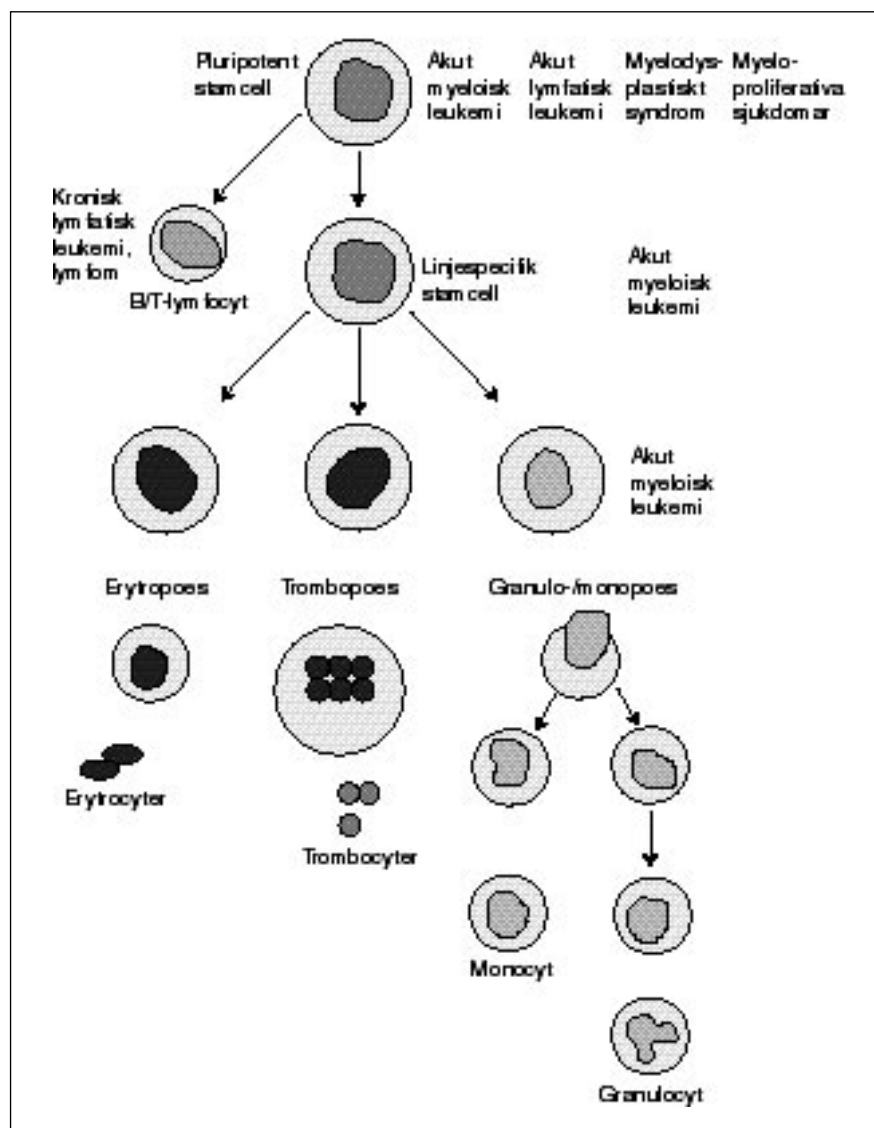


Den maligna hematopoiesens genetiska ursprung väl kartlagt

Flera av de genetiska förändringar som ger upphov till hematologiska maligniteter är idag väl kartlagda. Stor kunskap finns också om såväl den normala som den malignt transformerade stamcellen. Man har dessutom fått tillgång till metoder som kan påvisa olika kromosomala anomalier i morfologiskt identifierade enskilda hematopoetiska celler. Dessa metoder kan också användas kliniskt, t ex för att registrera kvarvarande klonala celler efter terapi vid akuta leukemier.

