium Medicum, Uniwersytet Jagielloński, Kraków  
Kierownik Kliniki: prof. dr hab. med. Walentyna Balwierz

<sup>2</sup>Katedra i Klinika Pediatrii, Hematologii i Onkologii, Warszawski Uniwersytet Medyczny  
Kierownik Katedry i Kliniki: prof. dr hab. med. Michał Matysiak

<sup>3</sup>Klinika Pediatrii, Hematologii, Onkologii i Endokrynologii, Uniwersytet Medyczny, Gdańsk  
Kierownik Kliniki: prof. dr hab. med. Elżbieta Adamkiewicz-Drożyńska

<sup>4</sup>Katedra i Klinika Transplantologii, Onkologii i Hematologii Dziecięcej, Uniwersytet Medyczny, Wrocław  
Kierownik Katedry i Kliniki: prof. dr hab. med. Alicja Chybicka

<sup>5</sup>Klinika Onkologii, Hematologii i Transplantologii Pediatricznej, Uniwersytet Medyczny, Poznań  
Kierownik Kliniki: prof. dr hab. med. Jacek Wachowiak

<sup>6</sup>Klinika Hematologii i Onkologii Dziecięcej, Uniwersytet Medyczny, Lublin  
Kierownik Kliniki: prof. dr hab. med. Jerzy Kowalczyk

<sup>7</sup>Katedra i Klinika Pediatrii, Hematologii i Onkologii, Collegium Medicum im. L. Rydygiera, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Bydgoszcz  
Kierownik Katedry i Kliniki: prof. dr hab. med. Mariusz Wysocki

<sup>8</sup>Klinika Hematologii i Onkologii Dziecięcej, Uniwersytet Medyczny, Białystok  
Kierownik Kliniki: prof. dr hab. med. Maryna Krawczuk-Rybak

<sup>9</sup>Klinika Pediatrii, Hematologii, Onkologii i Endokrynologii, Uniwersytet Medyczny, Łódź  
Kierownik Kliniki: prof. dr hab. med. Wojciech Młynarski

<sup>10</sup>I Klinika Chorób Dzieci, Pomorski Uniwersytet Medyczny, Szczecin  
Kierownik Kliniki: prof. dr hab. med. Tomasz Urasiński

<sup>11</sup>Katedra i Klinika Pediatrii, Hematologii i Onkologii, Śląski Uniwersytet Medyczny, Katowice  
Kierownik Katedry i Kliniki: prof. dr hab. med. Tomasz Szczepański

<sup>12</sup>Klinika Pediatrii, Oddział Onkologii, Hematologii i Chemioterapii Dziecięcej, Śląski Uniwersytet Medyczny, Katowice  
Kierownik Kliniki: prof. dr hab. med. Halina Woś

<sup>13</sup>Oddział Hematologii i Onkologii Dziecięcej, Wojewódzki Specjalistyczny Szpital Dziecięcy, Kielce  
Kierownik Oddziału: lek. Grażyna Karolczyk

<sup>14</sup>Oddział Onkologii i Hematologii Dziecięcej, Chorzowskie Centrum Pediatrii i Onkologii  
Kierownik Oddziału: dr med. Maria Wieczorek

#### Słowa kluczowe

ostra białaczka szpikowa, dzieci, mutacja FLT3/ITD, geny fuzyjne, nadekspresja *WT1*

#### Key words

acute myeloid leukemia, children, FLT3/ITD mutation, fusion genes, *WT1* overexpression

#### Streszczenie

**Wstęp.** Ostra białaczka szpikowa (AML) jest niejednorodną i rzadko występującą chorobą nowotworową układu krwiotwórczego u dzieci. Pomimo stosowania intensywnych metod leczenia, uzyskiwane wyniki terapii są ciągle niezadowalające. W celu lepszego poznania biologii AML, w ośrodkach Polskiej Pediatricznej Grupy ds. Leczenia Białaczek i Chłoniaków (PPGLBC) w 2006 roku rozszerzono diagnostykę zaburzeń genetycznych o badania w kierunku występowania genów fuzyjnych *RUNX1(AML1)-RUNX1T1(ETO)*, *PML-RARα*, *CBFβ-MYH11* i nadekspresji genu *WT1*.

**Cel pracy.** Celem pracy jest ocena częstości występowania wybranych zaburzeń genetycznych u dzieci z AML w Polsce oraz określenie ich znaczenia prognostycznego.

**Materiał i metody.** Molekularnymi badaniami genetycznymi objęto grupę 174 dzieci do 18 roku życia, u których leczenie z powodu *de novo* AML rozpoczęto w latach 2006-2012. Materiał badawczy stanowił szpik kostny pobrany w czasie diagnozy, z którego izolowano komórki mononuklearne i następnie materiał genetyczny w postaci próbek DNA i RNA. Do oznaczenia występowania genów fuzyjnych stosowano reakcję real-time PCR. Badano także ekspresję genu *WT1*. Mutację FLT3/ITD wykrywano za pomocą reakcji PCR obejmującej egzon 14 i 15 genu *FLT3*.

**Wyniki.** Geny fuzyjne: *RUNX1(AML1)-RUNX1T1(ETO)*, *CBFβ-MYH11*, *PML-RARα* stwierdzono odpowiednio u: 16,2; 4,8 i 6,6% badanych dzieci. Obecność mutacji FLT3/ITD wykryto w 18 przypadkach (10,4%). Spośród 148 badanych chorych 120 (81,1%) prezentowało wstępnie nadekspresję genu *WT1*.

**Wnioski.** W porównaniu do danych literaturowych częstość transkryptu genu fuzyjnego *RUNX1(AML1)-RUNX1T1(ETO)* w przebadanym materiale była nieco wyższa, podczas gdy *CBFβ-MYH11*, *PML-RARα*, nadekspresja genu *WT1* i duplikacja w genie *FLT3* były stwierdzane rzadziej. Zgodnie z najnowszymi rekomendacjami planuje się rozszerzenie badań poprzez oznaczanie dodatkowych genów fuzyjnych, m.in. rearanżacji chromosomu oraz mutacji w genach *NPM1*, *WT1* i *CEPBA*. Stwierdzone zaburzenia genetyczne pozwolą na bardziej precyzyjną stratyfikację do grup terapeutycznych i indywidualizację terapii, co może przyczynić się do dalszej poprawy wyników leczenia i jakości życia pacjentów z AML.

