ỨNG DỤNG SINH HỌC PHÂN TỬ TRONG BỆNH LÝ HUYẾT HỌC

PGS. TS. BS. Phan Thị Xinh
Bộ Môn Huyết Học
Đại Học Y Dược TP HCM

NỘI DUNG

Bất thường NST và gen trong bệnh lý huyết học:

- **Những rối loạn tăng sinh tủy**
- **Bạch cầu cấp dòng tủy**
- **Bạch cầu cấp dòng lympho**
- **Lymphoma**
- **Bạch cầu mạn dòng lympho (CLL)**

TẦM QUAN TRỌNG CỦA SHPT TRONG HUYẾT HỌC

TRIỆU CHỨNG LÂM SÀNG

↓

Tủy đồ, ± sinh thiết tủy,
Và dấu ấn tế bào

CHẨN ĐOÁN

↓

Phân tích NST, FISH,
PCR Và DNA sequencing

↓

Bất thường NST, đột biến gen,...

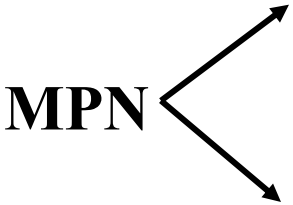
SHPT

ĐÁNH GIÁ TIÊN LƯỢNG,
LỰA CHỌN PHÁC ĐỒ ĐIỀU TRỊ THÍCH HỢP
VÀ THEO DÕI ĐIỀU TRỊ

BẤT THƯỜNG NST VÀ GEN TRONG NHỮNG RỐI LOẠN TĂNG SINH TỦY

(MYELOPROLIFERATIVE NEOPLASMS: MPN)

Phân Loại MPN Điển Hình Theo Đột Biến Gen



BCR/ABL(+) ✓**Bạch cầu mạn dòng tủy (CML)**

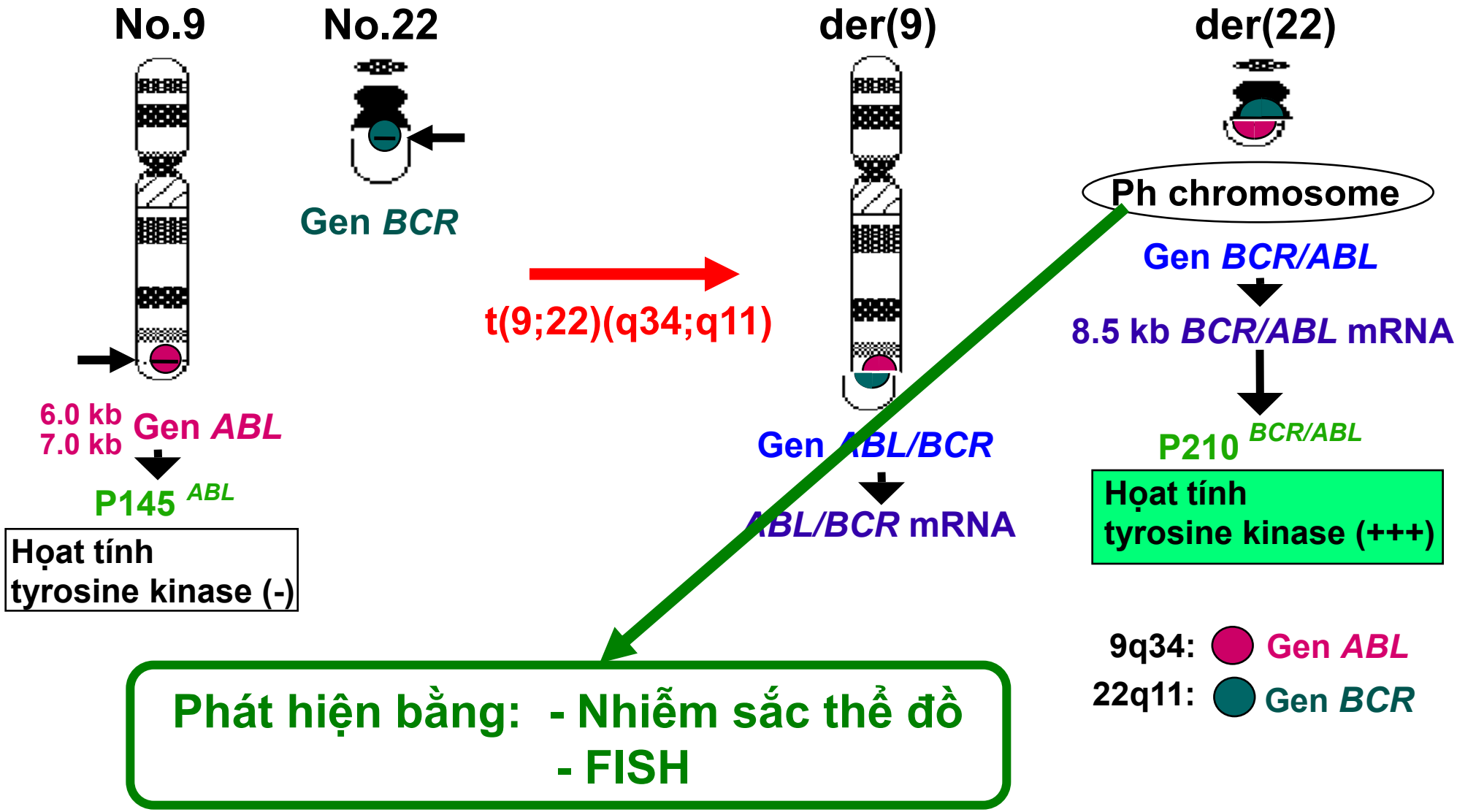
BCR/ABL(-) ✓**Đa hồng cầu (95 ~ 97% *JAK2*V617F)**

Tăng tiểu cầu nguyên phát
(~ 60% *JAK2*V617F)

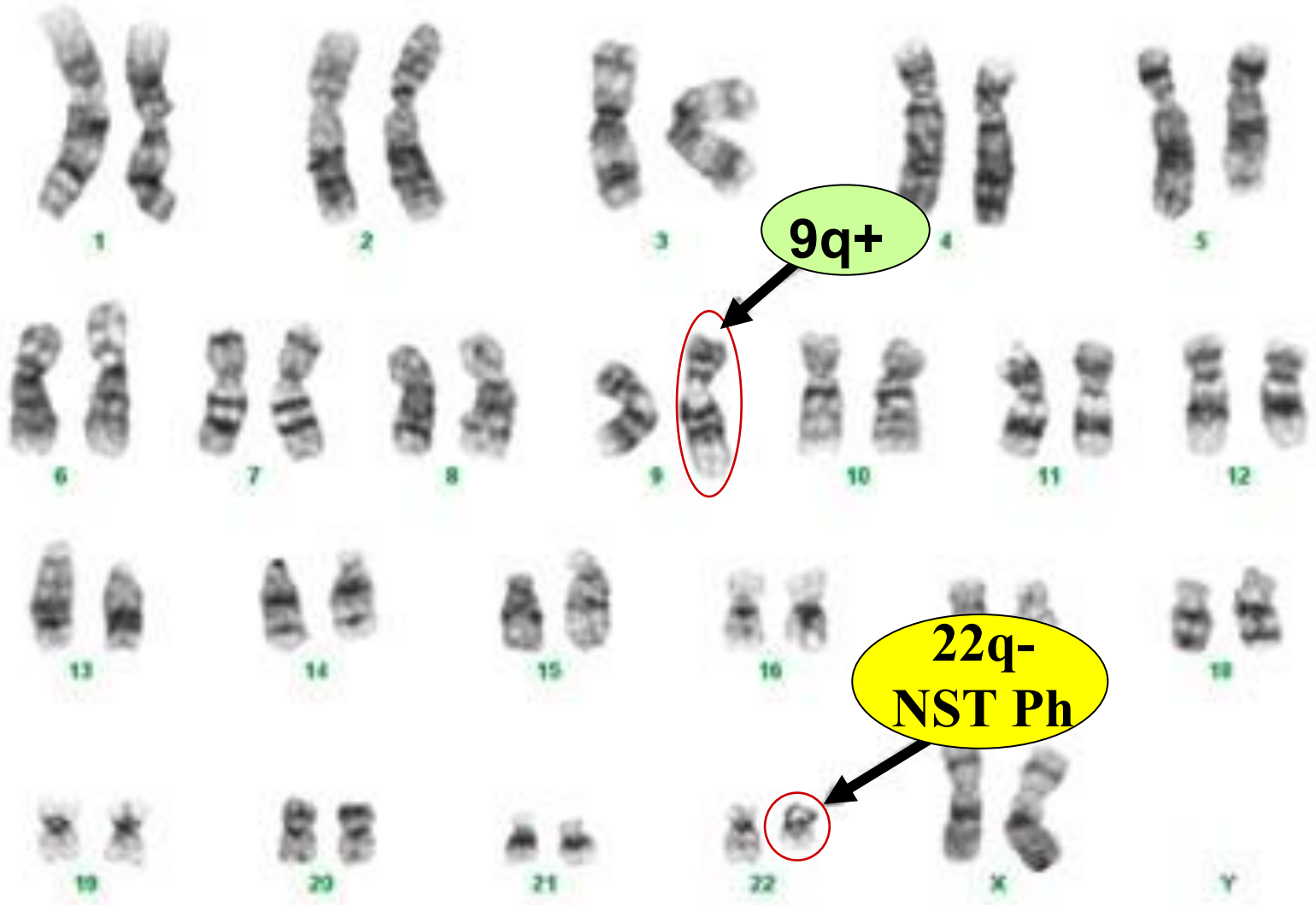
Xơ tủy nguyên phát
(~ 60% *JAK2*V617F)

BẠCH CẦU MẠN DÒNG TỦY ĐIỂN HÌNH CÓ t(9;22)(q34;q11)

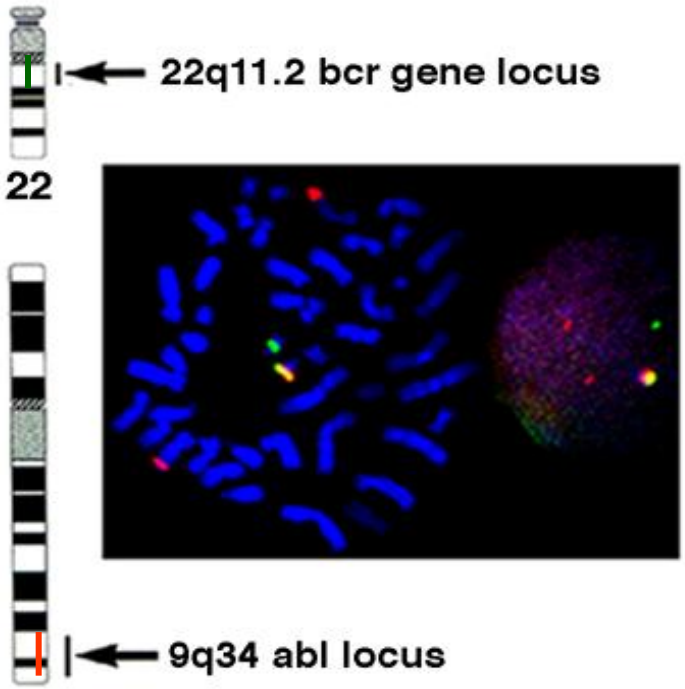
CHUYỂN VỊ NST PHILADELPHIA (Ph)

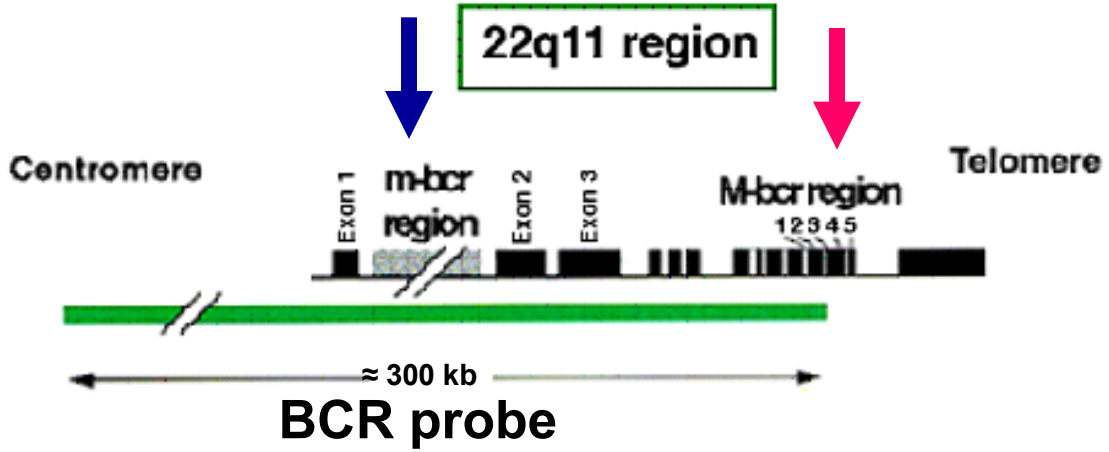


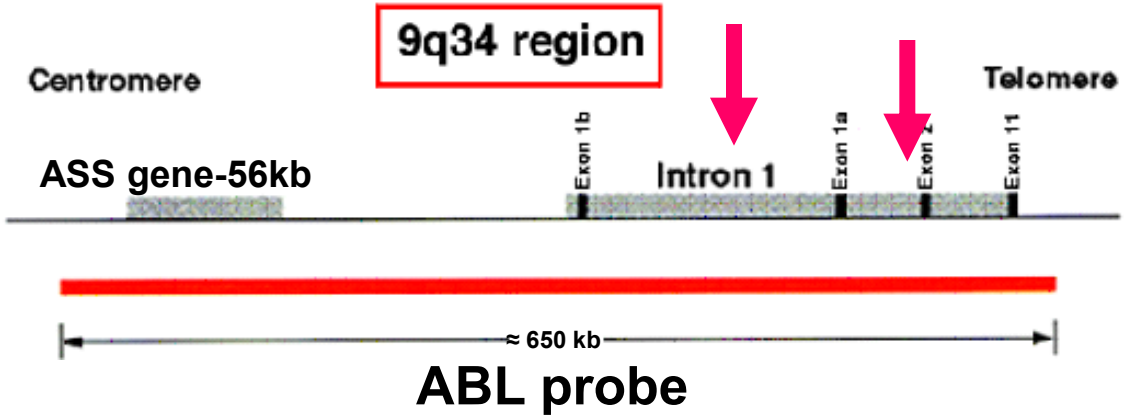
t(9;22)(q34;q11)



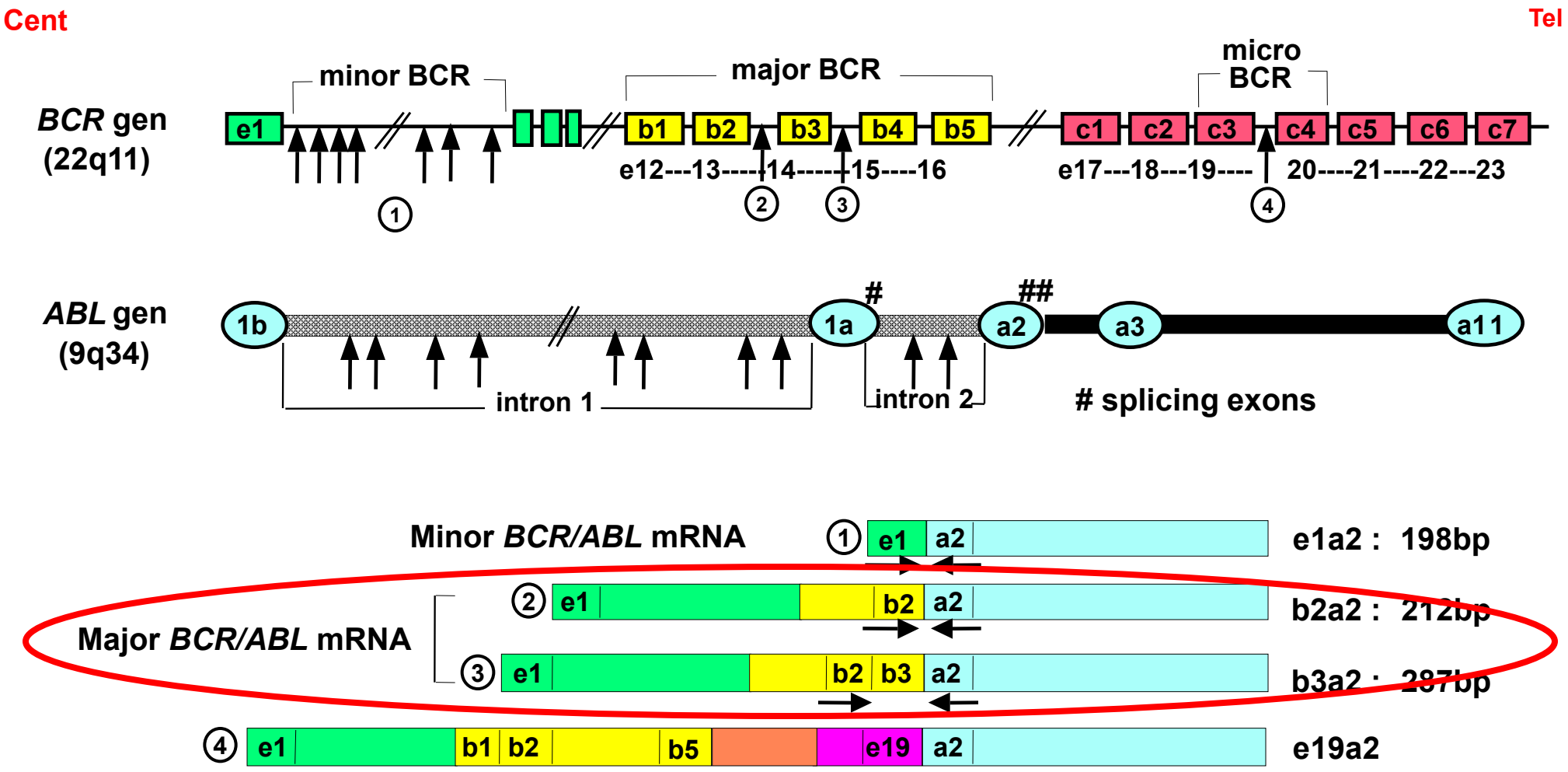
FISH Sử Dụng *BCR/ABL* Probe







CÁC KIỂU BẢN SAO *BCR/ABL* TRONG CML



Phát hiện được bằng kỹ thuật RT-PCR hoặc RQ-PCR

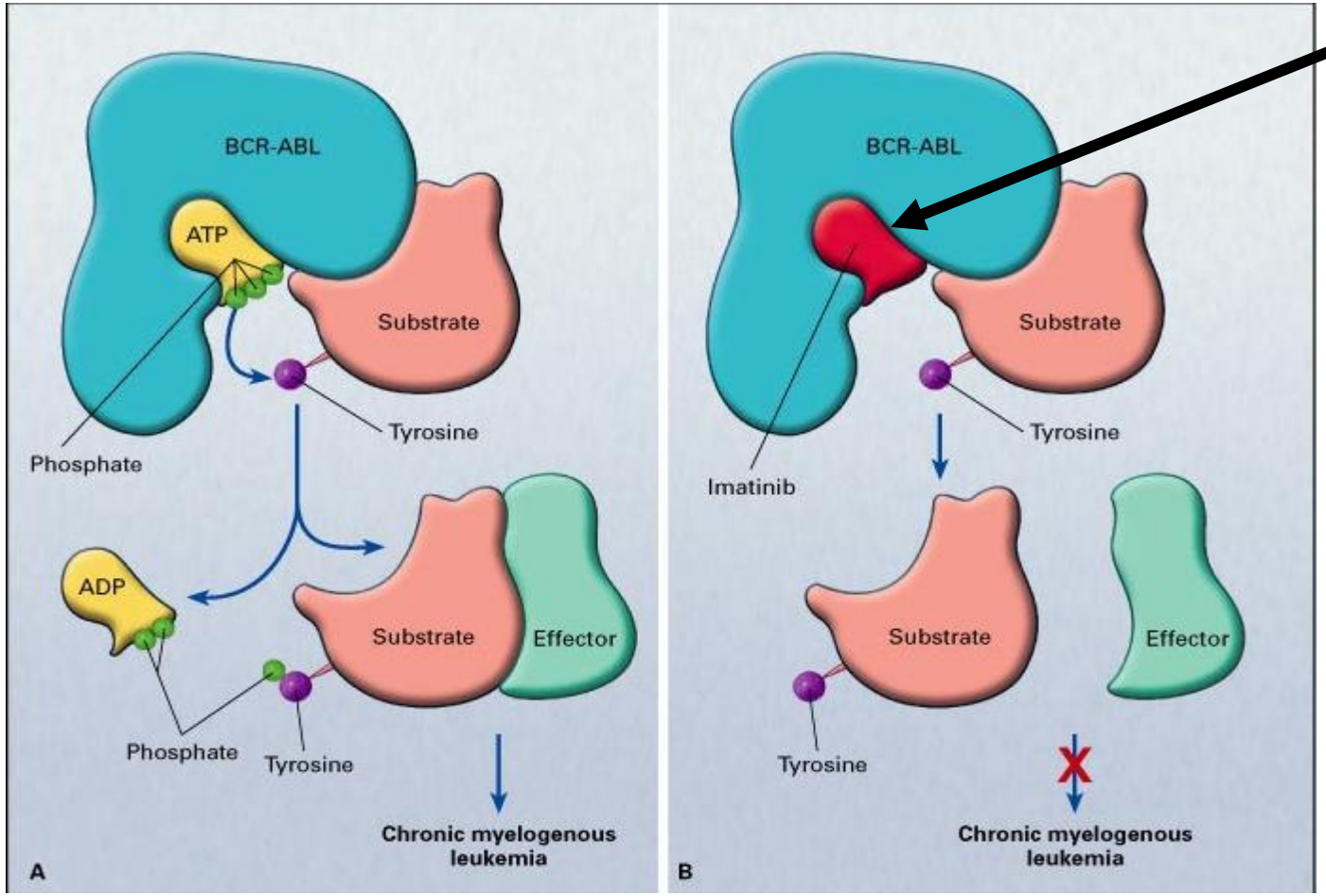
SINH BỆNH HỌC PHÂN TỬ CỦA CML

Tần suất	Điểm gãy trên BCR	Tổ hợp gen	Protein được mã hóa	Đặc điểm
2/3 ALL Ph(+), hiếm CML, AML	m-bcr (minor)	e1a2	$p190^{BCR/ABL}$	-Diễn tiến nhanh -Kém biệt hóa
Hầu hết CML Ph(+) 1/3 ALL Ph(+)	M-bcr (Major)	b2a2	$p210^{BCR/ABL}$	CML diễn tiến chậm
		b3a2		
1-2% CML Ph(+), AML	µ-bcr (micro)	e19a2	$p230^{BCR/ABL}$	Tăng ưu thế Neutrophil
	Khác	e6a2, b2a3, b3a3		

Phát hiện bằng RQ-PCR

Hoàng Anh Vũ & Phan Thị Xinh (2017),
Sinh bệnh học phân tử của bệnh lý huyết học ác tính