Hematopoetiska stamceller har förmåga till självgeneration och till att differentiera och mogna ut till myeloida celler (granulocyter/monocyter/trombocyter/erythrocyter) eller lymfocyter (Figur 1). Kunskapen om hematopoetiska stamceller har ökat avsevärt vad beträffar karakteristika, och de kan idag identifieras med olika ytmärkörer, så kallade CD-antigener (cluster of differentiation). Den tidiga, »pluripotenta», stamcellen är CD 34⁺/CD 38⁻, medan den mer differentierade, linjespecifika (committed) stamcellen är CD 34⁺/CD 38⁺ (Figur 1). De tidiga stamcellerna utgör endast omkring 0,1 procent av alla mononukleära celler i benmärgen och är därmed, relativt sett, få till antalet.

Stamcellernas differentiering och utmognad regleras av cirkulerande och lokalt verkande hematopoetiska tillväxtfaktorer och interleukiner. Det är således ej förutbestämt till vilken celllinje (det vill säga antingen granulocytopoes, lymfocyttopoes, trombocytopo-



Figur 1. Schematisk presentation av hematopoiesen och på vilken nivå av differentieringen olika hematologiska maligniteter antas uppstå.

Författare

PER BERNELL

med dr, avdelningsläkare, hematologsektionen, medicinska kliniken, Danderyds sjukhus

BJÖRN JACOBSSON

docent, överläkare, sektionen för patologi, Karolinska sjukhuset.

es eller erythrocytopoes) stamcellen mognar ut, utan det är bland annat beroende av exogena stimuli som till exempel infektion och blödning.

Genom att man idag kan identifiera inte bara de olika differentieringsstegen i hematopoiesen utan även respektive hematopoetisk cellinje, har man erhållit en bred kunskap om hematologiska maligniteter och dess biologi.

En malignt transformerad stamcell är grunden till den hematologiska ma-

ligniteten [1] som utgörs av en population tumörceller (klonen). Denna cellklon är vanligtvis morfologiskt homogen, men däremot biologiskt heterogen, och expanderar successivt, företrädesvis i benmärg och/eller lymfsystem.

Genetik och den maligna hematopoiesen

Uppkomst av kromosomala avvikelser i hematopoetiska celler är idag den mest väldokumenterade genetiska för-

ändring som leder till malign transformation. Till dessa avvikelser hör translokationerna, som kan leda till aktivering av onkgener (det vill säga gener som under normala förhållanden styr celltillväxt men som vid mutation bidrar till tumörutveckling), och deletioner, som leder till förlust av tumorsuppressorgener. Dessa förändringar i sig, eller i vissa fall tillsammans med submikroskopiska genförändringar såsom punktmutation i det så kallade RAS-lokus [2], kan vara associerade med leukemiutveckling.

Malign transformation kan föregås av flera mutationer, och kromosomala förändringar kan vara ett sent steg i den klonala evolutionen [3]. Frånvaro av kromosomavvikelse i hematopoetiska celler utesluter således inte att en enskild cell eller cellpopulation är malign.

Det är inte heller ovanligt med ackumulerande kromosomala förändringar som ger upphov till en stegvis mer malign sjukdom. Ett exempel på detta är kronisk myeloisk leukemi, där den så kallade Philadelphia-kromosomen oftast ses i kronisk fas av sjukdomen, men vid accelererad fas och i blastkris kan flera andra aberrationer, som tillkomst av trisomi 8 eller en extra Philadelphia-kromosom, ses [4]. Detta är ett klassiskt exempel på kromosomal evolution.

Snarlik evolution förekommer också vid myelodysplastiskt syndrom, som

vid övergång till akut leukemi kan uppvisa tillkomst av monosomi 7 eller trisomi 8, eller andra komplexa kromosomala kloner. Vid kronisk lymfatisk leukemi kan i vissa fall trisomi 12 tillkomma. Denna evolution är dock inte ett obligat fynd i varje tumörcell, vare sig vid myelodysplastiskt syndrom eller kronisk lymfatisk leukemi, utan en mindre population av de leukemiska cellerna kan uppvisa dessa förändringar [5-7] vilket är ett tecken på biologisk heterogenitet inom cellklonen. Huruvida denna kromosomala evolution är ett delfenomen av en progressiv sjukdom eller är orsaken till progressionen är ej säkert klarlagt.

