

Využití interfázní fluorescenční *in situ* hybridizace pro analýzu CD34+ buněk v periferní krvi u nemocných s myelodysplastickými syndromy

Ransdorfová Š.¹, Březinová J.¹, Šárová I.^{1,2}, Beličková M.¹, Jonášová A.³, Neuwirtová R.³, Zemanová Z.², Čermák J.¹, Michalová K.^{1,2}

¹Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha

²Centrum nádorové cytogenetiky, Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky VFN a 1. LF UK, Praha

³1. interní klinika VFN a 1. LF UK, Praha

Transfuzní Hematol. dnes, 22, 2016, No. 2, p. 90–96

SOUHRN

Klasická cytogenetická analýza buněk kostní dřeně je základním standardem pro vyšetření pacientů s myelodysplastickými syndromy (MDS). Pro detekci chromozomových aberací v jádrech nedělících se buněk lze využít interfázní fluorescenční *in situ* hybridizaci (I-FISH). Jako alternativu k I-FISH analýze buněk kostní dřeně jsme v této práci využili metodu I-FISH pro analýzu chromozomových aberací v CD34+ buňkách cirkulujících v periferní krvi. Cílem bylo hodnotit metodou I-FISH frekvenci chromozomových aberací v CD34+ buňkách izolovaných z periferní krve, porovnat ji s výsledky I-FISH analýz buněk kostní dřeně a posoudit možnost využití této metody k monitorování úspěšnosti terapie u nemocných s MDS. Vyšetřili jsme celkem 22 vzorků CD34+ buněk separovaných z periferní krve šestnácti pacientů s MDS (13 žen; 3 muži; 11krát 5q- syndrom, 4krát MDS RCMD a 1krát MDS/MPS). Čtyři nemocní byli vyšetřeni opakovaně. Metoda I-FISH na separovaných CD34+ buňkách potvrdila předchozí nálezy v buňkách kostní dřeně u všech vyšetřených pacientů – 14 nemocných mělo delecí chromozomu 5 v oblasti 5q31, u jednoho nemocného byla nalezena delecí chromozomu 20 v oblasti 20q11q12 a u jednoho nemocného monozomie chromozomu 7. V naší práci jsme prokázali, že izolace CD34+ buněk a následná I-FISH analýza je praktická neinvazivní metoda, která dokáže zachytit specifické chromozomové abnormality přítomné v kostní dřeni. Vyšetření lze tedy vhodně využít pro šetrnější kontrolu onemocnění a ke sledování dynamiky patologického klonu po léčbě.

KLÍČOVÁ SLOVA

CD34+ buňky – I-FISH – myelodysplastické syndromy

SUMMARY

Ransdorfová Š., Březinová J., Šárová I., Beličková M., Jonášová A., Neuwirtová R., Zemanová Z., Čermák J., Michalová K.

Application of interphase fluorescence *in situ* hybridisation for the analysis of CD34+ cells in peripheral blood of patients with myelodysplastic syndromes

Classical cytogenetic analysis of bone marrow cells is the standard for evaluating chromosomal aberrations in patients with myelodysplastic syndromes (MDS). However, there are several factors affecting the success of this method, such as the degree of cell proliferation, quality of preparations or size of pathological clone. In these cases, it is possible to use interphase fluorescence *in situ* hybridization (I-FISH), which allows detection of chromosomal aberrations in the nuclei of interphase cells. In this study, we used the I-FISH method to screen chromosomal aberrations in peripheral blood circulating CD34+ cells. Our objective was to evaluate the frequency of chromosomal aberrations in CD34+ cells isolated from peripheral blood, to compare this with the results of I-FISH analysis of bone marrow cells and to assess the significance of this method for monitoring the effect of therapy in patients with MDS.

We examined 22 samples of CD34+ cells separated from the peripheral blood of 16 patients with MDS (13 females, 3 males; 11 x 5q- syndromes, 4x MDS RCMD and 1x MDS/MPS). Four patients were investigated repeatedly.

I-FISH on the separated CD34+ cells confirmed the prior findings in bone marrow in all the patients examined – 14 patients had deletion of chromosome 5 in the 5q31 region, one patient had deletion of chromosome 20q11q12 and one patient had monosomy of chromosome 7. In our work, we demonstrated that isolation of CD34+ cells followed by I-FISH analysis is a practical, non-invasive method that can detect specific chromosomal abnormalities present in the pathological clone. This method has a predictive value and can be used for continuous disease control as well as for monitoring the pathological clone dynamics following treatment.

