

# Bioanalytikerne med i hele forløbet

Fra de første analyser af knoglemarv til flowcytometrisk analyse af behandlingens virkning har bioanalytikerne en vigtig funktion i hele forløbet hos børn med leukæmi



Lone Jørgensen lærer op, mens de andre suger til sig af hendes indgående kendskab til flowcytometri.



**Af afdelingsbioanalytiker //**  
**Helle Venters**  
Vævstypelaboratoriet, afs. 7631  
Klinisk immunologisk Afdeling  
Rigshospitalet

Lægen vil have mistanke til leukæmi, hvis et barn over længere tid har haft hyppigt tilbagevendende infektioner uden nogen forklarlig årsag og evt. har andre symptomer som hævede lymfeknuder, træthed, blå mærker, knoglesmerter, hovedpine og kvalme.

Ved mistanke om leukæmi får barnet taget en knoglemarvsprøve under narkose. Knoglemarvsprøven bliver analyseret for cellernes kromosomer og deres ekspresion af overfladeproteiner. Prøverne bliver håndbåret, når de ankommer, da de fleste prøver svares akut, idet klinikerne afventer svaret i forhold til evt. justering af behandlingsforløbet. Arbejdet giver stor tilfredsstillelse, og det er let at gøre en ekstra indsats, når man ved, at klinikerne og barnets familie venter på vores svar for at kunne komme videre med behandlingen.

Den analyse, vi udfører, kaldes for MRD-flowanalysen, Minimal Residual Disease. Gruppen, som arbejder med MRD-flow-

Vi håber, at vores artikel har givet dig interesse for flowcytometri. Hvis du ønsker at besøge vores laboratorium eller netværke omkring flowcytometri, kan du henvende dig til afdelingsbioanalytiker Helle Venters, mobil 35456777.

**KOM OG  
BESØG OS**

Foto // Sine Fiig

analysen, består af 5 bioanalytikere, 3 videnskabelige medarbejdere og 1 afdelingsbioanalytiker, som alle brænder for netop dette arbejdsområde og disse særlige børn.

### 80 procent helbredes

I Danmark får ca. 40 børn konstateret leukæmi årligt. Leukæmi er den mest almindelige kræftform hos børn, og 80% af disse børn bliver helbredt. Leukæmi er en sygdom, som udgår fra knoglemarven. Der kan forekomme leukæmi i alle blodets cellerækker, men den mest almindelige er i forstadierne til den lymfoide B-celle (Præ-B-ALL).

Akut Lymfatisk Leukæmi i den umodne B-cellelinje (Præ-B-ALL) udgør ca. 85% af alle leukæmi tilfældene. Ved Præ-B-ALL er kroppen ikke i stand til at producere modne B-celler til blodet og det lymfatiske system, men har derimod en overproduktion af umodne B-celler og derved et svækket immunforsvar. Årsagerne til sygdommen er ukendte og uklare.

### MRD-analyse med flowcytometri

Ved konstatering af Præ-B-ALL bliver der, jf. NOPHO-vejledningen, udtaget knoglemarv på dag 0, dag 15, dag 29, dag 79 og dag 92. Derudover kan det blive nødvendigt med yderligere prøver hos børn, som reagerer dårligt på behandlingen. Dette er nødvendigt for at konstatere en eventuel restsygdom (MRD = Minimal Residual Disease), som kan bevirke en justering i behandlingen.

MRD måles ved flowcytometri (MRD-flow). Vævstypelaboratoriet på Rigshospitalet har landsfunktion for varetagelse af MRD-analysen og modtager således ca. 400-500 prøver årligt.

Et flowcytometer er et apparat, hvor en væskestrøm sikrer, at celler i en kuvette passerer enkeltvis forbi en laser. Forud for kørsel på apparatet er cellerne inkuberet med forskellige antistoffer rettet mod overfladeproteiner. Antistofferne er mærket med hvert sit forskellige fluorokrom, som, når det bliver belyst med en særlig bølgelængde fra en laser, udsender lys i en anden bestemt bølgelængde. Apparatet omsætter disse lyssignaler og giver et billede af, hvilke celler marven indeholder og deres modenhedsgrad med meget stor sikkerhed og sensitivitet, idet der kan analyseres et stort antal celler – ofte op til 1.000.000 celler.

### Fænotype er patientens "fingeraftryk"

Ved Præ-B-ALL sammenlignes tilstedeværelsen og intensiteten af overflademærker med det normale niveau. B-celler er bl.a. karakteristiske ved at udtrykke CD45, CD19, CD10, CD20, CD38, globuliner (alle overfladeproteiner, som forefindes i varierende grad alt efter modenhed).