Studier av cytogenetiska avvikelser i enskilda celler

De tekniker som använts vid hematologiska maligniteter, dels för att kunna påvisa en malign klon, dels identifiera dess cellinjettillhörighet, är studier av cellulär morfologi och immunfenotyp i kombination med studier av genetisk klonalitet. Klonalitet kan studeras med antingen så kallad X-bunden polymorfism eller genom studier av kromosomala aberrationer. Studier av klonalitet genom X-bunden polymorfism har dock delvis fått träda tillbaka. Detta på grund av svårigheter att tolka resultaten i och med att så kallad skev inaktivering av X-kromosomen även förekommer hos normalbefolkningen. I denna översikt beskrivs ej dessa meto-

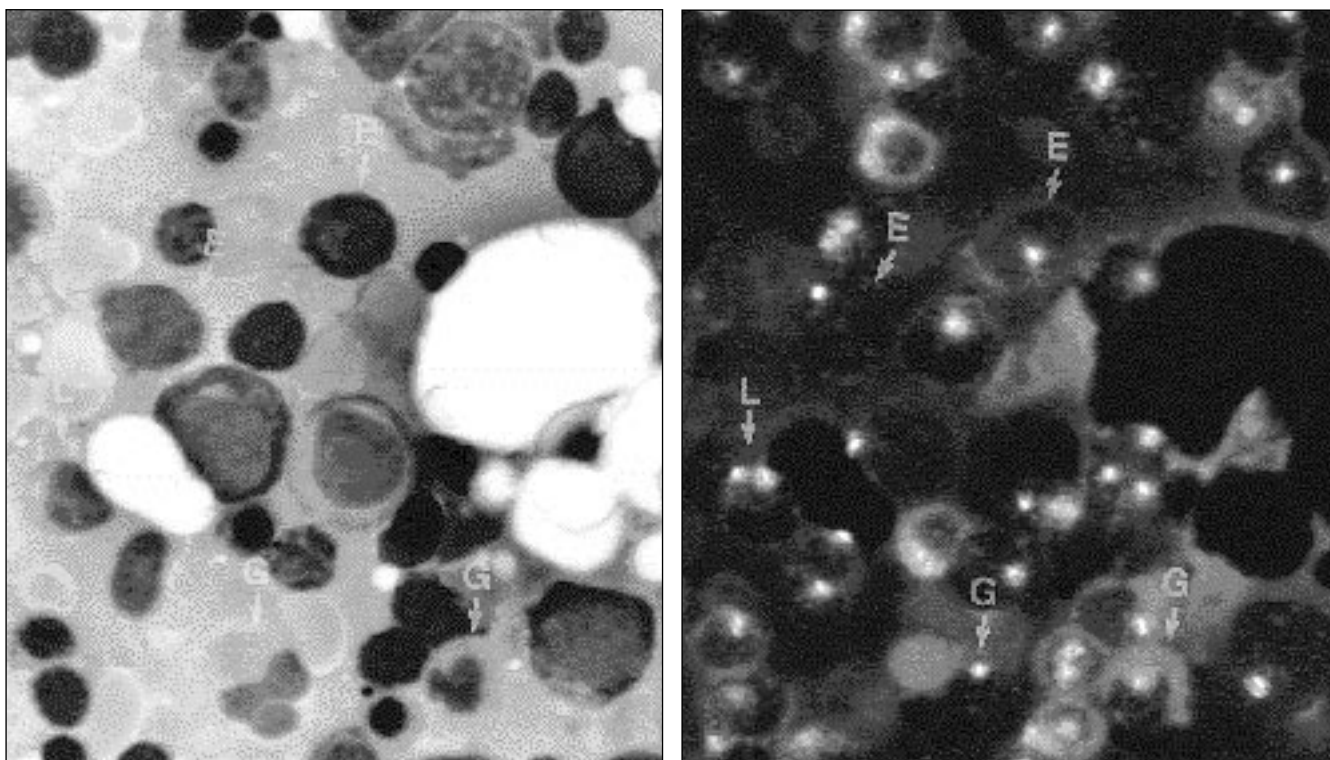
der i detalj, för detta ändamål hänvisas till speciallitteratur.

