

PCR in spremljanje uspeha zdravljenja bolnikov s kronično mieloično levkemijo

asist. dr. Tadej Pajič, spec.med.biokem.

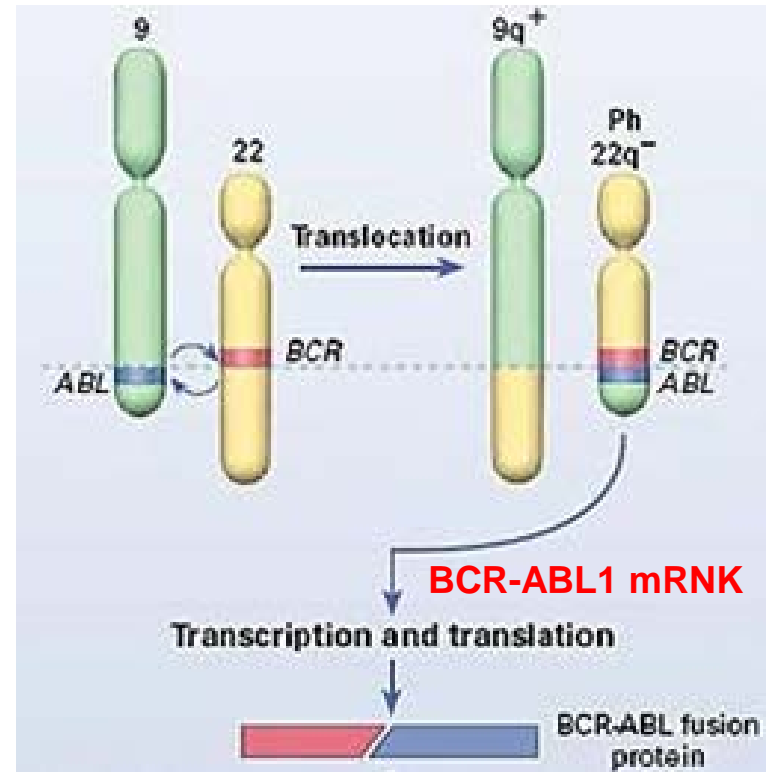
**Specializirani hematološki laboratorij kliničnega oddelka za
hematologijo**

Interna klinika

Univerzitetni klinični center Ljubljana

t(9;22)(q34;q11), Philadelphia kromosom (Ph): fuzijski gen *BCR-ABL1*

- Kronična mieloična levkemija (KML), BCR-ABL1 pozitivna,
- akutna limfoblastna levkemija celic B (B-ALL):
 - 3 % otrok z B-ALL,
 - 25 % odraslih z B-ALL,
- akutna mieloična levkemija (AML) < 1 %.



<http://a0.vox.com/>



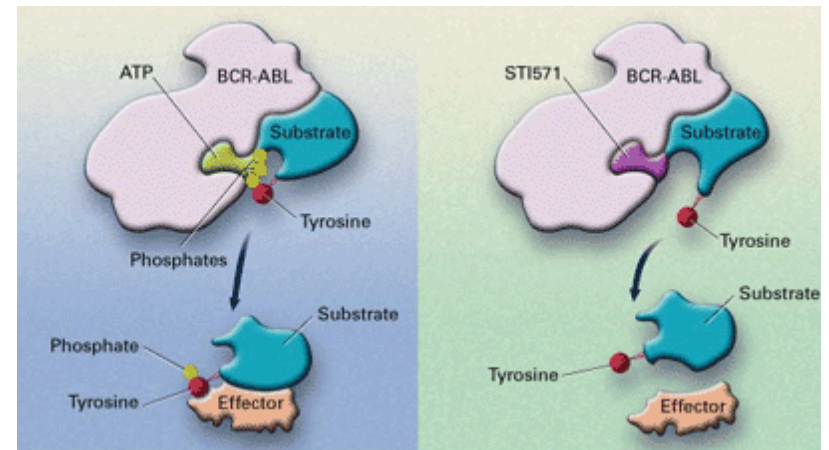
levkemična preobrazba krvnih celic

Zdravljenje z zaviralcem tirozinske-kinaze (TKI)

- zaviralec protein tirozin-kinaze BCR-ABL1

- Imatinib
- Nilotinib
- Dasatinib

Delovanje imatiniba



- veže se v vezavno mesto za ATP, prepreči fosforilacijo AK tirozin

- Drugi TKI za BCR-ABL1 in druga zdravila ter drugi načini zdravljenja (presaditev krvotvornih matičnih celic)