KEY WORDS

CD34+ cells – I-FISH – myelodysplastic syndromes

ÚVOD

Myelodysplastické syndromy (MDS) zahrnují heterogenní skupinu hematologických malignit charakterizovaných onemocněním pluripotentní hematopoetické buňky. Změny vedou k neefektivní hematopoeze, morfologické dysplazii krvetvorných buněk a současné periferní cytopenii postihující jednu či více krvetvorných linií. Přítomna je rovněž abnormální imunitní odpověď organismu vedoucí k aktivaci cytotoxických T-lymfocytů a zvýšené produkci cytokinů indukujících apoptózu, zejména zralejších forem krvetvorby [1, 2]. Incidence MDS je udávána 2–3 případy na 100 000 obyvatel ročně. Výskyt MDS u dětí a mladých dospělých osob je nízký, ale stoupá s věkem nad 50 let, ve věkové skupině nad 60 let je incidence 15–50 nemocných na 100 000. U 10–20 % pacientů dochází k postupnému rozvoji onemocnění a k transformaci do akutní myeloidní leukemie (AML).

Klasická cytogenetická analýza buněk kostní dřeně (KD) detekuje klonální chromozomové aberace u 50–60 % dospělých nemocných s primárními MDS a až u 80 % nemocných se sekundárním typem onemocnění [3]. Nález abnormálního karyotypu je jedním ze základních parametrů při hodnocení patogeneze a prognózy onemocnění. Vzhledem k tomu, že MDS jsou z hlediska morfologické prezentace, klinického průběhu i cytogenetických nálezů velmi heterogenní, prošlo rozdělení do jednotlivých skupin značným vývojem. Nejnovější publikace rozděluje MDS podle cytogenetického nálezu do 5 prognostických podskupin [4, 5]. Do kategorie velmi dobrá prognóza patří samostatná delece dlouhých ramen chromozomu 11, del(11)(q) a ztráta gonozomu Y. Normální karyotyp, samostatná delece dlouhých ramen chromozomu 5 a 20, del(5)(q) a del(20)(q) a delece krátkých ramen chromozomu 12, del(12)(p) řadí nemocné do skupiny s dobrou prognózou. V kategorii střední prognóza jsou zařazeny delece dlouhých ramen chromozomu 7, del(7)(q), trizomie chromozomu 8 (+8), izochromozom dlouhých ramen chromozomu 17, i(17)(q) a trizomie chromozomů 19 a 21. Do skupiny s nepří-

znivou prognózou jsou řazeni nemocní se samostatnou monozomií chromozomu 7 (-7), derivovaným chromozomem 3, der(3)(q) a komplexními změnami karyotypu zahrnujícími 3 změny. Velmi špatnou prognózu představují komplexní přestavby karyotypu s více jak třemi změnami [6]. Mezi nejčastější chromozomové aberace u MDS patří intersticiální delece dlouhých ramen chromozomu 5 (5q) vyskytující se u 10–15 % nemocných [7]. WHO klasifikace (World Health Organization, 2008) řadí nemocné s přítomností samostatné delece 5q spolu s dalšími specifickými znaky (absence Auerových tyčí, < 5 % blastů v KD, < 1 % blastů v periferní krvi a další morfologické změny) do podtypu MDS, nazývaného 5q-syndrom [8]. Pacienti s 5q-syndromem mají relativně jednotný fenotyp a nízkou pravděpodobnost transformace do AML [9]. Tento syndrom byl popsán už Van den Berghem v roce 1974 a jeho klinický popis platí dodnes [10]. Společným deletovaným úsekem (CDR) pacientů s 5q-syndromem je oblast 5q32-q33.1 [11]. Onemocněním jsou postiženy převážně ženy (více než 80 % případů), příčina tohoto jevu není známa. V poslední době se v souvislosti s 5q-syndromem hovoří o pacientech, kteří mají spolu s del(5)(q) druhý nepříbuzný klon s trizomií chromozomu 8. Vzhledem ke klinickému průběhu onemocnění se zvažuje zařazení těchto případů biklonality do samostatné podskupiny 5q-syndromu [12].

V roce 2001 Vehmeyer et al. [13] dokázali, že u MDS pacientů se zvyšuje počet CD34+ progenitorových buněk cirkulujících v periferní krvi (PK). Obvyklé zastoupení CD34+ buněk je přibližně 0,5–3 % v kostní dřeně a 0,05 až 0,2 % v PK. U nemocných s MDS se zastoupení těchto buněk v PK zvyšuje na 0,2–1,5 % [14]. Studie CD34+ buněk v KD pacientů s AML a MDS prokázaly výskyt klonálních chromozomových aberací [15]. V současné době je proto snaha využít přítomnost CD34+ buněk v PK k méně invazivní detekci těchto změn.