Fluorescent in situ-hybridisering FISH, har däremot blivit den metodik som för närvarande förefaller mest pålitlig när man vill studera kromosomalt aberranta celler för att därigenom kunna påvisa klonala celler. FISH bygger på att man först identifierat den cytogenetiska avvikelserna med sedvanlig konventionell metafascytogenetik. Därefter tas ett utstryk från benmärg eller perifert blod. Detta inkuberas med en komplementär fluorescerande DNA-prob riktad mot den sedan tidigare kända cytogenetiska avvikelserna, som sedan kan visualiseras i ett fluorescensmikroskop.

Denna metodik kombinerad med olika färgningstekniker, till exempel MGG-FISH [8] (Figur 2), tillåter identifiering av genetiska förändringar i morfologiskt identifierade celler i interfase, och därmed av vilka cellinjer som är involverade (se Ruta). Även den så kallade MAC-tekniken (morfologi, antikropp, kromosom) [9] tillåter samtidig analys av cellmorfologi, immunfenotyp på tumörceller och genotypisk avvikelse i enskilda celler, och har därmed visat sig utomordentligt användbar i detta sammanhang.

Myelodysplastiskt syndrom och akuta leukemier

För att kunna förstå lite av biologin hos den malignt omvandlade stamcel-



Figur 2. May-Grünwald-Giemsa (MGG)-färgat benmärgsutstryk (till vänster) från en patient med myelodysplastiskt syndrom och monosomi 7 som sedan avfärgats och därefter inkuberats med en DNA-prob mot den pericentromera regionen av kromosom 7 (till höger). Erytropoes (E), granulopoes (G) uppvisar klonala celler, det vill säga monosomi 7 (= en fluorescerande punkt) medan lymfopoes (L) uppvisar normalt (= två fluorescerande punkter) antal av kromosom 7.

ANNONS

ANNONS

MGG-FISH-tekniken

Man utgår från färsk eller fryskonserverade blod- och/eller benmärgsutstryk hos patienter med en känd numerisk (monosomi/trisomi) kromosomavvikelse.

Enskilda celler fotoidentifieras i MGG-färgning (Figur 2) och cellers läge registreras med koordinater.

Efter det att glaset avfärgats, fixerats och förbehandlats tillsätts en fluorescerande prob med specificitet för den tidigare definierade kromosomavvikelsen.

För att återfinna enskilda celler används de tidigare registrerade koordinaterna och därefter räknas antalet prickar (= antal kopior av undersökt kromosom/gensekvens i varje cell) (Figur 2, högra bilden).

Fördelar

- Tekniken tillåter en direkt korrelation mellan cytogenetiska data och cytologiska/morfologiska karaktistika.
- Snabb teknik där ett stort antal celler kan bedömas under kort tid.
- Hög sensitivitet och specificitet.
- Man erhåller cytogenetiska data från icke delande celler eller terminalt differentierade celler.

Nackdelar

- Avsaknad av cytogenetisk avvikelse hos en andel patienter, vilket begränsar antalet fall som kan undersökas.
- Celler kan vara klonala men ändå ej uppvisa kromosomavvikelse.
- Tillgängligheten av prover mot icke numeriska avvikelser.
- Fluorescerande ospecifika partiklar på glaset.
- Bakgrundsbrus, det vill säga »falsk» förekomst av icke monosomala celler (5–8 procent), men även trisomala celler (1 procent).

len och dess förmåga att differentiera och mogna ut, är det av värde att kunna påvisa vilka cellinjer som är involverade vid hematologiska maligniteter. I princip kan såväl lymfocyter som granulocyter, monocytter, trombocyter och erythrocyter vara involverade i den maligna klonen (Figur 1). Det skulle i sådant fall vara en malignitet utgången från den pluripotenta stamcellen. Emellertid förefaller både myelodysplastiskt syndrom, akut myeloisk leukemi och akut lymfatisk leukemi endast i några procent av alla fall ha sitt ursprung i den pluripotenta stamcellen (Figur 1), det vill säga att den maligna klonen diffe-

rentierar till både myeloiska och lymfoida celler.

Vad beträffar myelodysplastiskt syndrom kan klonala celler, till skillnad mot vid akut myeloisk leukemi, nästan alltid påvisas i granulocyter, monocytter och erythrocyter [6, 10]. Enstaka patienter (1–5 procent) har även uppvisat klonala B- såväl som T-lymfocyter [11, 12].