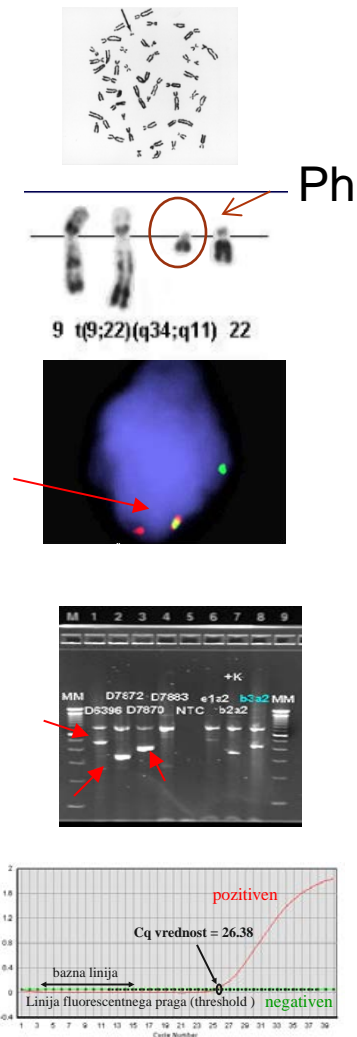
Potrditev diagnoze KML, BCR-ABL1 pozitivna

Dokazati moramo prisotnost:

- Philadelphia (Ph) kromosoma ali
- zlit gen *BCR-ABL1* ali
- BCR-ABL1 mRNK (BCR-ABL1 prepis).

Načini zaznave Ph¹ ali produkta Ph¹, zlitega gena *BCR-ABL1*:

Metode	Tarča/Rezultat	Tkivo	Občutljivost (%)
Standardna citogenetska preiskava (kariotip)	Ph – kromosom/ delež (%) Ph pozitivnih celic	Kostni mozeg	1-10
Fluorescenčna <i>in situ</i> hibridizacija (FISH)	Stik BCR in ABL1 gena (DNK)/ delež (%) Ph pozitivnih celic	Periferna kri/ kostni mozeg	0,2-5
Obratno prepisovanje in verižna reakcija s polimerazo (RT-PCR)	BCR-ABL1 mRNK/ Pozitiven/Negativen	Periferna kri / kostni mozeg	0,1 - 1
Kvantitativni RT-PCR (RT-qPCR)	BCR-ABL1 mRNK/ Delež (%) BCR-ABL1 prepisov predstavljen na mednarodnem merilu	Periferna kri / kostni mozeg	0,001-0,0001

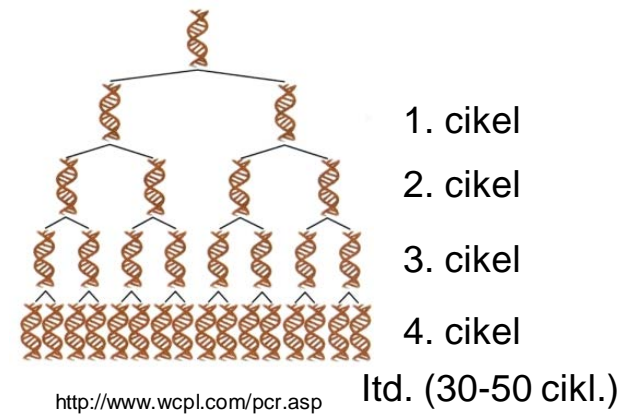


RT-PCR in RT-qPCR

PCR - kratica pomeni verižna reakcija s polimerazo

- t.j. reakcija, ki omogoča hitro in specifično pomnoževanje odseka genomske ali komplementarne DNK in vitro s termostabilno DNK-polimerazo.

Pridelke PCR običajno identificiramo z agarozno gelsko elektroforezo.



qPCR - kratica pomeni kvantitativna verižna reakcija s polimerazo

- je nadgradnja klasičnega PCR; omogoča nam **zaznavo in merjenje količine** odsekov DNK ali cDNK s pomočjo encima DNK-polimeraze in posebnih fluorescentnih barvil ali fluoresc. označenih nukleotidnih sond.

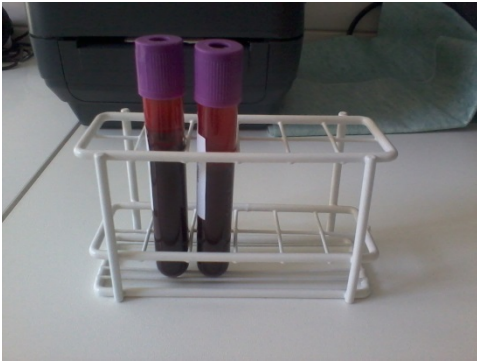
RT - kratica pomeni obratno prepisovanje (angl. reverse transcription)

- t.j. reakcija, kjer s pomočjo encima reverzna transkriptaza pretvorimo RNK v komplementarno DNK (cDNK). Ta je osnova za PCR, zato jo napravimo pred izvedbo reakcije PCR.

