



TAMPEREEN
AMMATTIKORKEAKOULU

KROONINEN MYELOOINEN LEUKEMIA JA SEN JÄÄNNÖSTAUDIN RAPORTOINTI GRAAFISESSA MUODOSSA

Kaisu Torniainen

Anri Vasara

Opinnäytetyö
Elokuu 2018
Bioanalytikkokoulutus



TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Bioanalytikkokoulutus

TORNIAINEN KAISU & VASARA ANRI:

Krooninen myeloinen leukemia ja sen jäännöstaudin raportointi graafisessa muodossa

Opinnäytetyö 61 sivua, joista liitteitä 20 sivua
Elokuu 2018

Krooninen myeloinen leukemia (KML) syntyy translokaatiosta kromosomien 9 ja 22 välillä, jonka seurauksena muodostuu Philadelphia-kromosomi. Translokaatio johtaa *BCR-ABL1*-fuusiogeeniin, mikä aiheuttaa soluissa tyrosiinikinaasin liiallisen tuotannon. Liiallista aktiivisuutta voidaan hoitaa tyrosiinikinaasi-inhibiittoreiden avulla ja saada näin leukeemiset solut vähenemään. Hoidon tehokkuutta seurataan mittaamalla *BCR-ABL1*-transkriptin määrää verestä tai luuytimeistä PCR-menetelmän avulla. Jäännöstaudin eli *BCR-ABL1*-transkriptien määrän mittauksella voidaan seurata, saavuttaako potilas hoidon tavoitteet.

Työ toteutettiin toiminnallisena opinnäytetyönä, joka sisältää raporttiosion ja tuotoksen. Kansainvälisten ohjeistusten mukaan KML:n seurannassa jäännöstaudin määrä tulee esittää myös graafisessa muodossa. Opinnäytetyön tavoitteena oli tuottaa Fimlab laboratoriot Oy:n genetiikan yksikön käyttöön jäännöstaudin määrää havainnollistava kuvaaja, jonka pohjalta KML-potilaille voidaan tehdä henkilökohtaiset kuvaajat. Niiden avulla klinikot voivat seurata paremmin potilaiden jäännöstaudin määrän vaihtelua. Tarkoituksena oli tehdä kymmenen potilaan jäännöstautiarvojen perusteella esimerkkikuvaajat Microsoft Excel -taulukkolaskentaohjelman avulla. Opinnäytetyössä käytettyjä potilastietoja käsiteltiin eettisesti ja potilaiden anonymiteettia kunnioittaen.

Tuotoksen toteutuksessa otettiin huomioon toimeksiantajan toiveet. Kehitetyssä kuvaajassa on ominaisuuksia, joiden vuoksi se ei ole sellaisenaan sujuvakäyttöinen, vaan vaatii lisää jatkokehittelyä mahdollisesti eri ohjelman avulla toteutettuna. Vaikka opinnäytetyön tavoitetta ei täysin saavutettu, kuvaajasta voidaan nähdä jäännöstaudin määrän vaihtelua selventävä hyöty. Lisäksi kuvaajaa voidaan käyttää mallina helppokäyttöisemmän kuvaajan suunnitteluun.

Asiasanat: krooninen myeloinen leukemia, jäännöstauti, *BCR-ABL1*

ABSTRACT

Tampereen ammattikorkeakoulu
Tampere University of Applied Sciences
Degree Programme in Biomedical Laboratory Science

TORNIAINEN KAISU & VASARA ANRI

Graphic Presentation of Minimal Residual Disease in Chronic Myeloid Leukemia

Bachelor's thesis 61 pages, appendices 20 pages
August 2018

Chronic myeloid leukemia (CML) is a disease caused by the translocation between chromosomes 9 and 22. The translocation results in BCR-ABL1 fusion gene, which leads to excessive tyrosine kinase activity. CML can be treated with tyrosine kinase inhibitors that help decrease the number of leukemic cells. The effectiveness of treatment can be monitored by using PCR method to measure the amount of BCR-ABL1 transcript in peripheral blood or bone marrow.

This study was conducted as a project. The topic of the study was working-life related and it was requested by Fimlab laboratoriot Oy. According to international guidelines a graphical presentation must be included in the report of minimal residual disease in CML. The purpose of this study was to create ten model graphs to portray the progress of minimal residual disease. The data for the graphs were collected from ten patients who have been diagnosed with CML. The aim of this study was to provide clinicians with a ready-to-use graph that would be a beneficial observation tool in the follow-up of CML.

The graph was created with Microsoft Excel spreadsheet programme. Due to limitations in Excel's features, some of the desired properties in the graph could not be fully accomplished and therefore it does not work directly as a ready-to-use graph. Our suggestion for a further study is to make a graph with similar properties as ours but using different software in order to make the graph more user-friendly.

Key words: chronic myeloid leukemia, minimal residual disease, BCR-ABL1

SISÄLLYS

1	JOHDANTO.....	6
2	KROONINEN MYELOINEN LEUKEMIA.....	8
2.1	Fuusiogeeni <i>BCR-ABL1</i>	9
3	TAUDIN VAIHEET JA OIREET.....	11
3.1	Krooninen vaihe.....	11
3.2	Akseleraatiovaihe.....	12
3.3	Blastikriisi.....	12
4	DIAGNOOSI JA TUTKIMUKSET	14
4.1	PCR-menetelmät.....	15
4.2	G-raita värjäys.....	16
4.3	Fluoresenssimenetelmät.....	18
4.4	Immunofenotyypitys.....	20
5	HOITO.....	21
6	JÄÄNNÖSTAUDIN SEURANTA JA TAVOITEVASTEET.....	23
6.1	Hematologinen vaste.....	24
6.2	Sytogeneettinen vaste	25
6.3	Molekulaarinen vaste.....	25
7	KANSAINVÄLINEN ASTEIKKO	28
8	TOIMINNALLINEN OPINNÄYTETYÖ	30
9	OPINNÄYTETYÖN TAVOITE JA TARKOITUS.....	31
10	OPINNÄYTETYÖN TUOTOKSEN TARKASTELU.....	32
11	POHDINTA.....	34
	LÄHTEET.....	37
	LIITTEET	42
	Liite 1. Potilaskuvaajat.....	42

LYHENTEET JA TERMIT

<i>ABL1</i>	<i>abelson1</i> -geeni
<i>BCR</i>	<i>breakpoint cluster region</i> -geeni
CyR	cytogenetic response, sytogeneettinen vaste
CCyR	complete cytogenetic response, täydellinen sytogeneettinen vaste
CHR	complete hematological response, täydellinen hematologinen vaste
FISH	fluoresenssi in situ -hybridisaatio
fuusiogeeni	kahden eri geenin osien yhdistymä
IS	International Scale
KML	krooninen myeloinen leukemia
MMR	major molecular response, major molekulaarinen vaste
MR	molecular response, molekulaarinen vaste
MRD	minimal residual disease, jäännöstauti
PCR	polymeraasiketjureaktio
Ph-kromosomi	Philadelphia-kromosomi, der(22)t(9;22)(q34;q11)
RT-qPCR	kvantitatiivinen reaaliaikainen PCR
TKI	tyrosiinikinaasi-inhibiittori

1 JOHDANTO

Krooninen myeloinen leukemia (KML) on klonaalisten hematopoeettisten kantasolujen sairaus, jolle on ominaista myelooisen solulinjan epänormaali proliferaatio. KML:n aiheuttaa Philadelphia-kromosomi (Ph), joka johtuu kromosomien 9 ja 22 välisestä translokaatiosta. Translokaation seurauksena muodostuu *BCR-ABL1*-fuusiogeneeni, joka toimii onkogeeninä lisäten tyrosiinikinaasin aktiivisuutta. Tämän aktiivisuuden kasvamisen myötä hematopoeettisten kantasolujen lisääntymis- ja erilaistumiskyky muuttuu normaalista poikkeavaksi, ja vähitellen ne syrjäyttävät terveet kantasolut aiheuttaen leukemian. Tyypillisesti sairaus todetaan sattumalta kroonisessa vaiheessa, josta se etenee hoitamattomana akseleraatiovaiheen kautta blastikriisiin. (Iwasaki & Akashi 2016, 1–2; Radich & Egan 2016, 53.)

Vielä pari vuosikymmentä sitten ennen tehokkaita hoitomuotoja KML:aa sairastavan ennuste ja elinajanodote eivät olleet lupaavia. Vuosien aikana taudin hoito on kehittynyt merkittävästi ja tyrosiinikinaasi-inhibiittori-lääkitys (TKI) on parantanut kaikenikäisten potilaiden ennustetta ja elämänlaatua huomattavasti. Nykyään sairastuneiden elinajan voidaan olettaa olevan jo lähes sama kuin valtaväestöllä. Tärkein tavoite KML-potilaiden hoidossa on estää taudin eteneminen kroonisesta vaiheesta. (Bower ym. 2016, 2851.) TKI-lääkityksen ansiosta suurin osa kroonisen vaiheen potilaista vastaa hyvin hoitoon ja riski taudin progressioon jää pieneksi. Joidenkin potilaiden kohdalla voidaan harkita jopa lääkeyksen lopettamista, jos jäännöstautia ei ole havaittavissa kahteen vuoteen. (Koskela ym. 2012; Radich & Egan 2016, 53.)

Jäännöstauti (minimal residual disease, MRD) kuvastaa KML:n *BCR-ABL1*-transkriptien määrää elimistössä hoidon aikana tai sen jälkeen potilaan ollessa oireeton. MRD:n määrää voidaan mitata PCR-menetelmien avulla. (Chereda & Melo 2016, 19; Roche n.d.) Riskit hoidon epäonnistumisessa voidaan tunnistaa ajoissa säännöllisen jäännöstaudin ja hoidon seurannan avulla. Vasteet luokitellaan optimaaliseen ja epäonnistuneeseen vasteeseen, joiden välille jää niin kutsuttu varoitusalue. Vasteet kuvastavat hoidon tehoa ja tarpeen tullen hoitoa voidaan niiden perusteella muuttaa. (Baccarani ym. 2012; Hughes, Ross & Melo 2014, 21–22.)

The International Randomized Study of Interferon and STI571 (IRIS) -tutkimus osoitti TKI-lääkkeen, imatinibin, olevan ylivoimaisesti parempi aiemmin käytössä olleisiin interferoneihin verrattuna. Tutkimuksessa analysoitiin eri PCR-laitteiden avulla 30 potilaan näytteet ja tuloksia verrattiin standardisoituun lähtökohtaan. Standardisoidun lähtökohdan avulla peräkkäisten kokeiden tuloksia voitiin normalisoida. Asteikko, jota IRIS-tutkimuksessa käytettiin, muodostui perustaksi kansainväliselle asteikolle (International Scale, IS). IS:a käytetään BCR-ABL1:n mitta-asteikkona, johon laboratoriot suhteuttavat tuottamansa tulokset muuntokertoimen avulla. Siten laboratoriot voivat hyödyntää omia tutkimusmenetelmiään ja tulokset ovat yhä keskenään vertailtavissa. (Cross & Hochhaus 2016, 91–92; Branford & Cross n.d.)

Opinnäytetyön aiheena on krooninen myeloinen leukemia ja sen jäännöstaudin raportointi graafisessa muodossa. Kansainvälisten ohjeistusten mukaan kroonisen myelooisen leukemian jäännöstaudin seurannan tulokset tulee esittää paitsi numeerisessa myös graafisessa muodossa. Koska Fimlab laboratoriot Oy:n genetiikan laboratorion ei kuitenkaan toistaiseksi ole ollut käytössä tällaista kuvaajapohjaa jäännöstaudin raportoimiseksi, saimme heiltä toimeksiannon kehittää mallikuvaaja. Raportissa tarkastellaan KML:aa tautina yleisesti, sekä perehdytään sen eri tutkimusmenetelmiin. Lisäksi työssä käsitellään kansainvälistä asteikkoa ja sen alkuperää. Teoriaosuudessa aihetta on rajattu siten, että taudin eri hoitomuotoihin ei perehdytä kovin syvästi, sillä bioanalyytikon rooli keskittyy vahvasti analytiikkaan. Sen sijaan työssä perehdytään hoidon aikaansaamiin vasteisiin ja erityisesti molekulaariseen vasteeseen, joka osaltaan on graafisen kuvaajan perustana.

2 KROONINEN MYELOOINEN LEUKEMIA

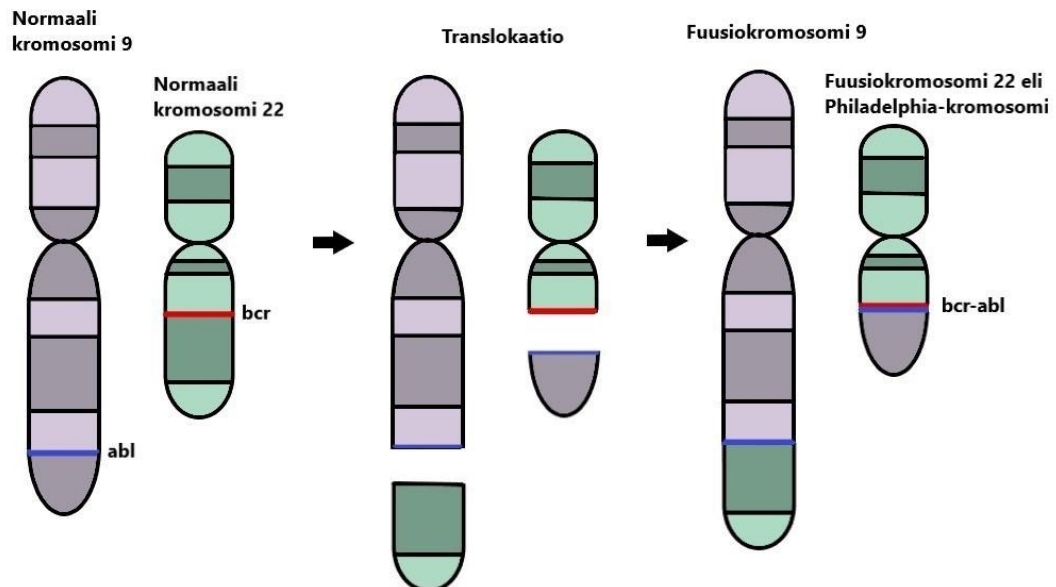
Krooninen myeloinen leukemia on pluripotenttien kantasolujen klonalisesta häiriöstä johtuva pahanlaatuinen veritauti, jonka osuus kaikista leukemioista on noin 15 prosenttia. KML:n diagnosointi ei yleensä ole vaikeaa, koska sille on tyypillistä niin kutsuttu Ph-kromosomisiirtymä. (Hoffbrand & Moss 2011, 192.) Ph-kromosomi on seurausta kromosomien 9 ja 22 pitkän varren translokaatiosta eli siirtymästä. Translokaation vuoksi kromosomiin 22 muodostuu *BCR-ABL1*-fuusiogeneeni, joka lisää tyrosiinikinaasientsyymin aktiivisuutta ja näin ollen aiheuttaa verisolujen liiallista tuotantoa. (Mustjoki & Koistinen 2015, 303.)

Ensimmäinen krooniseen myelooiseen leukemiaan liittyvä tärkeä löydös tehtiin vuonna 1960, kun huomattiin, että KML:aa sairastavien kromosomi 22 oli lyhyempi kuin terveillä henkilöillä. Löytö tehtiin Philadelphiassa Pennsylvanian lääketieteellisessä yliopistossa, minkä vuoksi tätä muutosta alettiin kutsua Philadelphia-kromosomiksi. (Leukemia & Lymphoma society 2014.) Vuonna 1973 havaittiin, että muutokseen liittyy translokaatio kromosomien 9 ja 22 välillä. 1980-luvulla selvisi, että KML-potilaiden leukemiasoluissa *BCR-ABL1*-fuusiogeneeni erittää proteiinia, joka tehostaa tyrosiinikinaasin aktiivisuutta. (Goldman & Daley 2007.)

KML:n etiologiaa ei tunneta, mutta säteilylle altistumisen tiedetään lisäävän sairastumisen riskiä. Taudin ei ole todettu olevan perinnöllinen, mutta se on miehillä hieman yleisempi kuin naisilla. KML:aa esiintyy kaikissa ikäluokissa, mutta sitä tavataan yleisimmin 40–70-vuotiailla, ja Suomessa siihen sairastuu vuosittain 50–60 henkilöä. (Hughes ym. 2014, 4; Mustjoki & Koistinen 2015, 303.) Tiedetään kuitenkin, että maantieteellisellä sijainnilla on vaikutusta KML:n ilmaantuvuuteen, sillä esimerkiksi Afrikassa ja Latinalaisessa Amerikassa diagnoosivaiheen potilaiden keski-ikä on vähintään 15 vuotta vähemmän kuin Euroopassa, Yhdysvalloissa ja Australiassa. Vaikka maiden välillä on erilaisia elinajanodotteita, ne eivät täysin selitä eroja KML:n puhkeamisissä. Tulevaisuudessa saatetaankin löytää lisää selittäviä tekijöitä taudin kehittymiselle. (Chereda & Melo 2016, 17.) KML:n hoitovaste on nykyään erittäin hyvä ja se saadaan pidettyä lääkityksellä hallinnassa, vaikka varsinaista parantavaa hoitoa ei vielä ole kehitetty (Hughes ym. 2014, 4; Mustjoki & Koistinen 2015, 303).