Akut myeloisk leukemi är en heterogen sjukdomsgrupp och uppvisar till varierande grad klonala celler inom såväl odifferentierade som mer differentierade granul- och monocytter [13]. Klonala celler inom erytropoes och trombopoes har endast kunnat påvisas hos enstaka patienter. Lymfoida celler har endast i undantagsfall (< 5 procent) visat sig vara klonala. Sammantaget kan sägas att akut myeloisk leukemi är en heterogen sjukdom, där den maligna klonen kan uppstå på varierande nivå av utdifferentieringen av stamcellen. Vidare förefaller myelodysplastiskt syndrom i de allra flesta fall uppstå betydligt tidigare i den hematopoetiska utdifferentieringen än akut myeloisk leukemi. Vid både myelodysplastiskt syndrom och akut myeloisk leukemi är det också klart visat att de granulopoetiska klonala cellerna har förmåga att differentiera ut till mogna granulocyter.

Akut lymfatisk leukemi är ej speciellt välstuderad vad gäller olika myeloida cellinjer och huruvida de är klonalt involverade. Enstaka patienter har uppvisat cytogenetiskt avvikande erytropoes, vilket skulle tala för ett engagemang av den pluripotenta stamcellen. Behovet av bekräftande studier är dock stort.

Myelo- och lymfoproliferativa sjukdomar

Vad beträffar de myeloproliferativa sjukdomarna talar preliminära data för att den maligna klonen expanderar från den pluripotenta stamcellen, som därmed skulle kunna ge upphov till både myeloiskt och lymfatiskt engagemang. Men liksom vid de akuta leukemierna är det lymfoida inslaget observerat på enstaka patienter, och även här finns ett behov av konfirmerande studier.

Kronisk lymfatisk leukemi är relativt välstuderad vad beträffar både den maligna klonens morfologi och biologi. Den genetiska aberration som är mest välstuderad är trisomi 12, som förefaller vara ett relativt sent fynd i sjukdomsutvecklingen och väl korrelerat till B-lymfocyter vid kronisk lymfatisk leukemi [7].

Vid non-Hodgkins lymfom finns inga säkra rapporter om engagemang av pluripotenta stamceller, utan den klonala expansionen förefaller vara begränsad till antingen B- eller T-lymfocyter

beroende på om B- eller T-cellslymfom föreligger [12]. Vad beträffar Hodgkins lymfom så har man funnit cytogenetiska avvikelser i Reed–Sternberg-cellerna, men inte i vare sig stamcell eller övriga B- eller T-lymfocyter.

Klinisk användbarhet

Utöver att rent vetenskapligt kunna karakterisera och lära sig mera om biologin bakom hematologiska maligniteter, finns flera kliniska applikationsområden för de metoder som tillåter identifiering av klonala, hematopoetiska celler i både benmärg och perifert blod. Ett stort och mycket viktigt användningsområde är att kunna registrera eventuella kvarvarande klonala celler (minimal residual disease) efter lämplig terapeutisk intervention vid akuta leukemier [13, 14]. Hit räknas också analys av så kallad perifer stamcellsskörd vid autolog stamcellstransplantation. MGG-FISH lämpar sig i många fall av akut myeloisk leukemi/akut lymfatisk leukemi för detektering av tidigt recidiv [13].

Då patienter med till exempel myelodysplastiskt syndrom i relativt stor utsträckning behandlas med olika varianter av tillväxtfaktorer (erytropoetin, G-CSF etc) kan man idag registrera effekten på klonala/icke klonala celler hos de patienter som förbättrar blodvärden på respektive behandling [15, opubl data, 1996].