## Summary

**Introduction.** Acute myeloid leukemia (AML) is a heterogeneous and rare disease in children. Despite an intensive treatment, therapy results are still unsatisfactory. For better understanding the biology of AML, in 2006 the centers of Polish Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group (PPGLBC) extended genetic diagnostics for detection of *RUNX1(AML1)-RUNX1T1(ETO)*, *PML-RARα*, *CBFβ-MYH11* fusion genes as well as *WT1* gene overexpression.

**Aim.** The aim of the study was to assess the prevalence of selected genetic abnormalities in children with AML in Poland and the attempt to determine their prognostic significance.

**Material and methods.** Molecular genetic studies included a group of 174 children under the age of 18 with *de novo* diagnosed AML from March 2006 to October 2012. The research material consisted of bone marrow samples collected at the time of diagnosis, from which mononuclear cells and later DNA and RNA samples were isolated. To determine the presence of fusion genes and the expression level of *WT1* gene real-time PCR reaction was used. FLT3/ITD mutation was detected by PCR reaction of exon 14 and 15 of the *FLT3* gene.

**Results.** The presence of fusion genes transcript of *RUNX1(AML1)-RUNX1T1(ETO)*, *CBFβ-MYH11*, *PML-RARα* was found in 16.2, 4.8 and 6.6% respectively. FLT3/ITD mutation were found in 18 cases (10.4%). Out of 148 examined children, 120 (81.1%) presented initially overexpression of *WT1* gene.

**Conclusions.** Compared to literature data, determined incidence of fusion gene transcript *RUNX1(AML1)-RUNX1T1(ETO)* in the examined material was slightly higher, while *CBFβ-MYH11*, *PML-RARα*, overexpression of *WT1* gene and the presence of FLT3/ITD mutation were reported less frequently. According to the experts recommendations it is planned to extend the molecular research to additional fusion genes among others chromosome rearrangements and determination of mutations in *NPM1*, *WT1* and *CEPBA*. Finding additional prognostic factors in AML will allow for a more precise stratification for therapeutic groups and individualization of treatment, which may lead to improvement of the treatment outcomes and the patient quality of life.

## Adres/address:

\*Walentyna Balwierz  
Klinika Onkologii i Hematologii Dziecięcej  
Polsko-Amerykański Instytut Pediatrii  
Collegium Medicum  
Uniwersytet Jagielloński  
ul. Wielicka 265, 30-663 Kraków  
tel./fax +48 (12) 658-02-61  
balwierz@mp.pl

## WSTĘP

Ostra białaczka szpikowa (ang. *acute myeloid leukemia* – AML) stanowi heterogeniczną grupę chorób nowotworowych mieloidalnego układu krwiotwórczego, różnicowaną zarówno pod względem przebiegu, odpowiedzi na prowadzone leczenie, jak i zmian cytogenetycznych i mutacji genowych. AML jest chorobą rzadką, występującą z częstością 7 przypadków na milion dzieci poniżej 15 roku życia (1). W ciągu ostatnich kilku dekad, dzięki zastosowaniu intensywnej chemioterapii i prowadzeniu skutecznego leczenia wspomagającego uzyskano znaczący wzrost przeżywalności (2, 3). Nadal jednak wyniki leczenia AML są niezadowalające, bo obecnie tylko oko-

ło 60% dzieci z AML uzyskuje wieloletnie bezobjawowe przeżycia, a przeprowadzone intensywne leczenie może mieć niekorzystny wpływ na jakość życia z powodu dużego ryzyka wystąpienia odległych powikłań (2). Uzyskana poprawa wyleczalności pacjentów z AML jest związana m.in. z właściwym dostosowywaniem sposobu i intensywności leczenia do istotnych czynników prognostycznych, w tym także zmian cytogenetycznych i mutacji genowych (1, 4-6). W AML wśród genetycznych zmian molekularnych, mających istotne znaczenie rokownicze wyróżniają się mutacje w takich genach jak: *WT1*, receptorowej kinazy tyrozynowej *FLT3*, genie *NPM1* kodującym nukleofosminę (białko uczestniczące w transporcie pomiędzy jądrem

i cytoplazmą) oraz białeliczną mutację w genie *CEPBA*, kodującym czynnik transkrypcyjny uczestniczący w regulacji proliferacji komórek (7-10). Istotne prognostycznie zmiany genetyczne związane są także z charakterystycznymi dla białaczek translokacjami chromosomowymi, powodującymi powstanie genów fuzyjnych, odpowiedzialnych za produkcję nieprawidłowych białek i stwierdzone zmiany chorobowe. Do korzystnych nieprawidłowości genetycznych w AML zalicza się obecność zrównoważonych translokacji, takich jak: t(8;21)(q22;q22), inv(16) lub t(16;16)(p13.1;q22) oraz t(15;17)(q22;q12), prowadzących do powstania odpowiednio następujących genów fuzyjnych: *RUNX1(AML1)-RUNX1T1(ETO)*, *CBFβ-MYH11* oraz *PML-RARα* (11, 12). Każda z tych zmian łączy się z charakterystycznymi cechami klinicznymi i morfologicznymi choroby. Ostatnie wyniki badań w dziedzinie diagnostyki genetycznej w AML wykorzystano w nowej klasyfikacji AML opracowanej przez Światową Organizację Zdrowia (World Health Organization – WHO), opartej głównie na stwierdzonych nieprawidłowościach cytogenetycznych i molekularnych (13).