2.1 Fuusiogeneeni *BCR-ABL1*

Tyrosiinikinaasigeeni *ABL1* (*abelson1*) toimii normaalisti kromosomissa 9 ja *BCR*-geeni (*breakpoint cluster region*) puolestaan kromosomissa 22. Nämä geenit fuusioituvat keskenään translokaation seurauksena ja synnyttävät *BCR-ABL1*-fuusiogeenin Ph-kromosomissa (kuva 1). (Balk, Fabarius & Haferlach 2016, 1.) KML:lle tyypillinen translokaatio tapahtuu kromosomialueiden 9q34 ja 22q11 välillä. *BCR-ABL1*-fuusiogeneeni eli onkogeeni syntyy 22q11-alueella sijaitsevan *BCR*-geenin ja 9q34-alueen *ABL1*-geenin yhdistyessä. Tämän seurauksena geenin tuottaman onkoproteiinin rakenne muuttuu ja tyrosiinikinaasiaktiivisuus kasvaa. (Fimlab Laboratoriot Oy 2017.)



KUVA 1. *BCR-ABL1*-fuusiogeenin muodostuminen (National Cancer Institute n.d., muokattu)

Fuusiogeneeni voi syntyä eri keinoin. *BCR*- ja *ABL1*-geenien tulee katketa sellaisissa kohdissa, joissa yhdistyminen on mahdollista (Fimlab Laboratoriot Oy 2017). *BCR-ABL1:n* koodaamat fuusiogeenit vaihtelevat kooltaan riippuen *BCR*-geenin katkaisukohtasta, mutta niille kaikille on yhteistä korkea tyrosiinikinaasiaktiivisuus, joka on osittain syynä leukemiasolujen syntyyn. Näitä katkaisukohtia ovat muun muassa major (M-BCR), minor (m-BCR) sekä mikro (μ -BCR). Yleisin katkaisukohta on M-BCR, joka havaitaan yli 95 prosentilla KML-potilaista. (Bilan ym. 2004; Matsumura 2016, 31.) Tyypillinen *BCR-*

geenin katkaisukohta sijoittuu eksonien 12–16 välille, joka tunnetaan M-BCR-alueena. Tämä katkaisukohdan irrottama osa puolestaan liittyy *ABL1*-geenin eksoniin a2, josta syntyvät *BCR-ABL1*-fuusiogeenin mRNA-transkriptit e13a2 ja e14a2. (Clark ym. 2009.) Nämä koodaavat proteiinia p210, joka saa aikaan tyrosiinikinaasin korkean aktiivisuuden (Qiagen 2014).

3 TAUDIN VAIHEET JA OIREET

Maailman terveysjärjestö (WHO) luokittelee KML:n kolmeen eri vaiheeseen. Tavallisesti krooninen myeloinen leukemia todetaan taudin kroonisessa vaiheessa. Potilas on usein oireeton ja tauti löydetään sattumalta epätavallisten veriarvojen jatkotutkimuksissa. Hoidattomana tauti voi edetä akseleraation (kiihtynyt vaihe) kautta blastikriisiin. (Koskela, Koskenvesa, Mustjoki & Porkka 2012; Hughes ym. 2014, 9.) Taulukossa 1 sivulla 13 esitetään KML:n vaiheet siten kuin maailman terveysjärjestö WHO määrittelee ne.

3.1 Krooninen vaihe

Kroonisessa vaiheessa tauti voi olla oireeton tai potilaalla esiintyy hypermetaboliaan liittyviä oireita, kuten väsymystä, hikoilua, laihtumista ja anemiaa. Lisäksi osalla potilaista saattaa esiintyä pernan suurenemista. (Vardiman, Melo, Baccarani & Thiele 2008, 32; Mustjoki & Koistinen 2015, 304.) Taudin kroonisessa vaiheessa verenkuvassa on tyypillisesti nähtävissä leukosytoosia. Erityisesti neutrofiilit ja myelosyytit ovat koholla, mutta myös eosinofiilien ja basofiilien määrä on normaalia verenkuvaa korkeampi. (Hughes ym. 2014, 9.) Usein trombosyyttiarvot kohoavat tai laskevat riippuen taudin tasosta. Lisäksi kroonisessa vaiheessa luuytimen tai veren epäkypsien solujen eli blastien määrä jää alle kymmeneen prosenttiin. (Leukemia & Lymphoma society 2014, 10–14.) Hyvin suurten leukosyyttimäärien yhteydessä voi esiintyä myös priapismia tai pernainfarkti. Joskus KML:aa sairastava voi kärsiä luustokivuista tai laajentuneen pernan vuoksi ylävatsakivuista. (Mustjoki & Koistinen 2015, 304.)

Huolimatta hallitsevasta neutrofiilisesta leukosytoosista ja trombosytoosista, KML:lle ominainen translokaatio t(9;22) tapahtuu pluripotenteissa hematologisissa kantasoluissa, ja sen vuoksi sitä esiintyy melkein kaikissa solulinjoissa. Kroonisessa vaiheessa tapahtuu huomattavasti myelooisten kantasolujen lisääntymistä. Näillä soluilla on lähes täydellinen kyky erilaistua, kypsyä ja toimia normaalisti. Taudin edetessä sytogeneettisten ja geneettisten poikkeavuuksien vuoksi solujen erilaistumiskyky häiriintyy. Sen seurauksena syntyy enemmän epäkypsiä blasteja kuin lopullisesti erilaistuneita leukosyyttejä. (Hughes ym. 2014, 7.)

3.2 Akseleraatiovaihe

Akseleraatiovaihe seuraa kroonista vaihetta ja on luonteeltaan aggressiivisempi. Noin 5–10 prosenttia potilaista on akseleraatiovaiheessa diagnoosin saadessaan. (Kalaycio & Mukherjee 2016.) KML:n hoidon ja ennusteen kannalta taudin vaiheesta toiseen etenemisen tunnistaminen on tärkeää (Koskela ym. 2012). Akseleraatiovaihe määritellään kliinisten löydösten, morfologian ja perifeerisen veren poikkeavuuksien avulla. Eri järjestöt, kuten WHO ja European LeukemiaNet (ELN) käyttävät erilaisia luokitusjärjestelmiä akseleraatiovaiheen määrittämiseksi. WHO:n mukaan akseleraatiovaiheessa blastien määrä veressä tai luuytimessä on 10–19 prosenttia ja trombosyyttien määrä veressä on alle $100 \times 10^9/l$ tai yli $1000 \times 10^9/l$. Osa järjestöistä määrittelee akseleraatiovaiheen vaihtuvan blastikriisiksi blastien määrän noustessa yli 20 prosentin, kun taas toiset käyttävät 30 prosenttia rajana. (Kalaycio & Mukherjee 2016.)

3.3 Blastikriisi

Tyrosiinikinaasi-inhibiittorihoidolla (TKI) näyttää olevan mahdollista estää KML:n eteneminen blastikriisiin (Hehlmann, Saußele & Silver 2016, 153). Ennen tehokkaiden lääkehoitojen kehittämistä tauti eteni viimeiseen vaiheeseensa keskimäärin 4–5 vuodessa diagnoosin saamisesta (Koskela ym. 2012). Blastikriisin ennuste on tavallisesti huono, ja kromosomaalisilla poikkeavuuksilla on suuri vaikutus taudin patogeneesiin (Kunitomi ym. 2015). Blastikriisiin ei toistaiseksi ole tehokasta hoitoa, mutta joskus kemoterapian jälkeen tauti saattaa palata krooniseen vaiheeseen, jolloin allogeeninen kantasolusiirto tarjoaa mahdollisen hoitomuodon pienelle osalle potilaista. Tärkeintä onkin pyrkiä estämään KML:n eteneminen blastikriisiin huolellisella hoidon seurannalla sekä tarvittaessa lääkityksen tehostamisella, mikäli jäännöstaudin tavoitehoitovasteita ei saavuteta tietyssä ajassa. (Hehlmann ym. 2016, 147.)

Blastikriisissä veren tai luuytimen soluista vähintään 20 prosenttia on blasteja ja lisäksi elimistössä voi esiintyä kloroomia eli paikallisia blastikertymiä (Koskela ym. 2012). Tällaisia kertymiä voi muodostua minne tahansa elimistössä, mutta useimmiten niitä todetaan ihossa, imusolmukkeissa, pernassa, luissa ja keskushermostossa (Vardiman ym. 2008, 34–35). Noin 70 prosentissa tapauksista blastit edustavat myelooista linjaa, johon voi kuulua neutrofiilisiä, eosinofiilisiä, basofiilisiä, monosyyttisiä ja megakaryosyyttisiä

blasteja sekä erythroblasteja – tai mitä tahansa näiden yhdistelmiä. Lymfoblasteja tavataan noin 20–30 prosentissa tapauksista. Toisinaan blastikriisissä blastien solulinja voi olla selkeästi erotettavissa morfologisesti, mutta usein tunnistamiseen tarvitaan ja on suositeltavaa käyttää sytokemiallista analyysia sekä immunofenotyyppitystä. Vaikka luuydinbiopsia muuten viittaisi krooniseen vaiheeseen, merkittävät blastikertymät luuytimessä antavat aihetta epäillä taudin edenneen blastikriisiin. Tällaiset kertymät voidaan erottaa immunohistokemiallisesti krooniselle vaiheelle tyypillisistä promyelosyytti- ja myelosyyttipesäkkeistä. (Vardiman ym. 2008, 34.)

TAULUKKO 1. KML:n vaiheet WHO:n määritelmän mukaan (Vardiman ym. 2008, 33–35; Mustjoki & Koistinen 2015, 306)

Vaihe	Määritelmä
Krooninen vaihe	Blastien määrä veressä ja luuytimessä < 10 %
Akseleraatiovaihe	Blastien määrä veressä ja/tai luuytimessä 10–19 %
Yksi tai useampi seuraavista:	Veren basofilia ≥ 20 %
	B-tromb $< 100 \times 10^9/l$ tai $> 1000 \times 10^9/l$
	Hoitoresistentti leukosytoosi ja splenomegalia
	Klonaalisen evoluution merkit kromosomitutkimuksessa (lisämuutokset)
Blastikriisi	Blastien määrä veressä ja/tai luuytimessä $\geq 20\%$
Yksi tai useampi seuraavista:	Luuytimessä laajoja blastisaarekkeita (biopsia)
	Ekstramedullaarinen blastikertymä

4 DIAGNOOSI JA TUTKIMUKSET

Epäily kroonisesta myeloisesta leukemiasta herää tavallisesti verenkuvassa havaitun leukosytoosin vuoksi. Tarkentavana tutkimuksena perusterveydenhuollossa tehdään valkosolujen erittelylaskenta, jossa ilmenevä neutrofiilivaltaisuus ja vasemmalle siirtymä granulopoieesin varhaismuotoina viittaavat KML:aan. Tällöin potilas ohjataan hematologian yksikköön jatkotutkimuksiin. Jos potilaalla on oireita, tulee hänet lähettää päivystyksellisesti sairaalaan. (Suomen hematologiyhdistys ry 2017.)

Diagnoosin varmentamiseksi ja taudin vaiheen selvittämiseksi tarvitaan useita eri tutkimuksia. Jotkin hematologiset sairaudet tai reaktiiviset tautitilat saattavat muistuttaa KML:aa, mutta useimmissa tapauksissa diagnosointi on yksinkertaista tyypillisen verenkuvan ja täydentävien sytogeneettisten tai molekulaaristen tutkimusten perusteella. (Hughes ym. 2014, 9, 15.) Taulukossa 2 esitetään tavallisimmat menetelmät, joita käytetään KML:n jäännöstaadin osoittamiseen ja seurantaan.

TAULUKKO 2. Menetelmät KML:n jäännöstaadin osoittamiseksi (Mustjoki & Koistinen 2015; Radich & Egan 2016)

Menetelmä	Kohde	Sensitiivisyys	Edut	Haitat
Sytogeneetiikka	t(9;22)	1–5 %	Mahdollistaa myös muiden kromosomaalisten muutosten havainnoinnin	Vaatii jakaantuvia soluja, joten yleensä onnistuu vain luuytimestä tehtynä
FISH	<i>BCR-ABL1</i> DNA:sta	0,1–5 %	Voidaan tehdä perifeerisestä verestä tai luuytimestä	Epäsensitiivisempi kuin PCR
PCR	<i>BCR-ABL1</i> mRNA:sta	0,001–0,01 %	Tehdään perifeerisestä verestä tai luuytimestä, hyvin sensitiivinen	Ei ole standardisoitu luotettavasti eri laboratorioiden välillä

Yleensä taudin määrittämiseen käytetään PCR-tutkimusta, joka osoittaa luuytimen tai veren *BCR-ABL1*-fuusiogeenin mittaamalla sen tuottaman transkriptin määrää. Tämä tutkimus on herkin menetelmä fuusiogeenin olemassaolon osoittamiseksi. (Mustjoki & Koistinen 2015, 305–306.) PCR-tutkimuksella selvitetään myös potilaan fuusiotranskriptityyppi, ja diagnoosivaiheen tulosta käytetään jäännöstaudin määrän seuraamiseen hoidon aikana. *BCR-ABL1*-fuusioproteiini on mahdollista havaita diagnoosivaiheessa myös virtausytometrisellä tutkimuksella, mutta se ei ole menetelmänä riittävän herkkä jäännöstaudin seurantaan. (Koskela ym. 2012.)

Diagnoosin tukena käytetään lisäksi sytogeneettistä luuytimen kromosomitutkimusta eli G-raitatutkimusta Ph-kromosomin osoittamiseksi. Fluoresenssi in situ -hybridisaatiolla (FISH) osoitetaan *BCR-ABL1*-fuusiogeenin olemassaolo DNA:sta, kun taas perifeerisestä verestä tehtävällä PCR-tutkimuksella *BCR-ABL1*-fuusiogeenin määrää voidaan mitata mRNA:sta. Diagnoosivaiheessa kaikilta potilailta tulisi ottaa luuytimen aspiraatti- ja biopsianäytteet taudin vaiheen määrittämiseksi. Aspiraattinäytteestä voidaan seuloa myös muita mahdollisia kromosomaalisia muutoksia, jotka viittaavat akseleraatiovaiheeseen. (Radich & Egan 2016, 55.)

4.1 PCR-menetelmät

Polymeraasiketjureaktion eli PCR-tutkimuksen avulla voidaan osoittaa veri- tai luuydinäytteestä tietty DNA- tai RNA-jakso monistamalla sitä eksponentiaalisesti. KML:n tapauksessa lähtömateriaalina toimii RNA, joten siitä täytyy ennen muita reaktioita valmistaa komplementaarista DNA:ta käänteiskopioijaensyymien avulla. Lisäksi tutkimukseen tarvitaan alukkeina toimivia synteettisiä nukleinihappojaksoja, jotka tunnistavat templaatti-DNA:sta niiden vastinemäsjärjestyksen omaavat alueet. Perinteisellä PCR-tekniikalla lopputuotteita voidaan tarkastella vasta reaktion päätyttyä ja reaktion tulkinta on siten kvalitatiivista, kun taas kvantitatiivisessa reaaliaikaisessa PCR-tutkimuksessa (RT-qPCR) fluoresoiva väri on reaktiossa mukana, ja fluoresenssia voidaan mitata jo itse reaktion aikana. (Hughes ym. 2014; Autio ja Kairisto 2015, 117.) RT-qPCR:llä monistetaan *BCR*- ja *ABL1*-geenien liitosta ympäröivää aluetta, jolloin saadaan selville fuusiogeenin määrä näytteessä. Tulos ilmaistaan suhteuttamalla *BCR-ABL1*:n määrä sen kontrolligeeniin. (Hughes ym. 2014, 23; Jabbour & Kantarjian 2016.)