Referenser

1. Messner HA, Griffin JD. Biology of acute myeloid leukemia. Clinics in Haematology 1986; 15: 641-67.
2. Janssen JWG, Buschle M, Layton M, Drexler HG, Lyons J, Van den Berghe H et al. Clonal analysis of myelodysplastic syndromes: Evidence of multipotent stem cell origin. Blood 1989; 73: 248-54.
3. Rabbitts TH. Chromosomal translocations in human cancer. Nature 1994; 372: 143-9.
4. Heim S, Mitelman F. Cancer Cytogenetics. Chromosomal and molecular genetic aberrations in tumor cells, 2nd ed. New York: Wiley-Liss, 1995.
5. Nylund SJ, Verbeek W, Larramendy ML, Ruutu T, Heinonen K, Hallman H et al. Cell lineage involvement in four patients with myelodysplastic syndrome and t(1;7) or trisomy 8. Studied by simultaneous immunophenotyping and fluorescence in situ hybridization. Cancer Genet Cytogenet 1993; 70: 120-4.
6. Bernell P, Jacobsson B, Norgren A, Hast R. Clonal cell lineage involvement in myelodysplastic syndromes studied by fluorescence in situ hybridization and morphology. Leukemia 1996; 10: 662-8.
7. Peres Losada A, Wessman M, Tiainen M, Hopman ANH, Willard HF, Sole F et al. Trisomy 12 in chronic lymphocytic leukemia: an interphase cytogenetic study. Blood 1991; 78: 775-9.
8. Jacobsson B, Bernell P, Arvidsson I, Hast R. Classical morphology, esterase cytochemistry and interphase cytogenetics off peripheral blood and bone marrow smears. J Histochem Cytochem 1996; 44: 1303-9.

9. Teerenhovi L, Lindholm C, Eklom M, Rossi L, Borgström GH, Tallman JK et al. A method for simultaneous study of the karyotype, morphology, and immunologic phenotype of mitotic cells in hematologic malignancies. *Blood* 1984; 64: 1116-22.
10. Fialkow PJ, Singer JW, Adamson JM, Vaidya K, Dow LW, Ochs J et al. Acute non lymphocytic leukemia: Heterogeneity of stem cell origin. *Blood* 1981; 57: 1068-73.
11. Lawrence HJ, Broudy VC, Magenis RE, Olson S, Tomar D, Barton S et al. Cytogenetic evidence for involvement of B lymphocytes in acquired idiopathic sideroblastic anemias. *Blood* 1987; 70: 1003-5.
12. Franssila KO, Lindholm C, Teerenhovi L, Knuutila S. A method combining morphological, immunocytochemical and chromosomal examination of the same cell in the study of lymphoproliferative disease. *Eur J Haematol* 1988; 40: 332-8.
13. Bernell P, Arvidsson I, Jacobsson B, Hast R. Fluorescence in situ hybridization in combination with morphology detects minimal residual disease and heralds relapse in acute leukaemia. *Br J Haematol* 1996; 95: 666-72.
14. Anastasi J, Vardiman JW, Rudinsky R, Patel M, Nachman J, Rubin CM et al. Direct correlation of cytogenetic findings with cell morphology using in situ hybridization and analysis of suspicious cells in bone marrow specimens of two patients completing therapy for acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1991; 77: 2456-62.
15. Anastasi J, Feng J, Le Beau MM, Larson RA, Rowley JD, Vardiman JW. Cytogenetic clonality in myelodysplastic syndromes studied with fluorescence in situ hybridization: Lineage, response to growth factor therapy, and clone expansion. *Blood* 1993; 81: 1580-5.

Summary

Genetic origins of haemopoietic malignancies well defined

Per Bernell, Björn Jacobsson

Läkartidningen 1998; 95: 5493-8

It is vital to determine which cell lines are affected in haematological malignancies, since such information is important to an understanding of the biology of neoplastic stem cells and their capacity to differentiate and mature. Parallel studies of cellular morphology and of chromosomal anomalies is an approach permitting determination of lineage specificity for different haematological neoplasms. Findings in current studies suggest that acute myeloid leukaemia and myelodysplastic disorders generally involve cells of myeloid lineage only, whereas myeloproliferative disorders may also involve lymphoid cell lines. Lymphoid malignancies such as non-Hodgkin's disease or acute lymphoid leukaemia usually involve lymphoid cell lines.

Correspondence: Dr Per Bernell, Haematology Section, Dept of Medicine, Danderyds sjukhus, SE-182 88 Danderyd, Sweden.