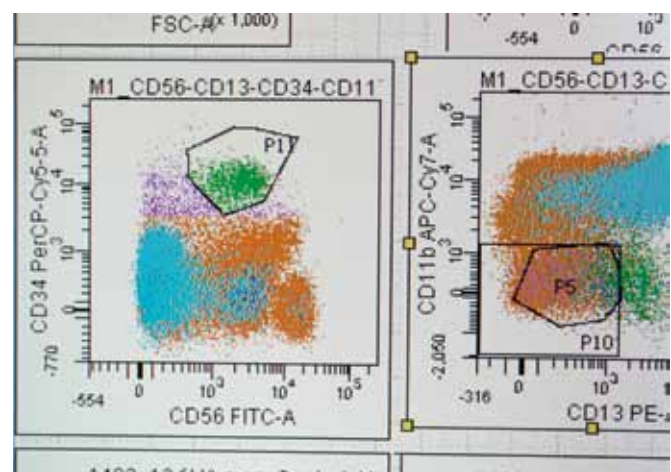
Ved flowcytometri er det muligt at få et billede af marvens cellefordeling, og om den evt. er domineret af en leukæmisk celleklon. Ved leukæmi opklares, hvilke overfladeproteiner de maligne leukæmiske celler udtrykker. Dette danner grundlag for fastlæggelse af immunfænotypen, som varierer mellem de enkelte tilfælde, idet der inden for B-ALL findes mange undertyper af sygdommen.

Denne individuelle fænotype er derved en slags "fingeraftryk", som kan følges for at konstatere evt. rest af sygdom undervejs i behandlingsforløbet.

### Behandling i 3 faser

Intensiteten af behandlingen af akut lymfoblastær leukæmi hos børn har traditionelt været baseret på en risikogruppering, der har afspejlet patientens alder og leukocyttal på diagnose-tidspunktet samt den leukæmiske klons immunfænotype og forekomsten af visse kromosomforandringer.

Typisk foregår behandlingen af leukæmibørnene over en periode på 2-3 år. Behandlingen foregår i tre faser, hvor målet med 1. fase er at bringe barnet i komplet remission med fjernelse af de leukæmiske celler og genoprettelse af normalt periferet blod, normal knoglemarv og normal klinisk status. ➔



Bioanalytikerne kan følge virkningen af behandlingen på de farvede dotplots. Efter 92 dage skal der helst ingen syge celler være tilbage.

**MALIGN = ONDARTET  
REMISSION = I BEDRING  
RECIDIV = TILBAGEFALD**



1 Bioanalytiker Stine Bruun Mathiesen og Sanne Krusaa Møller præparerer knoglemarvsprøverne, efter de er ankommet til vækststypelaboratoriet. Første skridt er typisk at tælle antallet af celler i prøven. Derefter vurderer de, hvordan prøven skal præpareres. Som regel opformeres cellerne forud for indfarvning. Efter indfarvning er de klar til at blive kørt i flowcytometeret.



2 Efter indfarvning sættes prøven i karussellen på flowcytometeret. Der køres et antal celler op til max 1 mio. Prøven kører fra et par og op til 10 minutter afhængig af, hvor mange celler den indeholder.

## AKTIV FORSKNINGSINDSATS

Inden for børneleukæmi foregår der meget forskning, og vækststypelaboratoriet deltager aktivt i arbejdet. Områdets ansvarlige, overlæge Hanne Marquart, har bl.a. opnået fondsmidler til ph.d. og postdoc og arbejder med forskellige projekter:

- Forståelse af leukæmicellens biologi
- Finde nye risikomarkører
- Immunstatus under og efter behandling af leukæmi.

Derudover yder vi flowcytometrisk bistand i projekter hos klinikerne. Vi måler bl.a. MRD-flow i spinalvæske og cellesortering.

Vores ledende bioanalytiker, Jannie Gregers, har skrevet en ph.d. omkring farmakogenetiske polymorfier (normale DNA-variationer) indvirkning på behandlingsrespons.



3 Bioanalytikerne kigger på dotplots fra en prøve. På de farvede billeder kan de bl.a. aflæse, hvilke antistoffer cellerne er positive eller negative for, ligesom de kan afgøre dobbeltpositive og -negative. De kan også se, hvor i modningsprocessen cellerne er. Bioanalytikerne i vækstlaboratoriet er i en oplæringsfase, for at overtage første del af datatolkningen, som lægerne ellers har haft som opgave.