KML-diagnoosin perustana on *BCR-ABL1*-fuusiogeenin osoittaminen verestä tai luuytimestä. Taudille ominainen tutkimus on kvantitatiivinen *BCR-ABL1*-fuusiogeenin määrittäminen, jota käytetään sekä diagnoosivaiheessa että jäännöstaudin seurannassa. (Suomen hematologiyhdistys ry 2017.) Tutkimus sopii Major-tyypin transkriptin mittaamiseen ja sitä voidaan käyttää myös jäännöstaudin seurannassa niillä potilailla, joilla on diagnoosivaiheessa todettu Major-tyypin b2a2- tai b3a2-fuusiotranskripti (Fimlab Laboratoriot Oy 2017). Muita harvinaisempia transkriptimuotoja epäiltäessä käytetään fuusiogeeniseulontaa (Suomen hematologiyhdistys ry 2017). Tavallisesti PCR- ja kromosomitutkimusten tulosten välinen ristiriita tuo esiin epäilyn poikkeavasta transkriptimuodosta (Autio & Kairisto 2015). Diagnoosivaiheessa myös kvalitatiivisella PCR-tutkimuksella voidaan todeta *BCR-ABL1*-fuusiogeenin olemassaolo, mutta jäännöstaudin seurantaan se ei sovellu (Jabbour & Kantarjian 2016).

PCR-tutkimus voidaan tehdä sekä perifeerisestä verestä että luuydinnäytteestä. Seuranta-näytteiden tulee kuitenkin edustaa samaa näytetyyppiä ja tämän vuoksi suositellaan helpommin saatavissa olevaa verinäytettä. Näytteeksi tarvitaan verta 18 millilitraa ja luuydintä 2–4 millilitraa EDTA-putkessa. Näyte suositellaan otettavaksi maanantaina tai tiistaina, koska se ei säily 24 tuntia kauemmin, vaan on toimitettava tässä ajassa genetiikan laboratorioon. Näytteen kuljetus tapahtuu huoneenlämmössä, ja tulos vastataan 2 viikon kuluessa. (Fimlab Laboratoriot Oy 2017.)

Fimlab Laboratoriot Oy:n genetiikan laboratorio käyttää tutkimuksessa PCR-tekniikkaan perustuvaa ipsogen® *BCR-ABL1* Mbcf RGQ RT-PCR Kit -menetelmää. Kyseessä on kvantitatiivinen määrittäminen, jossa käytetään kontrollina *ABL1*-geeniä ja mitataan *BCR-ABL1*-fuusiogeenin tuottaman lähetti-RNA:n määrää. Menetelmässä käytettävän plasmidistandardin tunnetun kopiokokumäärän avulla pystytään selvittämään fuusiotranskriptin tarkka määrä näytteessä. Vastaus saadaan muutettua kansainvälisesti vertailukelpoiseen muotoon kittikohtaisella IS-kalibraattoriarvolla. (Fimlab Laboratoriot Oy 2017.)

4.2 G-raitavärjäys

Diagnoosia täydennetään luuytimestä ja verestä tehtävillä sytogeneettisillä tutkimuksilla eli kromosomitutkimuksilla, jotka perustuvat solujen mikroskopiaan ja kuvantamiseen niiden ollessa jakaantumisvaiheessa. Solun jakaantuessa kromosomit järjestäytyvät ja ne

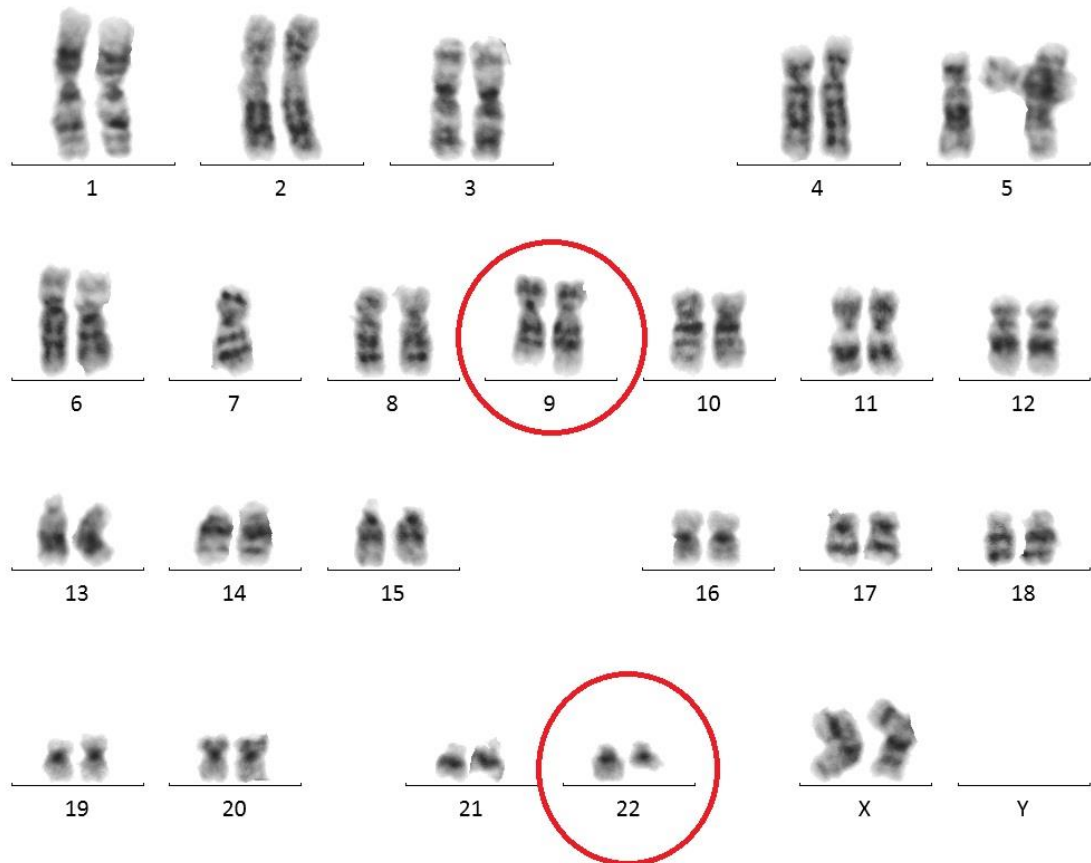
voidaan tunnistaa erityisvärjätystä valmisteesta. (Autio & Kairisto 2015, 101.) G-raita- eli giemsaraitavärjäys on perinteinen sytogenetiikan menetelmä, joka mahdollistaa kromosomien lukumääräisten muutosten tutkimisen, ja jonka avulla voidaan osoittaa KML:lle tyypillisen Ph-kromosomin olemassaolo (Autio & Kairisto 2015, 104; Suomen hematologiyhdistys ry 2017).

Kromosomitutkimusta varten tarvitaan jakautuvia soluja, joten veri- tai luuydinsoluja viljellään ensin ravintoliuoksessa muutaman vuorokauden ajan. Metafaasivaiheessa DNA on replikoitunut ja kromosomit ovat selvimmän näkyvissä. (Autio & Kairisto 2015, 110; Gisselsson 2015, 12.) Mitoosien ollessa runsaimmillaan solunjakautuminen pysäytetään lisäämällä viljelmään kolkisiinia, joka tuhoaa kromosomien sukkularihmat. Hypotonista kaliumkloridiliuosta käytetään sytoplasman ja solukalvon poistamiseen, minkä jälkeen solut fiksoidaan jääetikka-metanoliseoksella ja ne pestään useamman kerran. Hypotonian ja fiksoinnin ansiosta ainoastaan tumat ja kromosomit jäävät näkyviin analyysia varten. (Autio & Kairisto 2015, 110.)

Kromosomivalmiste tehdään pipetoimalla fiksaatiivissa olevaa solususpensiota objektilasille, johon mitoottiset solut muodostavat niin sanottuja metafaasilevyjä. G-raidoitus saadaan aikaan, kun huoneenlämmössä kuivatut lasit käsitellään trypsiinillä ja värjätään giemsavärillä. Värjäyksessä syntyy kullekin kromosomille ominaiset raidoitukset. Vaaleat raidat ovat GC-rikasta eukromatiinia, jossa sijaitsee aktiivisia geenejä ja tummat raidat puolestaan ovat AT-rikasta heterokromatiinia, jossa geenejä on vähemmän. Raidoituksen ansiosta kromosomit pystytään tunnistamaan ja se antaa yleiskuvan solun suuremmista geneettisistä muutoksista. (Autio & Kairisto 2015, 109–111.)

Diagnoosivaiheessa kromosomivalmisteiden analysoinnissa pyritään toteamaan mahdollinen klonaalinen kromosomipoikkeavuus. Useiden solunjakautumisten kautta muodostunut syöpäkudos on monoklonaalista, kun se on lähtöisin yhdestä pahanlaatuisesta solusta. Tällöin kaikki syöpäkudoksen solut ovat keskenään samanlaisia ja myös mahdollinen solussa syntynyt kromosomimuutos esiintyy kaikissa soluissa klonaalisen poikkeavuutena. G-raitatutkimuksessa analysoidaan 20 metafaasivaiheen solua ja kunkin solun kromosomit lasketaan. Kromosomien tai kromosomiparien tunnistus tehdään kullekin kromosomille tyypillisen raidoituskuvion perusteella. Näistä 20 analysoidusta solusta ainakin kahdessa tulee olla rakenteellinen kromosomipoikkeavuus (esimerkiksi translokatio) tai sama ylimääräinen kromosomi, jotta muutos määritellään klonaaliseksi. Järjestetty

kromosomisto eli karyotyyppe saadaan asettelemalla kromosomit pareittain, minkä jälkeen kromosomivalmisteet tutkitaan valomikroskoopilla käyttäen noin tuhatkertaista suurennotta. Tietokoneavusteinen kuvankäsittely toimii apuna poikkeavuuksien tunnistamisessa. (Autio & Kairisto 2015, 110–111.) Kuvassa 2 on esimerkki KML-potilaan karyotyypistä, jossa on nähtävissä translokaatio kromosomien 9 ja 22 välillä.



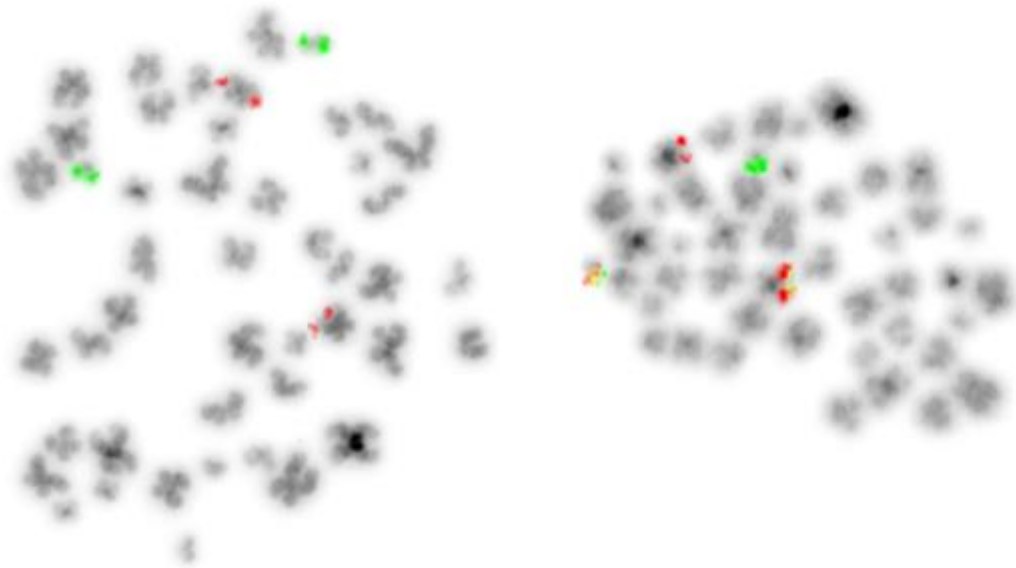
KUVA 2. G-raitavärjäys, jossa nähdään translokaatio kromosomien 9 ja 22 välillä. Kyseinen karyotyyppe on 46,XX,t(9;22)(q34;q11) (Karhu 2018)

4.3 Fluoresenssimenetelmät

FISH eli Fluoresenssi in situ -hybridisaatio on menetelmä, jota käytetään, kun G-raitatutkimuksessa havaittuja poikkeamia halutaan tutkia tarkemmin ja jonka avulla voidaan osoittaa *BCR-ABLI*-fuusiogeenin olemassaolo DNA:sta. (Radich & Egan 2016, 55.) Tutkimuksessa käytetään apuna tunnetuista DNA-jaksoista koostuvia hybridisaatiokoetti-

mia, joissa yleensä on liitettyä fluoroitavaa molekyyliä. Koettimen spesifinen kiinnittyminen DNA-vastinjuosteeseen on nähtävissä fluoresenssimikroskoopilla. (Autio & Kairisto 2015, 101.) Jotta DNA-jaksoista koostuva hybridisaatiokoetin voi sitoutua näytteen DNA-vastinjuosteeseen, tulee DNA ensin denaturoida eli tehdä yksijuosteiseksi. FISH-tutkimus on aina kohdennettu tutkimus eli sitä tehtäessä on tiedossa, mitä poikkeavuutta solusta haetaan tai vähintään mikä on kohteena oleva kromosomi tai kromosomialue. Näin osataan valita tarkoituksenmukainen koetin tutkimukseen. (Autio & Kairisto 2015, 114.)

Lokusspesifiseksi koettimeksi kutsutaan koetinta, joka tunnistaa geenin tai pienen kromosomialueen. Useimmiten käytettävät lokusspesifiset koettimet ovat kaksivärisiä ja ne tunnistavat jonkin tietyn poikkeavuuden, kuten translokaation, deleetion tai pienelle alueelle sijoittuvan muutoksen. KML:n tapauksessa taudille tyypillinen 9;22-translokaatio osoitetaan juuri kaksiväri-FISH-menetelmän avulla (kuva 3). (Autio & Kairisto 2015, 114.)



KUVA 3. KML-potilaan translokaation osoittaminen FISH-menetelmällä. *BCR-ABL1*:n translokaatio näkyy kahtena fuusiosignaalinä, punaisena ja vihreänä. Kuvassa vasemalla on normaali mitoottinen solu ja oikealla translokaatiota ilmentävä mitoottinen solu (Karhu 2018)

4.4 Immunofenotyyppitys

Immunofenotyyppitys on menetelmä, jolla määritetään solujen ilmentämien antigeenien perusteella solujen erilaistumislinja ja -aste (Siitonen & Penttilä 2015, 140). Immunofenotyyppitys ei ole välttämätön KML:n diagnosoimiseksi sen kroonisessa tai akseleratiovaiheessa, mutta blastikriisissä siitä on hyötyä leukemialinjan varmistamiseksi. Suuressa osassa eli noin 2/3 tapauksista tauti edustaa myelooista linjaa ja noin 1/3 tapauksista kyseessä on B-lymfaattinen linja. Myös sekamuotoista ja T-lymfaattista linjaa esiintyy, mutta nämä tapaukset ovat harvinaisempia. (Hughes ym. 2014, 12.)

5 HOITO

KML:n hoito on kehittynyt kemoterapiasta alfa-interferoniin (INF α) ja myöhemmin tyrosiinikinaasiestäjiin (TKI) (Talpez ym. 2013). INF α pidensi keskimääräistä elossaoloaika 4–5 vuodella. Kuitenkin suurimmalla osalla potilaista tauti johti akseleraatiovaiheeseen ja myöhemmin blastikriisiin. Nykyään oletuksena on, että uusilla KML-potilailla tyrosiinikinaasi-inhibiittorit saavat aikaan pidempiaikaisen taudin hallinnan ja osa potilaista saavuttaa remission ilman jatkuvaa hoitoa. (Hughes ym. 2014, 35.) TKI:lla hoidetut potilaat voivat saavuttaa täydellisen sytogeneettisen vasteen ja pitkäaikaisen elossaoloajan (overall survival, OS). Elossaoloajan pidentyminen ja lääkkeen hyvä sietokyky ovat johtaneet TKI:n käyttöönottoon ensisijaisena hoitomuotona. (Fava, Rege-Cambrin, Dogliotti & Saglio 2016, 41.)