Wyniki badań prowadzonych nad biologią AML, w tym dotyczących nieprawidłowości genetycznych, pozwoliły nie tylko na wyodrębnienie nowych czynników prognostycznych, ale również na lepszą stratyfikację pacjentów do różnych grup terapeutycznych. Stwierdzone zmiany genetyczne, jako swoiste markery, mogą być wykorzystane do monitorowania minimalnej choroby resztkowej (ang. *minimal residual disease* – MRD) (14, 15), a także stanowić podstawę do zastosowania leczenia zgodnie z prezentowanymi zmianami genetycznymi (terapia ukierunkowana). Stwierdzenie w ostrej białaczce promiocytozowej (ang. *acute promyelocytic leukemia* – APL) genu fuzyjnego *PML-RARα* i kodowanego przez niego patologicznego białka było podstawą do zastosowania w tej białaczce dodatkowo kwasu all-trans retinowego (ang. *all-trans-retinoic acid* – ATRA), co przyczyniło się do znaczącej poprawy wyników terapii w tym typie AML (16, 17).

Lepsze poznanie biologii AML przyczynia się do wyodrębnienia nowych czynników rokowniczych pozwalających na bardziej precyzyjną stratyfikację do grup terapeutycznych, indywidualizację terapii i może spowodować poprawę wyleczalności również w innych niż APL typach ostrej białaczki szpikowej. Dlatego w 2006 roku u dzieci z AML leczonych w ośrodkach Polskiej Pediatricznej Grupy ds. Leczenia Białaczek i Chłoniaków (PPGLBC) podjęto badania molekularne w celu oszacowania częstości występowania nieprawidłowości molekularnych i oceny ich wpływu na wyniki leczenia.

## CEL PRACY

Celem pracy jest ocena częstości występowania nieprawidłowości genetycznych oznaczanych za pomocą badań molekularnych u dzieci z AML w Polsce oraz określenie ich znaczenia prognostycznego.

## MATERIAŁ I METODY

W okresie od 1 marca 2006 do 30 września 2012 roku w 14 ośrodkach PPGLBC objęto lecze-

niem według jednolitego protokołu AML-BFM 2004 INTERIM (3) 291 pacjentów do 18 r.ż. z nowo rozpoznaną pierwotną AML. Molekularnymi badaniami genetycznymi objęto 174 (59,8%) dzieci, od których uzyskano próbkę szpiku kostnego pobraną przed rozpoczęciem leczenia. Dzieci były klasyfikowane do dwóch grup: standardowego (SR) i wysokiego (HR) ryzyka (tab. 1). Szczegóły dotyczące sposobu leczenia i stratyfikacji do grup ryzyka przedstawiono w innym artykule (3). Charakterystykę kliniczną poddanych ocenie pacjentów przedstawiono w tabeli 2. Badania prowadzono zgodnie z wymogami Deklaracji Helsińskiej, uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego, a od pacjentów i ich opiekunów prawnych uzyskiwano świadomą zgodę na uczestnictwo w badaniu.

**Tabela 1.** Grupy ryzyka w AML u dzieci wg programu AML-BFM 2004 INTERIM.

Grupa ryzyka	
standardowego	wysokiego
AML w zespole Downa	AML M0
AML M1/M2 bez <sup>1,2</sup> z pałkami Auera	AML M1/M2 bez pałek Auera
AML, M4Eo bez <sup>1,2</sup>	AML M1/M2 z <sup>1</sup> lub <sup>2</sup>
AML, t(8;21) bez <sup>1,2</sup>	AML M4 nie Eo
AML, inv(16) bez <sup>1,2</sup>	AML M4 z <sup>1</sup> lub <sup>2</sup>
AML M3, t(15;17)	AML M5/M6/M7

<sup>1</sup>obecna mutacja FLT3/ITD

<sup>2</sup>blasty > 5% w szpiku kostnym w 15. dniu leczenia

Materiał badawczy stanowiły próbki szpiku kostnego pobierane od dzieci w czasie diagnozy. Z próbek szpiku izolowano w gradiencie gęstości (Ficoll, GE Healthcare Life Sciences) komórki jednojądrzaste, z których następnie izolowano materiał genetyczny w postaci DNA (izolowane za pomocą DNA Extraction kit – MasterPure™ Purification Kit for Blood Version II, Epicentre Biotechnology) oraz RNA (izolowane przy użyciu TRIzol Reagent, Life Technologies Invitrogen). Do przeprowadzenia jakościowej reakcji RT-PCR i RQ-PCR transkryptów genów fuzyjnych (*RUNX1[AML1]-RUNX1T1[ETO]*, *CBFβ-MYH11*, *PML-RARα*/podtypy bcr 1 i bcr 3) zastosowano protokół opracowany przez Europe Against Cancer Program (15). Do syntezy cDNA każdorazowo używano 1 µg całkowitego RNA. Badano także ekspresję genu *WT1* za pomocą ilościowej reakcji RQ-PCR przy użyciu sond TaqMan (18) w oparciu o krzywe standardowe rozcieńczeń gotowych plazmidów zakupionych w firmie IPSOGEN. Analizę bezwzględnej liczby kopii transkryptu genu *WT1* przeprowadzono poprzez normalizację w stosunku do 10 tys. kopii transkryptu genu kontrolnego – *ABL*. Próbkę wyizolowanego DNA badano pod kątem obecności wewnętrznej tandemowej duplikacji (FLT3/ITD) w genie *FLT3* za pomocą reakcji PCR obejmującej egzon 14 i 15 genu *FLT3* (19). Produkty po amplifikacji rozdzielano w 3% żelu agarozowym wybarwionym bromkiem etydy.



**Tabela 2.** Charakterystyka pacjentów z ostrą białaczką szpikową leczonych w ośrodkach Polskiej Pediatricznej Grupy ds. Leczenia Białacek i Chłoniaków w latach 2006-2012.