Cílem této práce bylo zhodnotit výskyt a procentuální zastoupení chromozomových abnormalit v CD34+ buňkách izolovaných z PK u nemocných s MDS

v průběhu onemocnění metodou I-FISH, porovnat ji s výsledky interfázni fluorescenční *in situ* hybridizace (I-FISH) v buňkách kostní dřeně (KD) a posoudit možnost využití této metody k monitorování úspěšnosti terapie.

SOUBOR NEMOCNÝCH

Metodou I-FISH jsme vyšetřili celkem 22 vzorků CD34+ buněk separovaných z PK od 16 nemocných. Čtyři pacienti byli vyšetřeni opakovaně, z toho u jedné pacientky jsme provedli vyšetření na 4 vzorcích CD34+ buněk v průběhu onemocnění. Skupinu nemocných tvořilo 13 žen a 3 muži ve věku od 20 do 82 let, medián 70 let. Nejčastěji zastoupenou diagnózou byl 5q-syndrom u 11 nemocných, čtyři pacienti měli refrakterní cypopenii s dysplazií ve více řadách (MDS RCMD) a jeden myelodysplastický/myeloproliferativní syndrom (MDS/MPS).

Metody

Konvenční cytogenetická analýza

U všech pacientů byla při stanovení diagnózy provedena konvenční cytogenetická analýza buněk KD. Nestimulované buňky KD byly kultivovány 24 hodin při 37 °C v médiu pro kultivaci kostní dřeně Marrow Grow (Cytogen, GmbH, Germany) s následným G-pruhováním podle klasických cytogenetických postupů. Při dostatečném počtu dělicích se buněk jsme vyhodnotili u každého nemocného 20 metafází. Karyotypy jsme popsali podle mezinárodní nomenklatury ISCN 2013 (International system for human cytogenetic nomenclature) [16].

I-FISH, mFISH, mBAND

Sondy pro I-FISH byly zvoleny na základě výsledků klasické cytogenetické analýzy buněk KD. Preparáty jsme připravili ze stejné buněčné suspenze jako pro cytogenetické vyšetření KD a ze suspenze izolovaných CD34+ buněk PK. Pro detekci delecí 5q jsme použili dvoubarevnou lokus-specifickou sondu Vysis LSI 5q31/5p15.2 (Abbott Molecular, USA) nebo ON MDS 5q- EGR1 5q31; CSF1R 5q33/hTERT 5p15 Triple-Color (Kreatech Biotechnology B.V., The Netherlands). U jednoho nemocného byla použita k průkazu delecí dlouhých ramen chromozomu 20 dvoubarevná sonda ON PTPRT 20q11/20q12 (Kreatech Biotechnology B.V., The Netherlands) a u jednoho pacienta sonda pro ověření monozomie chromozomu 7 Vysis LSI 7q31/CEP 7 (Abbott Molecular, USA). Preparáty byly analyzovány ve fluorescenčním mikroskopu Axio Imager.Z1 (Carl Zeiss, Germany) a výsledný obraz byl zpracován softwarem pro I-FISH (ISIS, MetaSystems, Germany).

Vždy jsme hodnotili 200 interfázni jader či CD34+ buněk, hodnota „cut-off value“ byla stanovena na 5 %. K ověření komplexních chromozomových aberací nalezených konvenčními technikami u jednoho nemocného byla použita metoda mnohobarevné FISH (mFISH) (MetaSystems, Germany) a mnohobarevného pruhování (mBAND, MetaSystems, Germany). Metody byly prováděny podle standardních postupů doporučených výrobcem.

Izolace CD34+ buněk

V průběhu onemocnění byly analyzovány CD34+ buňky izolované z PK. Cirkulující CD34+ buňky z PK byly odděleny pomocí magneticky aktivované separace buněk Auto MACS separátorem (magnetic-activated cell sorting, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Pro izolaci byly použity mononukleární buňky – PBMCs (monocyty, lymfocyty) získané z 20 až 30 ml PK denzitní gradientovou centrifugací za pomoci Ficoll-Paque. Cílové buňky jsou zachyceny v separační koloně umístěné v magnetickém poli separátoru. Neoznačené buňky protékají separační kolonou a po odstranění separační kolony z magnetického pole jsou cílové buňky separovány do pozitivní frakce.