Ensimmäisen sukupolven TKI:a, imatinibia, suositellaan ensisijaiseksi hoitomuodoksi (Schmidt 2016.) Noin kolmasosa KML-potilaista ei kuitenkaan saavuta optimaalista vastetta imatinib-hoidon avulla, minkä vuoksi he kohtaavat tilastollisesti huomattavasti korkeampia riskejä liittyen oireettomaan elinaikaan (event-free survival, EFS), taudittomaan elinaikaan (progression-free survival, PFS) sekä elossaoloaikaan. (Fava ym. 2016, 43.) Potilailla, joilla ilmenee resistenssi tai intoleranssi imatinibia kohtaan, voivat käyttää hoitona toisen sukupolven TKI:ita, nilotinibia, dasatinibia, tai kolmannen sukupolven TKI:a, ponatibia. (Harbaum ym. 2014; Schmidt 2016; Winer & DeAngelo 2018.) Jos potilas ei saavuta hoidon aikana tavoitteellisia vasteita tai menettää aiemmin saavutetun vasteen, toisen TKI:n käyttöönotto on perusteltua (Schmidt 2016). Vasteen syvyys ja sen saavuttamiseen mennyt aika TKI-hoidon aloittamisen jälkeen ovat merkittävä ennuste taudin kululle. Potilailla, joiden kohdalla imatinib tehoaa paremmin ja jotka saavuttavat ja ylläpitävät täydellisen sytogeneettisen vasteen vähintään kahden vuoden ajan, elossaoloaika on samankaltaista kuin terveellä väestöllä. Puolestaan potilailla, jotka eivät saavuta hyvää sytogeneettistä tai molekulaarista vastetta imatinibin avulla tai vasteen saavuttaminen viivästyy, on suurentunut riski relapsiin, taudin progressioon ja kuolemaan. (Harbaum ym. 2014; Fava ym. 2016, 41–42.) Myös hoidon keskeyttäminen voi vaikuttaa negatiivisesti taudin kehitykseen etenkin ensimmäisten kuukausien aikana lääkehoidon aloittamisesta (Harbaum ym. 2014).

Tyrosiinikinaasi-inhibiittoreiden käyttöönoton jälkeen allogeenistä kantasolusiirtoa tarvitsevien potilaiden määrä on vähentynyt. Kuitenkin osa potilaista tulee resistentiksi monelle TKI:lle ja näin ollen tarvitsee kantasolusiirtoa. Se on erityisesti tärkeämmässä roolissa potilailla, joiden tauti kehittyy akseleraatiovaiheeseen tai blastikriisiin, sillä kantasolusiirto on ainoa parantava hoito näille vaiheille. Siirron mahdollisuus tulee ottaa myös huomioon kroonisessa vaiheessa oleville potilaille, jos vähintään kahdesta eri TKI-lääkityksestä huolimatta hoito on epäonnistunut. (Jabbour & Kantarjian 2016.)

6 JÄÄNNÖSTAUDIN SEURANTA JA TAVOITEVASTEET

Jäännöstaudilla (MRD) tarkoitetaan pahanlaatuisten verisolujen määrää potilaan elimistössä hoidon aikana tai hoidon jälkeen, kun potilas on oireeton. Potilaat reagoivat hoitoon vaihtelevasti; toisilla tauti etenee hoidosta huolimatta, toisilla puolestaan hoito tehoaa paremmin, jolloin jäännöstaudin määrä elimistössä vähenee. (Roche n.d.) Nykytietämyksen mukaan tyrosiinikinaasi-inhibiittori-lääkitys (TKI) ei siis ole täysin parantava hoito KML:aan. Osa potilaista pystyy lopettamaan lääkityksen, mutta tämä on mahdollista vain silloin, kun on saavutettu täydellinen molekulaarinen vaste, joka on ylläpidetty vähintään kaksi vuotta. (Koskela ym. 2012.) Suurella osalla potilaista tauti kuitenkin uusiutuu TKI-lääkityksen lopettamisen jälkeen. Vaikka potilas olisi ollut lääkityksellä jo yli viisi vuotta eikä hänellä olisi todettu lääkkeelle resistenttejä *ABL1*-geenin mutaatioita, usein jäännöstauti pystytään silti osoittamaan erittäin herkällä PCR-menetelmällä. (Iwasaki & Akashi 2016, 6.)

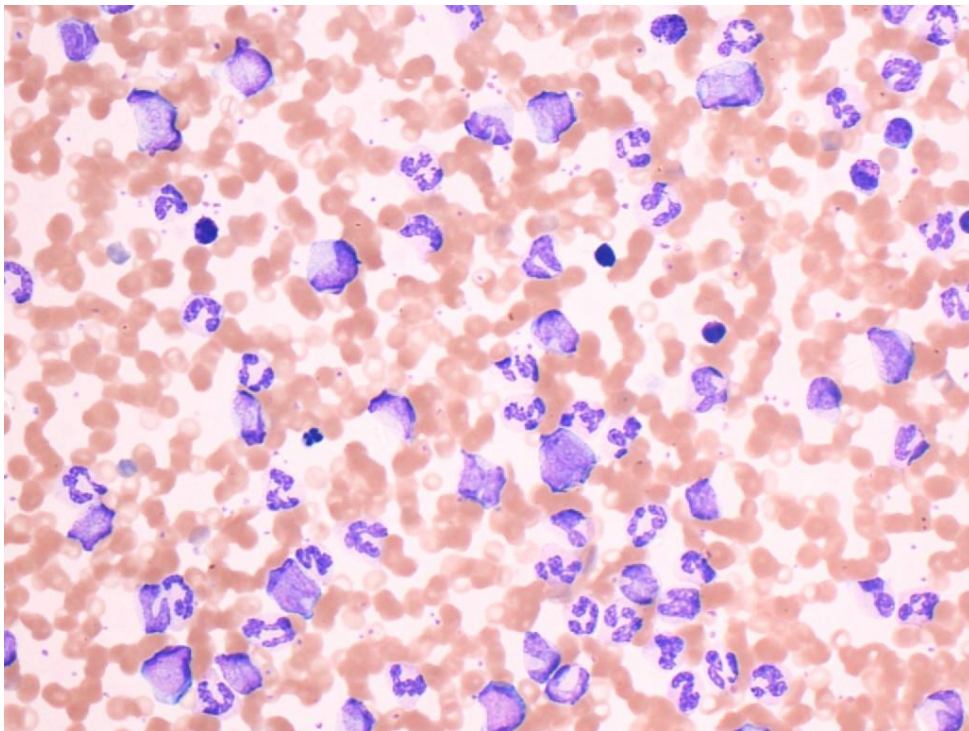
KML-potilaiden tyrosiinikinaasi-inhibiittorihoidon tavoitteena on saavuttaa ideaalinen hematologinen, sytogeneettinen ja molekulaarinen vaste tiettyjen virstanpylväiden kuluttua hoidon aloittamisesta. Nämä virstanpylväät sijoittuvat kolmen, kuuden ja 12 kuukauden päähän. Saavutettu vaste tulisi ylläpitää koko hoidon ajan. KML-potilaiden ennusteesta kertoo se, kuinka nopeasti vasteet saavutetaan TKI-hoidon aloituksesta. (Haznedaroglu 2014.) Huolellinen hoitovasteen seuranta on tärkeää, jotta potilas voi saavuttaa sairauden pitkäaikaisen hallinnan. KML:n hoidon tavoitteena on saada perifeerisen veren solut normaalille tasolle, sekä vähentää Ph-kromosomin määrää ja saada se häviämään kokonaan. *BCR-ABL1*-geeniekspression hävittäminen on lisäksi yksi hoidon tavoitteista. Säännöllisen hoidon seurannalla voidaan tunnistaa riskit hoidon epäonnistumisessa. (Hughes ym. 2014, 21–22.)

Vasteet voidaan luokitella optimaaliseen vasteeseen (optimal) sekä epäonnistuneeseen vasteeseen (failure). Optimaalinen vaste kuvastaa, että samaa hoitomuotoa jatkamalla saadaan parempi lopputulos. Epäonnistuneella vasteella tarkoitetaan hoitomuodon huonoa ennustetta, jolloin hoitoa tulisi muuttaa. Optimaalisen ja epäonnistuneen vasteen väliin jää niin kutsuttu varoitusalue (warning), jota tulee valvoa huolellisesti ja huomioida, että potilaalle voi sopia paremmin toinen hoitomuoto. (Baccarani ym. 2012.)

6.1 Hematologinen vaste

Ensimmäinen vasteen merkki on hematologisen remission havaitseminen, kun TKI-hoito on aloitettu. Tämä kuvastaa perifeerisen veren solumäärän normalisoitumista. (Radich & Egan 2016, 56.) Etenkin valkosolujen määrä normalisoituu, eikä veressä havaita varhaisia soluja, kuten blasteja, promyelosyyttejä, myelosyyttejä tai metamyelosyyttejä. Lisäksi hematologisen vasteen (CHR) saavuttamisen myötä taudin oireet häviävät. (Hughes ym. 2014, 22.) Vasteen saavutettua leukosyyttien määrä tulisi olla alle $10 \times 10^9/L$ sekä verihiutaleiden määrän alle $450 \times 10^9/L$. Lisäksi pernan koko normalisoituu. (Radich & Egan 2016, 59.)

Hematologinen vaste tulisi saavuttaa kolmen kuukauden aikana hoidon aloittamisesta. Lähes kaikki KML-potilaat saavuttavat CHR:n, ja se tulisi ylläpitää koko hoidon ajan. (Haznedaroglu 2014.) Hematologisen vasteen puuttuminen tekee sytogeneettisen ja molekulaarisen vasteen saavuttamisen mahdottomaksi ja näin ollen vaatii välitöntä muutosta hoitoon. (Radich & Egan 2016, 59.) Kuvassa 4 on KML-potilaan verenkuvaa ennen hematologisen vasteen saavuttamista. Siinä näkyy taudille tyypillistä leukosytoosia sekä erityisesti neutrofiilejä ja niiden nuoruusmuotoja myelosyyttejä.



KUVA 4. KML-potilaan verenkuvaa (Ruonioja 2018)

6.2 Sytogeneettinen vaste

Kun CHR on saavutettu, seuraavana hoidon tehon ennustavana tekijänä on sytogeneettinen Ph-metafaasien, eli Ph-kromosomia sisältävien solujen, seuranta (Radich & Egan 2016, 59). Hoidon aikaansaama sytogeneettinen vaste ilmenee veren lisäksi myös luuytimessä. Sytogeneettisellä vasteella tarkoitetaan yleisesti kaikkien Ph-kromosomin sisältävien solujen osuutta luuytimessä. (The national CML society n.d) Sytogeneettinen vaste määritellään eri asteiden avulla: ei vastetta, erittäin vähäinen (minimal), vähäinen (minor), osittainen (partial) sekä täydellinen (complete) vaste. Kun vastetta ei ole, metafaasien osuus luuytimessä on yli 95 prosenttia, erittäin vähäisessä vasteessa osuus on 66–95 prosenttia, vähäisessä 36–65 prosenttia, osittaisessa vasteessa 1–35 prosenttia sekä täydellisessä vasteessa alle yksi prosenttia. (Abruzzese ym. 2009.)

Täydellinen sytogeneettinen vaste (CCyR) tulisi saavuttaa ensimmäisen vuoden aikana TKI-hoidon aloituksesta ja ihanteellisin vasteen saavutusaika olisi puolen vuoden sisällä hoidon aloituksesta. Yli puolet potilaista saavuttaa täydellisen vasteen TKI-hoidon aikana ja se tulisi ylläpitää KML:n pitkäaikaisen hoidon ajan, sillä se estää huomattavasti taudin etenemistä. (Haznedaroglu 2014.) Taulukossa 3 on esitetty Ph-metafaasien osuus luuytimessä kunkin sytogeneettisen vasteen tasoon nähden.

TAULUKKO 3. Sytogeneettisen vasteen jaottelu (Baccarani ym. 2012, muokattu)

Sytogeneettinen vaste (Cytogenetic response, CyR)	Ph-metafaasien osuus luuytimessä
Ei vastetta	> 95 %
Minimal CyR	66–95 %
Minor CyR	36–65 %
Partial CyR	1–35 %
Complete CyR eli täydellinen vaste	< 1 %

6.3 Molekulaarinen vaste

Molekulaarisen vasteen seuranta antaa tärkeää tietoa yksittäisen KML-potilaan hoidon ennusteesta, ja kansainväliset hoitosuositukset sisältävät ajasta riippuvaisen molekulaari-

sen virstanpylvään, joka auttaa määrittämään tehoaako hoito potilaaseen. Molekulaarisen vasteen mittaustulokset saadaan RT-qPCR:n avulla arvioimalla BCR-ABL1-transkriptin määrää suhteessa sisäiseen kontrolligeeniin, joka on yleensä *ABL1*, *GUSB* tai *BCR*. Mittaustulokset ilmaistaan kansainvälisen asteikon IS-prosentin mukaan, jossa 100 % BCR-ABL^{IS} vastaa International Randomized Study of Interferon and STI571 (IRIS) -tutkimuksen standardisoitua lähtökohtaa. 0,1 % BCR-ABL^{IS} vastaa puolestaan major molekulaarista vastetta (MMR). MMR:a voidaan kutsua myös MR³:ksi, joka kuvaa 3-log alenemaa standardisoidusta lähtökohdasta. (Cross ym. 2015.) Taulukossa 4 sivulla 27 on esitetty kontrollitranskriptien ja BCR-ABL1-transkriptin määrää, jotka vastaavat näitä logaritmin alenemia. MMR tulisi saavuttaa viimeistään 18 kuukauden aikana TKI-hoitajaksolla ja se tulisi ylläpitää koko KML-hoidon ajan. MMR:n saavuttaminen on merkittävä hidaste taudin etenemiselle. Noin 18–58 prosenttia potilaista saavuttaa MMR:n TKI-hoitajaksolla. Jos MMR:a ei saavuteta 18 kuukauden aikana, sairauden suunta voi muuttua huonommaksi. (Haznedaroglu 2014.)

Kansainvälisen International Scale -asteikon (IS) mukaan aikainen molekulaarinen vaste saavutetaan, kun BCR-ABL1-transkriptin määrä laskee alle kymmenen prosentin. BCR-ABL1-transkriptin tasot kolmen, kuuden ja 12 kuukauden aikana ennustavat vahvasti potilaan tauditonta elinaikaa, elossaoloaikaa sekä oireetonta aikaa. (Harrington, Kizilors & de Lavalde 2017.) IS:n mukaan BCR-ABL1-transkriptit tulee ilmaista suhteessa kansainvälisesti tunnettuihin kontrollitranskripteihin ja raportoida BCR-ABL1 logaritmissen asteikon avulla (Yeung & Branford 2016, 85). Syvemmät molekulaariset vasteet määritellään IS:n mukaan siten, että MR⁴ ilmaisee 4-log alenemaa ja näin ollen BCR-ABL1^{IS} vastaa ≤ 0,01 prosenttia. MR^{4.5} ilmaisee puolestaan 4,5-log alenemaa, jolloin BCR-ABL1 on kansainvälisen asteikon mukaan ≤ 0,0032 prosenttia. MR⁵ ilmaisee 5-log alenemaa, joka vastaa ≤ 0,001 prosenttia BCR-ABL1:tä. (Mahon & Etienne 2014.)

TAULUKKO 4. Määritelmät syvemmille molekulaarisille vasteille kontrolligeenien *ABL1* ja *GUSB* mukaan (Cross ym. 2015, muokattu)

Molekulaarisen vasteen syvyys (log-alenema)	Havaittavaa tautia jäljellä (BCR-ABL1 IS %)	Havaitsematonta tautia cDNA:ssa ABL1-transkriptissä	Havaitsematonta tautia cDNA:ssa GUSB-transkriptissä
MR^{4.0}	0,01 %	10 000–31 999	24 000–76 999
MR^{4.5}	0,0032 %	32 000–99 999	77 000–239 999
MR^{5.0}	0,001 %	≥ 100 000	≥ 240 000

7 KANSAINVÄLINEN ASTEIKKO

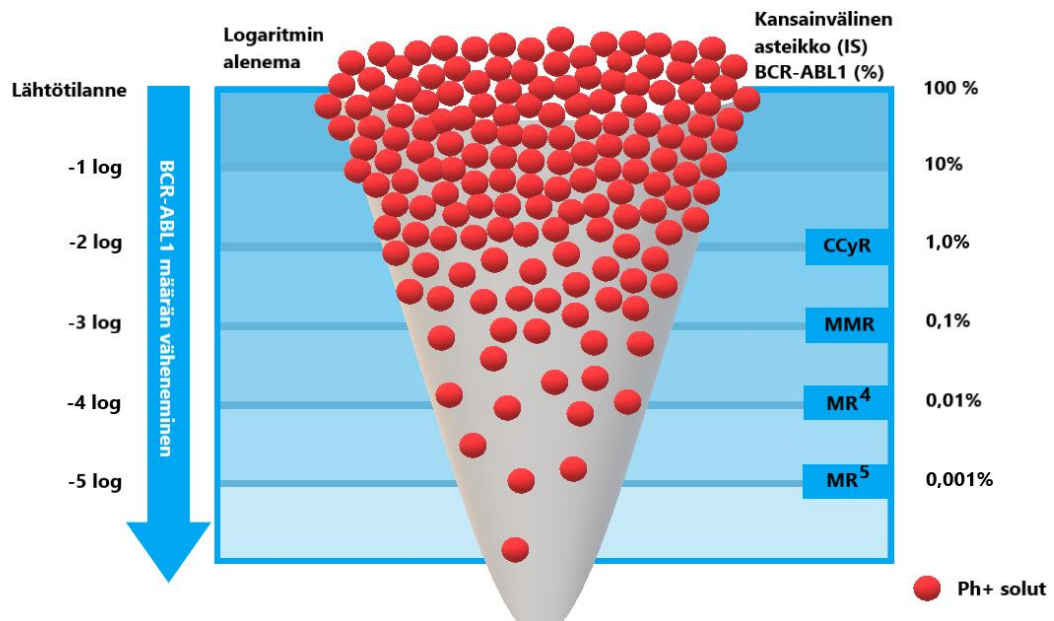
BCR-ABL1-tasojen vaihtelu laboratorioden välillä on väistämätöntä, sillä PCR-tekniikoissa on eroavaisuuksia ympäri maailmaa (Branford & Cross n.d.). Reagenssien, koneiden sovellusten, kontrolligeenien, alukkeiden ja koettimien sekvensoinnin sekä kalibraatioiden vaihtelut johtavat siihen, että jokainen laboratorio saa samalle näytteelle erilaiset arvot. Preanalyttisiä ja analyttisiä suureita on standardisoitu, jotta saataisiin minimoitua analyysien vaihtelevuutta. (Yeung & Branford 2016, 111.)