Badany parametr	Grupa SR	Grupa HR	Razem
Liczba (odsetek) pacjentów	61 (35,1%)	113 (64,9%)	174
Wiek (lata) mediana (zakres)	8,0 (0,1-17,9)	11,2 (0,2-17,74)	10,7 (0,1-17,9)
Płeć:			
żeńską	30	51	81
męską	31	62	93
Leukocyty ( $\times 10^9/L$ ) mediana (zakres)	15,2 (1,0-352,0)	27,7 (1,1-573)	20,85 (1,0-573)
Typy wg FAB			
M0	1 (0,6%)*	17 (9,8%)	18 (10,3%)
M1	11 (6,3%)*	18 (10,3%)	29 (16,7%)
M2	31 (17,8%)	16 (9,2%)	47 (27,0%)
M3	15 (8,6%)	–	15 (8,6%)
M4	2 (1,2%)	30 (17,2%)	32 (18,4%)
M5	–	24 (13,8%)	24 (13,8%)
M6	1 (0,6%)*	1 (0,6%)	2 (1,1%)
M7	–	6 (3,4%)	6 (3,4%)
SG	–	1 (0,6%)	1 (0,6%)
Odsetek blastów w szpiku kostnym w 15. dniu chemioterapii			
≤ 5%	49 (28,2%)	82 (47,1%)	131 (75,3%)
> 5%	8 (4,6%)	24 (13,8%)	32 (18,4%)
Brak danych	4 (0,9%)	7 (4,0%)	11 (6,3%)
Wewnętrzna tandemowa duplikacja w genie <i>FLT3</i> (FLT3/ITD)			
Obecna	4/61 (6,6%)**	14/113 (12,4%)	18/174 (10,4%)

\*AML w zespole Downa

\*\*Obecność FLT3/ITD, kwalifikuje pacjenta do HR, wyjątek stanowią dzieci z zespołem Downa i białaczką promielocytową

SR – grupa standardowego ryzyka, HR – grupa wysokiego ryzyka, SG – mięsak granulocytarny

Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu pakietu STATISTICA, version 10, StatSoft Inc. (2011), za pomocą testów nieparametrycznych: Manna-Whitneya i analizy rang Kruskana-Wallis. Analizę przeżycia przeprowadzono metodą Kaplana-Meiera z testem istotności log-rank. We wszystkich analizach wartość  $p$  poniżej 0,05 ( $p < 0,05$ ) była uznawana za istotną statystycznie. Obserwację pacjentów zakończono 30 grudnia 2012 roku.

## WYNIKI

**Wstępne genotypowanie przeprowadzono na próbkach szpiku kostnego otrzymanych od 174 dzieci z AML.** W 167 (96%) przypadkach uzyskano jednoznaczne wyniki, w pozostałych 7 (4%) przypadkach

zła jakość wyizolowanego materiału (RNA) uniemożliwiła oznaczenie obecności genów fuzyjnych i ekspresji genu *WT1*. U 27 (16,2%) pacjentów wykryto transkrypt genu fuzyjnego *RUNX1(AML1)-RUNX1T1(ETO)*, u 8 (4,8%) dzieci stwierdzono transkrypt genu *CBFB-MYH11*. Gen fuzyjny *PML-RAR $\alpha$*  oznaczony w podtypach bcr 1 i bcr 3 wykryto w 11 (6,6%) przypadkach (tab. 3). Translokacja t(8;21) (q22;q22) przeważała w typie M2 ( $n = 20$ ), wykryto ją jednak także u dzieci z typem FAB M1 ( $n = 5$ ) i po jednym przypadku z mięsakiem granulocytarnym (ang. *sarcoma granulocyticum* – SG) oraz M0. Inv(16) występowała w typie M4. Stwierdzony u 11 pacjentów gen fuzyjny *PML-RAR $\alpha$*  był obecny tylko w APL.

Spośród 174 badanych dzieci z AML u 18 (10,4%) stwierdzono wewnętrzną tandemową duplikację w genie *FLT3*. Obecność mutacji FLT3/ITD kwalifikowała pacjenta do grupy HR, wyjątek stanowiły dzieci z zespołem Downa i białaczką promielocytową. Wśród 113 pacjentów w HR, mutację FLT3/ITD stwierdzono u 14 (12,4%). W pozostałych 4 przypadkach z FLT3/ITD równocześnie wykazano obecność transkryptów genu fuzyjnego *PML-RAR $\alpha$* .

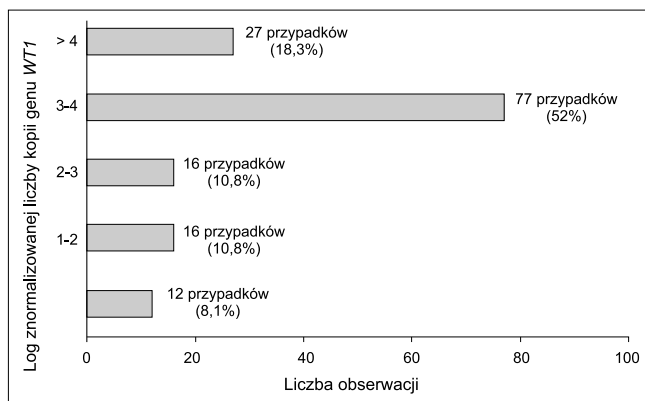
Wśród 174 pacjentów, u których przeprowadzono wstępne genotypowanie, u 148 (85,1%) uzyskano wyniki ekspresji genu *WT1*, umożliwiające analizę ilościową. Nadekspresję tego genu, co najmniej o dwa rzędy wielkości wyższą od genu kontrolnego, pozwalającą na pomiar MRD, prezentowało 120 (81,1%) dzieci (ryc. 1). Nie wykazano istotnych różnic w poziomie ekspresji genu *WT1* w zależności od grupy ryzyka ( $p > 0,1$ ). Stwierdzono jednak istotnie niższą ekspresję tego genu w przypadku podtypu FAB M5 w stosunku do podtypów M1 i M3 ( $p < 0,001$ ). Najwyższy poziom ekspresji występował w podtypie M3. Nie zaobserwowano także istotnych różnic w znormalizowanej liczbie transkryptów genu *WT1* w zależności od obecnych oznaczanych genów fuzyjnych ( $p = 0,08$ ). Natomiast w grupie pacjentów ze stwierdzoną mutacją FLT3/ITD stwierdzono istotnie statystycznie wyższy poziom ekspresji genu *WT1* ( $p < 0,005$ ) niż w grupie bez tej nieprawidłowości genowej.