IMATINIB ỨC CHẾ ĐẶC HIỆU BCR/ABL

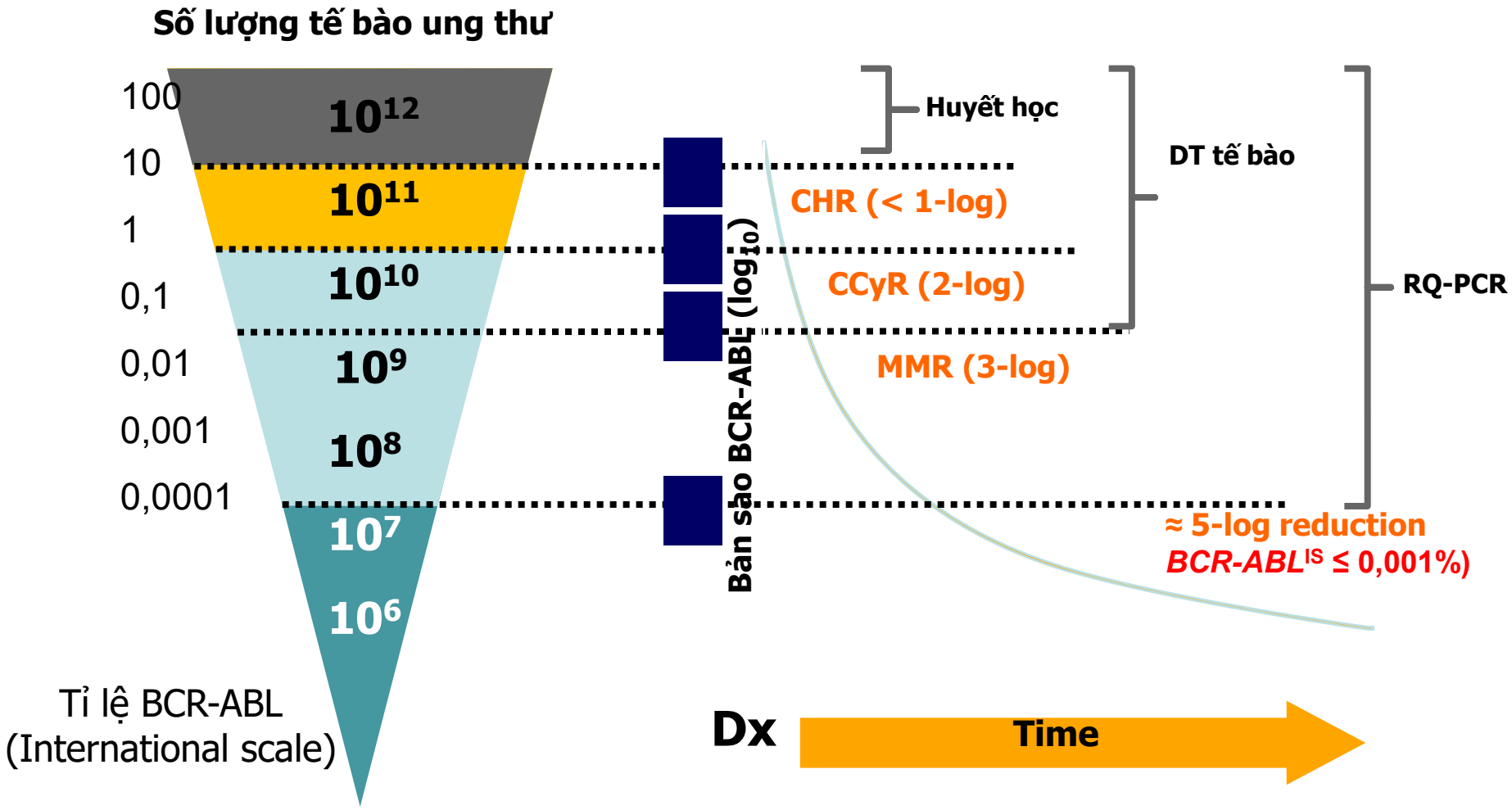


Imatinib Mesylate (gleevec, glivec):

- Viên: 100 mg
- Liều: 4 viên/ngày (Uống/gđ mạn)
- Theo dõi: ngoại trú, BN không phải nằm viện.

Đáp ứng hoàn toàn về DTTB: 87% sau 60 tháng (IRIS), 63% sau 24 tháng (BV.TMHH)
Đến nay đã điều trị khoảng 1000 BN tại BV.TMHH

THEO DÕI ĐÁP ỨNG ĐIỀU TRỊ CML



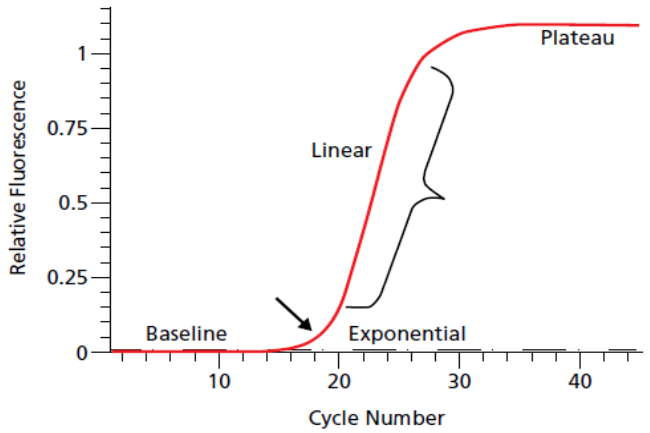
CHR, complete HR; Dx, diagnosis; MMR, major MR.

1. Baccarani M, et al. *Blood*. 2006;108:1809-1820;
2. Radich JP. *Blood*. 2009;114:3376-3381;
3. Cross NCP, et al. *Blood*. 1993;82:1929-1936.

CÁC PHƯƠNG PHÁP PCR ĐỊNH LƯỢNG

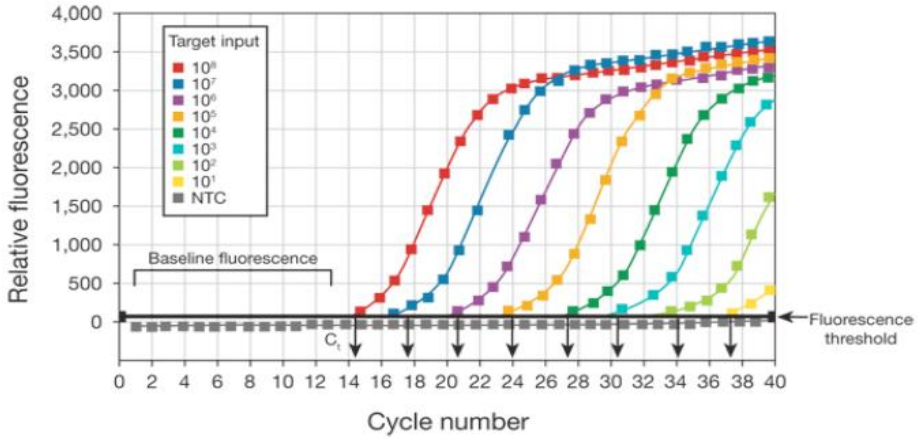
Standard PCR

Định lượng sản phẩm cuối cùng
trong toàn bộ phản ứng



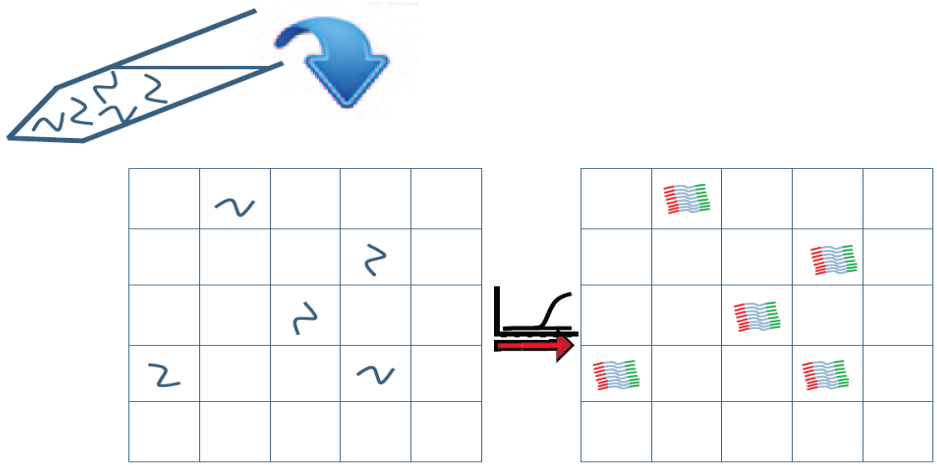
qPCR

Định lượng sản phẩm trong
lúc thực hiện của phản ứng



ddPCR

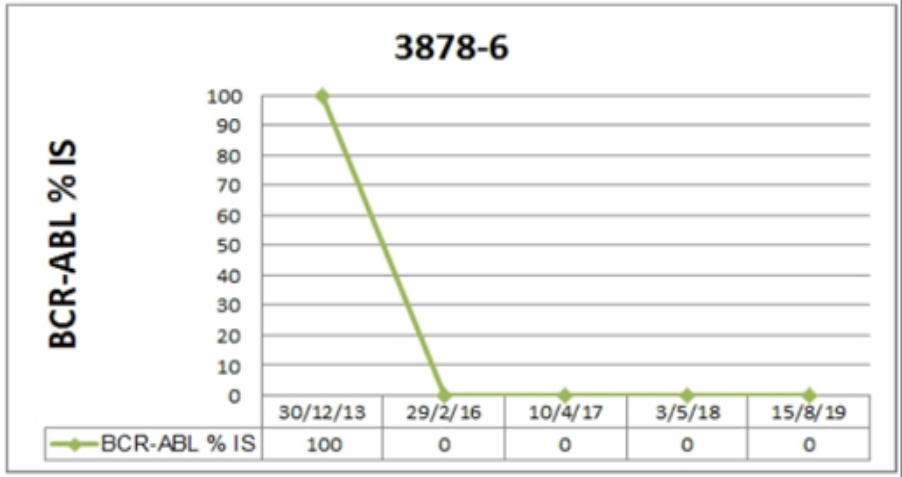
- Toàn bộ phản ứng được tách ra thành những giọt nhỏ.
- Mỗi giọt sẽ có chứa từ 0 đến 1 copy.
- Những giọt dương sẽ được tính toán theo phân bố Poisson để xác định số lượng copy tuyệt đối ban đầu.



EXETER CLINICAL LABORATORY INTERNATIONAL

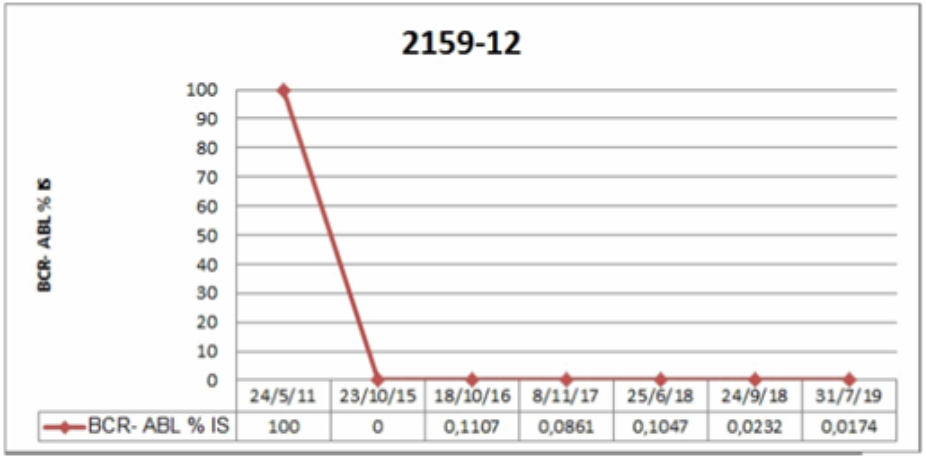
THEO DÕI ĐÁP ỨNG ĐIỀU TRỊ BẰNG KỸ THUẬT RQ-PCR

Kết quả xét nghiệm:
Không phát hiện tổ hợp gen major BCR/ABL
Hình ảnh:



Diễn giải: Đường khuếch đại gen ABL của mẫu bệnh nhân: Ct = 20,9 (17≤Ct≤21 có thể đánh giá MR⁴)
Đường khuếch đại ABL của mẫu chứng dương: Ct = 15,5
Đường khuếch đại BCR/ABL của mẫu chứng dương: Ct = 21
Chứng âm: Âm tính

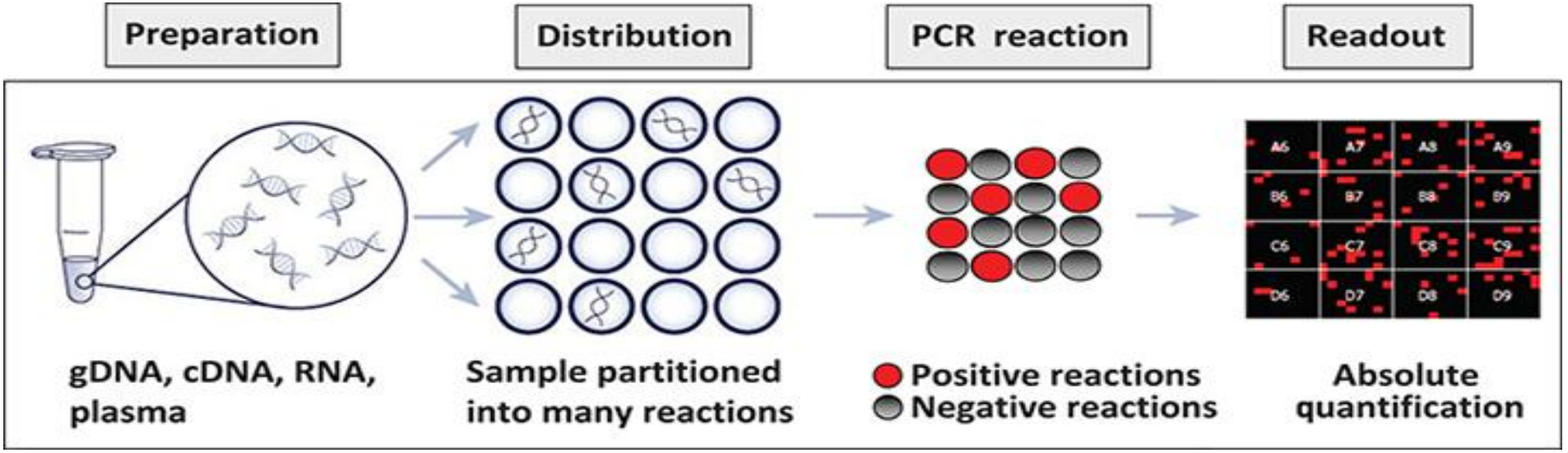
Kết quả xét nghiệm:
Phát hiện tổ hợp gen major BCR/ABL ở mức 0,0174% (IS).
Hình ảnh:



Diễn giải: Đường khuếch đại gen ABL của mẫu bệnh nhân: Ct = 20 (17≤Ct≤21 có thể đánh giá MR⁴)
Đường khuếch đại BCR/ABL của mẫu bệnh nhân: Ct = 31,8
Đường khuếch đại ABL của mẫu chứng dương: Ct = 15,05
Đường khuếch đại BCR/ABL của mẫu chứng dương: Ct = 20,15
Chứng âm: Âm tính

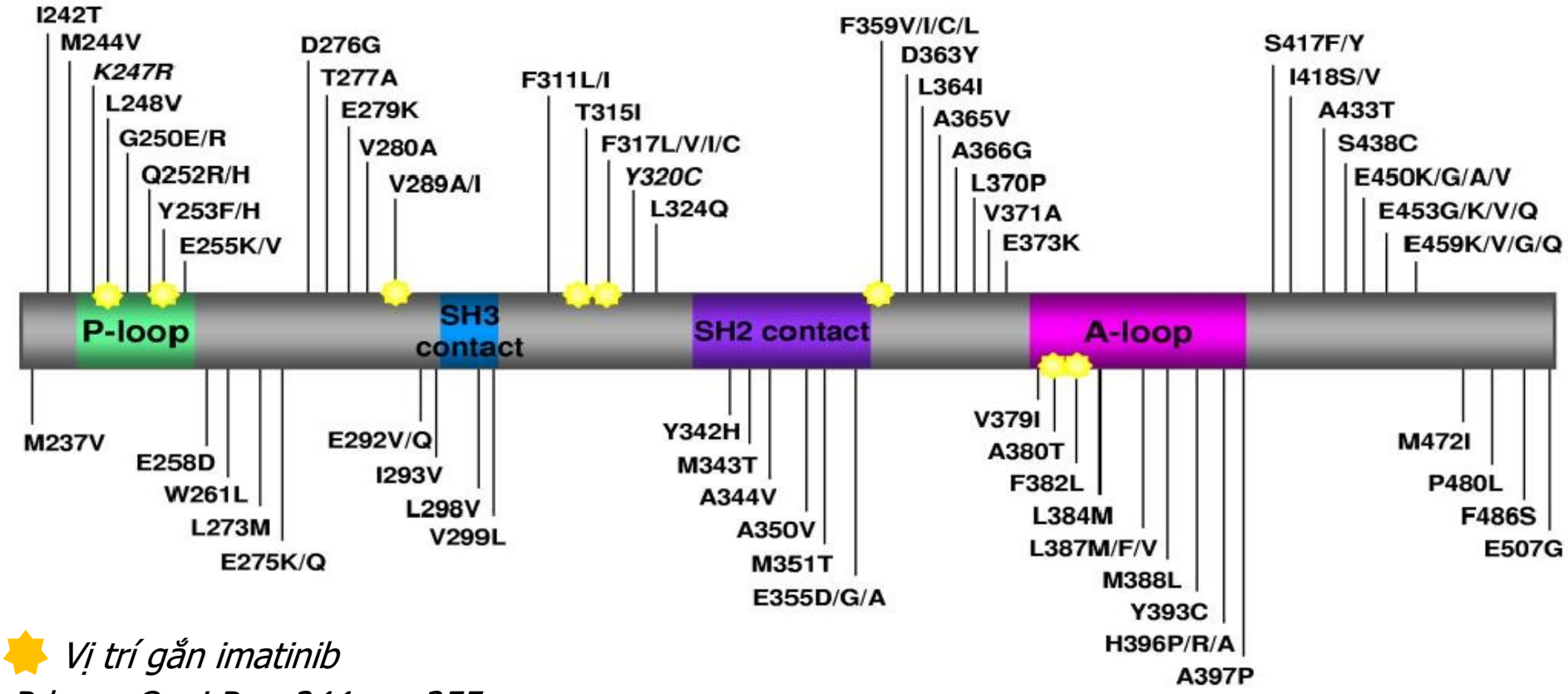
Digital PCR

- Hàng triệu phản ứng khuếch đại trong những vi hạt có kích thước nanoliter, tách biệt nhau.
- Chỉ có một hoặc không có phân tử khuôn mẫu nào trong mỗi giọt phản ứng. Sau phản ứng, mỗi giọt được ghi nhận dương hoặc âm.
- Định lượng trực tiếp, độ nhạy cao



Đột Biến Của *BCR/ABL* kinase domain Kháng Imatinib

>100 vị trí và >136 loại đột biến được phát hiện



Vị trí gắn imatinib

P-loop: Quai P, aa244 - aa255

A-loop: Quai hoạt hóa, aa379 – aa398

ATP-binding domain: aa - aa

Phát hiện được bằng kỹ thuật giải trình tự chuỗi DNA hoặc ASO-PCR

(Nguồn: Soverini s, et al. blood 118:1208, 2011)

ĐỘT BIẾN *BCR/ABL* TRÊN BN CML KHÁNG IM

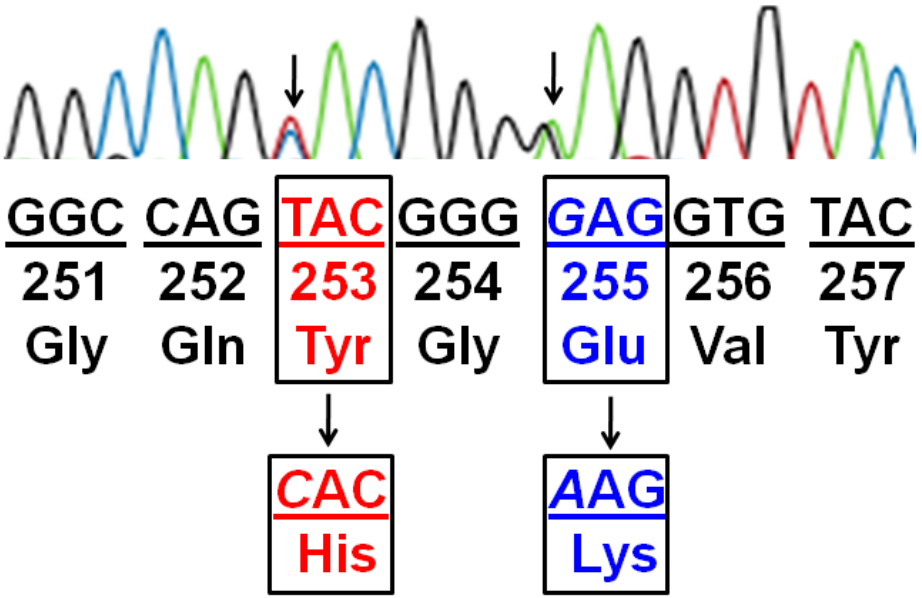
Bệnh nhân nam, 39 tuổi
Chẩn đoán CML
Có t(9;22)(q34;q11) và
BCR/ABL: b3a2

Imatinib:
-400 mg/ngày x 1 tháng
-800 mg/ngày x 2 tháng

Chuyển cấp

Dị ghép tủy

Tái phát 3 tháng sau ghép tủy, được điều trị giảm bạch cầu và nâng đỡ, BN tử vong 2 tháng sau tái phát



SO SÁNH PP GIẢI TRÌNH TỰ NGS VỚI SANGER

- Không thể xác định quần thể đột biến có tần số alen nhỏ hơn 15–20%
- không cung cấp tần số alen
- không thể phân biệt giữa compound và polyclonal mutations

Sanger

- Độ nhạy cao: có thể phát hiện dòng đột biến thấp khoảng 1%
- Phân định được đặc tính của dòng đột biến trong trường hợp có nhiều đột biến trong 1 mẫu
- Phân tích định lượng được động học của dòng đột biến kháng thuốc theo thời gian

NGS

CÁC KỸ THUẬT XN ĐỘT BIẾN KHÁNG TKIs

Table 2. Advantages and disadvantages of the main methods currently available for *BCR::ABL1* KD mutation testing

Method	Lower limit of detection	Mutation-specific?	Advantages	Disadvantages
Sanger sequencing	10%-20%	N	Enables TKD-wide screening; easy workflow and data analysis; relatively short turnaround time	Poorly sensitive
Mass spectrometry	0.05%-0.5%	Y	Accurate; highly sensitive	Not widely available; high throughput; longer turnaround time; no commercial kits available; can be implemented for a limited number of mutations; difficult identification of the T315L and T315M mutations (that are caused by a double nucleotide substitution)
NGS	1%-5%	N	Enables TKD-wide screening; sensitive	High throughput; longer turnaround time; requires specialized personnel and bioinformatic competences; relatively high error rate; no commercial kits available
ddPCR	0.1%-0.5%	Y	Accurate; highly sensitive; relatively easy workflow and data analysis; short turnaround time	Can be implemented for a limited number of mutations

ddPCR, droplet digital polymerase chain reaction; N, no; NGS, next generation sequencing; TKD, tyrosine kinase domain; Y, yes.