International Scale (IS) on kansainvälinen asteikko, joka perustuu International Randomized Study of Interferon Versus STI571 (IRIS) -tutkimuksen tuloksiin. Asteikko kehitettiin BCR-ABL1:n määrän arvioimiseksi. IS mahdollisti molekulaarisen vasteen määrittämisen vertaamalla BCR-ABL1:n määrää standardisoituun lähtökohtaan. (Mahon & Etienne 2014.) IRIS-tutkimus keskitettiin Lontoon, Seattlen ja Adelaiden laboratorioihin, joissa kussakin mitattiin 30 potilaan näytteet. Tulosten keskiarvoista saatiin standardisoitu diagnostinen lähtökohta, jonka arvoksi annettiin 100 prosenttia. (Yeung & Branford 2016, 111.)

Tutkimuksessa havaittiin, että BCR-ABL1:n määrän määrittämisessä oli toistettavia eroavaisuuksia näiden kolmen laboratorion välillä, minkä vuoksi tulokset eivät olleet sellaisenaan vertailukelpoisia. Vertailuaineiston puuttumisen takia laboratoriot mittasivat jäännöstaadin määrää yhteisistä näytejoukoista ja kyseiset potilastulokset normalisoitiin suhteessa standardisoituun lähtökohtaan. Tämä uudelleenanalysointi osoitti laboratorioden välisen vertailukelpoisuuden, ja siten muun muassa MMR saatiin määriteltä 3 logaritmin alenemaksi standardisoituun lähtökohtaan nähden. (Branford & Cross n.d.) IS:n mukaan BCR-ABL1-transkriptit tulee ilmaista suhteessa kansainvälisesti tunnettuihin kontrollitranskripteihin ja raportoida BCR-ABL1 logaritmisena asteikon avulla, jossa prosentit 10, 1, 0,1, 0,01, 0,0032 ja 0,001 vastaavat logaritmien 1, 2, 3, 4, 4,5 ja 5 alenemaa standardoidusta lähtökohdasta. (Yeung & Branford 2016, 85.)

Kuvassa 5 on havainnollistettu Ph-solujen vähenemistä. Lähtötilanne vastaa standardisoitua lähtökohtaa eli 100 prosenttia kansainvälisen asteikon mukaan. Tämä kuvastaa Ph-solujen määrää taudin diagnoosivaiheessa. Kun Ph-solujen määrä vähenee hoidon aikana, voidaan saavuttaa eri vasteita, kuten MMR ja syvemmat molekulaariset vasteet MR^{4.5} ja

MR⁵. Solujen vähenemisen myötä logaritminen alenema kasvaa ja IS-prosentti pienenee. Tämä kuvastaa, kuinka hoito vähentää Ph-solujen ja BCR-ABL1-transkriptien määrää elimistössä.



KUVA 5. Ph-solujen vähenemistä tarkastellaan logaritmissen aleneman ja kansainvälisen asteikon avulla (CML Support 2015, muokattu)

Tekemällä samoista näytteistä määritykset laboratoriot selvittävät, miten paljon omalla menetelmällä saadut tulokset poikkeavat kaikkien laboratorioden tulosten keskiarvosta. Näin laboratoriot saavat oman muuntokertoimen, jonka avulla voivat muuttaa vastauksensa IS-prosentin mukaisiksi. (Branford & Cross n.d.) Muuntokertoimen kehittämisen myötä tuloksia voidaan muokata ja vastata kansainvälisen asteikon avulla ja mahdollistaa validi vertailu laboratorioden välillä. Muuntokerroin mahdollistaa kuitenkin vain majorityypin transkriptien tulosten vastaamisen kansainvälisellä asteikolla, sillä muille transkripteille ei ole vielä kehitetty samanlaista vastausasteikkoa. (Yeung & Branford 2016, 111–112.)

8 TOIMINNALLINEN OPINNÄYTETYÖ

Toiminnallisella opinnäytetyöllä tarkoitetaan jonkin käytännön toiminnan ohjeistamista, opastamista tai toiminnan järjestämistä ammatillisessa kentässä. Opinnäytetyön tuotos voi olla esimerkiksi ammatilliseen käyttöön suunnattu kirjallinen tai virtuaalinen ohje tai opastus, kuten perehdyttämisoapas tai turvallisuusohjeistus. Alasta riippuen tuotos voi olla myös esimerkiksi verkkosivujen luominen tai jonkinlainen tapahtuma, kuten näyttelyn tai messuosaston järjestäminen. Ammattikorkeakoulun opinnäytetyössä käytännön toteutukseen tulee yhdistää toteutuksen raportointi tutkimusviestinnän keinoin. (Vilka & Airaksinen 2003, 9.)

Työelämälähtöinen opinnäytetyön aihe tukee opiskelijan ammatillista kasvua, koska toimiksiannon avulla opiskelija pääsee ratkaisemaan käytännönläheistä ongelmaa. Tällöin opiskelija pystyy peilaamaan opiskelujensa aikana karttuneita tietojaan ja taitojaan senhetkisen työelämän tarpeisiin. Työelämälähtöinen opinnäytetyöaihe myös usein lisää opiskelijan vastuuntuntoa opinnäytetyöstä ja opettaa tätä projektinhallintaan, koska täsmällisen suunnitelman tekeminen, aikataulutus ja tiimityö ovat projektityöskentelyn olennaisia osia. (Vilka & Airaksinen 2003, 17.)

Toiminnalliset opinnäytetyöt ovat projektin kaltaisia, mutta ne eroavat siten, ettei projektia tehdä tutkimuksellisella tarkoituksella eikä siinä hyödynnetä alakohtaista tietoperustaa yhtä laajasti ja järjestelmällisesti kuin opinnäytetyössä. Opinnäytetyössä lähestymistapa on tutkiva ja kehittävä, ja opinnäytetyön tekijä perustelee toimintaansa ja ratkaisujaan. Lisäksi toiminnallisen opinnäytetyön ja projektin erona on raportointi. Toiminnallisessa opinnäytetyössä raportoidaan sekä prosessi että tuotos. Lisäksi tuotos voi sisältää tekstiä, jonka vain tietty kohderyhmä ymmärtää. Raportointi on myös projektin raportointia syvällisempää ja siinä pohditaan ja perustellaan asioita enemmän. Tieto perustuu lähteisiin ja oman toiminnan tuottamaan tietoon, jota arvioidaan kriittisesti. (Vilka & Airaksinen 2004, 33.)

9 OPINNÄYTETYÖN TAVOITE JA TARKOITUS

Tämän opinnäytetyön aiheena on krooninen myeloinen leukemia ja sen jäännöstaudin raportointi graafisessa muodossa. Kansainvälisten ohjeistusten mukaan kroonisen myelooisen leukemian raportoinnin yhteyteen tulisi tehdä graafinen kuvaaja jäännöstaudin määrästä. Opinnäytetyömme tarkoituksena on tehdä tällaiset esimerkkikuvaajat Fimlab Laboratoriot Oy:n genetiikan laboratoriolle Microsoft Excel -taulukkolaskentaohjelmaa hyödyntäen. Keräämme toimeksiantajamme tietokannasta kymmenen KML:aa sairastavan potilaan jäännöstautianalytiikan tulokset, joiden pohjalta teemme kuvaajat kullekin potilaalle.

Opinnäytetyömme tehtävänä on tuottaa Fimlab Laboratoriot Oy:n genetiikan yksikön käyttöön Excel-taulukkopohja, johon he voivat täyttää KML-potilaiden jäännöstaudin seurantatiedot. Tavoitteena on, että toimeksiantajamme saa jatkossa tehtyä potilaille yksilölliset kuvaajat, joista taudin etenemisen pystyy hahmottamaan helposti. Kliinikot voivat hyödyntää näitä kuvaajia hoidon seurannassa.

10 OPINNÄYTETYÖN TUOTOKSEN TARKASTELO

Opinnäytetyön tuotoksena on Microsoft Excelissä tehdyt graafiset jäännöstautikuvaajat, jotka on esitelty liitteissä. Aloimme työstää ensimmäistä kuvaajaa syyskuussa 2017, kun olimme yhdessä sairaalageneetikko Ritva Karhun kanssa valinneet yhden potilaan, jonka jäännöstaudin seurantatuloksista tekisimme esimerkkikuvaajan. Päätimme alustavasti, että työn otokseksi valikoituisi kymmenen erilaista potilastapausta. Potilaiden tietoja käsitelimme opinnäytetyössä anonyymisti siten, että numeroimme potilaat luvuin 1–10 eikä heidän henkilöllisyyttään voi selvittää. Lisäksi taulukoimme kunkin potilaan näytteenottopäivät ja jäännöstautiarvot sekä ajokohtaisen sensitiivisyyden niiltä osin kuin ne olivat saatavilla. Osa analyyseista oli epäonnistunut esimerkiksi huonojen standardisuorien vuoksi, minkä takia tulosta ei ollut saatu. Ennen vuotta 2016 Fimlab laboratoriot Oy:n genetiikan yksikössä käytettiin jäännöstaudin määrittämiseen toista menetelmää. Toimeksiantajien ohjeistuksesta merkitsimme kuvaajiin vain uudemmalla menetelmällä saadut sensitiivisyysarvot, mutta jäännöstautiarvot edustavat sekä vanhalla että uudella menetelmällä saatuja tuloksia. Tämän vuoksi sensitiivisyyskäyrä alkaa kuvaajissa vasta uuden menetelmän käyttöönoton jälkeen.

Kuvaajien arvot saatiin kymmenen KML-potilaan näytteistä, joista oli mitattu jäännöstaudin määrä PCR-menetelmällä. Suositeltavat näytteenottoajankohdat jäännöstaudin seurannassa ajoittuvat kolmen kuukauden, kuuden kuukauden ja vuoden päähän diagnoosista (Hochhaus ym. 2017). Näihin ajankohtiin mennessä saavutetut vasteet kertovat potilaan ennusteesta ja kyseiset virstanpylväät on kuvattu pystyviivoina kuvaajissa. Tämän lisäksi myös yhdeksännen ja 18. kuukauden näytteenottopäivät on merkitty pystyviivoin toimeksiantajan pyynnöstä. Kaikki näytteenottopäivämäärät eivät vastaa suositeltuja ajankohtia, mutta kuvaajiin on merkitty virstanpylväiksi sellaisetkin päivämäärät, joissa ajankohta poikkeaa noin kuukaudella suosituksista. Tämä voidaan huomata esimerkiksi potilaan 4 kohdalla (liite 1), jossa ajallisesti näyte on otettu vasta 4 kuukauden kuluttua diagnoosista, mutta se on silti merkitty kolmannen kuukauden virstanpylvääksi.

Esimerkkikuvaajaan haluttiin näkyviin sekä potilaan jäännöstaudin että analyysimenetelmän sensitiivisyyden määrä. Sen avulla voidaan nähdä, kuinka paljon potilaalla on jäännöstautia elimistössään. Tuotokseen tehtiin tarvittavat laskukaavat, jotta arvot saataisiin edustavasti näkyviin. Sen ulkonäköä ja tietoja muokattiin tarpeen mukaan sellaisiksi, kuin

toimeksiantaja oli toivonut. Kuvaajassa esitetään jäännöstaudin määrää sinisellä ja menetelmän sensitiivisyyttä violetilla viivalla. Jos jäännöstaudin määrä on pienempi kuin sensitiivisyys, jäännöstauteja ei niiltä osin esitetä kuvaajassa, koska silloin sen määrää ei enää voida mitata tarkasti. Näin on esimerkiksi potilaan 1 kohdalla (liite 1). Kuvaajan taustalle laitettiin optimal-, warning- ja failure-alueet, joiden avulla nähdään selkeämmin, kuinka hyvin potilas vastaa hoitoon. Vihreällä kuvataan optimaalista vastetta, keltaisella niin sanottua varoitus-aluetta ja punaisella epäonnistunutta vastetta. Lisäksi kuvaajaan on merkitty MMR, $MR^{4,5}$ sekä MR^5 , jotka vastaavat kansainvälisen asteikon mukaan molekulaarisia vasteita. Graafisen kuvaajan avulla nähdään hyvin, mihin suuntaan potilaan tauti on sairaushistorian aikana kulkenut.

11 POHDINTA

Saimme opinnäytetyömme aiheen Krooninen myeloinen leukemia ja sen jäännöstaudin raportointi keväällä 2017. Otsikko muokkautui opinnäytetyöprosessin aikana paremmin työn sisältöä kuvaavaksi. Aihe tuli Fimlab laboratoriot Oy:n genetiikan yksiköstä, jossa yhteyshenkilöinäimme toimivat sairaalageneetikko Ritva Karhu ja laboratoriohoitaja Mari Virtanen. Työmme tarkoituksena oli tuottaa KML-potilaiden jäännöstauteja havainnollistava graafinen kuvaaja. Tavoitteena oli saada kliinikoiden käyttöön kuvaaja, joka osoittaa visuaalisesti, miten potilaan jäännöstauteja etenee hoidon aikana. Alun perin suunnitelimme, että kuvaaja tuotettaisiin erään terveydenhuoltoalan yrityksen kehittämällä jäännöstautejaohjelmalla. Kyseistä ohjelmaa ei kuitenkaan julkaistu, joten päädyimme toteuttamaan työn Microsoft Excelin avulla. Huomioimme työssä toimeksiantajan toiveet kuvaajan suhteen ja toteutimme nämä mahdollisuuksien mukaan.

Bioanalytiikan koulutusohjelmaan ei sisälly kovin paljon genetiikan opintoja, joten oli melko haastavaa perehtyä aiheeseen pohjatietojemme ollessa niin vähäiset. Aiheestamme löytyy paljon tietoa, mutta työmme kannalta oleellisia asioita oli käsitelty monissa lähteissä joko pintapuolisesti tai niin, että asioiden syvempi ymmärtäminen vaatisi opintoja, jotka eivät sisälly bioanalytiikan koulutusohjelmaan. Teoriaosuus koottiin alan kirjallisuudesta sekä uudemmissa artikkeleista ja julkaisuista. Pyrimme hyödyntämään mahdollisimman uusia julkaisuja työssämme, mutta käytimme myös hieman vanhempia lähteitä, joiden sisältämää tietoa voidaan yhä pitää ajantasaisena. Opinnäytetyön aikana opimme etsimään luotettavia lähteitä, mikä oli aluksi haastavaa, sillä aiheessamme oli niin paljon meille uutta tietoa. Lähdekriittisyytemme kasvoi ja tieteellinen ajattelumme kehittyi opinnäytetyöprosessin myötä vertaillen eri lähteitä ja tarkistaessamme, toistuuko informaatio niissä. Suurin osa lähteistä oli englanninkielisiä, joten useiden eri kansainvälisten lähteiden myötä kartutimme ammatillista sanastoamme. Englanninkielisissä artikkeleissa on käytössä paljon tieteellistä terminologiaa, jolle ei ole vakiintuneita suomenkielisiä käännöksiä. Lisäksi eri lähteissä samasta asiasta saatettiin käyttää eri termiä, minkä vuoksi käännöstyö vaati tarkkuutta. Suomenkielisiä lähteitä on selkeästi vähemmän, eikä KML:aan kohdistuvia tutkimuksia ole juuri julkaistu suomeksi. Työmme myötä olemme tuottaneet suomenkielistä tekstiä KML:n jäännöstaudesta, mistä voi olla hyötyä niille, jotka etsivät vastaavaa tietoa tulevaisuudessa.