Statistické metody

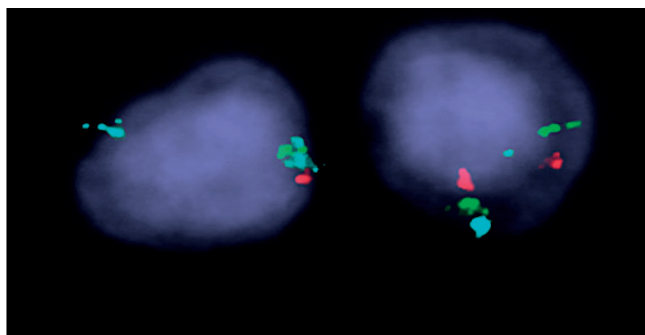
K průkazu korelací mezi výsledky vyšetření byl použit t-test.

VÝSLEDKY

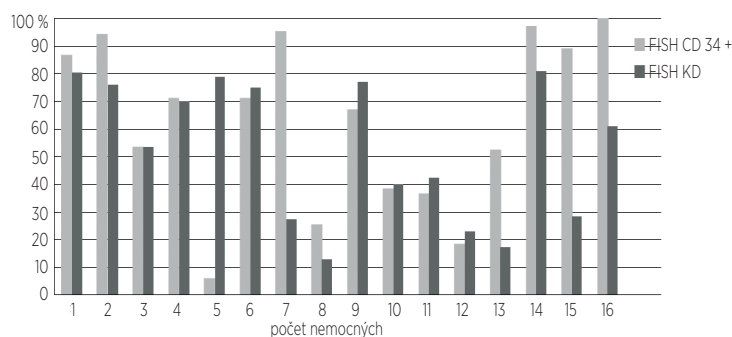
U všech 16 pacientů jsme při diagnóze provedli vyšetření buněk KD klasickou cytogenetickou analýzou a metodou I-FISH (tab. 1). Čtrnáct nemocných mělo delecí dlouhých ramen chromozomu 5, u 10 z nich se jednalo o samostatnou aberaci a u čtyř se del(5)(q) vyskytovala společně s dalšími cytogenetickými změnami. Nemocný č. 4 měl reciprokou translokaci t(2;11)(p21;q23), nemocný č. 6 delecí krátkých ramen chromozomu 12 v oblasti 12p13.3 až 12p11.2 a u nemocného č. 16 jsme detekovali deletovaný chromozom 5 zahrnutý do dalších chromozomových přestaveb. U pacientky č. 13 jsme prokázali dva nepříbuzné patologické klony, jeden s delecí del(5)(q13q33.3) a druhý s trizomií chromozomu 8. U dvou pacientů jsme identifikovali pomocí klasické cytogenetiky chromozomové aberace, které nezahrnovaly chromozom 5 – nemocná č. 2 měla delecí dlouhých ramen chromozomu 20 v oblasti 20q11 až 20q12 jako samostatnou aberaci a nemocný č. 15 monozomií chromozomu 7. Nález klasické cytogenetiky v buňkách KD jsme u všech nemocných potvrdili metodou I-FISH za pomoci komerčně dodávaných sond.

FLUORESCENČNÍ HYBRIDIZACE PRO ANALÝZU CD34+ U MDS

U všech 16 pacientů jsme rovněž provedli I-FISH vyšetření CD34+ buněk izolovaných z PK. Výsledky zobrazuje tabulka 1. Čtyři pacienti byli vyšetřeni opakovaně, z toho u jedné nemocné (č. 3) jsme v průběhu onemocnění provedli I-FISH vyšetření na čtyřech vzorcích CD34+ buněk z PK. Celkem 6 nemocných mělo odběry KD a PK provedeny ve stejný den nebo v rozmezí jednoho měsíce. U 10 nemocných byl časový odstup větší než 1 měsíc. Statistická analýza výsledků I-FISH KD a CD34+ buněk pomocí t-testu u všech 16 nemocných neprokázala významnou korelaci, ale ani odlišnost těchto hodnot (na zvolené hladině významnosti 0,05). U 11 nemocných rozdíl procentuálního zastoupení patologických klonů v buňkách KD a v CD34+ (graf 1) nepřesahoval 18 %. U těchto pacientů spolu hodnoty CD34+ a KD statisticky významně korelovaly, a to na hladině významnosti 0,001. Pouze u pěti pacientů se zastoupení klonů lišilo zásadněji, o více než 35 %. V případě nemocných č. 5, 7 a 13 se jednalo o velký časový odstup mezi odběry. Pacientka č. 5 měla v odběru KD při diagnóze v r. 2010 zachycenou delecí oblasti 5q31 v 79 % interfázních jader. Po dvou letech léčby lenalidomidem a dosažení celkové hematologické remise bylo v separovaných CD34+ buňkách detekováno pouze 6 % buněk s delecí 5q31 (obr. 1). Naopak pacientka č. 7 měla při vstupním vyšetření KD delecí oblasti 5q31 v 27,5 % buněk a 3,5 % blastů v PK. Po léčbě lenalidomidem (1/2011 až 8/2011) se krevní obraz znormalizoval a byla přerušena terapie (pojišťovna odmítla dále hrudit léčbu). U pacientky od 4/2012 následovala progresse onemocnění, pokles hemoglobinu, zmnožení blastů na 13 % a závislost na transfuzích. Delecí 5q31 jsme detekovali 7/2012 již v 95 % CD34+ buněk. V následujících odběrech, po léčbě azacitidinem, se procento patologických buněk snížilo na 2 % (pod hranici *cut-off*) a pacientka je v současné době v celkové hematologické remisi. Pacientka č. 13 měla v odběru KD při vstupním