Kaj določimo s kvantitativnim PCR pri KML?

- določimo raven izražanja gena *BCR-ABL1* (pravimo, da merimo število prepisov *BCR-ABL1* mRNK), ki se zelo dobro ujema s številom levkemičnih celic v periferni krvi.
- Raven izražanja gena *BCR-ABL1* predstavlja razmerje med številom kopij prepisa *BCR-ABL1* in številom kopij prepisa *ABL1* določenih v qPCR. Razmerje izrazimo kot delež, odstotek (%) na mednarodnem merilu (International Scale, IS).
- V izvid navedemo še celokupno število kopij prepisa gena *ABL1*, ki je mera občutljivosti reakcije qPCR.

Postopek



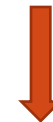
Periferna kri
(2 x 10 mL EDTA)



Izolacija levkocitov



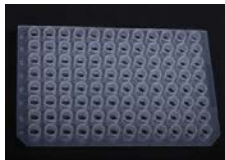
Shranjevanje levkocitov



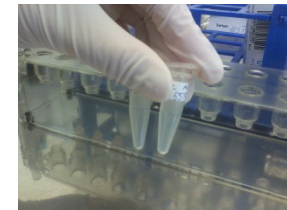
Določimo št. kopij prepisa
BCR-ABL1 in ABL1



Izvedba qPCR



Priprava cDNK



http://openwetware.org/wiki/Image:Trizol_phases.png



Izolacija RNK

Primer izračuna qPCR:

BCR-ABL1: 2700 kopij,

ABL1: 25 000 kopij;

Razmerje = 2700 deljeno s 25 000 (=0,108) in pomnoženo s 100 (= 10,8 %).

Mednarodno merilo (IS):

- 10,8 % pomnožimo z validiranim konverzijskim faktorjem (npr. 0,3371) = **3,64 % IS**.

V izvid se navede celokupno število kopij ABL1: npr. **25 000**.

Primer izvida

UKC Ljubljana, Interna klinika
 Specializiran hematološki laboratorij
 Njegoševa 4, 1000 Ljubljana
 01 522 37 93
 Dovoljenje za delo MZ: 0600-69/2011-10

Laboratorijski izvid		Končni izvid DUPLIKAT 2	
Prijemnik in ime:		Odstetek:	
[redacted]		[redacted]	
[redacted]		Zdravnik:	
[redacted]		[redacted]	
Zavarovanje: 034229006		ID naročila: 20104518	
Naslov:		Laboratorijska št.: 2004 / 27.08.2012	
Diagnoza:		Čas odvzema: 27.08.2012 12:00:00	
Zdravljenje:		Čas sprejema: 27.08.2012 12:13:00	
Opomba:		Čas zaključka: 10.09.2012 13:13:45	

Molekularno genetske preiskave

Preiskava	P	Izsledek	Ref. vr.
K-BCR-ABL1 t(9;22) (IS)qPCR		Pozitiven	Nedoločljiv
% IS		0.00362	
število kopij ABL1		26141	

Mnenje

Raven izražanja specifičnega prepisa BCR - ABL1 se giblje pod vrednostjo glavnega molekularnega odgovora (0,1 % IS), kar kaže na dobro odzivnost bolnika na zdravljenje.
 Priporočamo nadaljnje spremljanje zdravljenja z RT-qPCR preiskavo. Izsledek vrednotite skupaj s klinično sliko in drugimi preiskavami.

Poročilo o preiskavi/ah

Preiskavo za določitev ravni izražanja fuzijskega gena BCR-ABL1 smo izvedli in analizirali z obratnim prepisovanjem RNA in s kvantitativno PCR preiskavo (qPCR) (1,2).

Literatura:

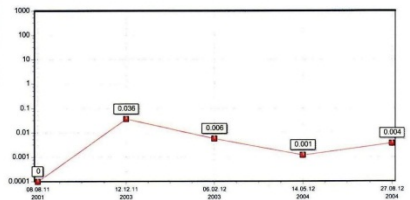
- Združenje hematologov Slovenije, Preložnik Zupan I, Pajič T. Smernice za odkrivanje in zdravljenje kronične mieloične levkemije. Zdrav. Vestnik (2008); 77: 1-5 - 10.
- Gabert J et al. Leukemia, 2003; 17 (12): 2318-2157.