Wykazano wyższy odsetek ponad 5-letnich przeżyć całkowitych (OS) w grupie SR (82,9%) w porównaniu do HR (57,2%). Różnica była istotna statystycznie ( $p = 0,015$ ) (ryc. 2). W obrębie grupy HR u pacjentów z obecną mutacją FLT3/ITD ponad 5-letni OS był niższy (42,2%) niż bez tej anomalii (59,8%), ale różnica ta nie była istotna statystycznie ( $p = 0,44$ ) (ryc. 3).

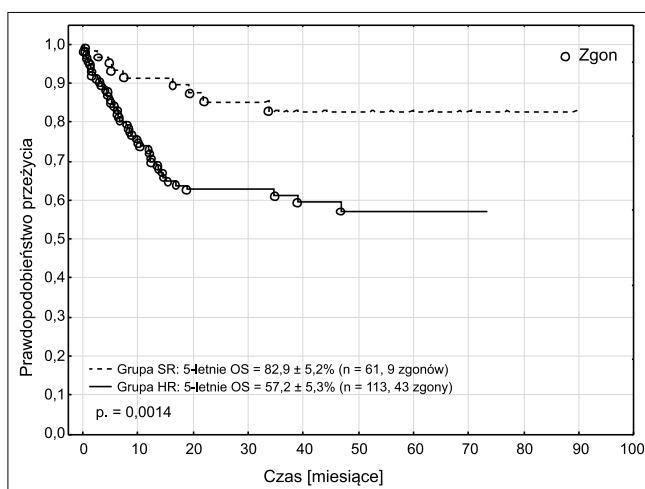
**Tabela 3.** Występowanie genów fuzyjnych u dzieci z AML leczonych w latach 2006-2012 (11-13, 20, 21, 38).

Geny fuzyjne*	Liczba pacjentów	Odsetek pacjentów	Dominujący typ FAB	Częstość
<i>RUNX1(AML1)-RUNX1T1(ETO)</i>	27	16,2%	M2, eozynofilia	12-15%
<i>CBFB-MYH11</i>	8	4,8%	M4Eo, eozynofilia	6-8%
<i>PML-RAR<math>\alpha</math></i>	11	6,6%	M3	8-10%
Podtyp bcr 1	6	3,6%		
Podtyp bcr 3	5	3,0%		

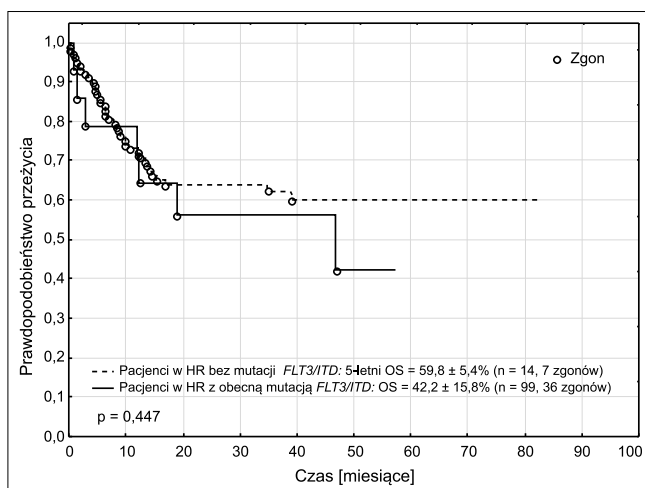
\*analizę wykonano u 167 pacjentów



**Ryc. 1.** Poziom ekspresji genu *WT1* w chwili rozpoznania AML u 148 dzieci. Wartość ekspresji przedstawiono jako logarytm dziesiętny znormalizowanej liczby kopii transkryptu genu *WT1* w stosunku do genu kontrolnego (*ABL*).



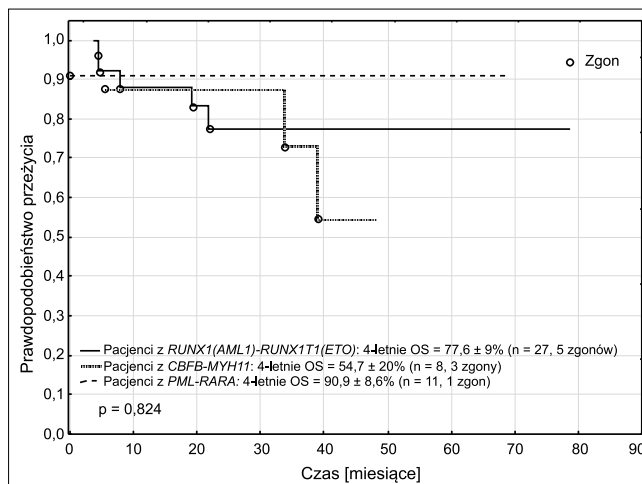
**Ryc. 2.** Krzywe całkowitego przeżycia dla dzieci z AML w zależności od grupy ryzyka.



**Ryc. 3.** Krzywe całkowitego przeżycia dla dzieci z AML w grupie HR w zależności od występowania mutacji *FLT3/ITD*.

Prawdopodobieństwo całkowitego przeżycia w zależności od występowania u pacjenta oznaczanych genów fuzyjnych przedstawiono na rycinie 4. Nie uzyskano istotnych różnic w przypadku krzywych całkowitego przeżycia w zależności od występowania oznaczanych w badaniu genów fuzyjnych ( $p = 0,824$ ). W przypadku

genów fuzyjnych *RUNX1(AML1)-RUNX1T1(ETO)* oraz *PML-RAR $\alpha$*  prawdopodobieństwo 5-letniego OS wynosiło odpowiednio 77,6 i 91%. Wśród 8 dzieci z *inv(16) (CBF $\beta$ -MYH11)* zmarło 3, a ponad 4-letnie OS było na poziomie 54,7% (najdłuższa obserwacja 48 miesięcy). W grupie pacjentów ze stwierdzoną wstępnie nadekspresją genu *WT1*, odsetek ponad 5-letniego OS był podobny (69,9%) do stwierdzonego u dzieci z prawidłową ekspresją tego genu (65,3%).