Obr. 1 Výsledek I-FISH na separovaných CD34+ buňkách u nemocné č. 1. Trojbarevná sonda ON MDS 5q- EGRI 5q31; CSF1R 5q33/hTERT 5p15; vlevo buňka s delecí oblasti 5q31 a 5q33 (zelený signál 1krát a červený signál 1krát), modrý kontrolní signál (2krát) pro oblast 5p15, vpravo buňka s normálním nálezem.



Graf 1. Srovnání procentuálního zastoupení I-FISH nálezů v buňkách KD a v CD34+ buňkách PK u 16 nemocných

vyšetření v r. 2013 nalezeny pomocí I-FISH dva izolované klony. Jeden s delecí del(5)(q13q33.3) v 57 % a druhý s trizomií chromozomu 8 v 8,5 % interfázních jader. Během léčby lenalidomidem (03/2014 až 11/2014) se snížil klon s delecí chromozomu 5 na 17,3 %. Po léčbě ale následovala progresse onemocnění, krvácivé stavy a delecí 5q31 jsme detekovali 12/2014 v 52,5 % CD34+ buněk. U dvou nemocných (č. 15, 16) bylo procentuální zastoupení patologického klonu v CD34+ buňkách vyšší oproti buňkám KD. Pacient č. 15 měl v odběru KD při diagnóze (02/2015) monozomii chromozomu 7 zachycenou v 18 % interfázních jader. V následujícím odběru KD 03/2015 se zvýšil patologický klon na 28,5 % interfázních jader, došlo k zmnožení blastů v PK na 7,2 % a současně cytologický nález svědčil o progresi onemocnění. V izolovaných CD34+ buňkách odběru PK téhož dne jsme detekovali vysoké procento patologického klonu (89 %). U nemocného č. 16 jsme v prvním odběru KD (10/2014) prokázali pomocí I-FISH aberovaný chromozom 5 v 28,5 % interfázních jader. V dalším odběru KD (04/2015) jsme zaznamenali již zvýšené procento patologického klonu (61 % interfázních jader), zvýšil se počet blastů v PK na 13,4 % a cytologický nález svědčil pro trvalý onemocnění MDS RCMD. V odběru PK z téhož dne jsme detekovali patologický klon ve všech izolovaných CD34+ buňkách (100 %).

DISKUSE

Cytogenetická analýza a cytomorfolgie jsou standardem pro vyšetření nemocných s MDS. V naší práci jsme se zaměřili na analýzu CD34+ buněk cirkulujících v PK, které představují obecně primární patologické hematopoetické buňky u MDS [15, 17]. K buněčné separaci lze využít techniku průtokové cytometrie nebo metodu magnetické separace buněk. Metoda MACS je založena na imunomagnetickém značení cílových buněk podle jejich povrchových antigenů monoklonální protilátkou, která je konjugována se superparamagnetickou partikulí [18].