Legenda:

K-BCR-ABL1 t(9;22) (IS)qPCR: Raven izražanja fuzijskega cDNA segmenta BCR - ABL1 je podana na mednarodnem merilu (International Scale, IS)(1). Vrednost izsledka 1 % ali nižje pomeni zmanjšanje za 2 desetiška logaritma od določene standardne začetne vrednosti in je običajno skladna s popočinim clogenetskim odgovorom. Vrednost 0,1 % ali nižje pomeni zmanjšanje vrednosti za 3 desetiške logaritme od začetne standardne vrednosti in označuje glavni molekularni odgovor. Zanesljivo lahko določimo med 5 in 10 kopij fuzijskega cDNA segmenta. Pod to mejo podamo izsledke kot Pozitiven, pod mejo zanesljive določite.

Prikaz zgodovine za preiskavo:K-BCR-ABL1 t(9;22) (IS)qPCR

Datum	Nid	% IS		število kopij ABL1
27.08.2012	2004	0.00362	Pozitiven	26141
14.05.2012	2004	0.00119	Pozitiven	24593
06.02.2012	2003	0.0058	Pozitiven	14430
12.12.2011	2003	0.036	Pozitiven	14970.8
08.08.2011	2001	0	Nedoločljiv	



Preiskavo izvedel:
Tadej Pajič

Vodja laboratorija:
asist. dr. Tadej Pajič, spec.med.biokem.

Rezultat, pozitiven ali nedoločljiv

Kvantitativni rezultat, kot % IS

Celokupno število kopij ABL1, indikator občutljivosti reakcije RT-qPCR; ustrezno ≥ 10.000 kopij

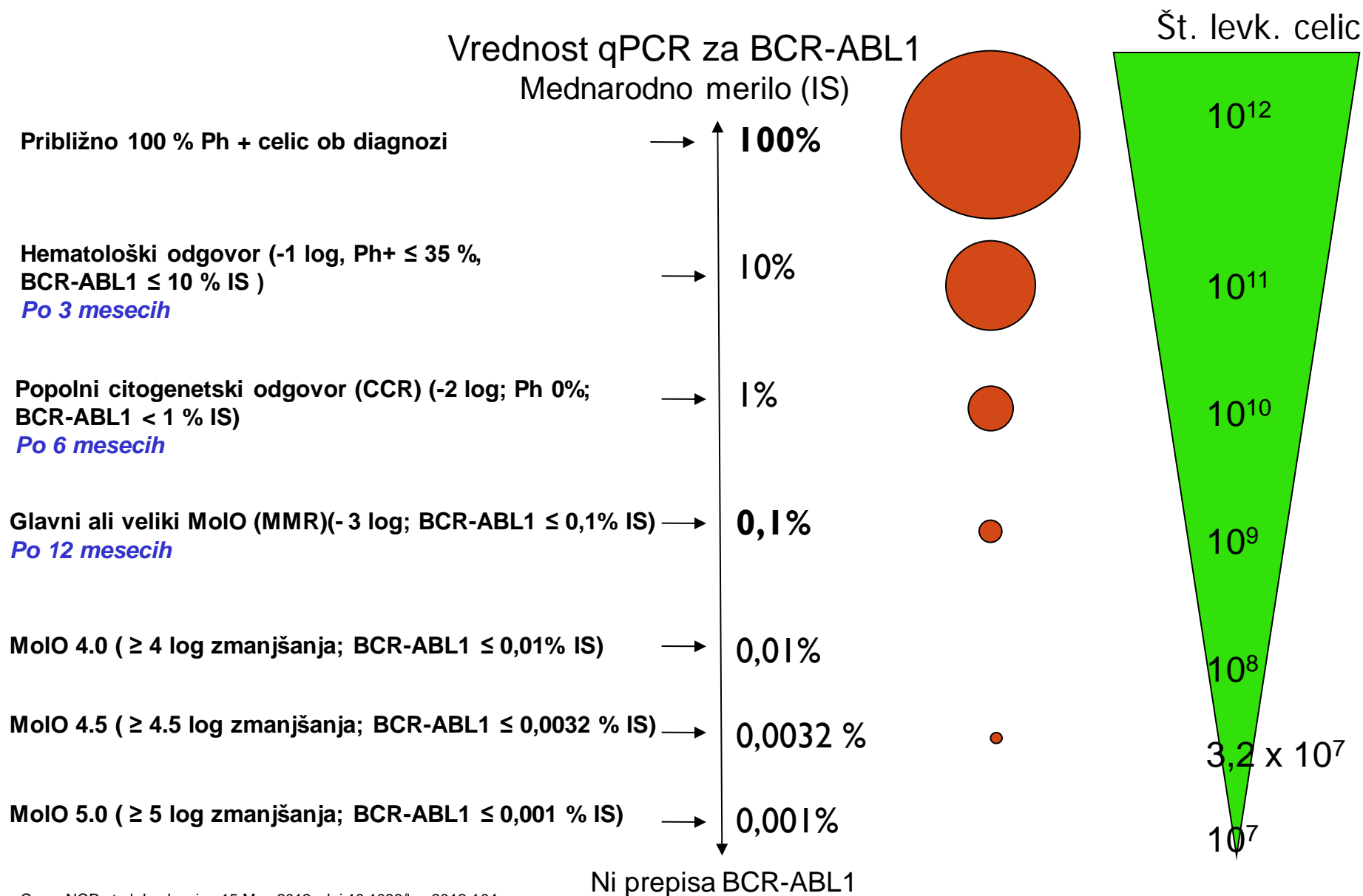
Zakaj je RT-qPCR pomemben pri zdravljenju KML?