Vägledning om information om läkemedel på Internet

I ett vägledande uttalande har Nämnden för bedömning av läkemedelsinformation (NBL) försökt undanröja den osäkerhet som råder om vilka regler som gäller för information på läkemedelsföretags hemsidor på Internet (NBL 478/98).

Tillämpningen av detta allmänna uttalande illustreras i ett aktuellt ärende (NBL 474/98). Det gällde ett pressmeddelande på Astras hemsida i december 1997 om ett i Sverige ännu inte godkänt medel mot impotens (brittiskt handelsnamn Muse). Informationsgranskningsmannen (IGM) hade ifrågasatt om detta var otillåten prelantering av ett ännu inte godkänt läkemedel, men det tyckte inte NBL.

Avgörande i Astra-fallet var att informationen fanns under rubriken »Om Astra», »Pressmeddelanden» – »News releases», att det inte fanns länkar dit från de grenar av hemsidan som markerats »För patienter» eller »För läkare» samt att medlet i Sverige får ett annat handelsnamn än det brittiska som användes i pressmeddelandet. Dessa faktorer ledde NBL till slutsatsen att informationen inte utgör kommersiell läkemedelsinformation, och då är inte branschens informationsregler tillämpliga.

Läkemedelsföretags hemsidor vänder sig till många olika målgrupper, såsom egen personal, aktieägare, återförsäljare, konsument, journalister osv, påpekade Astra i ärendet. Informationsbehovet hos dessa grupper varierar mycket, och företagets information är därför strukturerad med en gren för varje målgrupp.

Sökning eller aktiv spridning?

Det faktum att vem som helst kan söka sig fram till informationen även under »Pressmeddelanden» innebär inte att den har sådan karaktär och inriktning att den utgör sådan kommersiell läkemedelsinformation som NBL skall pröva. Det finns ju liknande gränsdragningsproblem när det gäller annonser för receptbelagda läkemedel i t ex *Läkartidningen*, påpekar NBL. Allmänheten kan ju via bibliotek ta del av sådana annonser.

Det avgörande är om den enskilde själv söker informationen (vilket mot-

svarar Internet-situationen) eller om läkemedelsföretaget genom egna aktiva åtgärder, t ex genom TV-reklam eller annonser i massmedier, sprider informationen eller uppgifter om var den kan sökas på Internet till allmänheten.

Dagens regler vägleder

NBL understryker att det faktum att det i stor utsträckning saknas särskilda regler för Internet inte innebär att området är oreglerat. Vad som i andra sammanhang utgör brott eller annan regelöverträdelse utgör det normalt också om åtgärden vidtas på Internet, och i stor utsträckning kan man tillämpa nu gällande regler. NBL anser inte att Internationella handelskammarens Internetregler ger konkret vägledning eftersom de är underställda nationell lag. (Reglerna anger att all »reklam och marknadsföring skall vara laglig, hederlig och vederhäftig och får ej utformas på ett stötande sätt».)

Om kommersiell information på läkemedelsföretags hemsidor anses ha mottagare på den svenska marknaden som mål kan NBL pröva den enligt reglerna för läkemedelsinformation samt etablerad praxis. Det gäller både läkemedelsinformation och terapi- och utbildningsriktad information på sådana hemsidor. Om informationen inriktas mot hälso- och sjukvårdspersonal respektive allmänheten skall den ha samma minimiinhåll som motsvarande tryckta information.

Även om läkemedel nämns vid namn behöver dock dessa regler inte tillämpas på t ex ekonomisk information riktad till potentiella investerare eller aktieköpare, trots att också andra kan söka sig fram till informationen. NBL förordar dock att målgruppen tydligt anges genom länkar eller hemsidans struktur. På motsvarande sätt som vid tryckt information undantas inslag i en fri medicinsk debatt från NBLs domäner; där gäller ju tryckfrihetslagstiftningen.

NBL har i princip att bedöma enbart marknadsföring av läkemedel på den svenska marknaden. Även om det blir en samlad bedömning i enskilda fall drar NBL gränsen med hänsyn till bl a följande faktorer: om språket är svenska, priser i svenska kronor, om produkterna är tillgängliga på den svenska marknaden, om indikationer, doseringar och förpackningar förekommer i Sverige samt om den som står för informationen har sin hemvist här.

Yngve Karlsson