ĐỘT BIẾN GEN *JAK2*V617F

- ✓ **Đa hồng cầu (95 ~ 97% *JAK2*V617F)**
- ✓ **Tăng tiểu cầu nguyên phát (~ 60% *JAK2*V617F)**
- ✓ **Xơ tủy nguyên phát (~ 60% *JAK2*V617F)**

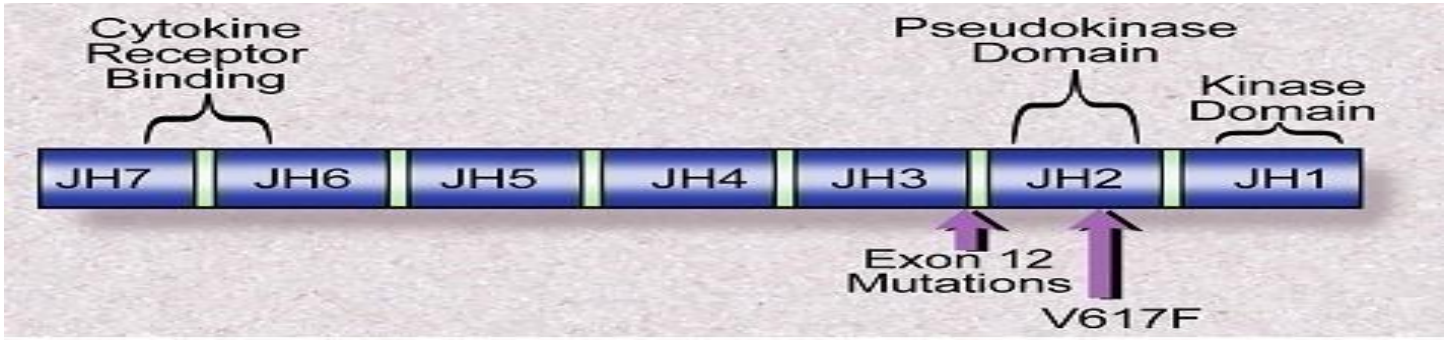
CẤU TRÚC VÀ CHỨC NĂNG *JAK2* (1)

Janus



the two faced Roman God of doorways

- ***JAK2*: tyrosine kinase, không phải thụ thể.**
- **Có vùng JH1 (Janus homology domain) và JH2 (2 mặt).**



- **JH1 có hoạt tính kinase. JH2 không có hoạt tính kinase nhưng có chức năng điều hòa ngược JH1.**
- ***JAK2* rất quan trọng cho sự tạo hồng cầu.**

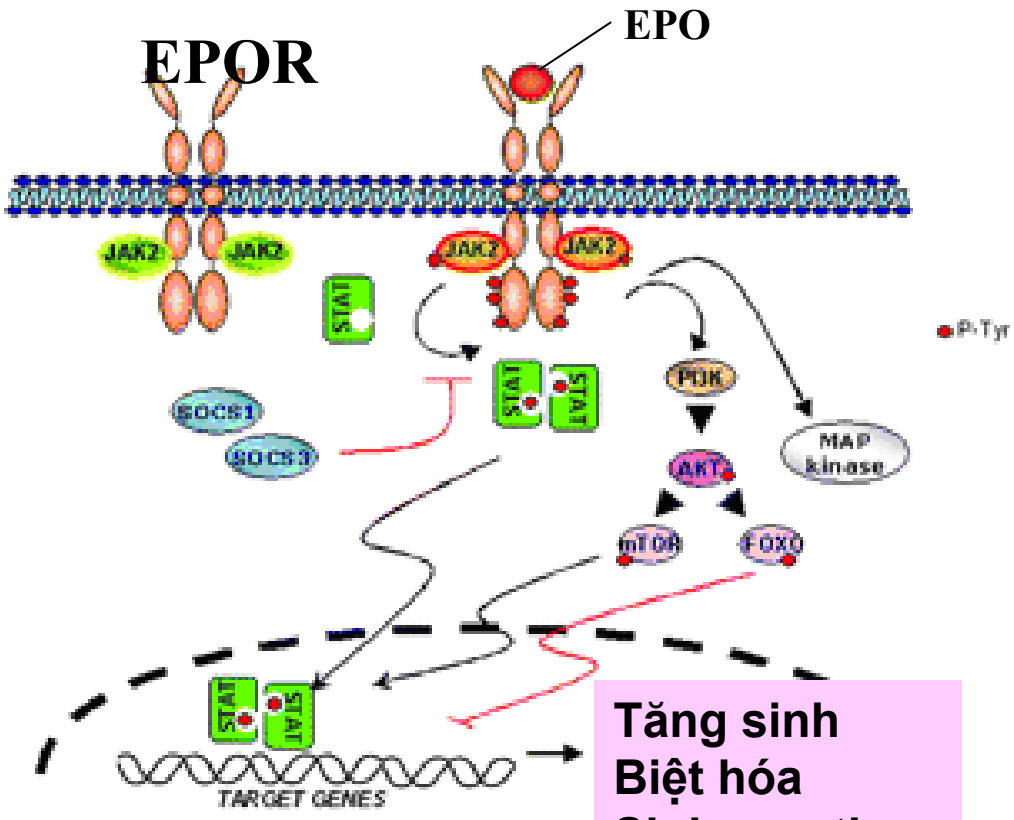
CẤU TRÚC VÀ CHỨC NĂNG *JAK2* (2)

- ***JAK2*** **luôn gắn với thụ thể của erythropoietin (EPOR)**

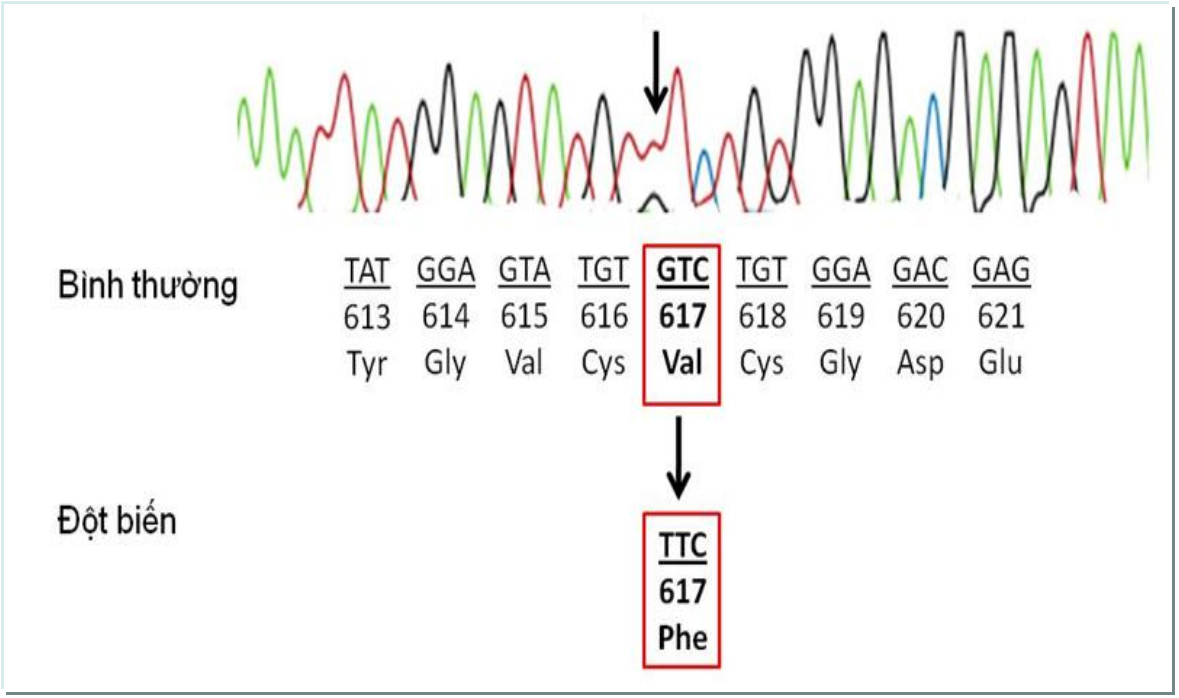
- **Nếu EPO gắn với EPOR, phản ứng bắt cặp của thụ thể xảy ra và *JAK2* được hoạt hóa.**

- **Đột biến *JAK2*V617F (nằm trên JH2) làm mất chức năng điều hòa ngược của JH2 đối với JH1 và gia tăng tính đáp ứng với EPO.**

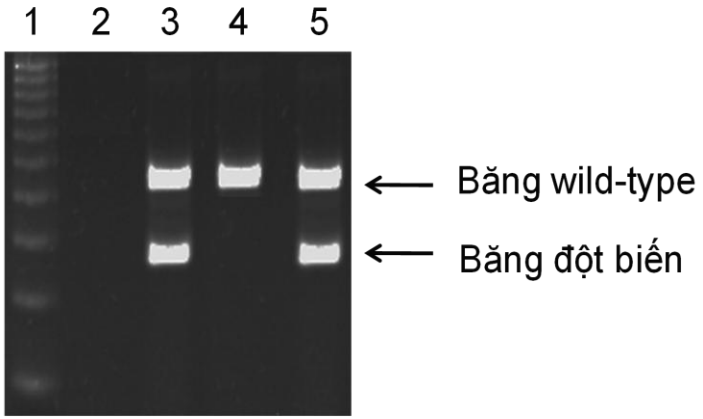
- **Khi có đột biến *JAK2*V617F, tín hiệu được truyền đi để sinh hồng cầu mà không cần hiện diện EPO.**



KẾT QUẢ KHẢO SÁT ĐỘT BIẾN *JAK2*V617F



Giải trình tự DNA



ASO-PCR

ĐỘT BIẾN GEN TRONG MPN VỚI *BCR/ABL*(-)

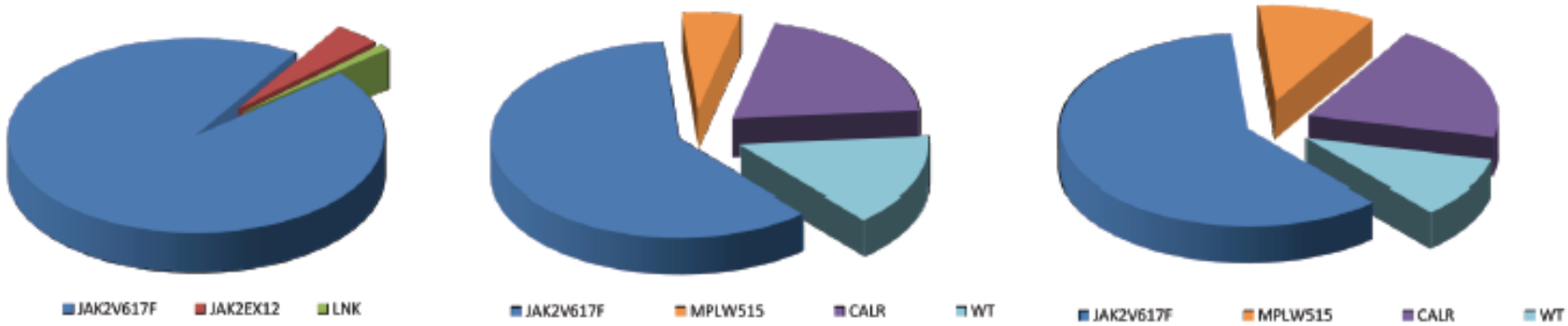
Gene	Exon/mutation	Genomic location	Protein	Mutation frequency in MPN, % of cases			
				PV	ET	MF	Blast phase
JAK2	Exon 14; V617F	9p24	JAK2	95-97	60	60	50
JAK2	Exon 12; indels	9p24	JAK2	1-2	Rare	Rare	nk
MPL	Exon 10; S505N, W515K/L/A	1p34	TpoR	Rare	3-5	5-10	nk
CBL	Exons 8 and 9	11q23	CBL	Rare	Rare	5-10	nk
SH2B3	Mainly exon 2	12q24	LNK	1	3-6	3-6	10
TET2	Inactivating mutations	4q24	TET2	10-20	5	10-20	20
IDH1/2	Mainly IDH1-R132 or IDH2-R140	2q34/15q26	IDH1/2	Rare	Rare	6	20-36
ASXL1	Inactivating mutations	20q11	ASXL1	2-5	2-5	13-20	20
EZH2	Inactivating mutations	7q36	EZH2	1-3	1	5-10	nk
DNMT3a	Inactivating mutations	2p23	DNMT3A	5-10	1-5	5-10	20
IKZF1	Deletions	7p12	Ikaros	Rare	Rare	Rare	20

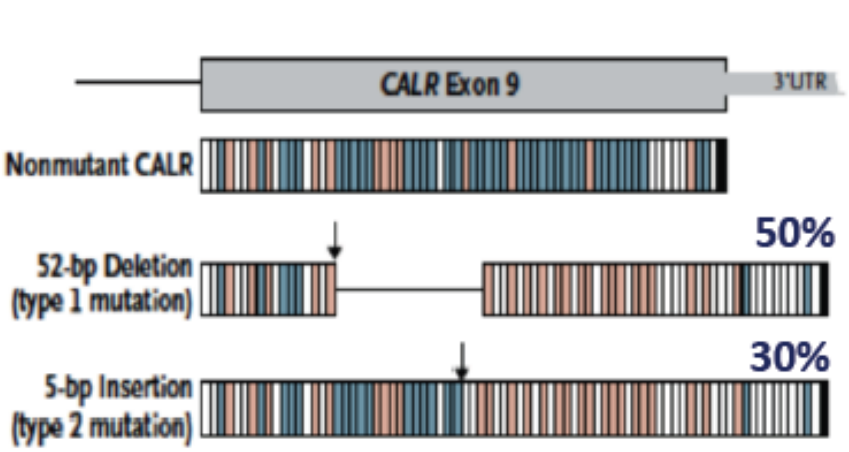
PV: Đa hồng cầu nguyên phát
ET: Tăng tiểu cầu nguyên phát
MF: Xơ tủy nguyên phát

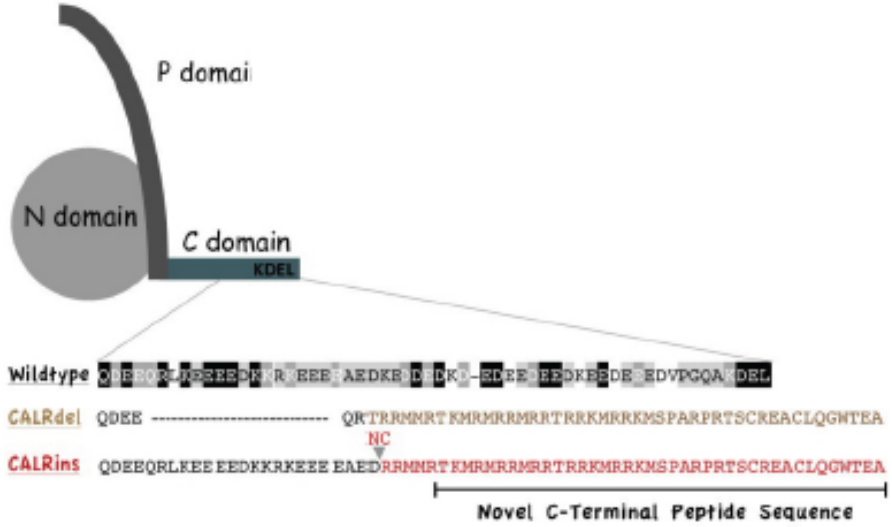
Cross NCP, American Society of Hematology 2011

ĐỘT BIẾN GEN *CALR*

Đa HCNP	Tăng TCNP	Xơ tủy NP
0%	15-25%	20-30%



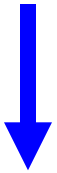




Klampfl T, et al. *NEJM* 2013 Dec 19;369(25):2379-90; Nangalia J, et al. *NEJM* 2013 2013 Dec 19;369(25):2391-405

ĐIỀU TRỊ

Jakavi (INC424, ruxolitinib): ức chế *JAK1* và JAK2,
đã được European Commission và FDA
chấp nhận cho điều trị đa HC và xơ tủy nguyên phát



- TC> 200.000/μL: liều khởi đầu 20 mg x 2 lần/ngày
  (4 viên 5 mg x 2 lần/ngày)
- TC 100.000/μL - 200.000/μL: liều khởi đầu 15 mg x 2 lần/ngày
  (3 viên 5 mg x 2 lần/ngày)
- TC < 100.000/μL: không đủ điều kiện để nhận vào nghiên cứu.

Lách nhỏ lại và giảm triệu chứng do lách to
trong xơ tủy nguyên phát

BẤT THƯỜNG NST VÀ GEN TRONG BẠCH CẦU CẤP DÒNG TỦY

(ACUTE MYELOID LEUKEMIA: AML)

BẢNG PHÂN NHÓM NGUY CƠ THEO BẤT THƯỜNG NST

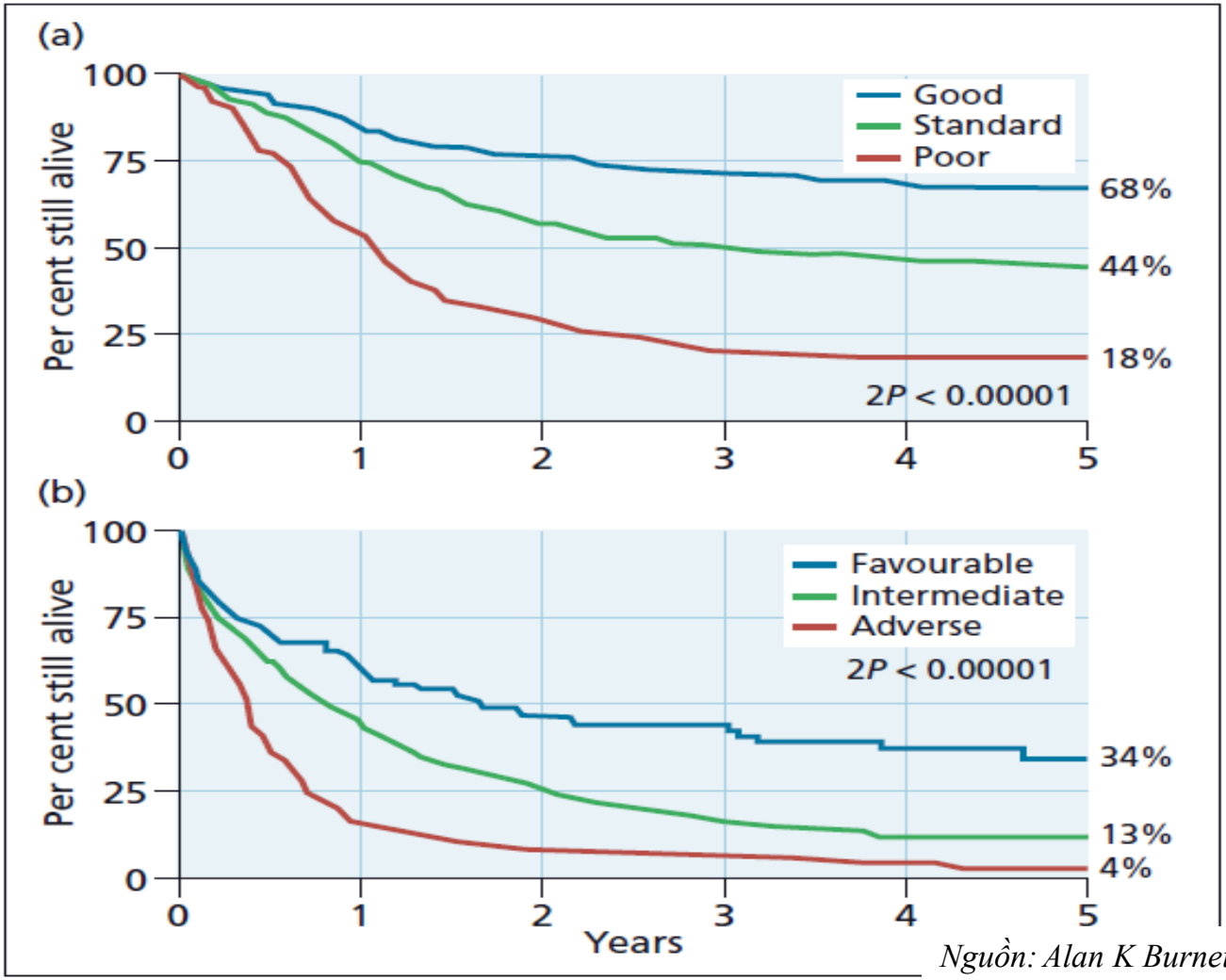
Nhóm nguy cơ	Bất thường nhiễm sắc thể
Tốt	t(8;21)(q22;q22)
	t(15;17)(q22;q12-21)
	inv(16)(p13q22)/t(16;16)((p13;q22)
Trung bình	Nhiễm sắc thể đồ bình thường
	-Y, +8, +11, +13, +21, +22
	del(7q), del(9q), del(11q), del(20q), t(9;11)(p22;q23)
	Bất thường 11q23, bất thường NST khác
Xấu	inv(3)(q21q26)/t(3;3)(q21;q26), -5, -7, del(5q)
	t(6;9)(p23;q34), t(6;11)(q27;q23), t(11;19)(q23;p13.1)
	Bất thường Nhiễm sắc thể phức tạp (≥3)

(American Society of Hematology 2006)