- ker je to najboljčutljivejši način za oceno odgovora na zdravljenje KML,
- z njim zaznamo ponovitev bolezni prej kot z drugimi načini.

Pomemben je zato,

- ker je stopnja zmanjšanja ravni bolezni pomemben prognostični dejavnik in
- ker z njim lahko ocenimo slab začetni odgovor ali ponovitev bolezni po začetnem odgovoru na zdravljenje, kar lahko vodi, oz. omogoči izbiro najustreznejšega nadaljnjega zdravljenja.

Odgovori na zdravljenje z zaviralcem tirozinske kinaze



Kdaj izvedemo RT-qPCR?

- vsake 3 m iz vzorca PK (oz. dokler ni dosežen in potrjen glavni MoLO, nato vsakih 3 do 6 m),
- čimprej, takrat ko zaznamo pomembno povečanje ravni izražanja BCR-ABL1 (npr. povečanje ravni za 0,5 do 1,0 logaritem; > 5 X)

Pomembno: povečanje ne pomeni nujno neuspeha zdravljenja, ampak je razlog potrebno raziskati:

- npr. prekinitev ali opustitev jemanja zdravila;
- pridobljene mutacije v BCR-ABL1;
- klonska evolucija, to so dodatne kromosomske spremembe v klonu Ph (citogenetika) + genska amplifikacija BCR-ABL1 (FISH) in podobno

Molekularni odgovori in pomen

- **Glavni ali veliki MoIO (Major Molecular response, MMR), če bolezen lahko zaznamo v $\leq 0,1$ % BCR-ABL1 IS; trenutni cilj je, da vsi bolniki dosežejo vsaj stabilen glavni MoIO – ZAKAJ?**

Zato, ker je doseganje glavnega MoIO povezano s

- povečano verjetnostjo, da se bolezen ne bo ponovila,
 - povečano verjetnostjo dolgotrajnejšega odgovora na zdravljenje,
 - z večjo verjetnostjo doseganja globljega MoIO, če se glavni MoIO doseže prej.
- **Molekularni odgovor 4.0, 4.5 in 5.0**

Pri novejših zdravilih (nilotinib, dasatinib) je

- delež bolnikov, ki doseže glavni MoIO v krajšem času večji in
- delež bolnikov z globljim MoIO odgovorom kot je glavni MoIO je večji.

Najverjetneje bo doseganje teh odgovorov povezan z možnostjo, da bi bolniki nekoč lahko prenehali z zdravljenjem.

POZOR!

- **Izbira zdravljenja ni odvisna samo od učinkovitosti, ampak tudi od bolnikovega kliničnega stanja, prenašanja zdravila, stranskih učinkov ipd.**

Zaključek

- Kvantitativni PCR je zelo občutljiva in pomembna preiskava za določitev ravni izražanja gena BCR-ABL1 pri KML.
- Doseganje **stabilnega glavnega molekularnega odgovora (MMR)** (vrednost manj ali enako 0,1 % BCR-ABL1 IS) je trenutno cilj zdravljenja KML s TKI.
- Najverjetneje bo doseganje **stabilnih molekularnih odgovorov npr. 4.5 ali 5.0** povezan z možnostjo, da bi bolniki nekoč lahko prenehali z zdravljenjem.
- POZOR!

Izbira zdravljenja ni odvisna samo od učinkovitosti, ampak tudi od bolnikovega kliničnega stanja, prenašanja zdravila, stranskih učinkov ipd.