**Ryc. 4.** Krzywe całkowitego przeżycia dla dzieci z AML w zależności od występowania genów fuzyjnych: *RUNX1(AML1)-RUNX1T1(ETO)*, *CBF $\beta$ -MYH11* oraz *PML-RAR $\alpha$* .

## DYSKUSJA

Na podstawie przeprowadzonych badań molekularnych obecność trzech charakterystycznych dla AML zmian chromosomowych (*RUNX1[AML1]-RUNX1T1[ETO]*, *PML-RAR $\alpha$*  oraz *CBF $\beta$ -MYH11*) w materiale własnym stwierdzono u 27,6% analizowanych dzieci. Wykrycie u pacjenta translokacji *t(15;17)(q22;q12)* potwierdza rozpoznanie APL i wspiera zasadność zastosowania preparatu ATRA. W każdym z powyższych zmian genetycznych zostało udokumentowane korzystne znaczenie prognostyczne, co jest uwzględniane w obecnie stosowanych protokołach terapeutycznych (11, 20, 21). W obecnie przedstawianym materiale wykazano korzystną wartość prognostyczną translokacji *t(8;21)(q22;q22)* i *t(15;17)(q22;q12)*. Ponad 5-letni OS dla pacjentów z obecnymi genem fuzyjnymi: *RUNX1(AML1)-RUNX1T1* i *PML-RAR $\alpha$*  wynosił odpowiednio: 77,6 i 91%. Wśród 11 dzieci z obecnym genem fuzyjnym *PML-RAR $\alpha$* , 10 żyje w utrzymującej się pierwszej remisji, a w jednym przypadku wystąpił wczesny zgon w czasie leczenia indukcyjnego z powodu powikłań krwotocznych. U tego pacjenta stwierdzono również mutację *FLT3/ITD*. Równoczesne występowanie obu tych zmian genetycznych może mieć niekorzystny wpływ na przebieg APL (22). Natomiast gorsze wyniki leczenia w porównaniu do przedstawianych w literaturze (11, 20, 21) uzyskaliśmy w przypadku obecności genu fuzyjnego *CBF $\beta$ -MYH11*. W przypadku tego genu fuzyjnego ponad 4-letni OS wynosił tylko 54,7%, co może wynikać z małej liczebności grupy. Wśród

8 dzieci z obecną *inv(16)*, żyje 5, a troje zmarło, w tym 2 z powodu powikłań.

**Obecnie stratyfikacja pacjentów z ostrą białaczką szpikową do terapeutycznych grupy ryzyka w dużej mierze zależy od obecnych w komórkach białaczkowych zmian cytogenetycznych i mutacji genowych.** Ponadto stwierdzone w czasie diagnozowania zmiany genetyczne, oprócz wartości predykcyjnej wpływającej na dobór odpowiedniej terapii, mogą być również wykorzystane jako specyficzne markery molekularne do monitorowania MRD molekularne w czasie prowadzonej terapii (23, 24).

**Znaczenie prognostyczne mutacji FLT3/ITD w dziecięcej AML jest szeroko badane. Większość prac wskazuje na niekorzystny wpływ występowania tej mutacji** (19, 25). Pojawiły się jednak także doniesienia o jej niewielkim znaczeniu w prognozowaniu wyników leczenia (26) oraz o dodatkowych elementach rokowniczych, takich jak stosunek ilości nieprawidłowego allelu do jego prawidłowej formy (27). W stosowanym od 2005 roku w Polsce protokole AML-BFM 2004 INTERIM mutacja FLT3/ITD stanowi niekorzystny czynnik prognostyczny. Dzieci z AML z oznaczoną mutacją FLT3/ITD kwalifikowane są do grupy HR, co łączy się z bardziej intensywnym leczeniem. W przedstawianym materiale dzieci w obrębie grupy HR z obecną mutacją FLT3/ITD miały niższy wskaźnik ponad 5-letnich przeżyć (42,2%) w stosunku do dzieci bez tej nieprawidłowości genetycznej (59,8%), ale różnica ta nie była istotna statystycznie ( $p = 0,44$ ) (ryc. 3).

**Wartość prognostyczna nadekspresji genu WT1 w momencie rozpoznania nadal nie jest w pełni określona** (28, 29). W prawidłowych komórkach hematopoetycznych ekspresja tego genu jest bardzo niska, czasami wręcz niewykrywalna (30) w związku z procesem wyciszenia w czasie różnicowania komórek (31). Wysoki poziom ekspresji genu *WT1* jest obserwowany w większości przypadków białaczek i zespołów mielodysplastycznych (32, 33). Dane literaturowe wskazują, że wysoki poziom ekspresji genu *WT1* w momencie rozpoznania AML u dorosłych może mieć niekorzystne znaczenie rokownicze (34) lub nie mieć wpływu na przebieg choroby (35). W przypadku dzieci z AML doniesienia na temat znaczenia rokowniczego nadekspresji genu *WT1* nie są również jednoznaczne. Ostatnie doniesienia wskazują zarówno na korzystne znaczenie niskiej ekspresji genu *WT1* stwierdzonego w czasie rozpoznania AML u dzieci (18), jak i na istotnie lepsze rokowanie w przypadku wyższych ekspresji tego genu (29). W badaniach własnych wykazano, że w grupie pacjentów ze stwierdzoną wstępnie nadekspresją genu *WT1* odsetek ponad 5-letniego OS był podobny (69,9%) jak u dzieci z prawidłową ekspresją tego genu (65,3%).