TỈ LỆ SỐNG CÒN SAU 5 NĂM KHI ĐIỀU TRỊ HÓA TRỊ LIỆU

< 60 tuổi

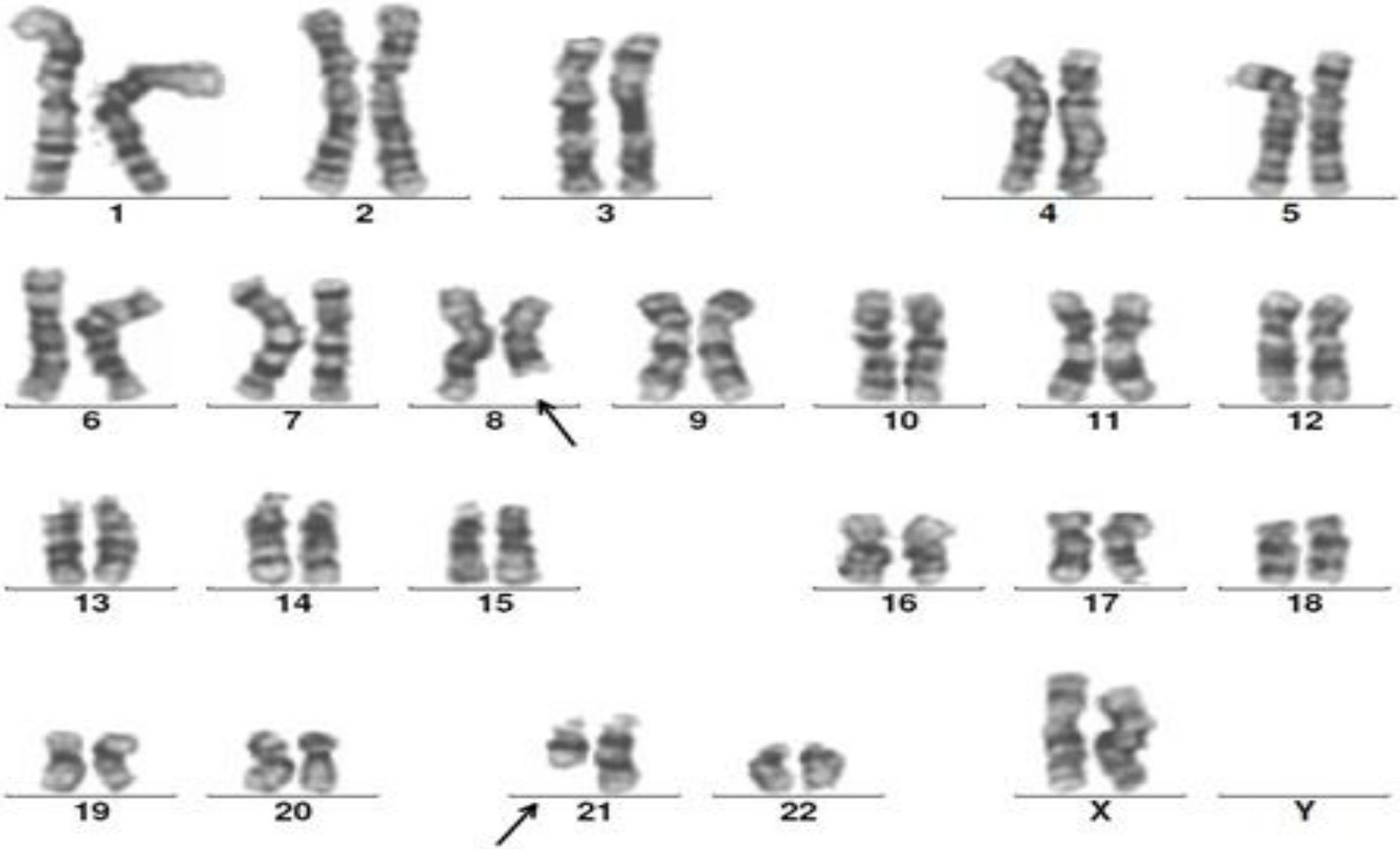
≥ 60 tuổi



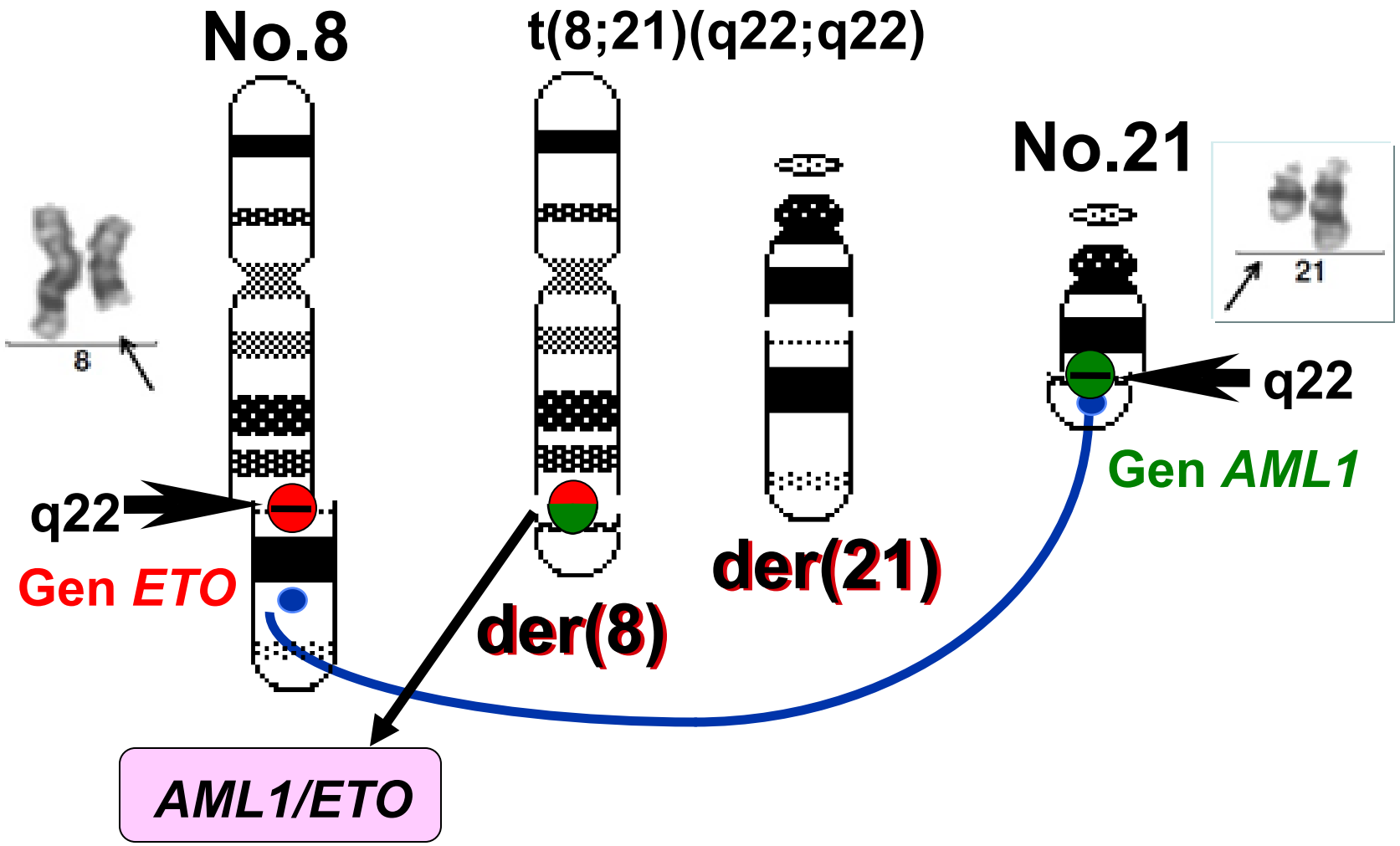
Nguồn: Alan K Burnett, School of Medicine, Cardiff University, Cardiff, UK

Nhóm tiên lượng xấu phải được điều trị với phác đồ hóa trị liệu mạnh và ghép tủy sau khi đạt lui bệnh hoàn toàn

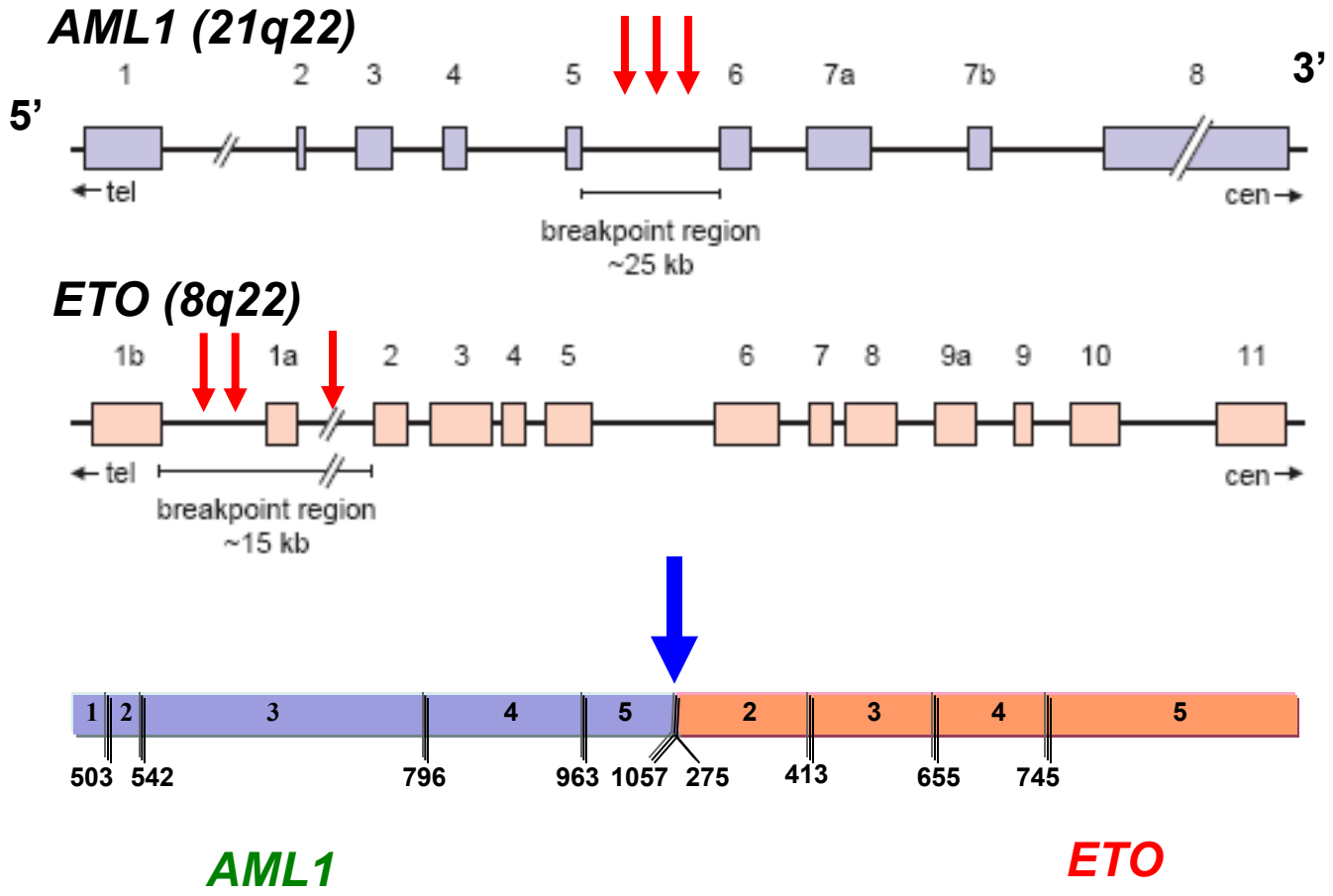
46,XX,t(8;21)(q22;q22) TRONG AML

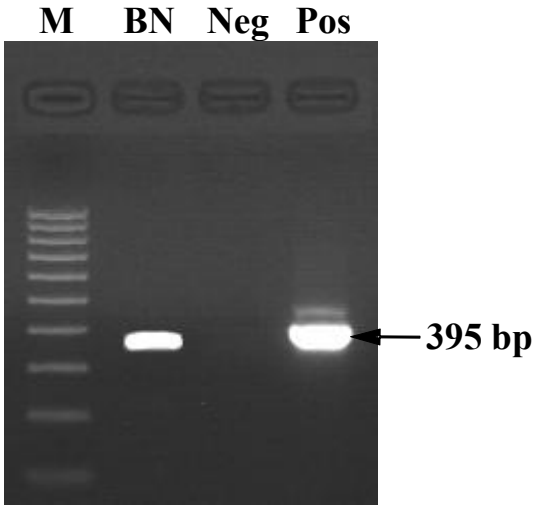


t(8;21)(q22;q22) TẠO RA TỔ HỢP GEN *AML1/ETO*



t(8;21)(q22;q22) TẠO RA TỔ HỢP GEN *AML1/ETO*

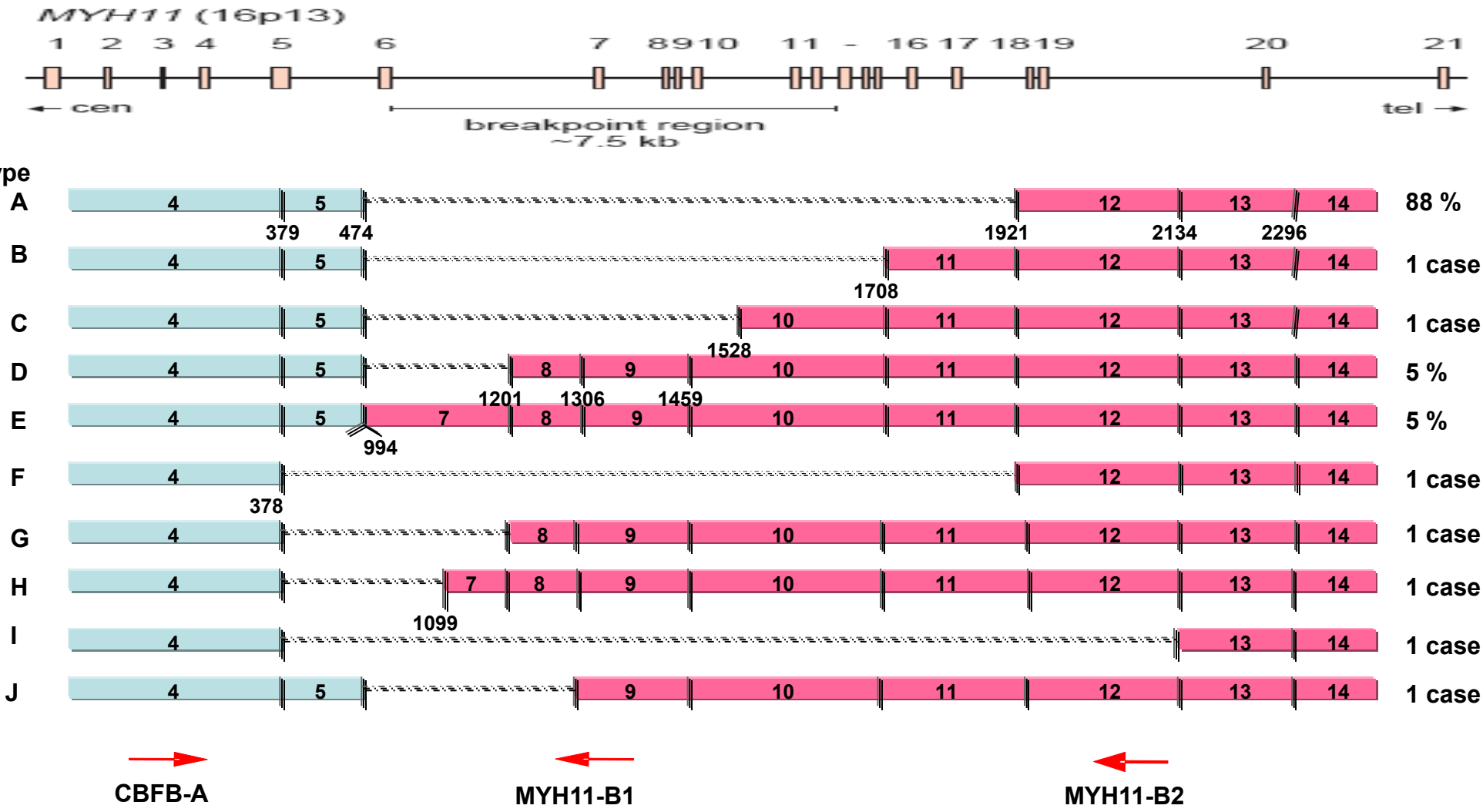




M: Thang chuẩn
BN: Bệnh nhân
Neg: Chứng âm (nước)
Pos: Chứng dương (KASUMI-1)

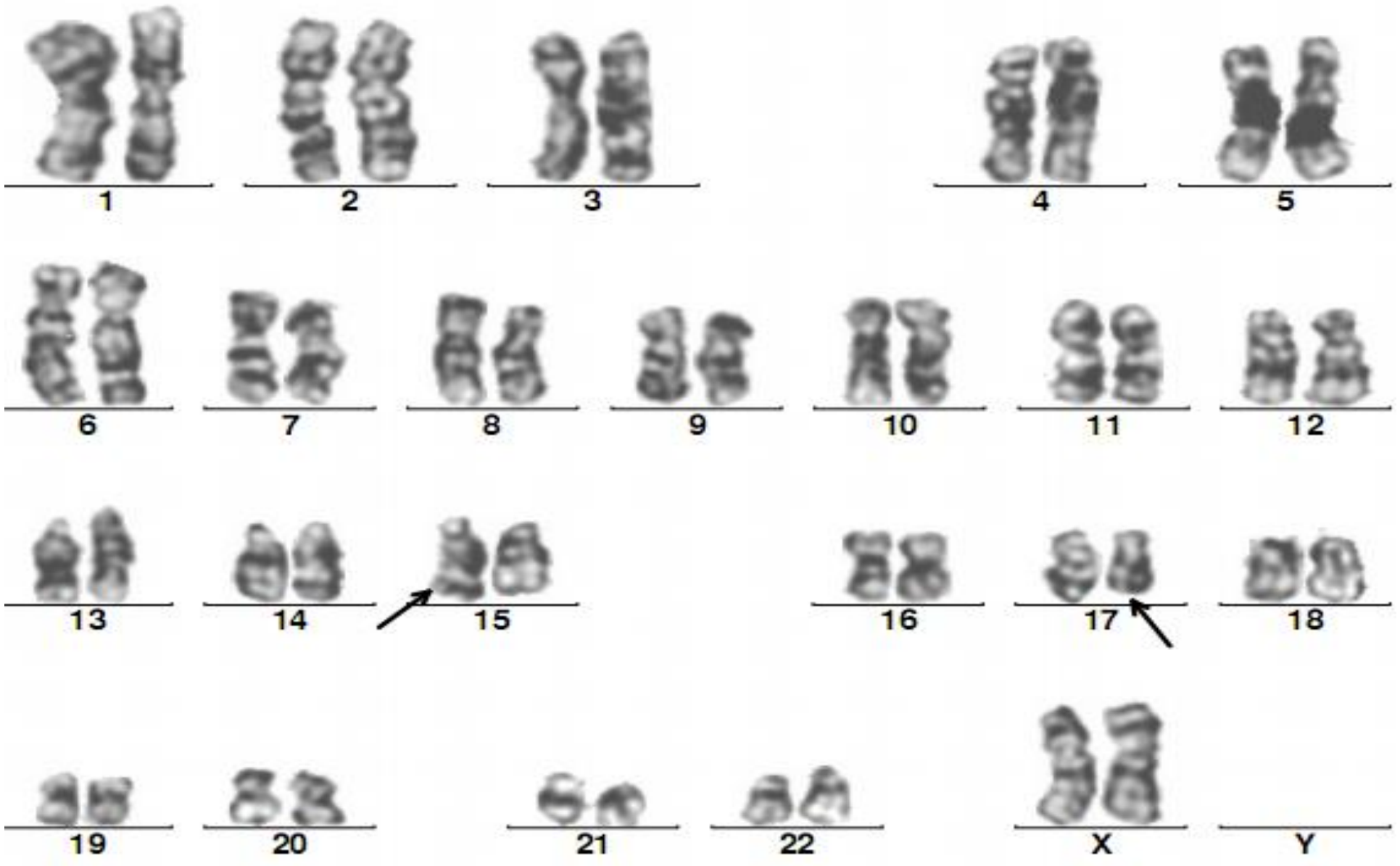
Tổ hợp gen *AML1/ETO* hướng từ đầu tận đến tâm trên der(8)

inv(16)(p13q22)/*CBFB/MYH11*

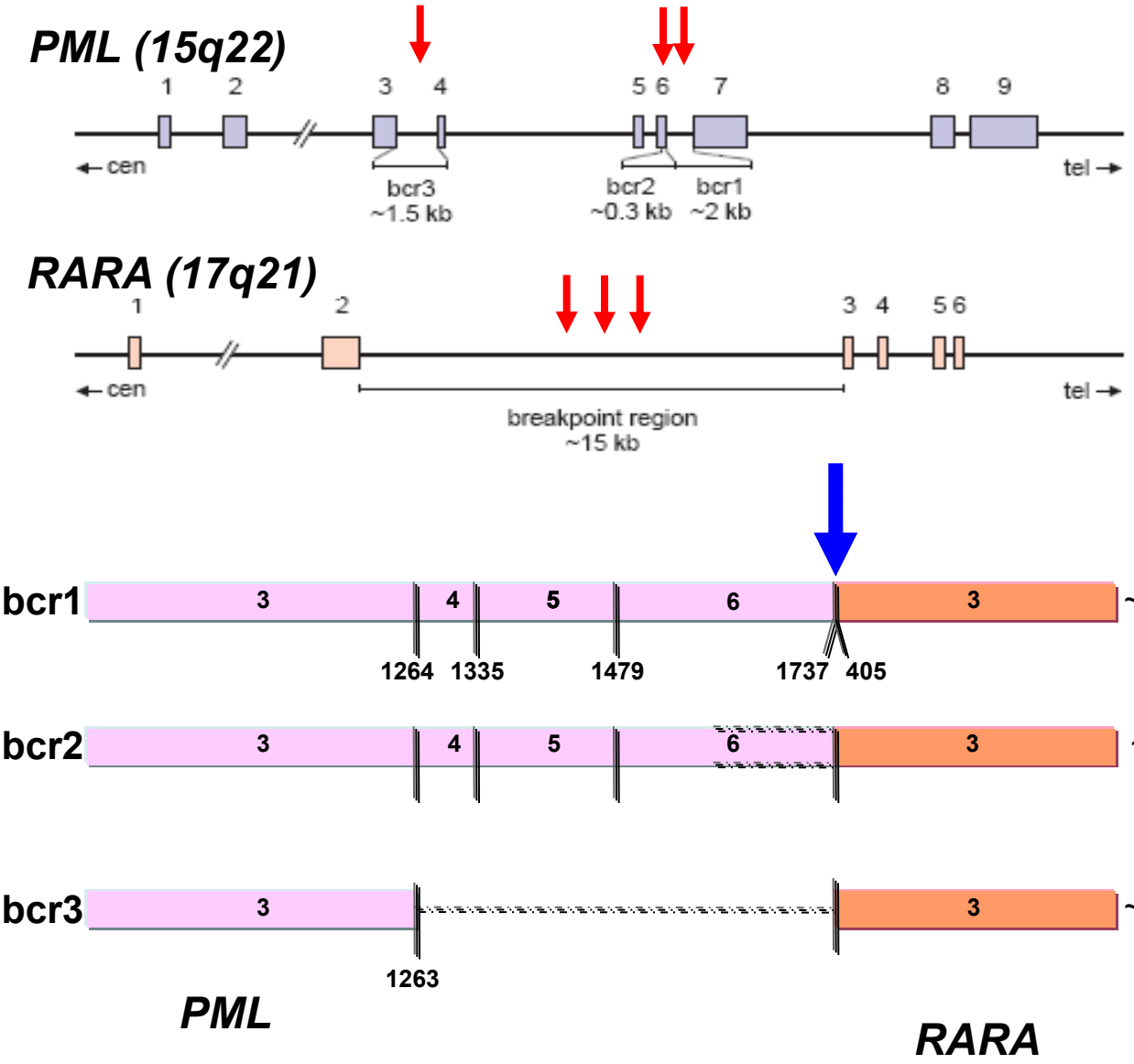


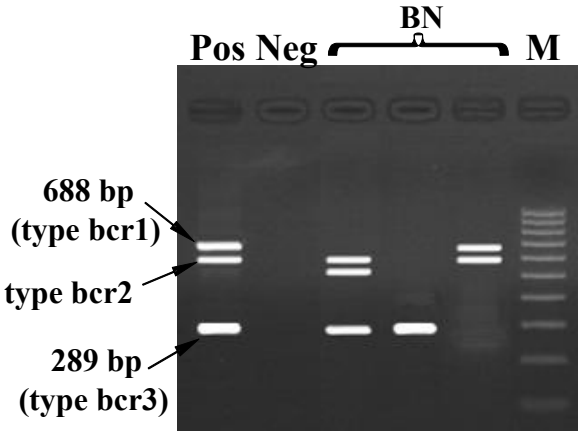
inv(16) tạo ra 10 kiểu bản sao của tổ hợp gen *CBFB/MYH11*