Tab. 1 Souhrn cytogenetických dat nemocných

č.	Pohlaví	Věk při diagnóze	Diagnóza	Materiál KD/ CD34+	Data odběru	Karyotyp	FISH (%)*
1	ž	82	5q-syndrom	KD	24. 10. 2011	46,XX,del(5)(q22q33.2)[17]/46,XX[5]	80,5
				CD34+	29. 3. 2012	0	86,5
2	ž	76	MDS/MPS	KD	23. 11. 2011	46,XX,del(20)(q11q12)[15]	76
				CD34+	2. 4. 2012	0	94
3	ž	66	5q-syndrom	KD	1. 6. 2010	46,XX,del(5)(q14q33)[6]/46,XX[14]	53,5
				CD34+	12. 11. 2010	0	49
				CD34+	29. 5. 2012	0	53,5
				KD	7. 1. 2013	46,XX,del(5)(q14q33)[5]/46,XX[13]	70,5
				CD34+	23. 5. 2013	0	35
				CD34+	30. 5. 2013	0	11
				KD	23. 9. 2013	46,XX[22]	4
4	m	54	5q-syndrom	KD	22. 6. 2010	46,XY,t(2;11)(p21;q23),del(5)(q13.3q33.3)[4]/46,XY[12]	70
				CD34+	26. 6. 2012	0	71
5	ž	77	5q-syndrom	KD	12. 10. 2010	46,XX,del(5)(q13q33)[12]/46,XX[10]	79
				CD34+	3. 7. 2012	0	6
6	ž	77	5q-syndrom	KD	10. 7. 2012	46,XX,del(5)(q13q33),del(12)(p13.2p11.2)[11]/46,XX[5]	75
				CD34+	10. 7. 2012	0	71
7	ž	66	5q-syndrom	KD	3. 6. 2010	0 mitos	27,5
				CD34+	24. 7. 2012	0	95
				KD	23. 10. 2012	46,XX,del(5)(q31.2q33.1)[4]/46,XX[4]	45,5
				KD	22. 7. 2013	46,XX[23]	2
8	ž	78	5q-syndrom	CD34+	24. 7. 2012	0	25,5
				KD	16. 8. 2012	46,XX[22]	13
				CD34+	12. 8. 2013	0	77
9	ž	71	5q-syndrom	KD	31. 5. 2011	46,XX,del(5)(q14q33)[15]	77
				CD34+	19. 9. 2012	0	67
10	ž	71	5q-syndrom	KD	16. 4. 2013	46,XX,del(5)(q13q33.3)[14]/46,XX[5]	40
				CD34+	21. 5. 2013	0	38,5
				CD34+	23. 7. 2013	0	44,5
11	ž	68	5q-syndrom	KD	26. 6. 2013	46,XX,del(5)(q13q33.3)[6]	69,5
				CD34+	30. 5. 2013	0	45
				KD	18. 7. 2013	46,XX,del(5)(q13q33.3)[6]/46,XX[16]	42,5
				CD34+	25. 7. 2013	0	36,6
12	ž	68	5q-syndrom	KD	11. 6. 2013	46,XX,del(5)(q11.2q34)[2]/46,XX[20]	23
				CD34+	22. 7. 2013	0	18,5
13	ž	69	RCMD	KD	22. 10. 2014	46,XX,del(5)(q13q33.3)[6]/47,XX,+8[9]/46,XX[7]	17,3/18,3
				CD34+	1. 12. 2014	0	52,5/0

FLUORESCENČNÍ HYBRIDIZACE PRO ANALÝZU CD34+ U MDS

Tab. 1 Souhrn cytogenetických dat nemocných

(pokračování)

č.	Pohlaví	Věk při diagnóze	Diagnóza	Materiál KD/ CD34+	Data odběru	Karyotyp	FISH (%)*
14	ž	82	RCMD	KD	30. 10. 2014	46,XX,del(5)(q13q33.3)[17]/46,XX[5]	81
				CD34+	1. 12. 2014	0	97
15	m	20	RCMD	KD	24. 3. 2015	45,XY,-7[2]	28,5
				CD34+	24. 3. 2015	0	89
16	m	68	RCMD	KD	23. 4. 2015	42,XY,psu dic(3;6)(?;?),der(5)t(5;17)(q11;q11.2),-12,-15,-17,i(21)(q10)x2,der(21)t(19;22)(?;p11),+mar[11]	61
				CD34+	23. 4. 2015	0	100

*FISH výsledky – procentuální zastoupení patologického klonu v buňkách KD a v CD34+ buňkách

Legenda: KD – kostní dřeň, MDS – myelodysplastický syndrom, MPS – myeloproliferativní syndrom, FISH – fluorescenční *in situ* hybridizace, ž – žena, m – muž, RCMD – refrakterní cytopenie s dysplázií ve více řadách