Hyvän tieteellisen käytännön mukaan tutkimuksissa toimitaan rehellisesti ja huolellisesti ja tutkimustyön sekä siihen liittyvien tulosten tallentamiseen ja esittämiseen perehdytään tarkasti (Tutkimuseettinen neuvottelukunta 2012). Vaikka opinnäytetyömme ei suoranaisesti ollut tutkimus, sovelsimme näitä käytäntöjä työssämme. TENK:n (2012) mukaan eettisesti toimittaessa muiden tutkijoiden töitä ja saavutuksia kunnioitetaan viittaamalla näiden julkaisuihin. Työssämme käytetyt lähteet on merkattu asianmukaisesti lähdeluetteloon ja niihin on viitattu tekstissä. Näin voimme varmistaa, ettei raporttiin tule toisen tutkijan tutkimustietoa omalla nimellä. Työmme luotettavuutta ja eettisyyttä voidaan tarkastella myös sillä, että pyrimme käyttämään mahdollisimman uusia lähteitä, jotta työssä ei olisi vanhentunutta tietoa. Opinnäytetyössä tulee huomioida, ettei kaikkia artikkeleja tai tutkimusaineistoa ollut mahdollista saada, sillä osa näistä on maksullisia tai vaatii organisaatioiden käyttäjätunnuksia.

Tuotoksessa käytettyjä potilastietoja käsiteltiin eettisten arvojen mukaisesti. Potilaat, joiden tietoja tuotokseen valittiin, olivat pääasiassa sairaalageneetikko Ritva Karhun valitsemia. Tarkastelimme valittuja potilastietoja salassapitovelvollisuuden mukaisesti ja potilastiedoista otimme käyttöön vain näytteenottopäivämäärät, jäännöstautiarvot sekä tutkimuksen herkkyysarvot. Näin voidaan taata, ettei potilastietoja käytetä väärin eikä potilaita voida tunnistaa kuvaajien tietojen avulla.

Opinnäytetyöprosessi sujui hyvin, sillä yhteistyö toimi välillämme. Jaoimme teoriaosuiden puoliksi, mutta kävimme yhdessä kaikki aihealueet läpi ja muokkasimme kieltä yhtenäiseksi. Olimme toimeksiantajien kanssa tiiviisti yhteydessä kuvaajiin liittyvien tietojen vuoksi sekä osin myös teoreettisen tiedon puolesta, mikä kehitti vuorovaikutustaitojamme. Saimme myös lisää kokemusta moniammatillisesta yhteistyöstä työskennellessämme genetiikan laboratorion henkilöstön kanssa. Pääsimme seuraamaan KML-jäännöstautitutkimuksen suorittamista, mikä auttoi meitä ymmärtämään paremmin bioanalytiikan roolia jäännöstaudin seurannassa. Työ vaati meiltä ajankäytön suunnittelua sekä siihen sitoutumista. Ajankäytön suhteen olisimme voineet tehdä pieniä muutoksia, mutta kaiken kaikkiaan pysyimme hyvin aikataulussa. Koska kuvaajat vaativat pohjaksi teoriatietoa, jotta niitä voisi ymmärtää, olisi ollut parempi vaihtoehto kirjoittaa ensin teoriaosuus ja sitten tehdä kuvaajat. Kirjoitimme raporttiosuutta ja teimme kuvaajia samanaikaisesti, joten ymmärryksemme aiheesta kasvoi prosessin aikana.

Tavoitteena oli tuottaa graafinen kuvaaja, jota voitaisiin käyttää mallipohjana ja johon voitaisiin lisätä uusia potilasarvoja. Sen myötä jäännöstaudin määrän kehitys olisi havaittavissa myös visuaalisesti, mikä helpottaisi klinikoiden työtä. Kuvaajastamme ei tullut niin helppokäyttöinen, kuin olimme suunnitelleet, mutta se on hyvä prototyyppi, josta voi lähteä muokkaamaan toimivampaa versiota. Se sisältää tarpeeksi informaatiota, jotta potilaiden jäännöstitä voidaan seurata, mutta sen ominaisuuksien vuoksi sitä ei pysty hyödyntämään jatkuvana kuvaajana. Tuotostamme voidaan tarvittaessa käyttää esimerkkinä tietojenkäsittelyn ammattilaisille, mikäli Fimlab laboratoriot Oy haluaa käyttöönsä sen tyyppisen kuvaajan. Tulevaisuutta varten kehitysehdotuksena voidaan pitää jäännöstautikuvaajasovellusta, jossa olisi samankaltaisia ominaisuuksia kuin meidän tuotoksesamme. Oleellista olisi sovelluksen helppokäyttöisyys ja kuvaajan informatiivisuus. Tämän tyyppinen ohjelma jäännöstaudin seurantaan on ilmeisesti ollut kehitteillä, mutta toistaiseksi siitä ei ole enempää tietoa saatavilla.

Opinnäytetyömme aihe oli mielenkiintoinen, ja jo ennen aiheiden julkaisemista olimme toivoneet genetiikkaan liittyvää työtä. Työssämme yhdistyi sekä genetiikka että hematologia. Olimme tutustuneet hematologian tunneilla krooniseen myelooiseen leukemiaan, mutta opinnäytetyön myötä pääsimme syventymään kyseiseen tautiin sekä sen tutkimusmenetelmiin entistä paremmin. Vaikka tiesimme etukäteen hieman KML:sta, opimme hyvin paljon uutta opinnäytetyötä tehdessä ja työn haastavuudesta huolimatta prosessi oli kokonaisuudessaan palkitseva.

LÄHTEET

Autio, K. & Kairisto, V. 2015. Verisyöpien syto- ja molekyyli­genetiikka. Teoksessa: Porkka, K., Lassila, R., Remes, K. & Savolainen, E-R. (toim.) Veritaudit. 4. painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.

Baccarani, M., Pileri, S., Steegmann, J-L., Muller, M., Soverini, S. & Dreyling, M. 2012. Chronic myeloid leukemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology* 23 (7), vii72–vii77. Luettu 27.11.2017.
https://academic.oup.com/annonc/article/23/suppl_7/vii72/144183

Balk, B., Fabarius, A. & Haferlach, C. 2016. Cytogenetics of Chronic Myeloid Leukemia (CML). Teoksessa Hehlmann, R. (toim.) *Chronic Myeloid Leukemia*. Switzerland: Springer Nature.

BCR-ph fusion gene. No date. National Cancer Institute. Luettu 21.5.2017.
<https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/bcr-abl-fusion-gene>

Bilan, F., Bourmeyster, N., Chasseriau, J., Chomel, J-C., Guilhot, F., Kitzis, A. & Rivet, J. 2004. Characterization of the Different BCR-ABL Transcripts with a Single Multiplex RT-PCR. *The Journal of Molecular Diagnostics: JMD* 6 (4), 343–347. Luettu 27.9.2017.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1867492/>

Bower, H., Björkholm, M., Dickman, P. W., Höglund, M., Lambert, P. C. & Andersson, T. M.-L. 2016. Life Expectancy of Patients With Chronic Myeloid Leukemia Approaches the Life Expectancy of the General Population. *Journal of Clinical Oncology* 24 (34), 2851–2857. Luettu 9.8.2018.
<http://ascopubs.org/doi/pdf/10.1200/JCO.2015.66.2866>

Branford, S. & Cross, N. No date. International Standardisation for BCR-ABL RQ-PCR in CML. How close are we to achieving the ultimate goal of global standardization for BCR-ABL measurement by RQ-PCR in CML? Luettu 21.5.2018.
<https://www.cml-foundation.org/index.php/science-education/scientific-news-cml/13-standardisation>

Chereda, B. & Melo, J. V. 2016. The Biology and Pathogenesis of Chronic Myeloid Leukemia. Teoksessa: Hehlmann, R. (toim.) *Chronic Myeloid Leukemia*. Switzerland: Springer Nature.

Chronic Myeloid Leukemia. 2014. *Leukemia & Lymphoma society*, 10–14. Luettu 26.9.2017.
http://www.lls.org/sites/default/files/file_assets/cml.pdf

Clark, R., Davies, A., Giannoudis, A., Harris, R., Knight, K., Lucas, C., Wang, L. & Watmough, J. 2009. Chronic myeloid leukemia patients with the e13a2 BCR-ABL fusion transcript have inferior responses to imatinib compared to patients with the e14a2 transcript. *Haematologica* 94 (10), 1362–1367. Luettu 19.10.2017.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2754951/>

CML Support. 2015. International standardisation (I.S.) of test results. Luettu 22.5.2018.
<https://www.cmlsupport.org.uk/section/international-standardisation-test-results>

Cross, N. C. P. & Hochhaus, A. 2016. Standardization of Molecular Monitoring for Chronic Myeloid Leukemia. Teoksessa: Hehlmann, R. (toim.) Chronic Myeloid Leukemia. Switzerland: Springer Nature.

Cross, N. C. P., White, H. E., Colomer, D., Ehrencrona, H., Foroni, L., Gottardi, E., Lange, T., Lion, T., Machova Polakova, K., Dulucq, S., Martinelli, G., Oppliger Leibundgut, E., Pallisgaard, N., Barbany, G., Sacha, T., Talmaci, R., Izzo, B., Saglio, G., Pane, F., Müller, M.C. & Hochhaus, A. 2015. Laboratory recommendations for scoring deep molecular responses following treatment for chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 29 (5), 999–1003. Luettu 3.3.2018.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4430701/>

Fava, C., Rege-Cambrin, G., Dogliotti, I. & Saglio, G. 2016. The Choice of First-Line Chronic Myelogenous Leukemia Treatment. Teoksessa Hehlmann, R. (toim.) Chronic Myeloid Leukemia. Switzerland: Springer Nature.

Fimlab Laboratoriot Oy. 2017. BCR-ABL-geenien Major-tyypin fuusio-RNA:n jäännöstautimäärittäminen (kvant.). v.1.9. [tutkimusohje]. Luettu 18.10.2017.
https://www.fimlab.fi/ohjekirja/nayta.tpl?sivu_id=194;setid=6779

Gisselsson, D. 2015. Cytogenetic methods. Teoksessa: Heim, S. & Mitelman, F. (toim.) Cancer Cytogenetics. Chromosomal and Molecular Genetic Aberrations of Tumor Cells. 4. painos. John Wiley & Sons, Ltd.

Goldman, J. & Daley, G. 2007. Chronic Myeloid Leukemia – A Brief History. Myeloproliferative Disorders. Hematologic Malignancies. Berlin. Luettu 26.9.2017.

Harbaum, L., Marx, A., Goekkurt, E., Schafhausen, P. & Atanackovic, D. 2014. Treatment with dasatinib for chronic myeloid leukemia following imatinib-induced hepatotoxicity. *International Journal of Hematology* 99 (1), 91–94. Japan: Springer. Luettu 15.5.2018.
<https://link-springer-com.libproxy.helsinki.fi/content/pdf/10.1007%2Fs12185-013-1474-x.pdf>

Harrington, P., Kizilers, A., & de Lavallade, H. 2017. The Role of Early Molecular Response in the Management of Chronic Phase CML. *Current Hematologic Malignancy Reports* 12 (2), 79–84. Luettu 3.3.2018.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5410202/>

Haznedaroglu, I. C. 2014. Monitoring the Response to Tyrosine Kinase Inhibitor (TKI) Treatment in Chronic Myeloid Leukemia (CML). *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases* 6 (1). Luettu 27.11.2017
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3894837/>

Hehlmann, R., Saußebe, S. & Silver, R. T. 2016. CML Blast Crisis: Implications and Management. Teoksessa: Hehlmann, R. (toim.) Chronic Myeloid Leukemia. Switzerland: Springer Nature.

Hochhaus, A., Saussele, S., Rosti, G., Mahon, F.-X., Janssen, J. J. W. M., Hjort-Hansen, H., Richter, J. & Buske, C. 2017. Chronic myeloid leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology* 28 (4), iv41–iv51. Luettu 8.8.2018.

https://academic.oup.com/annonc/article/28/suppl_4/iv41/3958153

Hoffbrand, V. & Moss, P. 2011. *Essential Haematology*. 6. painos. Chichester: Wiley-Blackwell.

Hughes, T. P., Ross, D. M. & Melo, J. V. 2014. *Handbook of Chronic Myeloid Leukemia*. Switzerland: Springer.

Iwasaki, H. & Akashi, K. 2016. *Identification and Biology of CML Stem Cells*. Teoksessa: Kizaki, M. (toim.) *Molecular Pathogenesis and Treatment of Chronic Myelogenous Leukemia*. Japan: Springer.

Jabbour, E. & Kantarjian, H. 2016. Chronic myeloid leukemia: 2016 update on diagnosis, therapy, and monitoring. *American Journal of Hematology* 91 (2). Luettu 16.5.2018. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ajh.24275>

Kalaycio, M. & Mukherjee, S. 2016. Accelerated Phase CML: Outcomes in Newly Diagnosed vs. Progression From Chronic Phase. *Current Hematologic Malignancy Reports*. Springer US. Luettu 7.5.2018.

<https://link-springer-com.libproxy.helsinki.fi/article/10.1007/s11899-016-0304-7>

Karhu, R. vanhempi sairaalageneetikko, dos. KML-kuvia. 2018. Sähköpostiviesti. Ritva.Karhu@fimlab.fi. Luettu 23.5.2018.

Koskela, H., Koskenvesa, P., Mustjoki, S. ja Porkka, K. 2012. Kroonisen myelooisen leukemian nykyhoito. *Lääketieteellinen aikakauskirja Duodecim* 128 (6), 579–88. Luettu 25.9.2017.

<http://duodecimlehti.fi/lehti/2012/6/duo10158>

Koskenvesa, P., Mustjoki, S. & Rosenberg, L. 2017. KML-potilaan opas. Krooninen myeloinen leukemia ja sen hoito. Suomen syöpäpotilaat ry.

<https://www.syopapotilaat.fi>

Kunitomi, A., Kimura, S., Okamoto, Y., Sakai, K., Muranushi, H., Tsukamoto, T., Sugiura, H., Matsui, H., Jo, T., Ueda, T., Okada, K., Onishi, T. & Ueda, Y. 2015. Myeloid blast crisis in chronic myeloid leukemia with a unique deletion near the BCR/ABL breakpoint. *International Cancer Conference Journal* 4 (1). Luettu 7.5.2018.

<https://link-springer-com.libproxy.helsinki.fi/article/10.1007/s13691-014-0165-7>

Mahon, F.-X. & Etienne, G. 2014. Deep Molecular Response in Chronic Myeloid Leukemia: The New Goal of Therapy? *American Association for Cancer Research*. Luettu 21.5.2017.

<http://clincancerres.aacrjournals.org/content/20/2/310.long>

Matsumura, I. 2016. *Roles for Signaling Molecules in the Growth and Survival of CML Cells*. Teoksessa: Kizaki, M. (toim.) *Molecular Pathogenesis and Treatment of Chronic Myelogenous Leukemia*. Japan: Springer.

Mustjoki, S. & Koistinen, P. 2015. Krooninen myeloinen leukemia. Teoksessa: Porkka, K., Lassila, R., Remes, K. & Savolainen, E-R. (toim.) 2015. Veritaudit. 4. painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.

The National CML Society. Response. Luettu 18.10.2017.
<http://www.nationalcmlsociety.org/living-cml/response>

Qiagen. 2014. Ipsogen BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit Handbook.

Radich, J. & Egan, D. 2016. Goals of CML Treatment in the Tyrosine Kinase Inhibitor Era. Teoksessa: Kizaki, M. (toim.) Molecular Pathogenesis and Treatment of Chronic Myelogenous Leukemia. Japan: Springer.

Roche. The importance of minimal residual disease (MRD) in blood cancer. Luettu 5.5.2017.
http://www.roche.com/dam/jcr:3205c548-9a78-4e95-89c8-ac4e35123469/en/mrd_backgrounder__191115_without_data.pdf

Rounioja, S. hematologian erikoislääkäri. Diffi- ja virtaussytometriakuvia. 2018. Sähköpostiviesti. Samuli.Rounioja@fimlab.fi. Luettu 28.5.2018.

Schmidt, S. 2016. Short overview on the current treatment of chronic myeloid leukemia in chronic phase. Magazine of European Medical Oncology 9 (4), 157–162. Luettu 15.5.2018.
<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs12254-016-0299-8>

Siitonen, S. & Penttilä, T-L. 2015. Pahanlaatuisten veritautien immunofenotyypitys. Teoksessa: Porkka, K., Lassila, R., Remes, K. & Savolainen, E-R. (toim.) Veritaudit. 4. painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.