**W obecnie stosowanych protokołach terapeutycznych w AML coraz częściej markery genetyczne decydują o prognozowaniu i stanowią podstawę do podziału na grupy różniące się sposobem oraz intensywnością leczenia.** Ostatnie badania wykazały,

że występujące w komórkach białaczkowych mutacje w takich genach jak: *NPM1*, *CEBPA*, *MLL*, *WT1*, *FLT3*, *N-RAS* i *KIT* mają również znaczenie rokownicze (7-10, 36-38). Wykrycie tych mutacji jest szczególnie istotne zwłaszcza u dzieci, u których nie stwierdza się zmian widocznych w kariotypie (ang. *normal karyotype* – NK), pozwalają one na prawidłową ocenę ryzyka i dobór odpowiedniej terapii. Według zaleceń międzynarodowego panelu ekspertów ds. AML pod przewodnictwem AML Committee of the International BFM Study Group (1), u dzieci w czasie diagnozowania białaczki powinno się wykonać badanie kariotypu komórek białaczkowych metodami cytogenetyki klasycznej oraz przy użyciu fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (ang. *fluorescent in situ hybridization* – FISH) pozwalającej na analizę kariotypów komórek niedzielących się i wykrywanie anomalii chromosomowych, zarówno liczbowych, jak i strukturalnych. Należy przeprowadzić również wstępne (przed rozpoczęciem leczenia) genotypowanie komórek białaczkowych w celu znalezienia markerowego zaburzenia w obrębie genów: *FLT3*, *WT1*, *RUNX1(AML1)-RUNX1T1(ETO)*, *MLL-several*, *MLL-AF9*, *NPM1*, *CEBPA* i *PML-RAR $\alpha$*  oraz *CBF $\beta$ -MYH11*.

Po zastosowaniu współczesnych metod intensywnego leczenia 85-90% dzieci z AML uzyskuje remisję. Wśród pacjentów, u których remisji nie uzyskano (10-15%), 50% ma oporną białaczkę, a inni umierają z powodu powikłań w przebiegu mielosupresji, w czasie wstępnego leczenia. U ponad 25% dzieci dochodzi do wznowy choroby, a wyniki leczenia nawrotów AML, mimo intensyfikacji terapii, są nadal złe (2). Uzyskiwane wyniki leczenia w AML ciągle są niezadowolające. Dlatego istnieje potrzeba zastosowania bardziej precyzyjnej diagnostyki, pozwalającej na wyłonienie nowych czynników prognostycznych. Nowe metody leczenia, dostosowane intensywnością nie tylko do grupy ryzyka, ale także specyficznością do odpowiedniego typu białaczki i występujących zaburzeń genetycznych mogą doprowadzić do dalszej poprawy zarówno wyleczalności, jak i zmniejszenia niepożądanych skutków terapii przeciwbiałaczkowej. Dalsze wielokierunkowe badania nad biologią AML pozwolą na opracowania innowacyjnych terapii ukierunkowanych na rozpoznane zaburzenie genetyczne.

## WNIOSKI

Wstępne genotypowanie materiału własnego wykazało występowanie u dzieci z AML transkryptu genu fuzyjnego *RUNX1(AML1)-RUNX1T1(ETO)* z nieco wyższą częstością niż opisywaną w danych literaturowych, podczas gdy *PML-RAR $\alpha$* , *CBF $\beta$ -MYH11*, nadekspresja genu *WT1* i wewnętrzna tandemowa duplikacja w genie *FLT3* były stwierdzane rzadziej.

Zgodnie z najnowszymi rekomendacjami planuje się w ramach współpracy PPGLBC dalsze poszerzenie genetycznych badań diagnostycznych u dzieci z AML o oznaczanie genów fuzyjnych z udziałem innych rearanżacji chromosomowych



oraz wykrywanie mutacji w genach *NPM1*, *WT1* i *CEBPA*. Stwierdzone zaburzenia genetyczne pozwolą na bardziej precyzyjną stratyfikację do

grup terapeutycznych i indywidualizację terapii, co może przyczynić się do dalszej poprawy wyników leczenia i jakości życia pacjentów z AML.