4 På afdelingens planlægningstavle, kan de hurtigt få et overblik over prøverne. De blå magneter er de prøver, som er kommet ind samme dag, mens de røde er prøver, der forventes ind de kommende dage. På dagen for fotograferingen var der kommet hele 10 prøver. Det gav stor travlhed, da prøvesvar garanteres inden for 24 timer- og gerne hurtigere, da barn, familie og klinikerne venter på svaret. Normalt modtager afdelingen mellem 10-15 knoglemarvsprøver på en hel uge

De efterfølgende faser er kombinationsbehandling via cytostatikakure, som skal sikre, at barnet forbliver i remission. Der behandles med forskellige stoffer, som bevirker celledød. Stofferne går fx ind og påvirker cellens metabolisme, DNA-syntese og celledeling. Nedenstående stoffer indgår i behandlingen:

- **Remissions-induktionsbehandlingen** omfatter kombinationer af: doxorubicin, vinkristin, glukokortikoider og intratekal methotrexate.
- **Intensifikations-/konsolideringsfasen** tilpasses forekomsten af visse cytogenetiske risikofaktorer og graden af restsygdom på de første 4 ugers behandling. Omfatter først og fremmest behandling med L-asparaginase, antimetabolitter, glukokortikosteroider, vincristin og højdosis methotrexat samt højdosis Ara-C (cytosar), cyklofosamid, etoposid og fludarabine til de mest resistente patienter. Aktive kemoterapeutiske stoffer til intratekal leukæmi profylakse er methotrexat, Ara-C og et glukokortikoid. Kranial bestråling anvendes ikke længere rutinemæssigt.
- **Vedligeholdelsesbehandling** indtil 2,5 år fra diagnosetidspunktet. Omfatter peroral methotrexat og 6-merkaptopurin.

Hvis et barn får recidiv af akut leukæmi, er højdosisbehandling med allogent stamcelletransplantation sædvanligvis den eneste behandling, som kan kurere patienten. Transplantation kan også blive aktuel i første behandlingsfase hos patienter med akut lymfatisk leukæmi, der ikke er i remission efter induktionsbehandling. □



5 Lone Jørgensen (tv) er gruppens store støtte og har et mangeårigt "kærligheds" forhold til flowcytometri. Hun har været med helt fra starten til at bygge MRD flowcytometri op på Vævstypelaboratoriet, og Lone oplærer løbende de øvrige i gruppen ud fra sin store erfaring. Bioanalytiker Sanne Krusaa Møller (th.) er ved at blive oplært i cellesortering, som benyttes i særlige tilfælde ved udredning af leukæmi samt i forskningsøjemed.



"Arbejdet giver mig stor tilfredsstillelse, og det er let at gøre en ekstra indsats, når man ved at klinikerne og barnets familie venter på vores svar for at kunne komme videre med behandlingen", bioanalytiker Belgin Satan.



"Flowcytometri er min passion. Det fascinerer mig at følge alle de forskellige celler og opmodningsstadier og nu er jeg også ved at blive oplært i fortolkning af data, som ellers har været lægernes område. Resultaterne bliver stadig endeligt gennemgået af en læge, og det giver en tryghed i overtagelsen af denne nye arbejdsopgave," bioanalytiker Ulla Fält

#### FÆLLES NORDISKE RETNINGSLINJER FOR BEHANDLING

Behandling af leukæmi fastlægges af den nordiske samarbejdsorganisation NOPHO, som udstikker fælles retningslinjer for behandling og omfang af de specifikke laboratoriemæssige analyser. De kliniske resultater og laboratorieresultaterne indtastes i en fælles database, som evalueres hvert 6. år med formålet at forbedre behandlingen og øge overlevelsen.

#### Referencer

Gustafsson G, Schmiegelow K, Forestier E, et al. *Improving outcome through two decades in childhood ALL in the Nordic countries: the impact of high-dose methotrexate in the reduction of CNS irradiation: Nordic Society of Pediatric Haematology and Oncology (NOPHO). Leukemia 2000;14(12):2267-2275.*



6 Overlæge Hanne Marquart er afdelingens fagligt ansvarlige person. Hun skal bl.a. sørge for, at alle er opdaterede med den sidste nye viden, og hun har dialogen med klinikerne. Efter tolkningen af prøverne er det Hanne Marquart og de to andre videnskabelige medarbejdere, som sender det endelige svar af sted.