Poprvé popisuje I-FISH analýzu CD34+ buněk izolovaných z PK jako novou metodu pro genetické sledování MDS pacientů Braulke et al. v roce 2010 [14]. Autoři separovali CD34+ buňky pomocí MACS separátoru celkem u 27 nemocných s MDS a označili ji jako citlivou a vhodnou k použití u všech pacientů. Rovněž naše výsledky ukazují, že I-FISH analýza cirkulujících CD34+ buněk v PK je schopna zachytit cytogenetické aberace přítomné v buňkách KD. Metoda I-FISH na buňkách KD potvrdila předchozí nálezy klasické cytogenetiky u všech 16 vyšetřených pacientů a následná I-FISH analýza separovaných CD34+ buněk z PK a KD ukázala statisticky významnou korelaci u 11 nemocných (69 %). Ve třech případech (č. 5, 7 a 13) se výsledky procentuálně rozcházejí v důsledku časového odstupu mezi odběry KD a PK, odpovídaly ale aktuálnímu klinickému stavu nemocných. U dvou pacientů (č. 15 a 16) se potvrdila přítomnost patologického klonu, jehož procentuální zastoupení bylo v CD34+ buňkách PK vyšší oproti KD. V obou případech byly odběry provedeny v době léčebné terapie nemocných. Domníváme se, že důsledkem léčby je zastoupení patologického klonu v KD nižší a předchází nálezu v PK. Podobné výsledky uvádí i Lübbert et al. [19]. V další multicentrické studii z německých pracovišť sledovali autoři celkem 360 nemocných s MDS po dobu tří let [20]. K vyšetření CD34+ buněk pomocí I-FISH použili panel centromerických sond pro chromozomy 7, 8, X, Y a lokus-specifických sond pro delecí 5q, delecí 20q, gen TP53 a fúzní gen TEL/AML1. I-FISH analýzou potvrdili předchozí nález klasické cytogenetiky u 96 % nemocných a rovněž korelaci nálezů v buňkách KD a CD34+. V poslední práci z roku 2015 [21], autoři rozšířili panel použitých sond o lokus-specifické sondy pro delecí v oblasti 1p36 a 1q25, delecí genu RBI, delecí genu TET2 a fúzní gen IgH/BCL2 a opět potvrdili shodu výsledků.

V souladu s literaturou naše výsledky potvrzují, že analýza separovaných CD34+ buněk pomocí I-FISH je

vhodná metoda pro sledování aberantního klonu v PK. Jedná se o cílené vyšetření, které umožňuje monitorovat pouze konkrétní vybrané aberace. Tato metoda tak nenahrazuje počáteční vyšetření KD, kdy je nutné určit chromozomové změny v karyotypu pomocí klasické cytogenetiky. Neodráží ani klonální vývoj nebo nedetekuje další změny karyotypu, a nemůže tedy nahradit klasickou cytogenetickou analýzu. Může ji ale vhodně doplnit v intervalech mezi odběry KD. Zvláště u pacientů s „low-grade“ FAB/WHO – podtypy s nízkým rizikem transformace do akutní myeloidní leukemie je žádoucí častější sledování v průběhu léčby (nejlépe s odstupem 1 měsíce). V těchto případech je analýza chromozomových aberací prováděná z PK méně invazivní než biopsie KD a může pomoci efektivněji vést léčbu založenou na molekulárně-cytogenetické odpovědi. Lze ji použít k šetrnému sledování průběhu nemoci, nebo pokud nelze odebrat KD pro suchou punkci, případně když pacient odběr KD odmítá.

ZÁVĚR

Prokázali jsme, že izolace CD34+ buněk s následnou I-FISH analýzou je praktická neinvazivní metoda, jejíž výsledky reprezentují patologické klony přítomné v buňkách kostní dřeně a mají vypovídající hodnotu. Tato metoda tak umožňuje častěji a snadněji monitorovat nemoc a individuální rizika v souladu s IPSS-R [5].

LITERATURA

1. Silverman LR, Demakos EP, Peterson BL, et al. Randomized controlled trial of azacitidine in patients with the myelodysplastic syndrome: a study of the cancer and leukemia group B. *J Clin Oncol* 2002; 20: 2429–2440.
2. Parker JE, Mufti GJ. Ineffective haemopoiesis and apoptosis in myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 1998; 101: 220–230.