Suomen hematologiyhdistys ry. 2017. KML. Luettu 28.11.2017. <http://www.hematology.fi>

Talpaz, M., Hehlmann, R., Quintás-Cardama, A., Mercer, J., & Cortes, J. 2013. Re-emergence of interferon- α in the treatment of chronic myeloid leukemia. Leukemia 27 (4), 803–812. Luettu 8.5.2018.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3703612/>

Testoni, N., Marzocchi, G., Luatti, S., Amabile, M., Baldazzi, C., Stacchini, M., Nanni, M., Rege-Cambrin, G., Giugliano, E., Giussani, U., Abruzzese, E., Kerim, S., Grimoldi, M. G., Gozzetti, A., Crescenzi, B., Carcassi, C., Bernasconi, P., Cuneo, A., Albano, F., Fugazza, G., Zaccaria, A., Martinelli, G., Pane, F., Rosti, G. & Baccarani, M. 2009. Chronic myeloid leukemia: a prospective comparison of interphase fluorescence in situ hybridization and chromosome banding analysis for the definition of complete cytogenetic response: a study of the GIMEMA CML WP. Blood 114 (24), 4939–4943. Luettu 19.10.2017.
<http://www.bloodjournal.org/content/114/24/4939?sso-checked=true>

Tutkimuseettinen neuvottelukunta. 2012. Hyvä tieteellinen käytäntö ja sen loukkausepäilyjen käsitteleminen Suomessa. Luettu 7.8.2018.
http://www.tenk.fi/sites/tenk.fi/files/HTK_ohje_2012.pdf

Vardiman, J. W., Melo, J. V., Baccarani, M. & Thiele, J. 2008. Chronic myelogenous leukaemia, BCR-ABL1 positive. Teoksessa: Swerdlow, S. H., Campo, E., Harris, N. L., Jaffe, E. S., Pileri, S. A., Stein, H., Thiele, J. & Vardiman, J. W. (toim.) 4. Painos. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: IARC.

Vilkka, H. & Airaksinen, T. 2003. Toiminnallinen opinnäytetyö. Jyväskylä: Gummerus Kirjapaino Oy.

Vilkka, H. & Airaksinen, T. 2004. Toiminnallisen opinnäytetyön ohjaajan käsikirja. Tampere: Tammi.

Winer, E. & DeAngelo, D. 2018. A Review of Omacetaxine: A Chronic Myeloid Leukemia Treatment Resurrected. Springer Healthcare. Luettu 15.5.2018.
<https://link-springer-com.libproxy.helsinki.fi/article/10.1007/s40487-018-0058-6>

Yeung, D. & Branford, S. 2016. Optimal Monitoring of CML Treatment: Molecular and Mutation Analysis. Teoksessa Kizaki, M. (toim.) Molecular Pathogenesis and Treatment of Chronic Myelogenous Leukemia. Japan: Springer.

LIITTEET

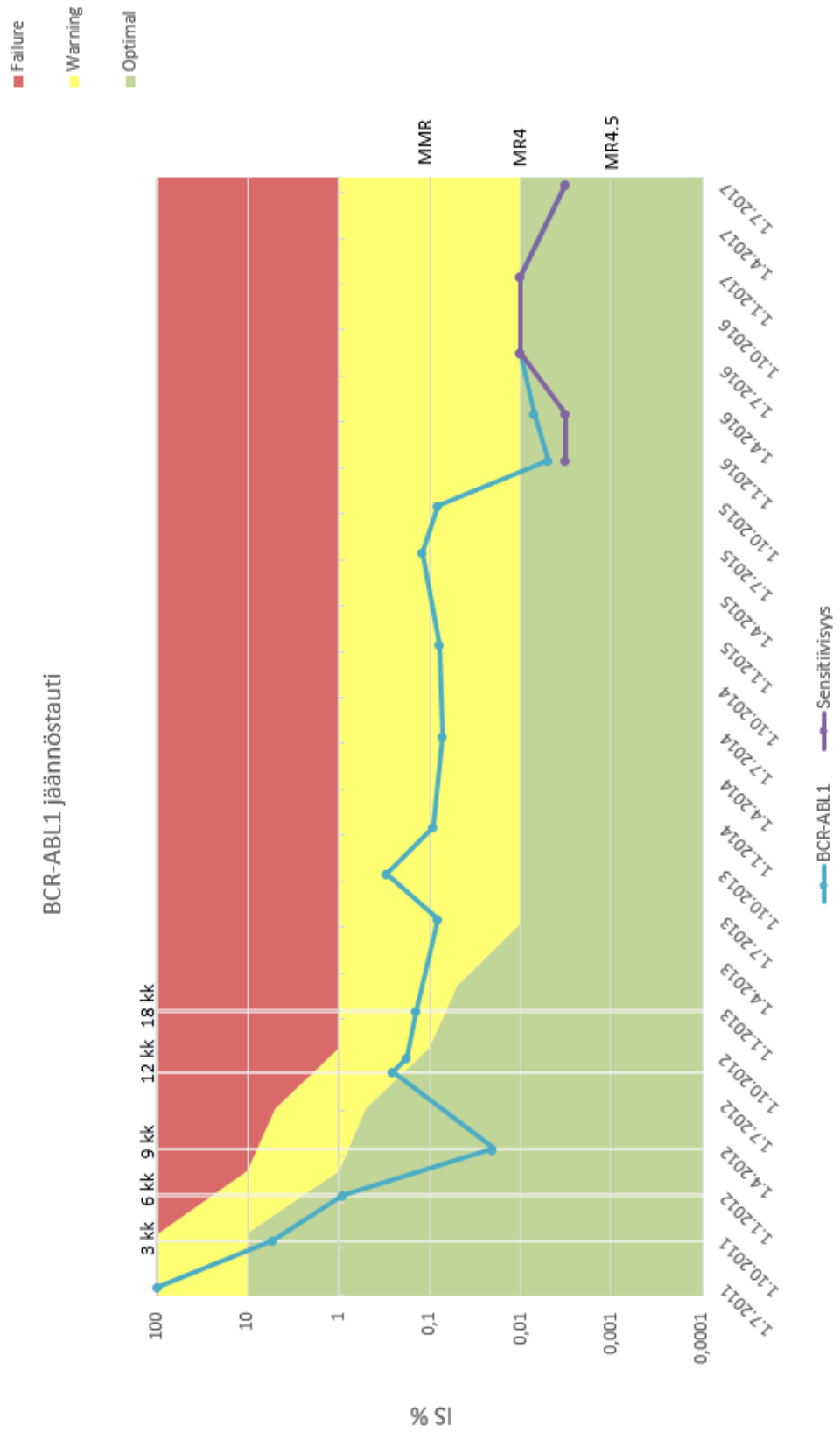
1 (20)

Liite 1. Potilaskuvaajat

Potilas 1. Tiedot jäännöstautikuvaajaa varten

Näytteenottopvm	MRD suht. GUS % (Jäännöstauti)	Sensitiivisyys %
29.7.2011	100	
31.10.2011	5,4	
11.1.2012	0,91	
4.4.2012	0,02	
10.9.2012	0,25	
23.10.2012	0,18	
3.1.2013	0,14	
1.7.2013	0,08	
25.10.2013	0,3	
2.1.2014	0,09	
11.7.2014	0,071	
15.1.2015	0,079	
28.7.2015	0,12	
20.10.2015	0,08	
29.1.2016	0,005	4,5
12.4.2016	0,007	4,5
15.8.2016	0,008	4
13.1.2017	0,003	4
17.7.2017	0,002	4,5

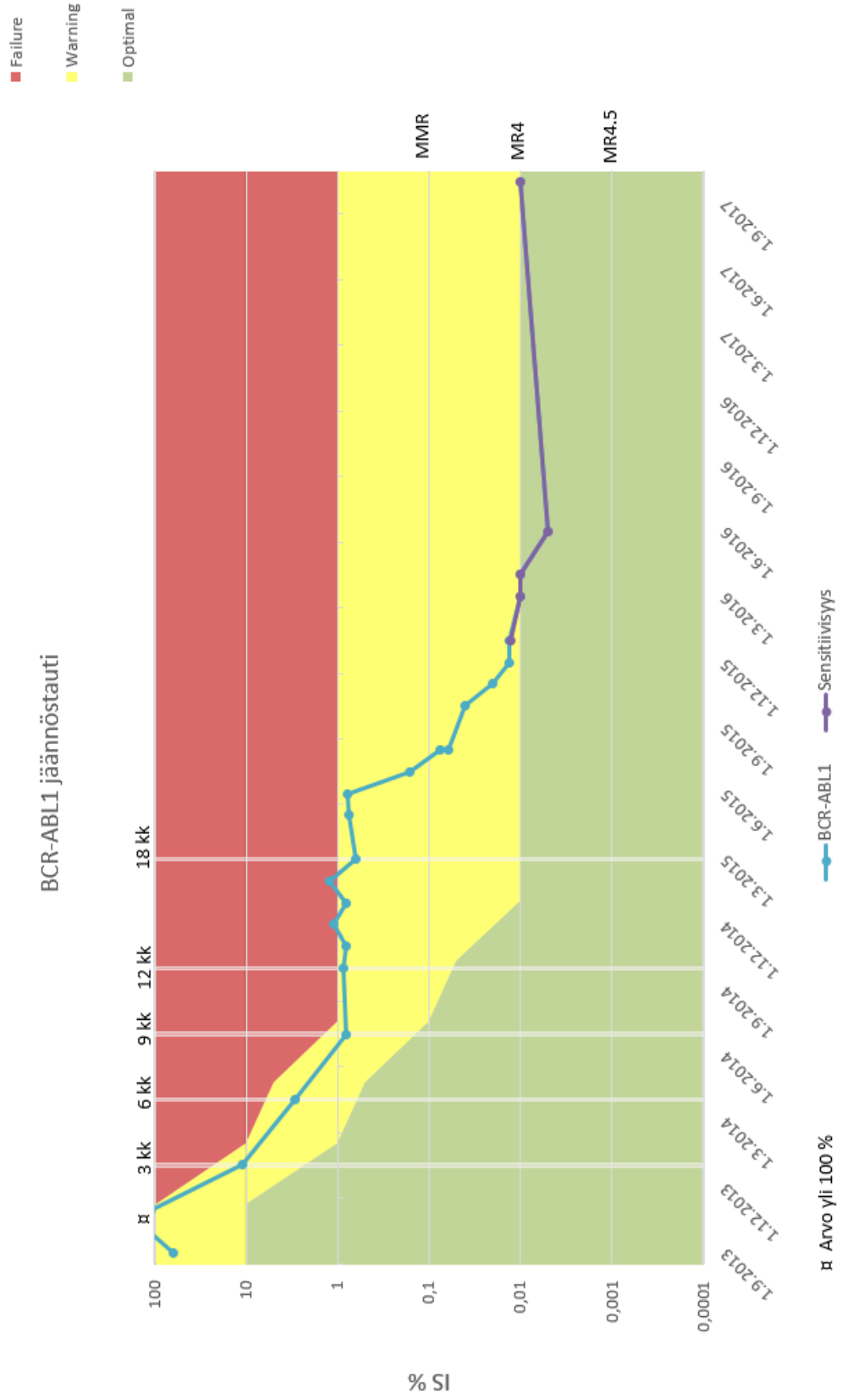
Potilas 1. Jännöstautikuvaaja



Potilas 2. Tiedot jäännöstautikuvaajaa varten

Näytteenottopvm	MRD suht. GUS % (Jäännöstauti)	Sensitiivisyys %
30.9.2013	62,5	
29.10.2013	117	
21.11.2013	103	
8.1.2014	11	
16.4.2014	2,9	
17.7.2014	0,8	
10.10.2014	0,86	
10.11.2014	0,79	
8.12.2014	1,1	
8.1.2015	0,8	
5.2.2015	1,2	
12.3.2015	0,62	
4.5.2015	0,75	
2.6.2015	0,78	
8.7.2015	0,16	
3.8.2015	0,074	
31.8.2015	0,061	
8.10.2015	0,04	
13.11.2015	0,02	
16.12.2015	0,013	
29.1.2016	0,013	0,012589
9.3.2016	0,01	0,01
19.4.2016	0,01	0,01
6.6.2016	0,005	0,005011
11.10.2017	0,003	0,01

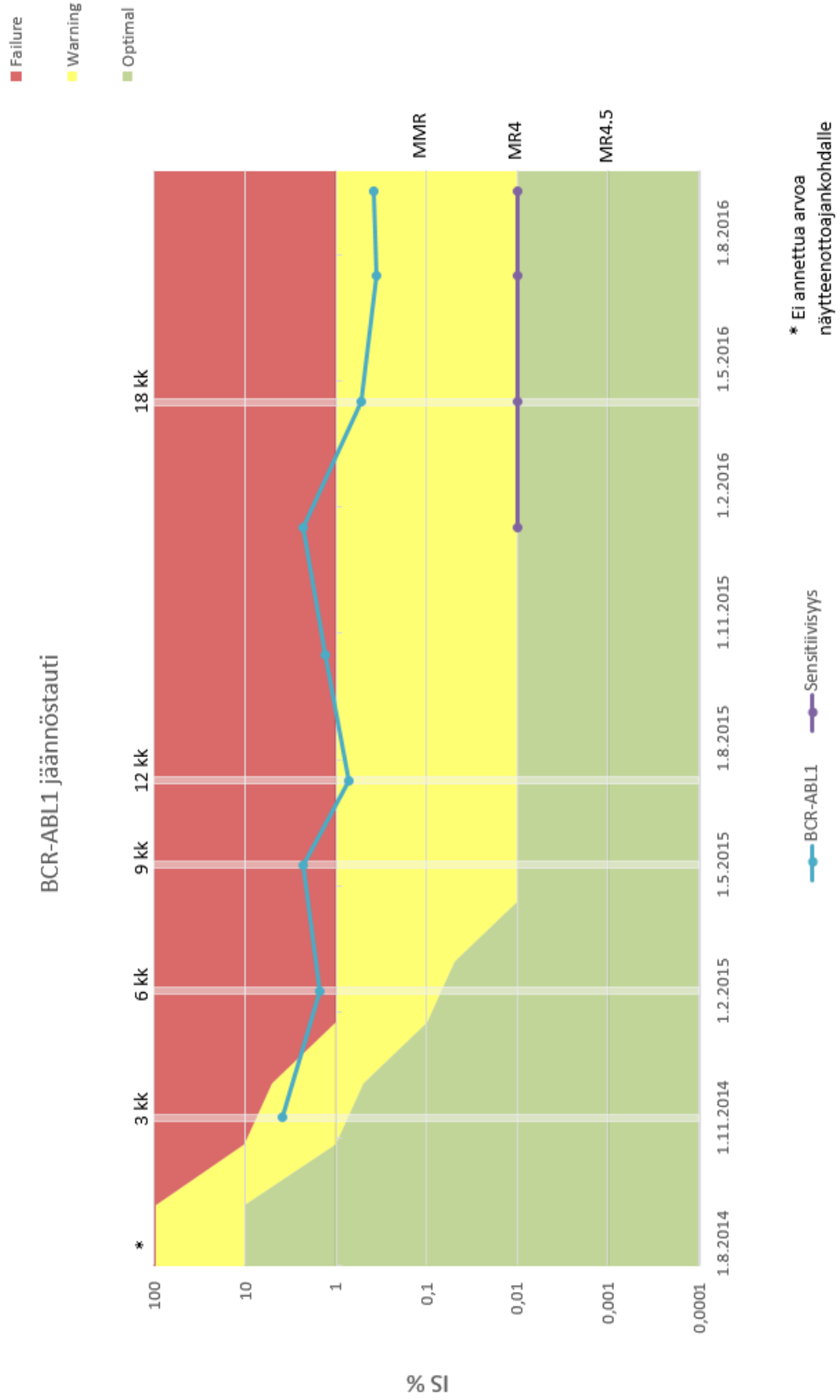
Potilas 2. Jännöstautikuvaaja



Potilas 3. Tiedot jäännöstautikuvaajaa varten

Näytteenottopvm	MRD suht. GUS % (Jäännöstauti)	Sensitiivisyys %
6.8.2014		
5.11.2014	3,9	
10.2.2015	1,5	
5.5.2015	2,3	
6.7.2015	0,71	
6.10.2015	1,3	
4.1.2016	2,3	0,01
11.4.2016	0,52	0,01
5.7.2016	0,36	0,01
13.9.2016	0,38	0,01