46,XY,t(15;17)(q22;q21) TRONG AML-M3



t(15;17)(q22;q21) TẠO RA TỔ HỢP GEN *PML/RARA*





M: Thang chuẩn
BN: Bệnh nhân
Neg: Chứng âm (nước)
Pos: Chứng dương (NB4)

TIẾN BỘ TRONG ĐIỀU TRỊ AML-M3

PML **là promyelocytic leukemia**

Arsenic trioxide (ATO) tác động vào phần *PML* của tổ hợp gen *PML/RARA* làm tế bào đi vào chu trình chết tự nhiên (apoptosis)

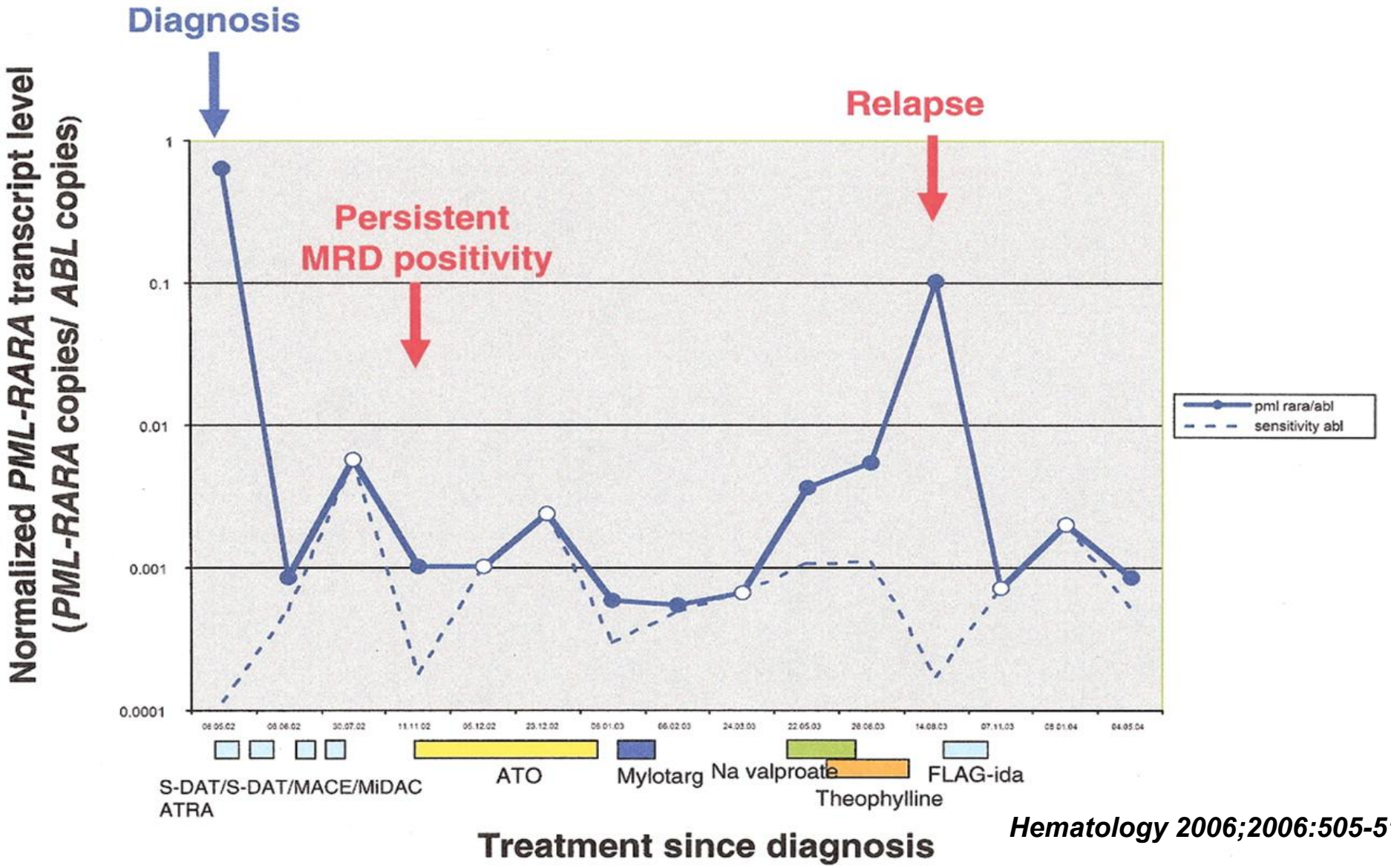
RARA **là retinoic acid receptor alpha**

All-trans retinoic acid (ATRA) tác động vào đích *RARA* của tổ hợp gen *PML/RARA* làm tế bào đi vào quá trình biệt hóa.

Phác đồ phối hợp ATRA hoặc ATO với hóa trị liệu chuẩn

- **Giảm tỉ lệ tử vong do DIC**
- **Tăng tỉ lệ lui bệnh (75% được chữa lành bệnh)**

Định Lượng *PML/RARA* Bằng RQ-PCR Để Theo Dõi Tồn Lưu Tế Bào Ác Tính Trong AML



Hematology 2006;2006:505-516

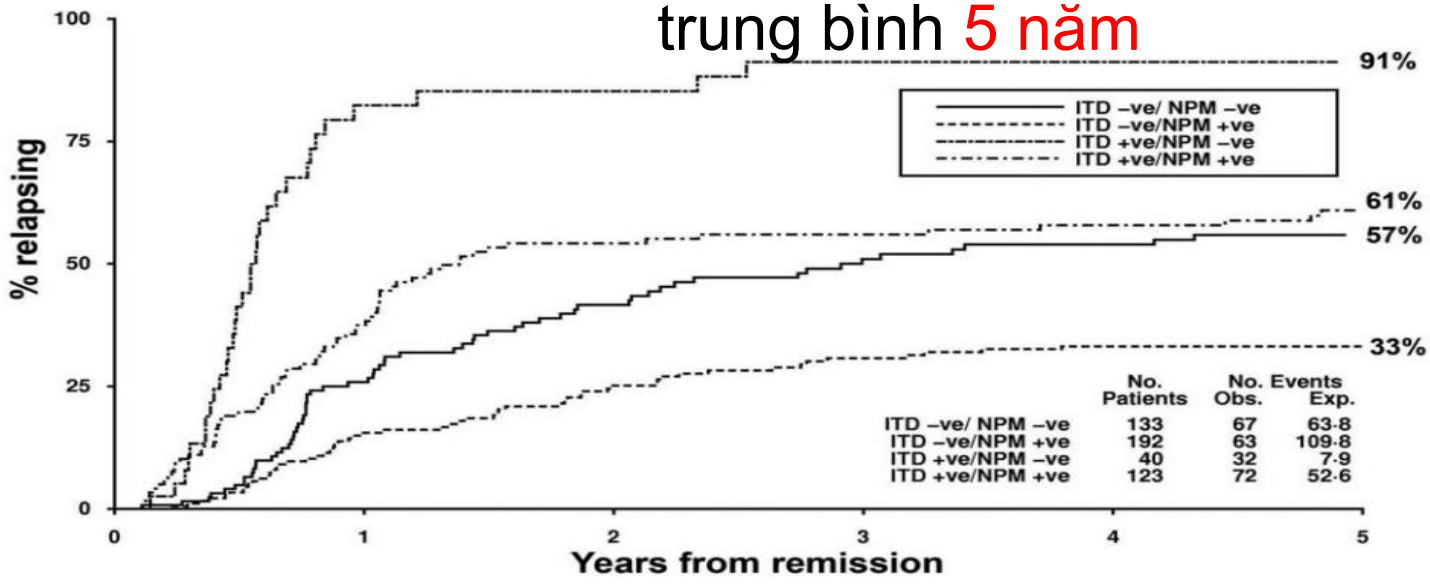
BẢNG PHÂN NHÓM NGUY CƠ THEO ĐỘT BIẾN GEN

40 – 50% trường hợp có NST đồ bình thường:

Nhóm nguy cơ	Bất thường	Bệnh cảnh lâm sàng
Tốt	Đột biến *NPM1*	46-62% Nữ, blast tủy cao, CD33+ cao nhưng CD34-
	Đột biến *CEBPA*	15- 20% AML với NST đồ bình thường và del(9q)
	FLT3-TKD	10-14%
Xấu	*FLT3*-ITD	28-34% (Exon 14, 15)
	MLL-PTD	5-10% (Exon 5-11) Tự ghép có thể cải thiện tiên lượng
	Đột biến *WT1*	~ 10% Thường kết hợp với thất bại ở giai đoạn tấn công

(American Society of Hematology 2007)

Nghiên cứu trên 550 BN NST đồ bình thường, thời gian theo dõi trung bình 5 năm

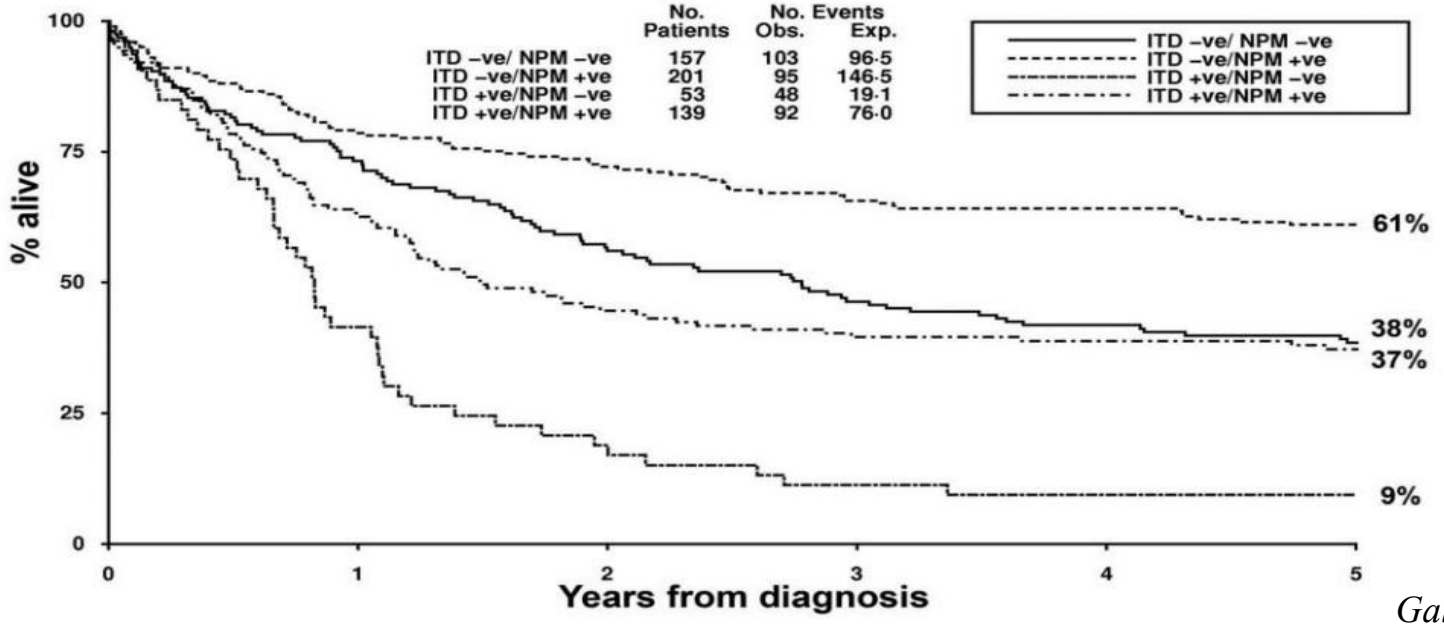


FLT3-ITD(+)/NPM1(-)

FLT3-ITD(+)/NPM1(+)

FLT3-ITD (-)/NPM1 (-)

FLT3-ITD(-)/NPM1(+)



FLT3-ITD(-)/NPM1(+)

FLT3-ITD (-)/NPM1 (-)

FLT3-ITD(+)/NPM1(+)

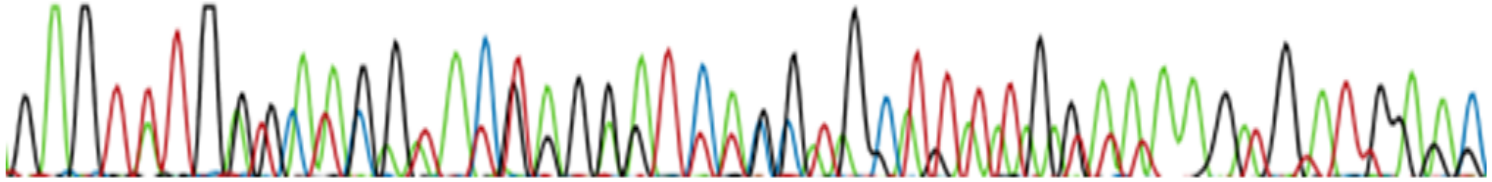
FLT3-ITD(+)/NPM1(-)

Gale RE, 2008;111:2776-2784

ĐỘT BIẾN FLT3-ITD TRONG AML

Bệnh nhân nam, 10 tuổi
Tủy đồ: tế bào non 35%
Chẩn đoán AML-M1
Khảo sát đột biến FLT3 từ exon 14-exon 20

Điều trị giai đoạn tấn công → Không lui bệnh



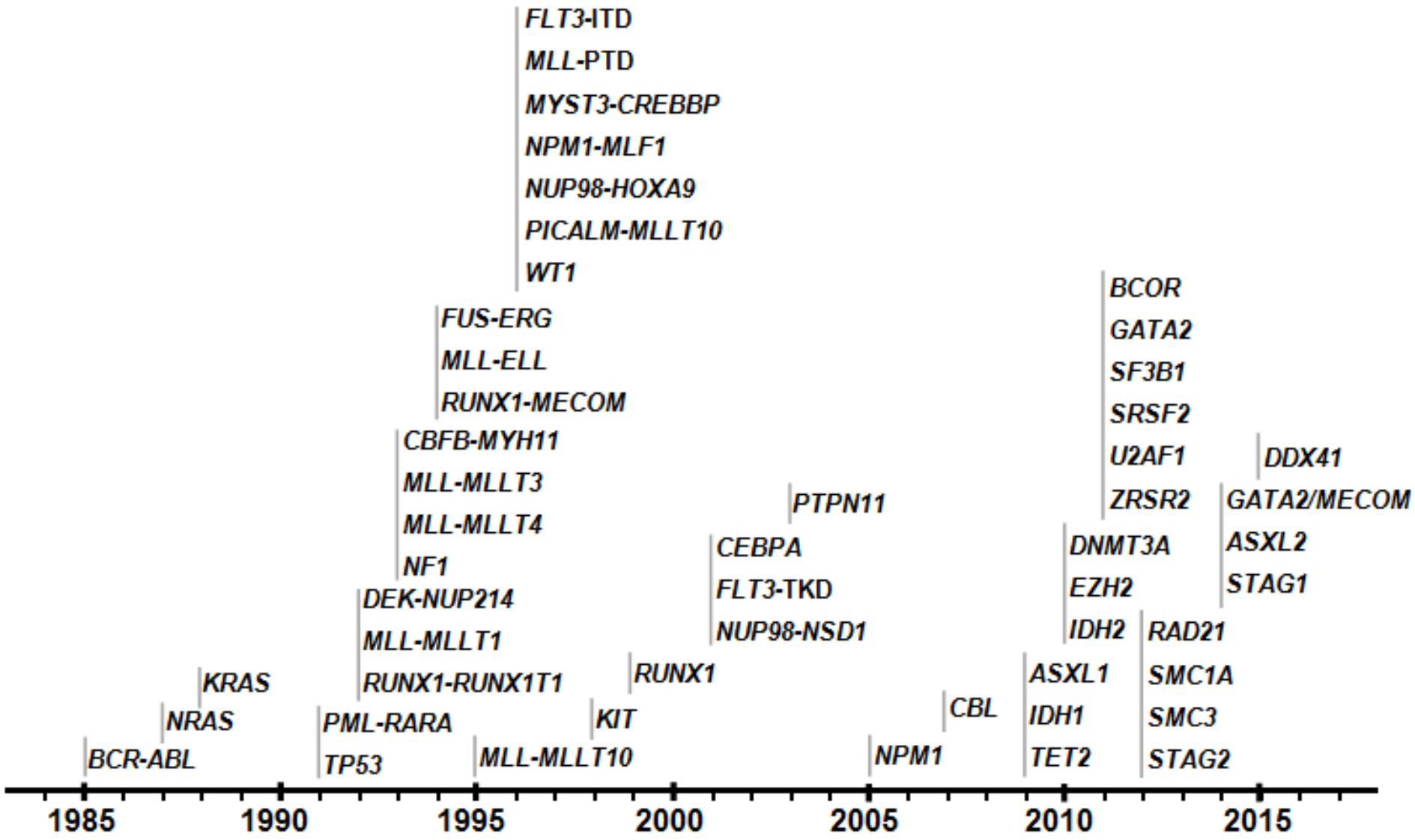
Bình thường	GAG	TTT	GGG	AAG	GTA	CTA	GGA	TCA	GGT	GCT	TTT	GGA	AAA	GTG	ATG	AAC
	611	612	613	614	615	616	617	618	619	620	621	622	623	624	625	626
	Glu	Phe	Gly	Lys	Val	Leu	Gly	Ser	Gly	Ala	Phe	Gly	Lys	Val	Met	Asn

Đột biến	GAG	TAT	GAT	CTC	AAA	TGG	GAG	TTT	CCA	AGA	GAA	AAT	TTA	GAG	TTT	GGG
	611	599	600	601	602	603	604	605	606	607	608	609	610	611	612	613
	Glu	Tyr	Asp	Leu	Lys	Trp	Glu	Phe	Pro	Arg	Glu	Asn	Leu	Glu	Phe	Gly

Đột biến p.E611_F612ins13 trên exon 14 của gen *FLT3*

→ **Tiên lượng xấu**

LỊCH SỬ PHÁT HIỆN CÁC ĐỘT BIẾN GEN TRONG AML

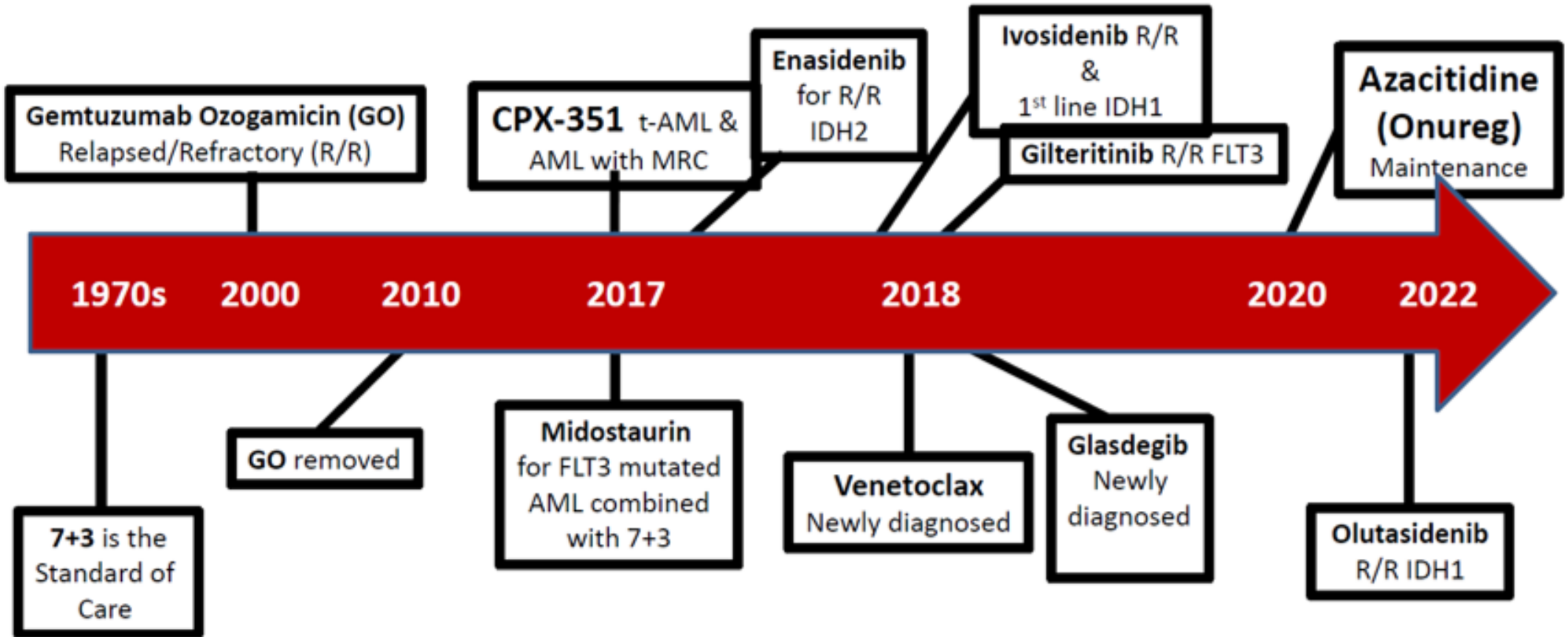


BẢNG PHÂN NHÓM NGUY CƠ THEO EUROPEAN LEUKEMIA NET

Risk category†	Genetic abnormality
Favorable	• t(8;21)(q22;q22.1)/*RUNX1*::*RUNX1T1*†,‡ • inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22)/ *CBFB*::*MYH11*†,‡ • Mutated *NPM1*†,§ without *FLT3*-ITD • bZIP in-frame mutated *CEBPA*‖
Intermediate	• Mutated *NPM1*†,§ with *FLT3*-ITD • Wild-type *NPM1* with *FLT3*-ITD (without adverse-risk genetic lesions) • t(9;11)(p21.3;q23.3)/*MLLT3*::*KMT2A*†,¶ • Cytogenetic and/or molecular abnormalities not classified as favorable or adverse
Adverse	• t(6;9)(p23.3;q34.1)/*DEK*::*NUP214* • t(v;11q23.3)/*KMT2A*-rearranged# • t(9;22)(q34.1;q11.2)/*BCR*::*ABL1* • t(8;16)(p11.2;p13.3)/*KAT6A*::*CREBBP* • inv(3)(q21.3q26.2) or t(3;3)(q21.3;q26.2)/ *GATA2*, *MECOM(EVI1)* • t(3q26.2;v)/*MECOM*(*EVI1*)-rearranged • −5 or del(5q); −7; −17/abn(17p) • Complex karyotype,** monosomal karyotype†† • Mutated *ASXL1*, *BCOR*, *EZH2*, *RUNX1*, *SF3B1*, *SRSF2*, *STAG2*, *U2AF1*, and/or *ZRSR2*‡‡ • Mutated *TP53*§