## PIŚMIENNICTWO

- Creutzig U, van den Heuvel-Eibrink MM, Gibson B et al.: Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in children and adolescents: Recommendations from an international expert panel, on behalf of the AML Committee of the International BFM Study Group. *Blood* 2012; 120: 3187-3205.
- Creutzig U, Zimmermann M, Ritter J et al.: Treatment strategies and long-term results in paediatric patients treated in four consecutive AML-BFM trials. *Leukemia* 2005; 19: 2030-2042.
- Balwierz W, Pawinska-Wasikowska K, Klekawka T et al.: Development of treatment and clinical results in childhood acute myeloid leukemia in Poland. *Memo* 2013; 6: 54-62.
- Meshinchi S, Arcenci RJ: Prognostic factors and risk-based therapy in pediatric acute myeloid leukemia. *Oncologist* 2007; 12: 341-355.
- Schlenk RF, Dohner K: Impact of new prognostic markers in treatment decisions in acute myeloid leukemia. *Curr Opin Hematol* 2009; 16: 98-104.
- Stark B, Jeison M, Glazer Gabay L et al.: Classical and molecular cytogenetic abnormalities and outcome of childhood acute myeloid leukemia: report from a referral centre in Israel. *Br J Haematol* 2004; 126: 320-337.
- Gale RE, Green C, Allen C et al.: The impact of *FLT3* internal tandem duplication mutant level, number, size, and interaction with *NPM1* mutations in a large cohort of young adult patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2008; 111: 2776-2784.
- Dohner K, Schlenk RF, Habdank M et al.: Mutant nucleophosmin (*NPM1*) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: interaction with other gene mutations. *Blood* 2005; 106: 3740-3746.
- Bienz M, Ludwig M, Mueller BU et al.: Risk Assessment in Patients with Acute Myeloid Leukemia and a Normal Karyotype. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 1416-1424.
- Pabst T, Eyholzer M, Fos J, Mueller BU: Heterogeneity within AML with *CEBPA* mutations; only *CEBPA* double mutations, but not single *CEBPA* mutations are associated with favourable prognosis. *Br J Cancer* 2009; 100: 1343-1346.
- Grimwade D, Walker H, Oliver F et al.: The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Blood* 1998; 92: 2322-2333.
- Manola KN: Cytogenetics of pediatric acute myeloid leukemia. *Eur J Haematol* 2009; 83: 391-405.
- Swerdlow SH, Campo E, Harris NL et al.: WHO Classification of Tumors of Haemopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2008.
- Cilloni D, Renneville A, Hermitte F et al.: Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction Detection of Minimal Residual Disease by Standardized *WT1* Assay to Enhance Risk Stratification in Acute Myeloid Leukemia: A European LeukemiaNet Study. *J Clin Oncol* 2009; 27: 5195-5201.
- Gabert J, Beillard E, van der Velden VHJ et al.: Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia – A Europe Against Cancer Program. *Leukemia* 2003; 17: 2318-2357.
- Gregory J, Feusner J: Acute Promyelocytic Leukemia in Childhood. *Curr Oncol Rep* 2009; 11: 439-445.
- Sanz MA, Grimwade D, Tallman MS et al.: Management of acute promyelocytic leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* 2009; 113: 1875-1891.
- Trka J, Kalinowa M, Hrusak O et al.: Real-time quantitative PCR detection of *WT1* gene expression in children with AML: prognostic significance, correlation with disease status and residual disease detection by flow cytometry. *Leukemia* 2002; 16: 1381.
- Meshinchi S, Woods WG, Stirewalt DL et al.: Prevalence and prognosis significance of *FLT3* internal tandem duplication in pediatric acute myeloid leukemia. *Blood* 2001; 97: 89-94.
- von Neuhoff C, Reinhardt D, Sander A et al.: Prognostic Impact of Specific Chromosomal Aberrations in a Large Group of Pediatric Patients With Acute Myeloid Leukemia Treated Uniformly According to Trial AML-BFM 98. *J Clin Oncol* 2010; 28: 2682-2689.
- Betts DR, Ammann RA, Hirt A et al.: The prognostic significance of cytogenetic aberrations in childhood acute myeloid leukaemia: A study of the Swiss Paediatric Oncology Group (SPOG). *Eur J Haematol* 2007; 78: 468-476.
- Kutny MA, Moser BK, Laumann K et al.: *FLT3* Mutation Status Is a Predictor of Early Death in Pediatric Acute Promyelocytic Leukemia: A Report From the Children's Oncology Group. *Pediatr Blood Cancer* 2012; 59: 662-667.
- Zwaan CM, Meshinchi S, Radich JP et al.: *FLT3* internal tandem duplication in 234 children with acute myeloid leukemia: prognostic significance and relation to cellular drug resistance. *Blood* 2003; 102: 2387-2394.
- Zhu H-H, Zhang X-H, Qin Y-Z et al.: MRD-directed risk stratification treatment may improve outcomes of t(8;21) AML in the first complete remission: results from the AML05 multicenter trial. *Blood* 2013; 121: 4056-4062.
- Buccisano F, Maurillo L, Del Principe MI et al.: Prognostic and therapeutic implications of minimal residual disease detection in acute myeloid leukemia. *Blood* 2012; 119(2): 332-341.
- Lacayo NJ, Meshinchi S, Kinnunen P et al.: Gene expression profiles at diagnosis in *de novo* children AML patients identify *FLT3* mutations with good clinical outcomes. *Blood* 2004; 104: 2646-2654.
- Meshinchi S, Stirewalt DL, Alonzo TA et al.: Structural and numerical variation of *FLT3/ITD* in pediatric AML. *Blood* 2008; 111: 4930-4933.
- Niegemann E, Wehner S, Kornhuber B et al.: *WT1* gene expression in childhood leukemias. *Acta Haematol* 1999; 102: 72-76.
- Rodrigues PC, Oliveira SN, Viana MB et al.: Prognostic Significance of *WT1* Gene Expression in Pediatric Acute Myeloid Leukemia. *Pediatr Blood Cancer* 2007; 49: 133-138.
- Baird PN, Simmons PJ: Expression of the Wilms tumor gene (*WT1*) in normal hemopoiesis. *Exp Hematol* 1997; 25: 312-320.
- Ellison LW, Carlesso N, Cheng T et al.: The Wilms tumor suppressor *WT1* directs stage-specific quiescence and differentiation of human hematopoietic progenitor cells. *EMBO J* 2001; 20: 1897-1909.
- Cilloni D, Gottardi E, Messa F et al.: Significant correlation between the degree of *WT1* expression and the International Prognostic Scoring System Score in patients with myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol* 2003; 21: 1988-1995.
- Garg M, Moore H, Tobal K et al.: Prognostic significance of quantitative analysis of *WT1* gene transcripts by competitive reverse transcription polymerase chain reaction in acute leukaemia. *Br J Haematol* 2003; 123: 49-59.
- Bergmann L, Miething C, Maurer U et al.: High levels of Wilms' tumor gene (*WT1*) mRNA in acute myeloid leukemias are associated with a worse long-term outcome. *Blood* 1997; 90: 1217-1225.
- Weisser M, KernW, Rauhut S et al.: Prognostic impact of RT-PCR based quantification of *WT1* gene expression during MRD monitoring of acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2005; 19: 1416-1423.
- Balgobind BV, Hollink I, Arentsen-Peters S et al.: Integrative analysis of type-I and type-II aberrations underscores the genetic heterogeneity of pediatric acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2011; 96(10): 1478-1487.
- Foran JM: New Prognostic Markers in Acute Myeloid Leukemia: Perspective from the Clinic. *Hematology An Soc Hematol Educ Program* 2010; 2010: 47-55.
- Pui CH, Carroll WL, Meshinchi S, Arcenci RJ: Biology, Risk Stratification, and Therapy of Pediatric Acute Leukemias: An Update. *J Clin Oncol* 2011; 29(5): 551-565.

otrzymano/received: 07.02.2014  
zaakceptowano/accepted: 20.03.2014