3. Germing U, Gattermann N, Strupp C, et al. Validation of WHO proposals for a new classification of primary myelodysplastic syndromes: a retrospective analysis of 1600 patients. *Leukemia Res* 2000; 24: 983–992.
 4. Schanz J, Tüchler H, Solé F, et al. A new comprehensive cytogenetic scoring system for primary myelodysplastic syndromes (MDS) and oligoblastic AML after MDS derived from an international database merge. *J Clin Oncol* 2012; 30: 820–829.
 5. Greenberg P, Tuechler H, Schanz J, et al. Revised international scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood* 2012; 120: 2454–2465.
 6. Schanz J, Steidl C, Fonatsch C, et al. Coalesced multicenter analysis of 2,351 patients with myelodysplastic syndromes indicates an underestimation of poor-risk cytogenetics of myelodysplastic syndromes in the international prognostic scoring system. *J Clin Oncol* 2011; 29: 1963–1970.
 7. Solé F, Espinet B, Sanz GF, et al. Incidence, characterization and prognostic significance of chromosomal abnormalities in 640 patients with primary myelodysplastic syndromes: Grupo Cooperativo Espanol de Citogenetica Hematologica. *Br J Haematol* 2000; 108: 346–356.
 8. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 2009; 114: 937–951.
 9. Nimer SD. Clinical management of myelodysplastic syndromes with interstitial deletion of chromosome 5q. *J Clin Oncol* 2006; 24: 2576–2582.
 10. Van den Berghe H, Cassimann JJ, David G, et al. Distinct haematological disorder with deletion of long arm of no.5 chromosome. *Nature* 1974; 251: 437–438.
 11. Jerez A, Gondek LP, Jankowska AM, et al. Topography, clinical and genomic correlates of 5q myeloid malignancies revisited. *J Clin Oncol* 2012; 30: 1343–1349.
 12. Neuwirtová R, Zemanová Z, Březinová J, et al. Jsme oprávněni řadit nemocné s dvěma samostatnými buněčnými klony a to s delecí 5q a s trizomií 8 jako podskupinu myelodysplastického syndromu typu 5q- syndromu? *Transfuze Hematol Dnes* 2014; 20: 25–31.
 13. Vehmeyer K, Haase D, Alves F. Increased peripheral stem cell pool in MDS: an indication of disease progression? *Leukemia Res* 2001; 25: 955–959.
 14. Bräulke F, Schanz J, Jung K, et al. FISH analysis of circulating CD34+ cells as a new tool for genetic monitoring in MDS: Verification of the method and application to 27 MDS patients. *Leukemia Res* 2010; 34: 1296–1301.
 15. Haase D, Feuring-Buske M, Schäfer C, et al. Cytogenetic analysis of CD34+ subpopulations in AML and MDS characterized by the expression of CD38 and CD 117. *Leukemia* 1997; 11: 674–679.
 16. Shaffer LG, McGowan-Jordan J, Schmid M (eds). *ISCN 2013: An international system for human cytogenetic nomenclature*. S. Karger, Basel 2013.
 17. Haase D, Fontasch C, Freund M, et al. Cytogenetic findings in 179 patients with myelodysplastic syndromes. *Ann Hematol* 1995; 70: 171–187.
 18. Miltenyi S, Müller W, Weichel W, et al. High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* 1990; 11: 231–238.
 19. Lübbert M, Wijermans P, Kunzmann R, et al. Cytogenetic responses in high-risk myelodysplastic syndrome following low-dose treatment with the DNA methylation inhibitor 5-aza-2'-deoxycytidine. *Br J Haematol* 2001; 114: 349–357.
 20. Bräulke F, Jung K, Schanz J, et al. Molecular cytogenetic monitoring from CD34+ peripheral blood cells in myelodysplastic syndromes: first results from a prospective multicenter German diagnostic study. *Leukemia Res* 2013; 37: 900–906.
 21. Bräulke F, Platzbecker U, Müller-Thomas C, et al. Validation of cytogenetic risk groups according to International Prognostic Scoring Systems by peripheral blood CD34+FISH: results from a German diagnostic study in comparison with an international control group. *Haematologica* 2015; 100: 205–213.
- Podíl autorů na přípravě rukopisu**
 ŠR – provedení a vyhodnocení I-FISH analýz KD a CD34+ v PK, zpracování podkladů a literatury, napsání rukopisu
 JB – provedení a vyhodnocení I-FISH analýz KD a CD34+ v PK, připomínkování rukopisu, schválení finální verze
 IŠ – vyhodnocení I-FISH analýz KD a CD34+ v PK, úprava rukopisu
 MB – spolupráce při separaci CD34+ buněk, připomínkování rukopisu
 AJ – diagnostika a léčba nemocných, sběr klinických dat
 RN – diagnostika a léčba nemocných, sběr klinických dat
 JČ – diagnostika a léčba nemocných, sběr klinických dat
 ZZ – analýza komplexních karyotypů, mFISH/mBAND, připomínkování rukopisu, schválení finální verze
 KM – připomínkování rukopisu, schválení finální verze
- Poděkování**
 Práce byla podpořena granty MZČR00023736, RVO-VFN0064165, GAČR P302/12/G157
 Za provedené statistické analýzy děkujeme Ing. Aleně Dohnalové.
- Čestné prohlášení autora**
 Autor práce prohlašuje, že v souvislosti s tématem, vznikem a publikací tohoto článku není ve střetu zájmů a vznik ani publikace článku nebyly podpořeny žádnou farmaceutickou firmou. Toto prohlášení se týká i všech spoluautorů.
- Doručeno do redakce dne 17. 9. 2015.
 Přijato po recenzi dne 8. 2. 2016.*

Mgr. Šárka Ransdorfová Ph.D.

ÚHKT, oddělení cytogenetiky

U Nemocnice 1

128 20 Praha 2

email: sarka.ransdorfova@uhkt.cz