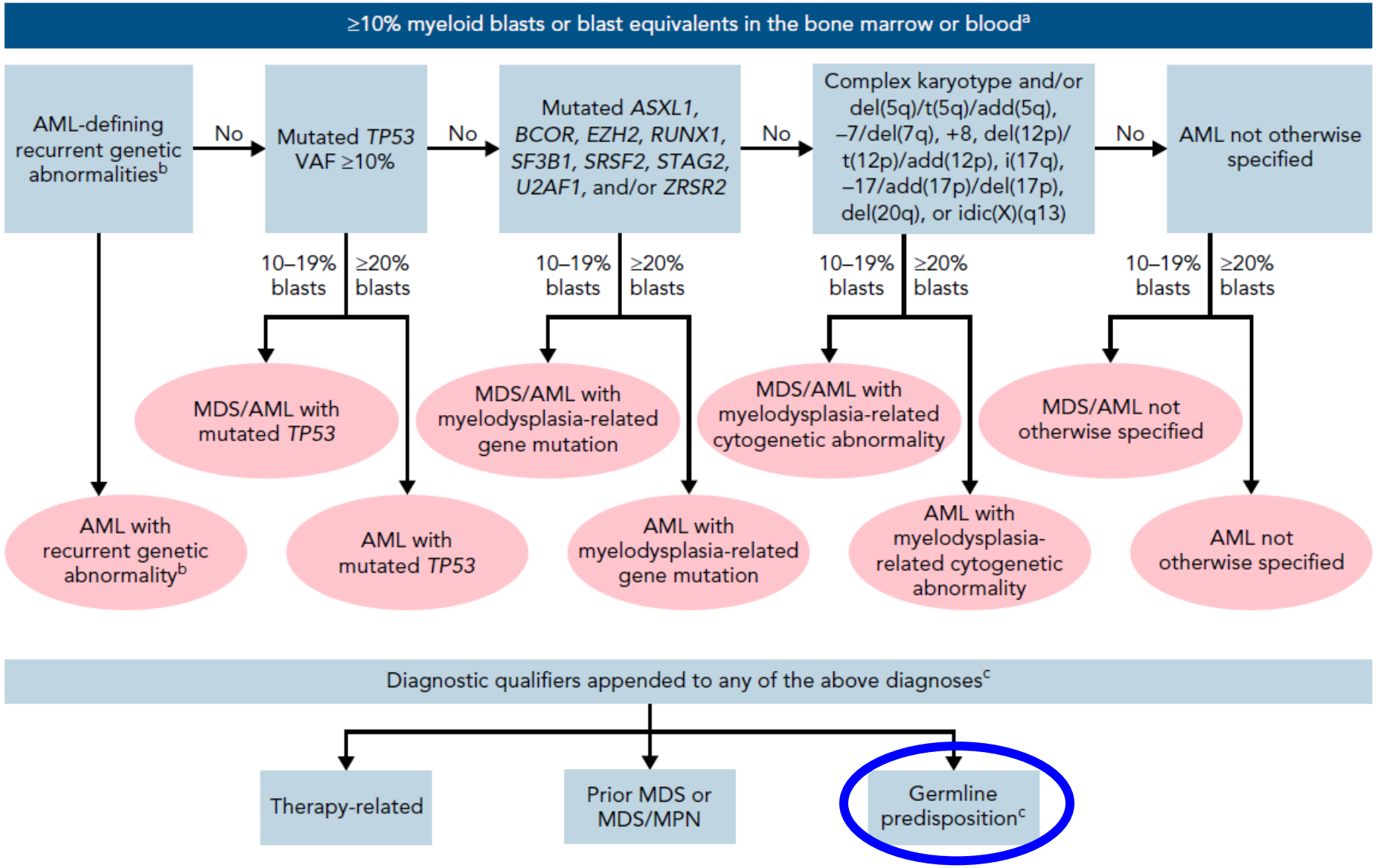
Döhner H., Wei A. H., et al. (2022). "Diagnosis and Management of AML in Adults: 2022 ELN Recommendations from an International Expert Panel". Blood.

THUỐC ĐIỀU TRỊ AML THEO THỜI GIAN



Döhner H., Wei A. H., Appelbaum F. R., et al. (2022). "Diagnosis and Management of AML in Adults: 2022 ELN Recommendations from an International Expert Panel". Blood.

CẬP NHẬT CHẨN ĐOÁN AML



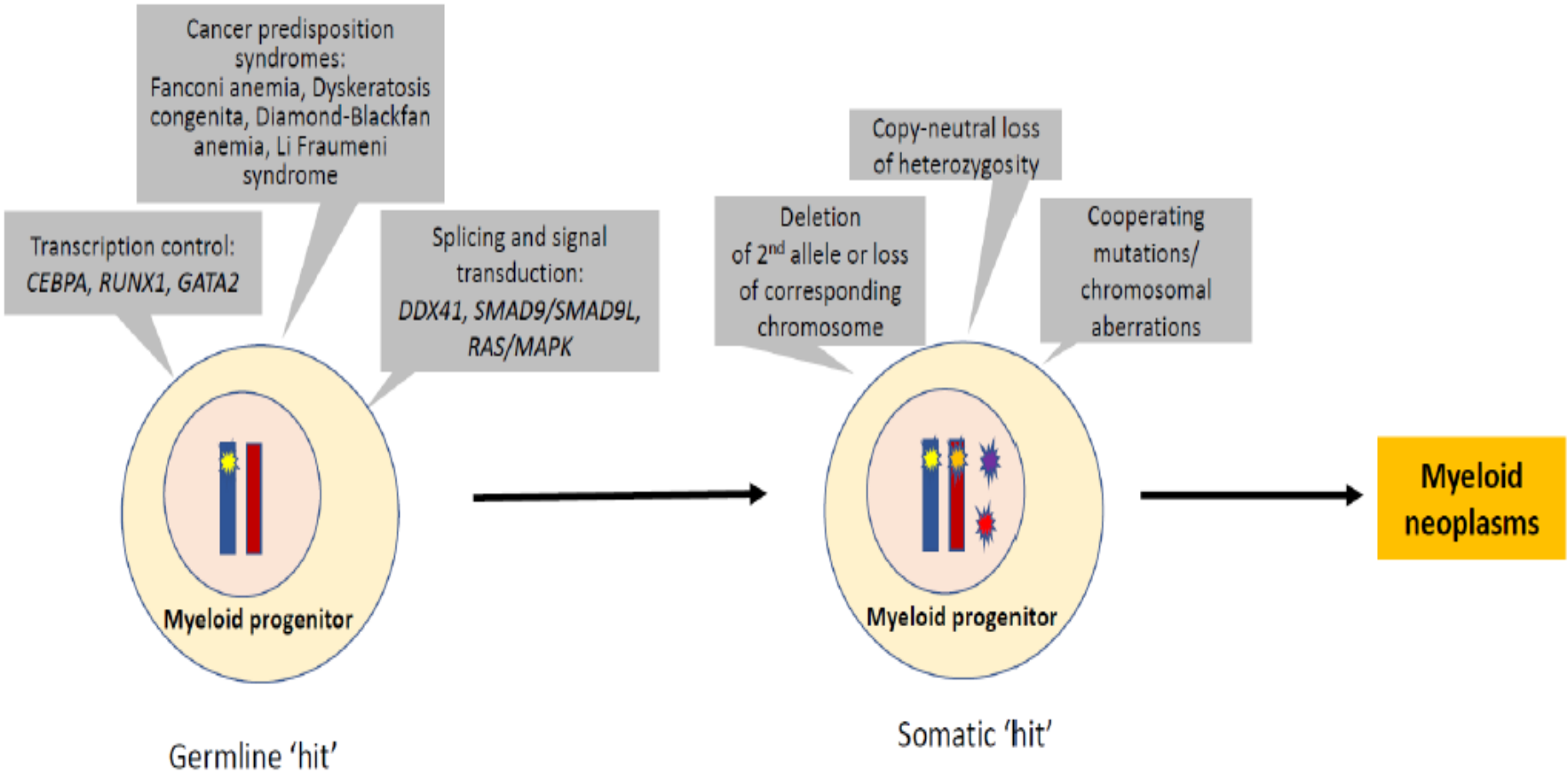
Döhner H., Wei A. H., Appelbaum F. R., et al. (2022). "Diagnosis and Management of AML in Adults: 2022 ELN Recommendations from an International Expert Panel". Blood.

ĐỘT BIẾN KHUYNH HƯỚNG DÒNG MẦM

- Tỷ lệ đột biến gen dòng mầm gây bệnh ung thư ở trẻ em ước tính là 8,5% (nghiên cứu hơn 1000 trẻ em)
- Một nghiên cứu gần đây cho thấy tỷ lệ đột biến dòng mầm có khả năng gây bệnh/gây bệnh ở người bệnh AML trưởng thành là 13,6%.

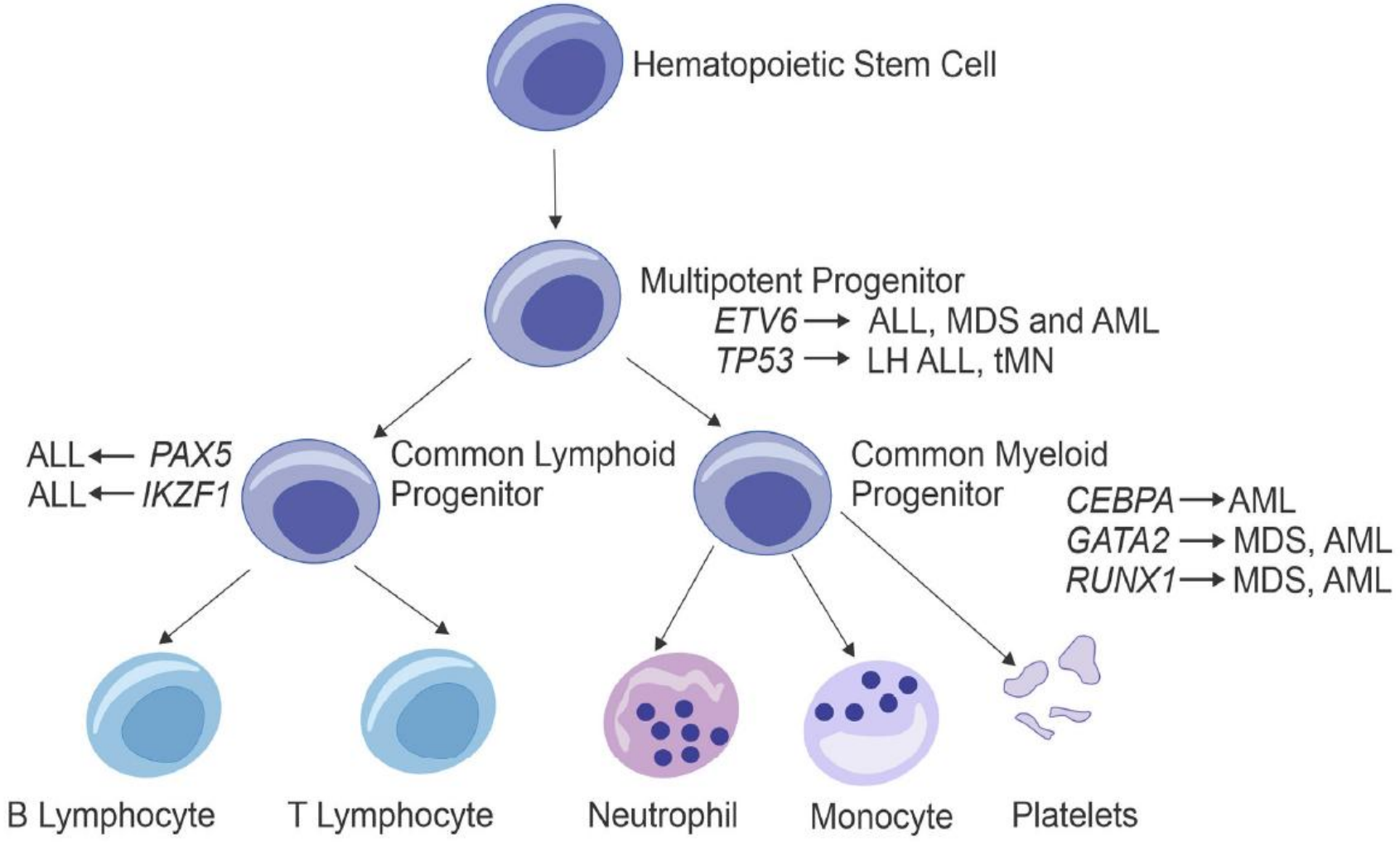
Yang F, Long N, Anekpuritanang T, et al. Identification and prioritization of myeloid malignancy germline variants in a large cohort of adult patients with AML. Blood. 2022;139(8):1208-1221

ĐỘT BIẾN KHUYNH HƯỚNG DÒNG MẦM



Gao J, Chen Y, Sukhanova M. Molecular Pathogenesis in Myeloid Neoplasms with Germline Predisposition. *Life*. 2022; 12(1):46.

ĐỘT BIẾN KHUYNH HƯỚNG DÒNG MẦM



Klco JM, Mullighan CG. Advances in germline predisposition to acute leukaemias and myeloid neoplasms. Nat Rev Cancer. 2021;21(2):122-137

PHÂN LOẠI ĐỘT BIẾN DÒNG MẦM THEO WHO

MN with germline predisposition without a preexisting disorder or organ dysfunction	AML with germline *CEBPA* mutation
	MN with germline *DDX41* mutation
MN with germline predisposition and preexisting platelet disorder	MN with germline *RUNX1* mutation
	MN with germline *ANKRD26* mutation
	MN with germline *ETV6* mutation
MN with germline predisposition and other rgan dysfunction	MN with germline *GATA2* mutation
	MN associated with bone marrow failure syndromes
	MN associated with telomere biology disorders
	Juvenile myelomonocytic leukemia associated with neurofibromatosis, Noonan syndrome, or Noonan-syndrome-like disorders
	MN associated with Down syndrome

AML: acute myeloid leukemia; MN: myeloid neoplasms.

BẤT THƯỜNG NST VÀ GEN TRONG BẠCH CẦU CẤP DÒNG LYMPHO

(ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA: ALL)

Bất Thường NST Trong ALL

Nhóm nguy cơ	Bất thường	Bệnh cảnh lâm sàng
Tiên lượng tốt	High hyperdiploidy (51 - 67)	Trisomy NST 4, 10 và 17: Tiên lượng rất tốt
	Bất thường 12p như t(12;21)(p13;q22) (*TEL/AML1*)	10% của childhood ALL 25% của B-precusor ALL
Tiên lượng xấu	Hypodiploidy (< 44)	Cải thiện với phác đồ điều trị mạnh
	Tái sắp xếp *KMT2A* [t(4;11) hoặc chuyển vị khác]	Tỉ lệ thất bại với điều trị cao
	t(9;22)(q34;q11) (*BCR/ABL1*)	Cải thiện với phác đồ hóa trị kèm thuốc ức chế TKI
	BCR/ABL1-like (ph-like) ALL	- JAK-STAT (*CRLF2r*, *EPORr*, *JAK1/2/3r*, *TYK2r,* mutation of *SH2B3*, *IL7R*, *JAK1/2/3*) - ABL class (rearrangements of *ABL1*, *ABL2*, *PDGFRA*, *PDGFRB*, *FGFR*) - Các gen khác: *NTRKr*, *FLT3r*, *PTK2Br*
	t(17;19) (*TCF3-HLF*)	
	iAMP21	Intrachromosomal amplification of chromosome 21
	Bất thường của *IKZF1*	

Bất Thường NST Trong ALL

GENETIC RISK GROUPS FOR B-ALL

RISK GROUPS	GENETICS[a,b]	
Favorable-risk features	• High hyperdiploidy (51–67 chromosomes) ‣ Double trisomy (DT) of chromosomes 4 and 10 or triple trisomy of chromosomes 4, 10, and 17 are among trisomies that have the most favorable outcome	• Cryptic t(12;21)(p13;q22): *ETV6::RUNX1* fusion • *DUX4r* • *NUTM1r*
Intermediate-risk features	• *MEF2Dr*, *ZNF384r*, *PAX5alt*, *PAX5* P80R, *ETV6::RUNX1*-like, t(1;19): *TCF3::PBX1*	
Unfavorable-risk features	• Hypodiploidy (<44 chromosomes)[c,d] • *KMT2Ar* (t[4;11] or others) • t(9;22)(q34;q11.2): *BCR::ABL1* • *BCR::ABL1*–like ALL ‣ JAK-STAT (*CRLF2r*,[e] *EPORr, JAK1/2/3r, TYK2r,* mutations of *SH2B3, IL7R, JAK1/2/3*) ‣ ABL class (rearrangements of *ABL1, ABL2, PDGFRA, PDGFRB, FGFR1*) ‣ Other (*NTRKr, FLT3r, LYNr, PTK2Br*)	• t(17;19): *TCF3::HLF* and t(17;18): *TCF4::HLF* • Intrachromosomal amplification of chromosome 21 (iAMP21) • Alterations of *IKZF1*[f]

[a] There is emerging evidence that several molecular markers not listed here may have an impact on prognosis. The Panel will review these data and update the table as they become available.

[b] Emerging evidence suggests new subtypes: *ETV6*::*RUNX1*-like, and the other defined genetic abnormalities: rearrangements of *DUX4*, *MEF2D, ZNF384*, and *NUTM1*; *IG::MYC* fusion; *PAX5alt;* and *PAX5* p.P80R. Further confirmatory studies are necessary to assess the risk associated with these alterations.

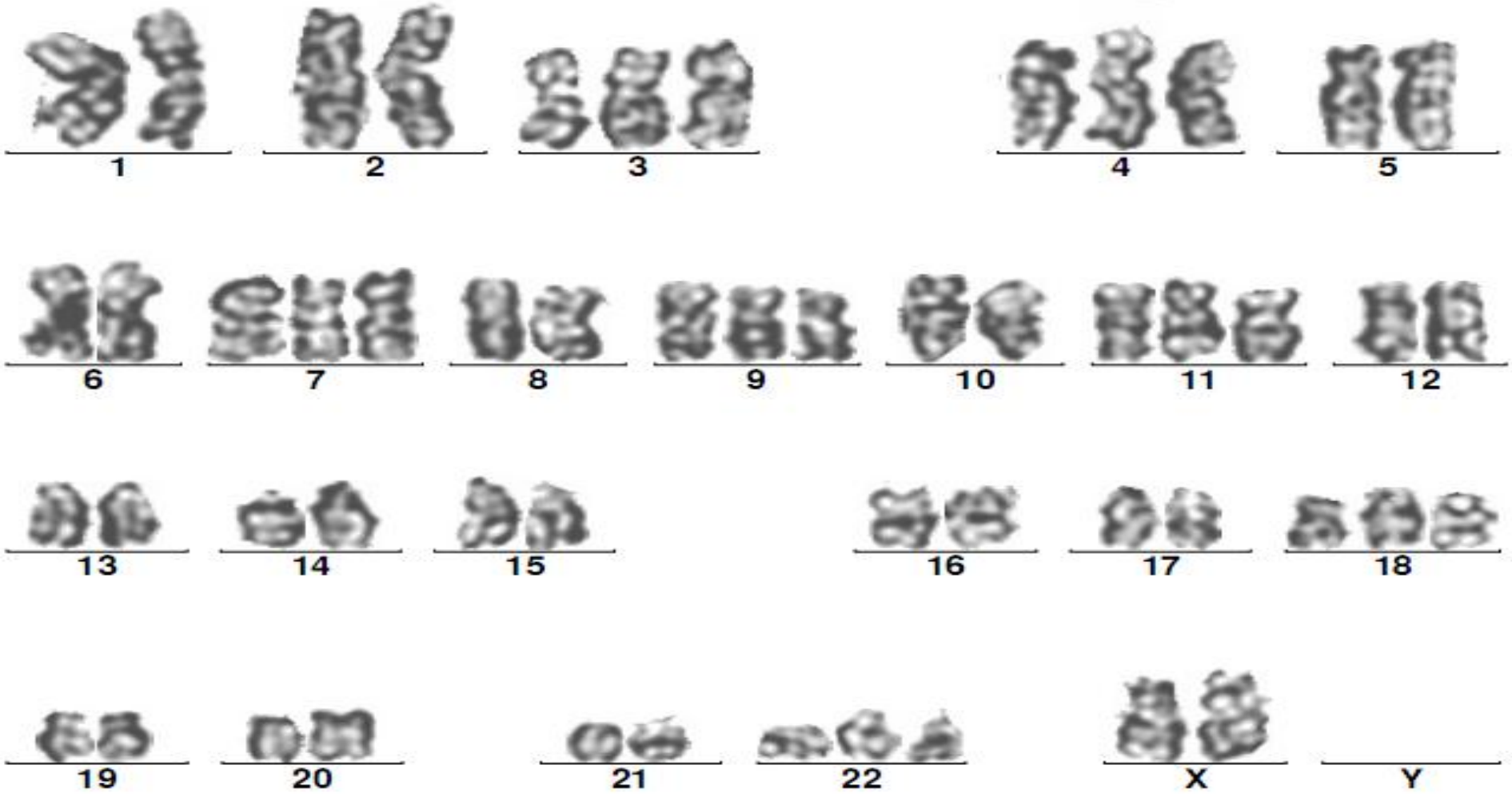
[c] Alternatively defined as DNA index less than protocol-defined threshold or other clear evidence of hypodiploid clone: near-haploid (24–31 chromosomes); low-hypodiploid (32–39 chromosomes); or high-hypodiploid (40–43 chromosomes). Low hypodiploid ALL is also often associated with *TP53* loss-of-function somatic mutations in which half are observed to be germline pathogenic variants associated with Li-Fraumeni syndrome. Holmfeldt L, Wei L, Diaz-Flores E, et al. The genomic landscape of hypodiploid acute lymphoblastic leukemia. Nat Genet 2013;45:242-252.

[d] There are other results that are not <44 chromosomes that may be equivalent to hypodiploidy and have the same implications. It is important to distinguish true hyperdiploidy from masked hypodiploidy, which results from the doubling of hypodiploid clones. Single nucleotide polymorphism (SNP) array or whole genome sequencing to look for loss of heterozygosity (LOH) can distinguish true hyperdiploidy from masked hypodiploidy. Carroll AJ, Shago M, Mikhail FM, et al. Masked hypodiploidy: Hypodiploid acute lymphoblastic leukemia (ALL) mimicking hyperdiploid ALL in children: A report from the Children's Oncology Group. Cancer Genet 2019;238:62-68.

[e] Harvey RC, Mullighan CG, Chen IM, et al. Rearrangement of CRLF2 is associated with mutation of JAK kinases, alteration of IKZF1, Hispanic/Latino ethnicity, and a poor outcome in pediatric B-progenitor acute lymphoblastic leukemia. Blood 2010;115:5312-5321.

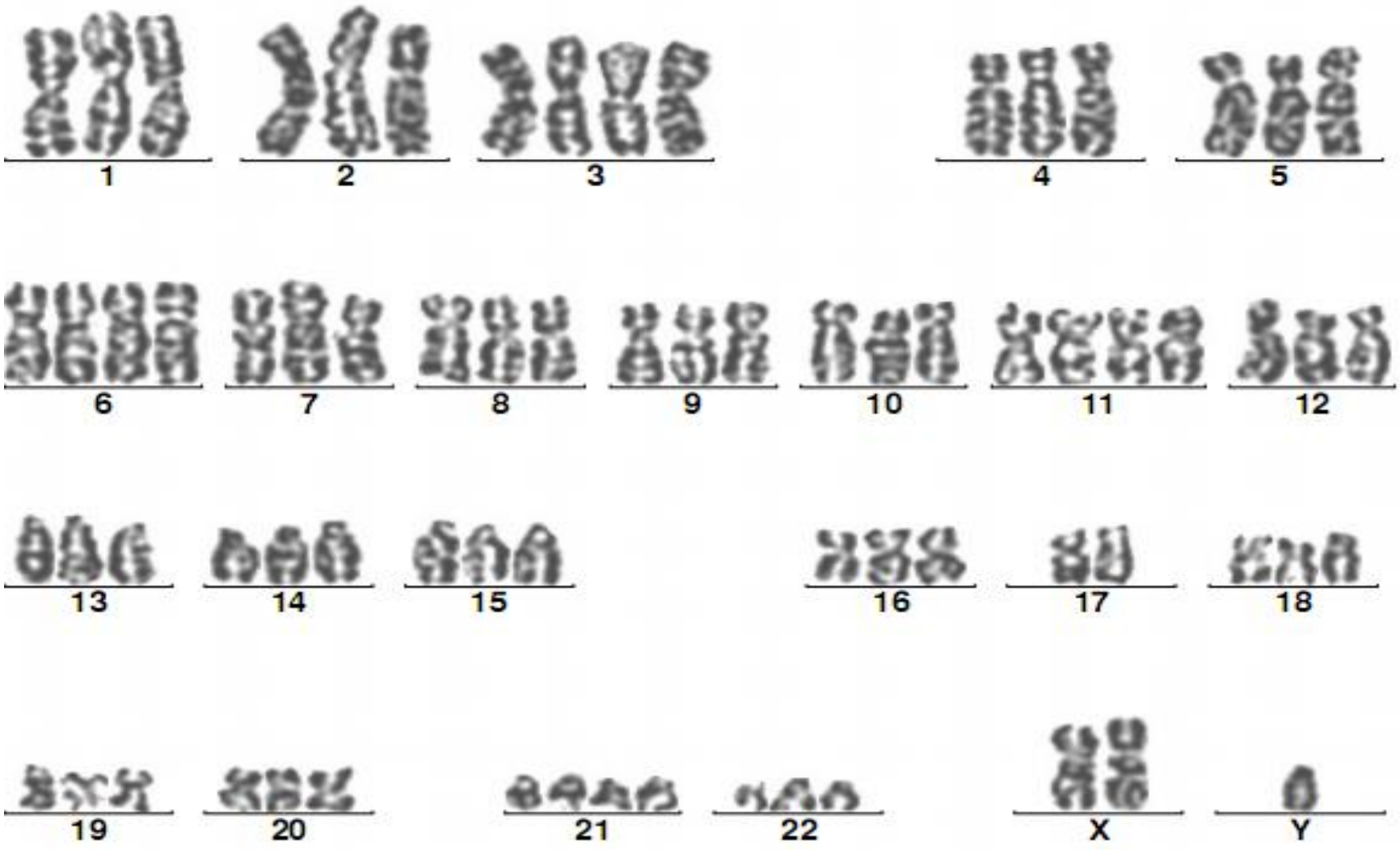
[f] *IKZF1* deletions with deletions in *CDKN2A, CDKN2B* (homozygous), *PAX5,* or *PAR1* region in the absence of *ERG* deletion, which are called *IKZF1*plus, as well as those with concomitant 22q11.22 deletions are especially associated with worse outcomes. However, *DUX4* rearrangements with *IKZF1* alterations do not confer poor prognosis. Mullighan CG, Su X, Zhang J, et al. Deletion of IKZF1 and prognosis in acute lymphoblastic leukemia. N Engl J Med 2009;360:470-480; Stanulla M, Dagdan E, Zaliova M, et al. IKZF1plus defines a new minimal residual disease-dependent very-poor prognostic profile in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. J Clin Oncol 2018;36:1240-1249; Mangum DS, Meyer JA, Mason CC, et al. Association of combined focal 22q11.22 deletion and IKZF1 alterations with outcomes in childhood acute lymphoblastic leukemia. JAMA Oncol 2021;7:1521-1528.

ĐA BỘI TRONG ALL



53,XX,+3,+4,+7,+9,+11,+18,+21

ĐA BỘI TRONG ALL



72,XXY,+1,+2,+3,+3,+4,+5,+6,+6,+7,+8,+9,+10,+11,+11,
+12,+13,+14,+15,+16,+18,+19,+20,+21,+21,+22

Các rối loạn gen trong đa bội NST/ALL

- Giảm biểu hiện gen mã hóa asparagine synthetase (men tổng hợp L-asparagine)

- Tăng biểu hiện gen SLC19A1 (mã hóa chất vận chuyển MTX vào tb) trên NST 21 → tăng tích tụ của MTX polyglutamates trong tế bào (thường có 3, 4 NST 21/đa bội)

- Tăng biểu hiện của gen proapoptotic CAS-P8AP2 tại NST 6q15 → tế bào blast đa bội có xu hướng trải qua quá trình chết theo chương trình tế bào một cách tự phát khá rõ

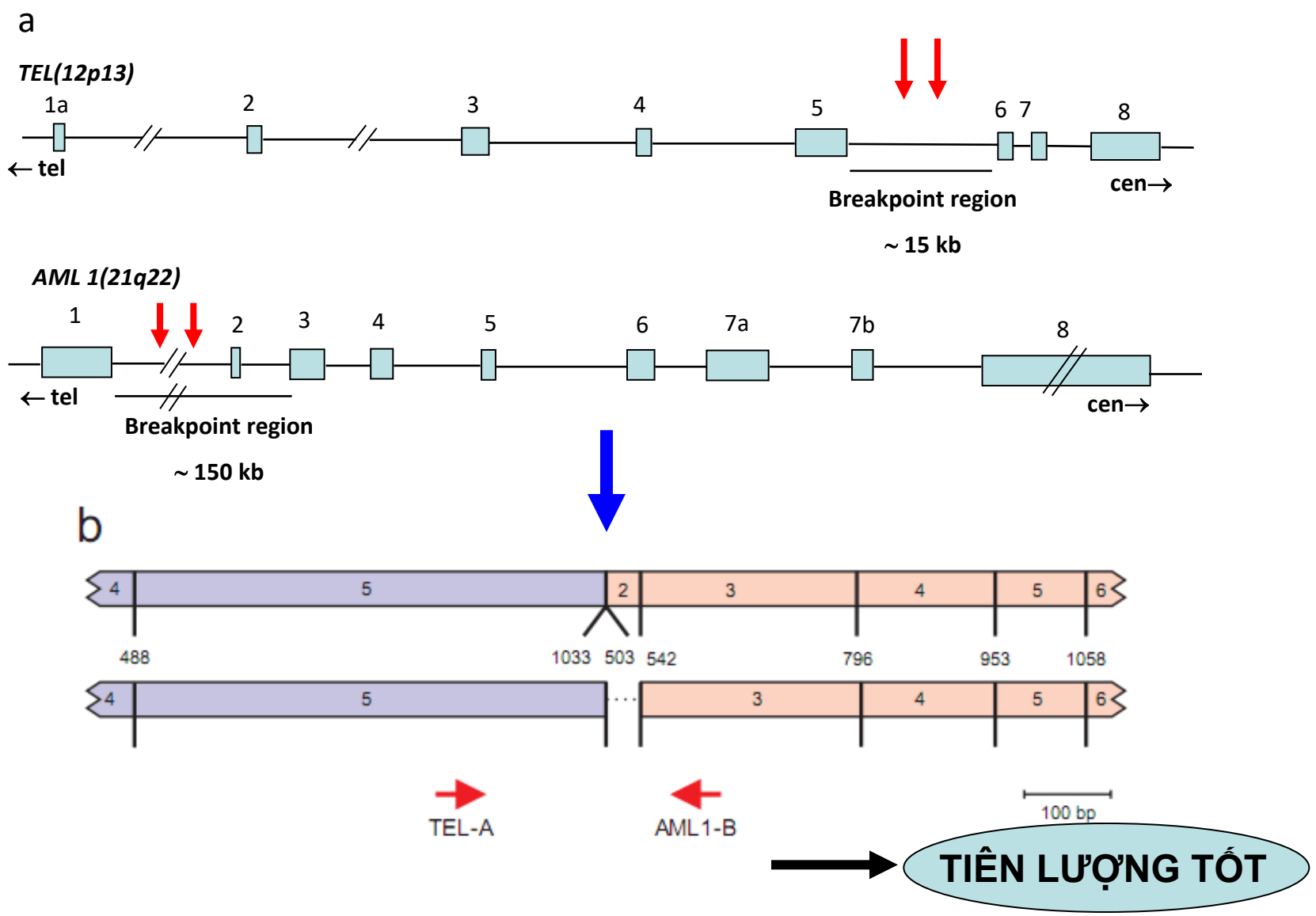
Giải thích

Vấn đề nhạy với hóa trị liệu:
corticosteroids, mercaptopurine, thioguanine,
cytarabine, L-asparaginase (ASP) và methotrexate (MTX)

t(12;21)(p13;q22) TẠO RA TỔ HỢP GEN *TEL/AML1*



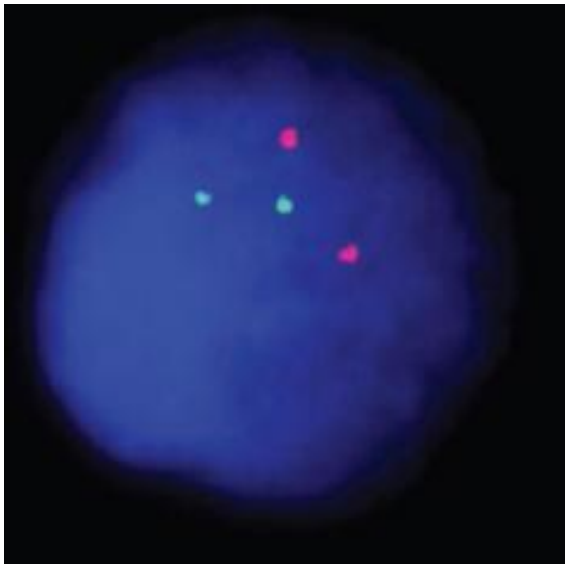
t(12;21)(p13;q22) TẠO RA TỔ HỢP GEN *TEL/AML1*



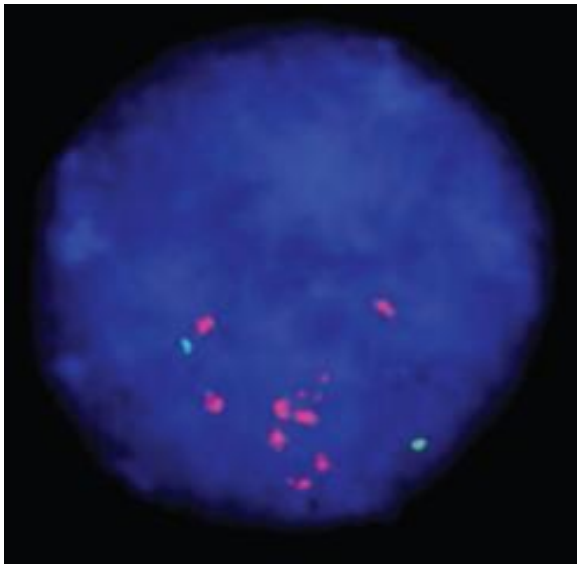
INTRACHROMOSOMAL AMPLIFICATION OF CHROMOSOME 21 (iAMP21)

- 2% B-ALL ở trẻ em, hiếm gặp ở người lớn
- Tiên lượng xấu khi điều trị theo nhóm nguy cơ chuẩn, cải thiện khi điều trị theo phác đồ nhóm nguy cơ cao
- Hiện diện ≥ 5 copies của *RUNX1* (*AML1*) trên 1 tế bào hoặc ≥ 3 copies trên 1 NST 21 bất thường quan sát trên metaphase FISH
- Sử dụng kỹ thuật FISH với probe *TEL-AML1* (*ETV6-RUNX1*)

INTRACHROMOSOMAL AMPLIFICATION OF CHROMOSOME 21 (iAMP21)



Tế bào bình thường



Tế bào có iAMP21

BẤT THƯỜNG NST VÀ GEN TRONG LYMPHOMA

BẤT THƯỜNG NST CỦA NON-HODGKIN LYMPHOMA

- **Tăng sinh tế bào B (chiếm khoảng 88%):**
  - **Diffuse large B cell lymphomas (30%)**
  - **Follicular lymphoma (25%)**
  - **Mucosa-associated lymphatic tissue (MALT) lymphoma (7.5%)**
  - **Mantle cell lymphoma (6.0%)**

Bất thường NST thường gặp liên quan 14q32 (*IGH*), 3q27 (*BCL6*), 11q13 (*BCL1*), 18q21.3 (*BCL2*)

- **Tăng sinh tế bào T (khoảng 12%)**

Bất thường NST thường gặp liên quan 14q11.2 (T cell receptor α–chain: *TCRA*), 7q34 (*TCRB*), 7p14 (*TCRG*), 2q23 (*ALK*)

BẤT THƯỜNG NST CỦA NON-HODGKIN LYMPHOMA

Bất thường NST	Non-Hodgkin Lymphoma
t(14;18)(q32;q21) liên quan gen *BCL2*	70-90% follicular small cleaved cell
t(3;22)(q27;q11.2), t(3;14)(q27;q32) t(2;3)(p12;q27) 3q27 có gen *BCL6*	40% trường hợp DLBCLs
	10% follicular lymphoma
t(8;14)(q24;q32) liên quan gen *MYC*	Small noncleaved cell và diffuse large B cell (DLBCLs)
t(11;14)(q13;q32) liên quan gen *CCND1*	Hầu hết các trường hợp mantle cell

BẤT THƯỜNG NST CỦA NON-HODGKIN LYMPHOMA

	WHO 2016	WHO 2022 – WHO-HAEM5
HGBL, NOS	Có	**Vẫn có**
MYC + BCL2 rearrangement	HGBL, với MYC và BCL2 và/hoặc BCL6 rearrangements	**DLBCL/HGBL with MYC and BCL2 rearrangements**
MYC + BCL6 nhưng không có BCL2	Thuộc nhóm HGBL với MYC và BCL2/BCL6 rearrangements → "double-hit"	**Không còn là một entity riêng**; phân loại thành DLBCL, NOS hoặc HGBL, NOS tùy hình thái
MYC + BCL2 + BCL6	Triple-hit, thuộc HGBL với MYC và BCL2/BCL6 rearrangements	**DLBCL/HGBL-MYC/BCL2**, vì BCL6 có thể đi kèm
Burkitt-like lymphoma + 11q aberration	Entity tạm thời	**HGBL with 11q aberration (HGBL-11q)**
"Double-hit lymphoma"	MYC/BCL2 **hoặc** MYC/BCL6	Trong WHO-2022, về cơ bản entity DH được định nghĩa bởi **MYC + BCL2 rearrangement**

BẤT THƯỜNG NST CỦA NON-HODGKIN LYMPHOMA

Phân nhóm	Đặc điểm
Double expressor	Biểu hiện chuyển vị MYC và BCL-2/BCL-6 xác định bằng tỷ lệ % TB dương tính trong nhuộm hóa mô miễn dịch (HMMD).
Double - hit	Có cả 2 chuyển vị MYC và BCL-2, chẩn đoán dựa vào FISH hoặc các XN gen thế hệ mới.

BẤT THƯỜNG NST CỦA NON-HODGKIN LYMPHOMA

Tái sắp xếp gen MYC có tương quan với mức biểu hiện của protein MYC không?

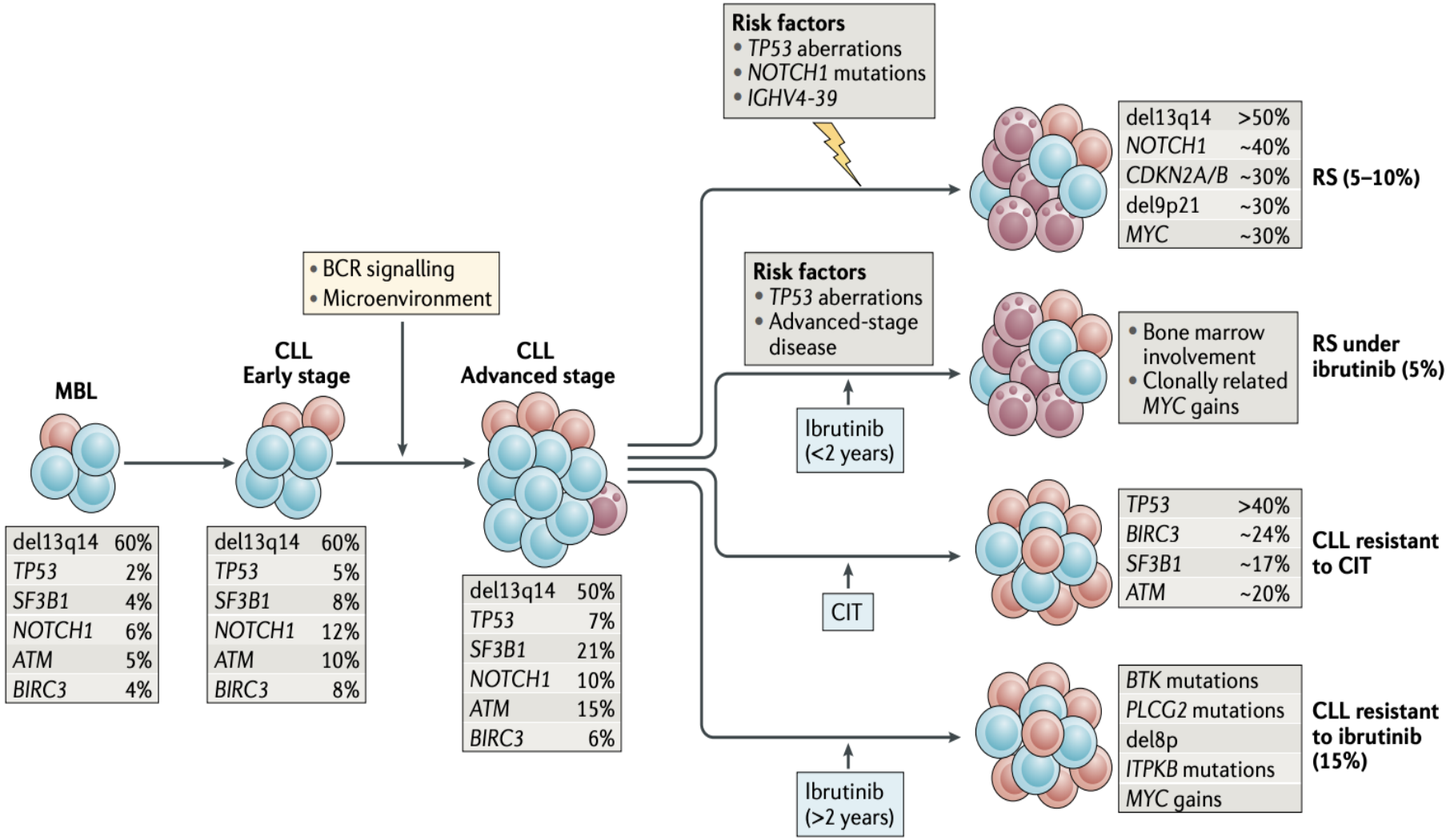
- Green và đồng nghiệp đã báo cáo trong 205 mẫu DLBCL: MYC(+) ≥ 70% trên HMMD có độ nhạy 100% và độ đặc hiệu 93% khi phát hiện tái sắp xếp gen MYC với kỹ thuật FISH.

- NC Agarwal và đồng nghiệp kết luận: < 30% các trường hợp có biểu hiện protein MYC cao trên HMMD mà không có tái sắp xếp gen MYC với kỹ thuật FISH.

1-Double Hit Lymphoma: From Biology to Therapeutic Implications - Mauricio Burotto

BẤT THƯỜNG NST VÀ GEN TRONG BẠCH CẦU MẠN DÒNG LYMPHO

SỰ TÍCH TỤ ĐỘT BIẾN TRONG CLL



Francesc B. (2019). Nature. 16: 684–701

CÁC DẤU ẤN TIÊN LƯỢNG VÀ XÉT NGHIỆM

Method of Detection	Prognostic Variable	Risk Category
Interphase cytogenetics (FISH)[b]	del(17p)	Unfavorable
	del(11q)	Unfavorable
	+12	Intermediate
	Normal	Intermediate
	del(13q) (as a sole abnormality)	Favorable
DNA sequencing[c]	*TP53*	Wild-type: Favorable Mutated: Unfavorable
	IGHV	>2% mutation: Favorable ≤2% mutation: Unfavorable
CpG-stimulated metaphase karyotype	CK[d] (≥3 unrelated clonal chromosome abnormalities in more than one cell on karyotype)	Unfavorable

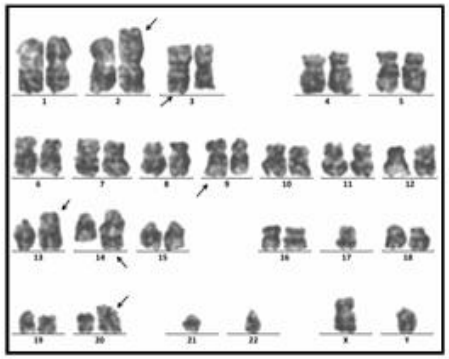
NCCN
Ver2.2023

KẾT QUẢ NST VÀ FISH CỦA BN CLL

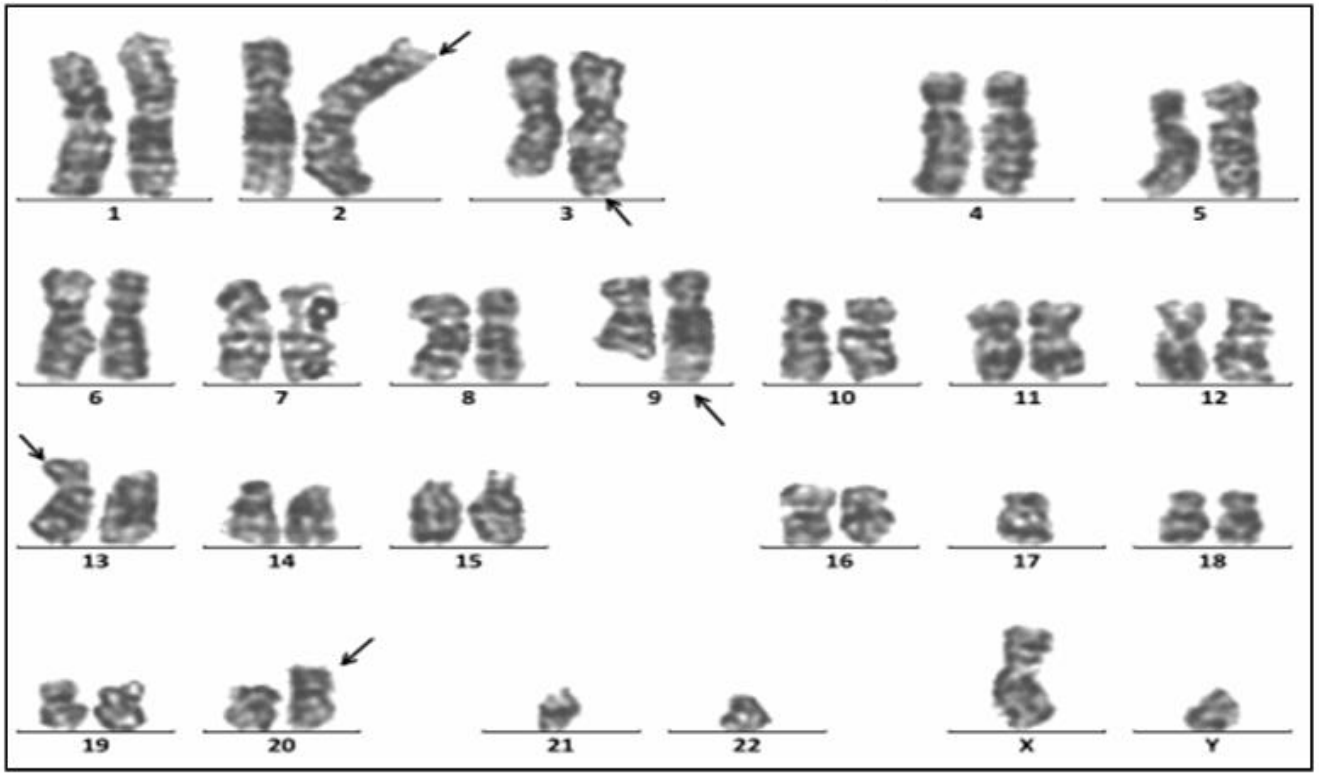
NST ĐỒ (CpG-stimulated metaphase karyotype)

Kết quả xét nghiệm:
43,XY,add(2)(p25),der(3)t(3;22)(q27;q11),add(9)(q34),der(13;22)(q10;q10)t(3;22)(q27;q11),-17,der(20)t(17;20)(q21;p13),-21[10]/43,idem,add(4)(p16)[5]/43,idem,der(14)t(14;?)(q32;?)[5]

Diễn giải: Đề nghị kiểm tra FISH với probe 3q27 và t(11;14).

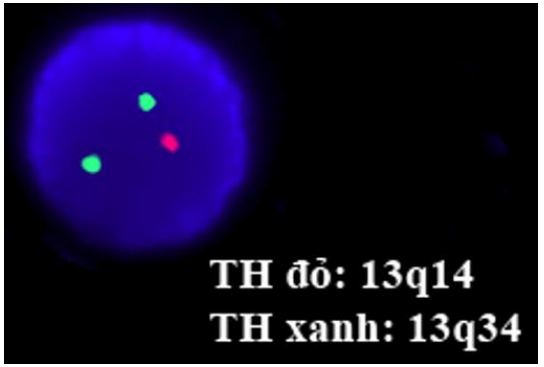


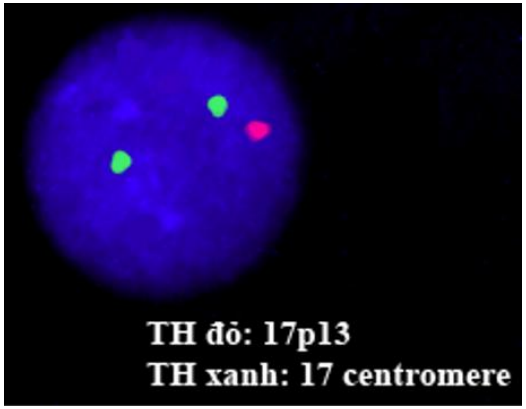
Hình ảnh công thức nhiễm sắc thể



FISH

Del(13q14)

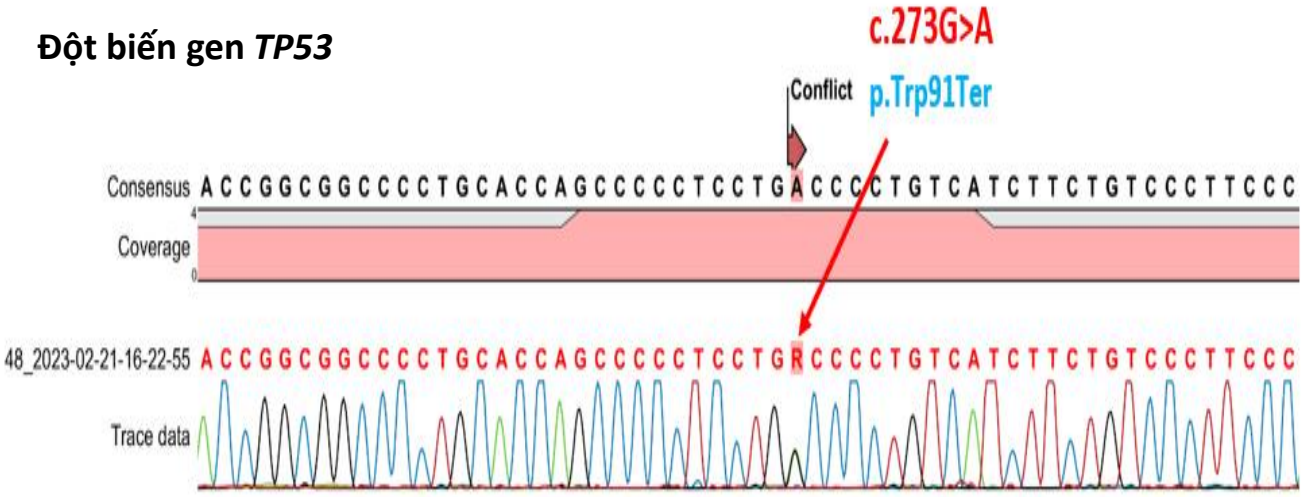




Del(17p13)

KẾT QUẢ ĐỘT BIẾN GEN TP53 VÀ IGHV

Đột biến gen *TP53*



NB có đột biến c.273G>A (p.Trp91Ter) thuộc exon 4 của gen *TP53*

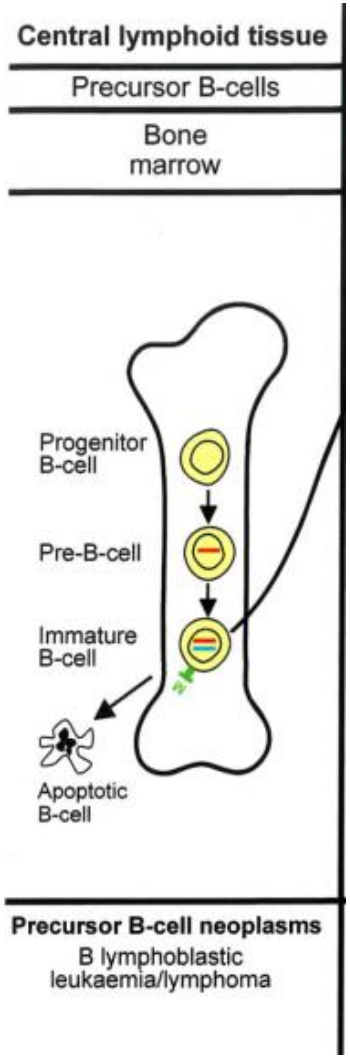
Tình trạng đột biến *IGHV*

```
>CLL-15_VH3L
gcgkcattaggtgattcatggatcaatagagatgttgagtgtgagtgaacacgagtgaga
gaaacagtggatttgtgtggcagtttctgaccagggtgtctctgtgtttgcaggtgtcca
gtgtgaggtgcagctggtggagtctgggggaggtgtggtacggcctgggggtccctgag
actctcctgtgcagcctctggattcacctttgatgattatggcatgagctgggtccgcca
agctccagggaaggggctggagtgggtctctggtattaattggaatggtggtagcacagg
ttatgcagactctgtgaagggccgattcaccatctccagagacaacgccaagaactccct
gtatctgcaaatgaacagtctgagagccgaggacacggccttgtattactgtgcgagagc
cgcgtattactatgatagtagtggttattatcagcggcactactactacggtatggacgt
ctgggccaagggaccacggtcaccgtctcctymaggtaaraaga
```

Result summary: CLL-15_VH3L	Productive IGH rearranged sequence (no stop codon and in-frame junction)		
V-GENE and allele	Homsap IGHV3-20*04 F	score = 1440	identity = 100.00% (288/288 nt)
J-GENE and allele	Homsap IGHJ6*02 F	score = 243	identity = 87.30% (55/63 nt)
D-GENE and allele by IMGT/JunctionAnalysis	Homsap IGHD3-22*01 F	D-REGION is in reading frame 2	
FR-IMGT lengths, CDR-IMGT lengths and AA JUNCTION	[25.17.38.11]	[8.8.23]	CARAAYYYDSSGYYQRHYYYGMDVW
JUNCTION length (in nt) and decryption	75 nt = (10)-1{3}+1(27)-4{8}-6(26)	(3'V)3'(N1)5'(D)3'(N2)5'(5'J)	

NB được xác định thuộc nhóm unmutated IGHV, kiểu TXS *IGHV3-20/IGHD3-22/IGHJ6*.

QUÁ TRÌNH PHÁT TRIỂN TẾ BÀO LYMPHO B TRONG TỦY XƯƠNG



	Stem cell	Early pro-B cell	Late pro-B cell	Large pre-B cell	Small pre-B cell	Immature B cell	Mature B cell
				pre-B receptor		IgM	IgD IgM
H-chain genes	Germline	D–J rearranging	V–DJ rearranging	VDJ rearranged	VDJ rearranged	VDJ rearranged	VDJ rearranged
L-chain genes	Germline	Germline	Germline	Germline	V–J rearranging	VJ rearranged	VJ rearranged
Surface Ig	Absent	Absent	Absent	μ chain transiently at surface as part of pre-B-cell receptor. Mainly intracellular	Intracellular μ chain	IgM expressed on cell surface	IgD and IgM made from alternatively spliced H-chain transcripts

Janeway's Immunobiology 9th edition

CẤU TRÚC CỦA CÁC GEN IG

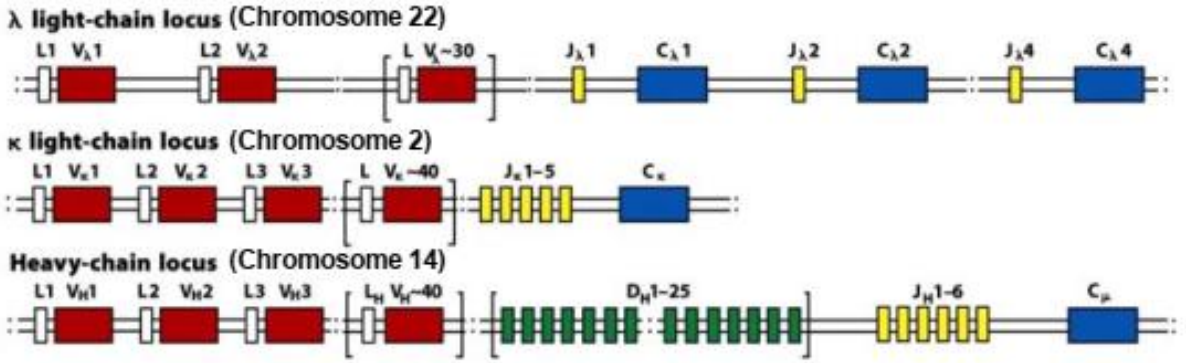
- Gen **IgH** bao gồm nhiều đoạn V, D, J, C.
- Gen **IgK, IgL** gồm các đoạn V, J, C.

- V = variable; D = diversity; J = joining;
- C = constant; L = leader peptide.

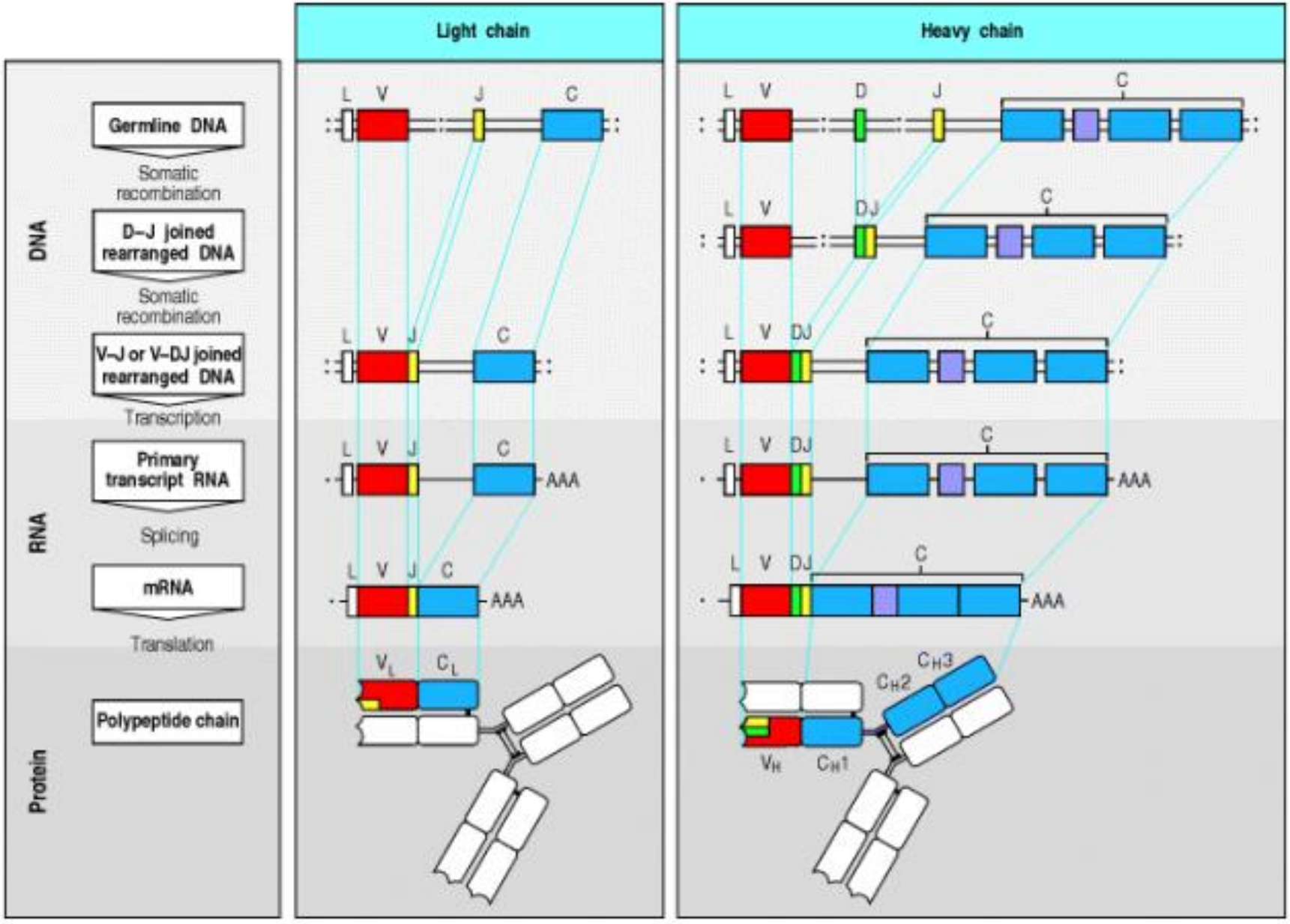
Number of functional gene segments in human immunoglobulin loci

Segment	Light chains		Heavy chain
	κ	λ	H
Variable (V)	40	30	40
Diversity (D)	0	0	25
Joining (J)	5	4	6

The germline organization of the immunoglobulin heavy- and light-chain loci in the human genome



TÁI SẮP XẾP CỦA CÁC GEN IG



BẤT THƯỜNG NHÓM NGUY CƠ CAO TRÊN BN CLL

Select high-risk genomic features in CLL

	presence of **del(17p)**	mutations in ***TP53***	presence of **del(11q)**	unmutated **IGHV**
ESMO (2020)[1]	✓	✓	✓	✓
iwCLL (2018)[2]	✓	✓	✓	✓
NCCN (2023)[3]	✓	✓	✓	✓

The presence of high-risk genomic features may impact PFS outcomes[1,2]

ESMO: European Society of medical oncology
iwCLL: International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia
NCCN: National Comprehensive Cancer Network

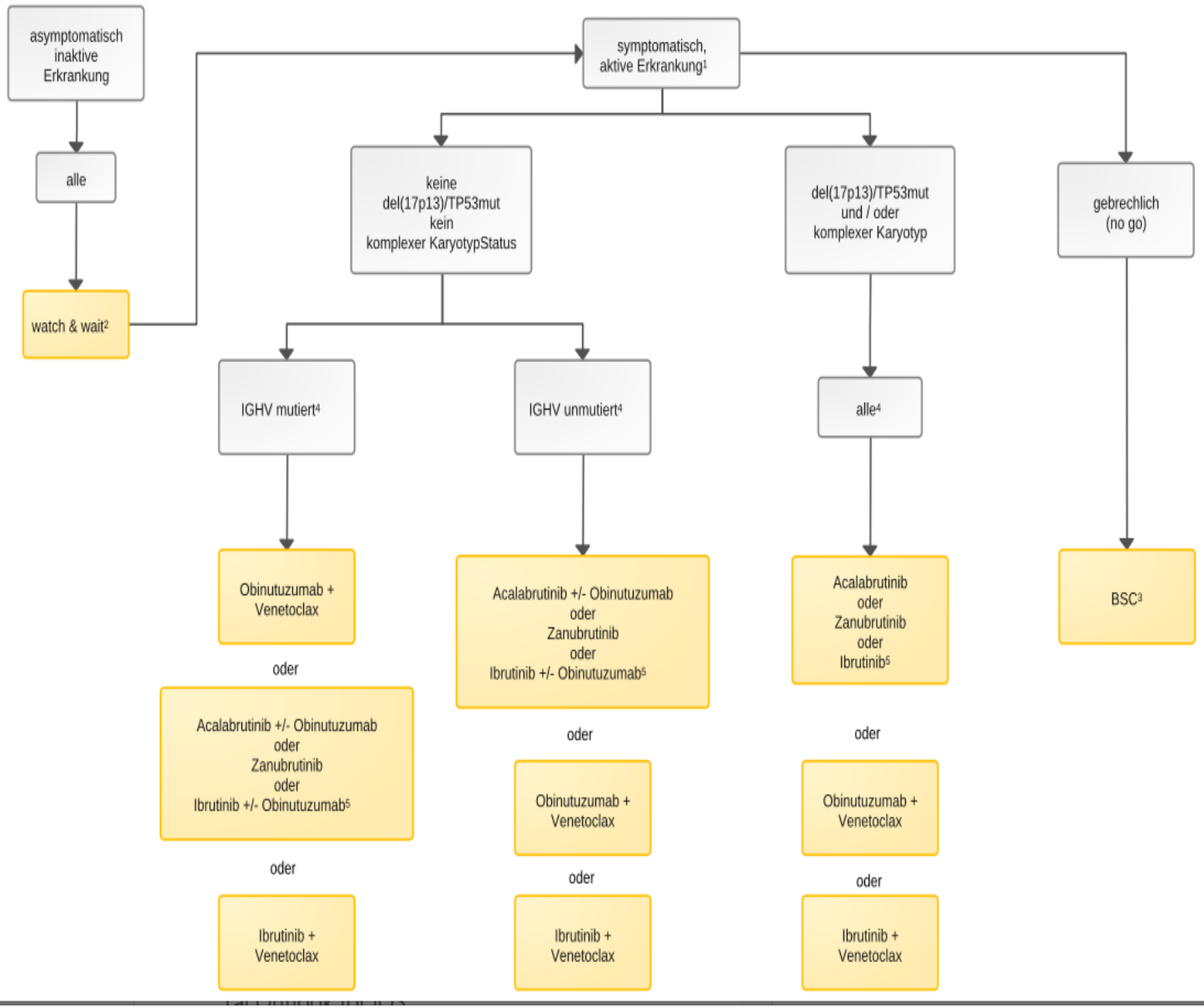
1. Eichhorst B et al. Ann Oncol. 2020;32(1):23-33.
2. Hallek M et al. Blood. 2018;131(25):2745-2760.
3. aWierda WG et al. J Natl Compr Canc Netw. 2020;18(2):185-217.

ĐIỀU TRỊ CLL THEO BẤT THƯỜNG NST VÀ ĐỘT BIẾN GEN

Guideline Đức 2023

Các yếu tố nguy cơ chính được khuyến nghị để lựa chọn điều trị[1]

- **Del (17p) và TP53**
- **Complex Karyotype**
- **Tình trạng IGHV không đột biến**



XÉT NGHIỆM SHPT CẦN THỰC HIỆN TRÊN BN CLL

Diagnostic test	General practice	Clinical trial
Tests to establish the diagnosis		
CBC and differential count	Always	Always
Immunophenotyping of peripheral blood lymphocytes	Always	Always
Assessment before treatment		
History and physical, performance status	Always	Always
CBC and differential count	Always	Always
Marrow aspirate and biopsy	When clinically indicated (unclear cytopenia)	Desirable
Serum chemistry, serum immunoglobulin, and direct antiglobulin test	Always	Always
Chest radiograph	Always	Always
Infectious disease status	Always	Always
Additional tests before treatment		
Molecular cytogenetics (FISH) for del(13q), del(11q), del(17p), add(12) in peripheral blood lymphocytes	Always	Always
Conventional karyotyping in peripheral blood lymphocytes (with specific stimulation)	NGI*	Desirable
TP53 mutation	Always	Always
IGHV mutational status	Always	Always
Serum β_2-microglobulin	Desirable	Always
CT scan of chest, abdomen, and pelvis	NGI	Desirable
MRI, PET scans	NGI	NGI
Abdominal ultrasound†	Possible	NGI

General practice is defined as the use of accepted treatment options for a CLL patient not enrolled on a clinical trial.

CBC, complete blood count; MRI, magnetic resonance imaging; NGI, not generally indicated; PET, positron emission tomography.

*Conventional karyotyping in peripheral blood lymphocytes (with specific stimulation) may be useful before therapy, if established methodology is available.

†Used in some countries to monitor lymphadenopathy and organomegaly.

1. **Cấy NST (kích thích lympho B)**
2. **Tìm đột biến *IGHV***
3. **Giải trình tự tìm đột biến *TP53***
4. **FISH với probe:**
   11q22, 13q14-34, 12p, 17p13

blood® 21 JUNE 2018 | VOLUME 131, NUMBER 25

CÁC ĐIỂM CẦN LƯU Ý

1. Nhiễm sắc thể (NST) Philadelphia, các kiểu bản sao *BCR/ABL* và kỹ thuật phát hiện.
2. Vấn đề theo dõi đáp ứng điều trị trong CML
3. Đặc điểm đột biến gen *BCR/ABL* gây kháng imatinib, kỹ thuật phát hiện.
4. Đột biến gen *JAK2*V617F: gặp trong bệnh nào? Kỹ thuật phát hiện?
5. Phân nhóm nguy cơ theo bất thường NST và đột biến gen trong bệnh bạch cầu cấp dòng tủy (AML): nhóm tốt và nhóm xấu
6. Bất thường NST, gen trong AML-M3 và tiến bộ trong điều trị AML-M3
7. Đột biến khuynh hướng dòng mầm trong AML
8. Phân nhóm nguy cơ trong bạch cầu cấp dòng lympho (ALL)
9. iAMP21
10. Bất thường NST trong lymphoma
11. Bất thường NST và KT phát hiện trong bạch cầu mạn dòng lympho (CLL)