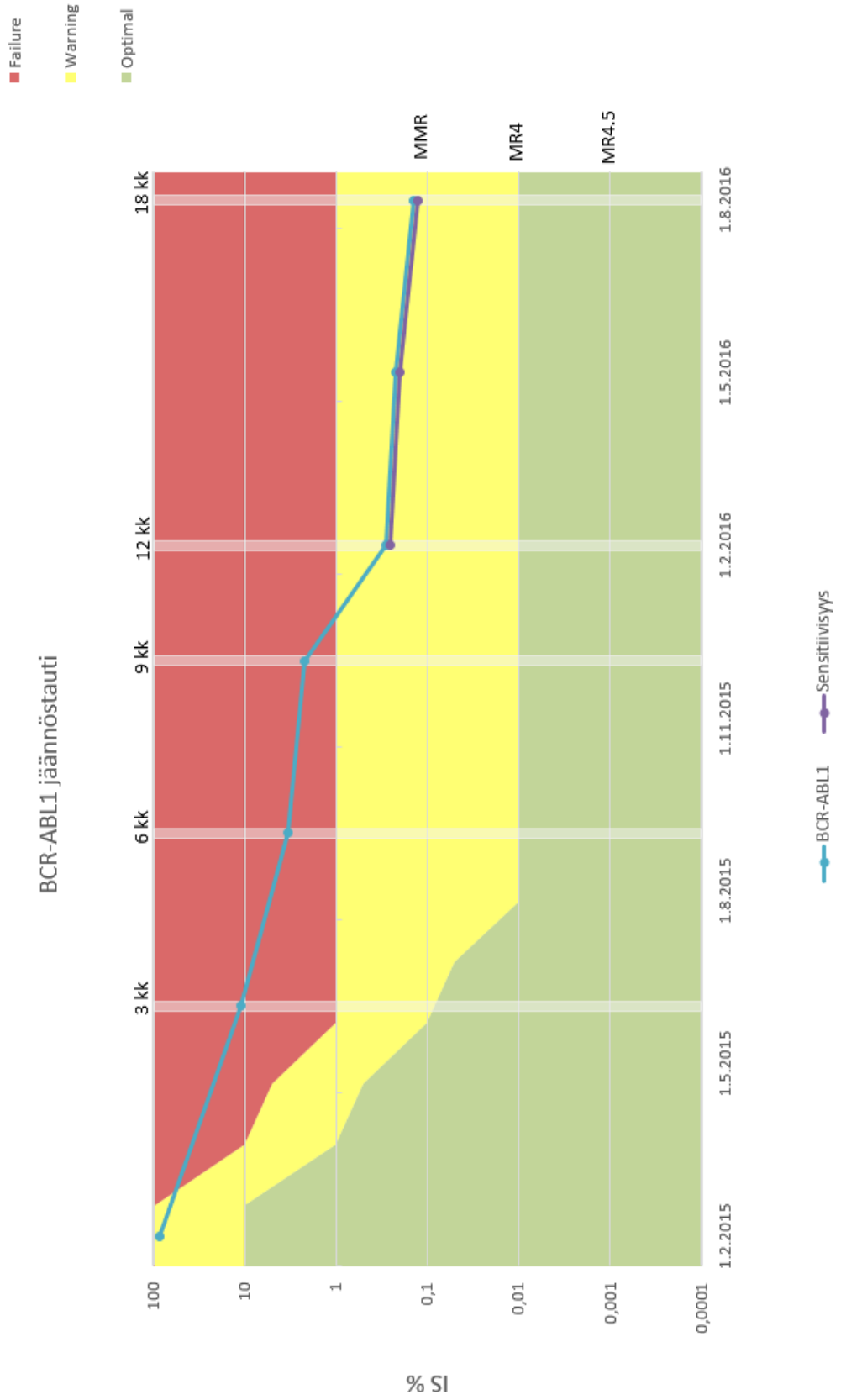
Potilas 3. Jäännöstautikuvaaja



Potilas 4. Tiedot jäännöstautikuvaajaa varten

Näytteenottopvm	MRD suht. GUS % (Jäännöstauti)	Sensitiivisyys %
26.2.2015	86,3	
15.6.2015	11,1	
21.9.2015	3,4	
14.12.2015	2,2	
11.2.2016	0,28	0,2511886
27.5.2016	0,22	0,1995262
29.8.2016	0,14	0,1258925

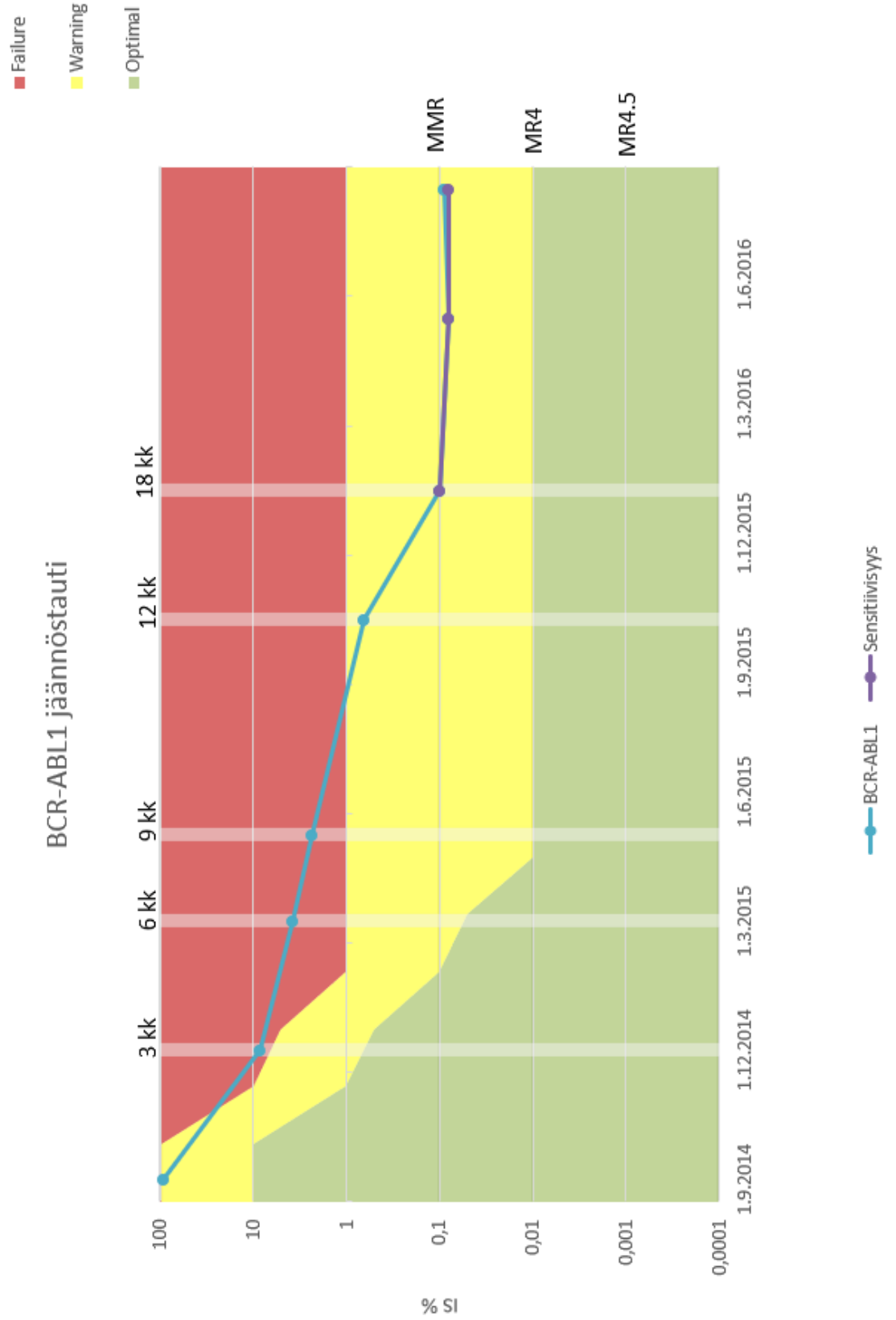
Potilas 4. Jännöstautikuvaaja



Potilas 5. Tiedot jäännöstautikuvaajaa varten

Näytteenottopvm	MRD suht. GUS % (Jäännöstauti)	Sensitiivisyys %
1.9.2014	91,1	
11.12.2014	8,3	
3.3.2015	3,7	
21.5.2015	2,3	
26.10.2015	0,65	
27.1.2016	0,1	0,1
23.5.2016	0,08	0,079432823
29.8.2016	0,089	0,079432823

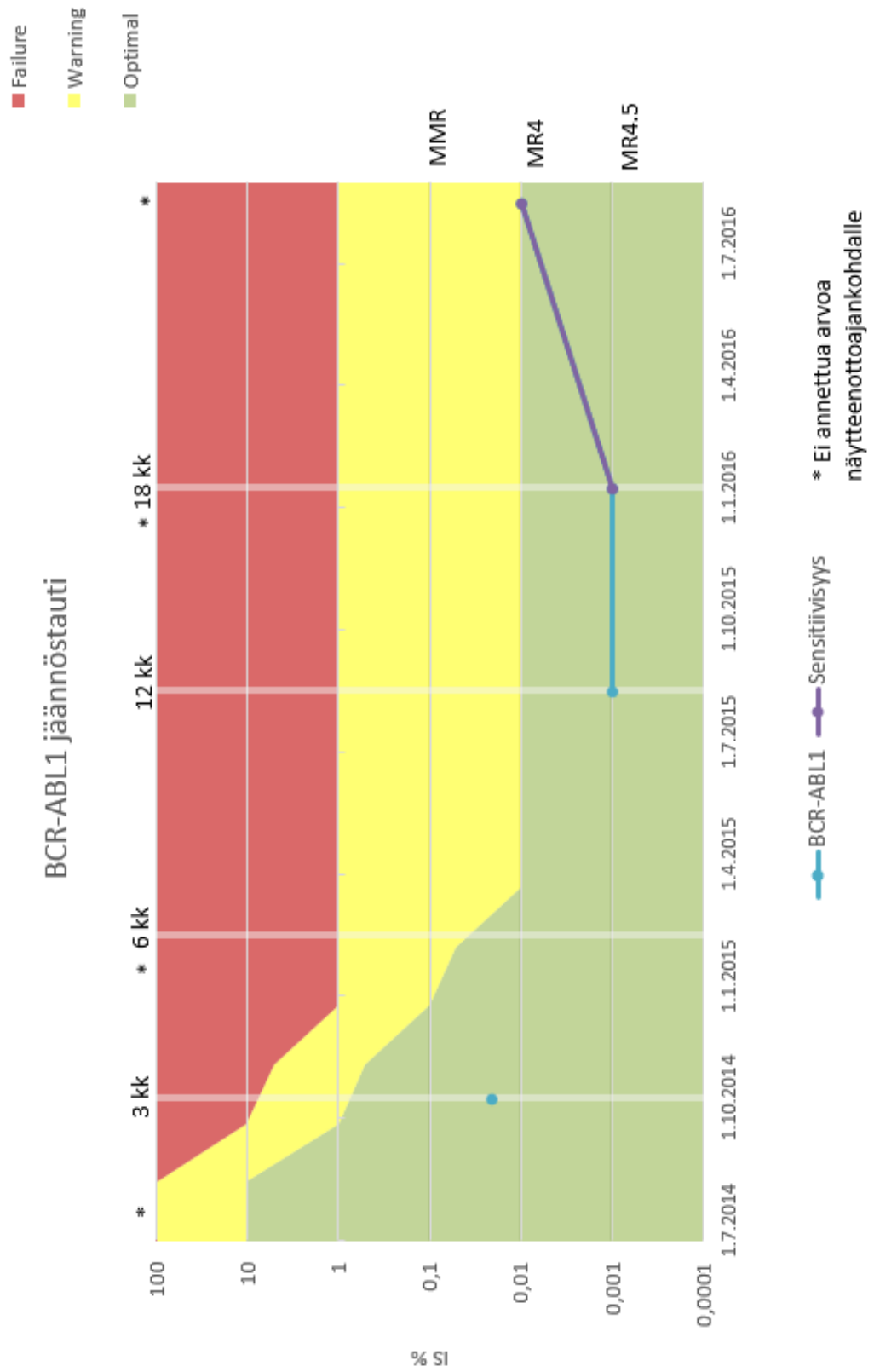
Potilas 5. Jännöstautikuvaaja



Potilas 6. Tiedot jäännöstautikuvaajaa varten

Näytteenottopvm	MRD suht. GUS % (Jäännöstauti)	Sensitiivisyys %
18.7.2014		
22.10.2014	0,02	
2.2.2015		
24.8.2015	0,001	
29.1.2016		0,001
16.8.2016		0,01

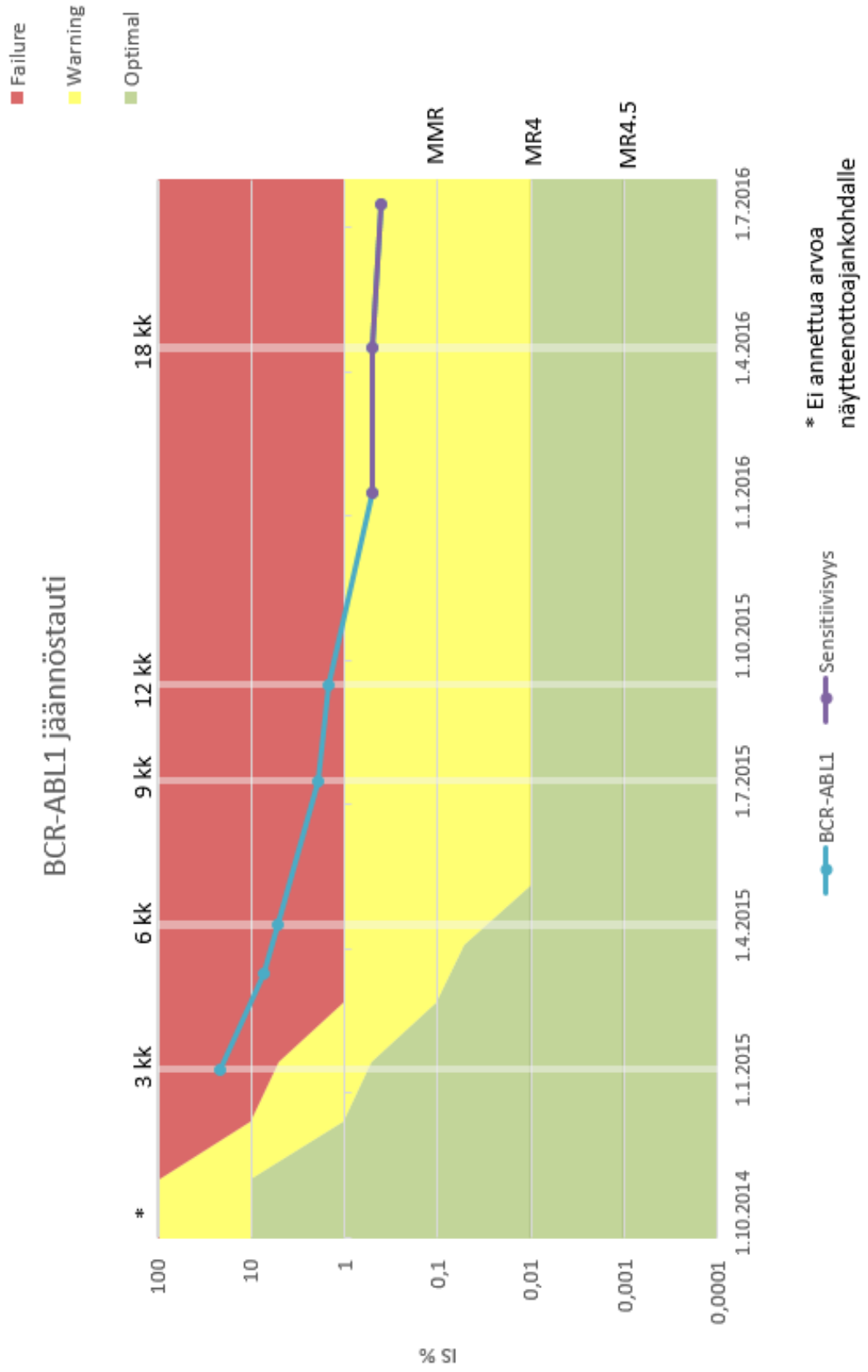
Potilas 6. Jännöstautikuvaaja



Potilas 7. Tiedot jäännöstautikuvaajaa varten

Näytteenottopvm	MRD suht. GUS % (Jäännöstauti)	Sensitiivisyys %
14.10.2014		
12.1.2015	22	
6.3.2015	7,4	
9.4.2015	5,1	
15.7.2015	1,9	
21.9.2015	1,5	
12.1.2016	0,47	0,501187234
11.4.2016	0,46	0,501187234
25.7.2016	0,39	0,398107171

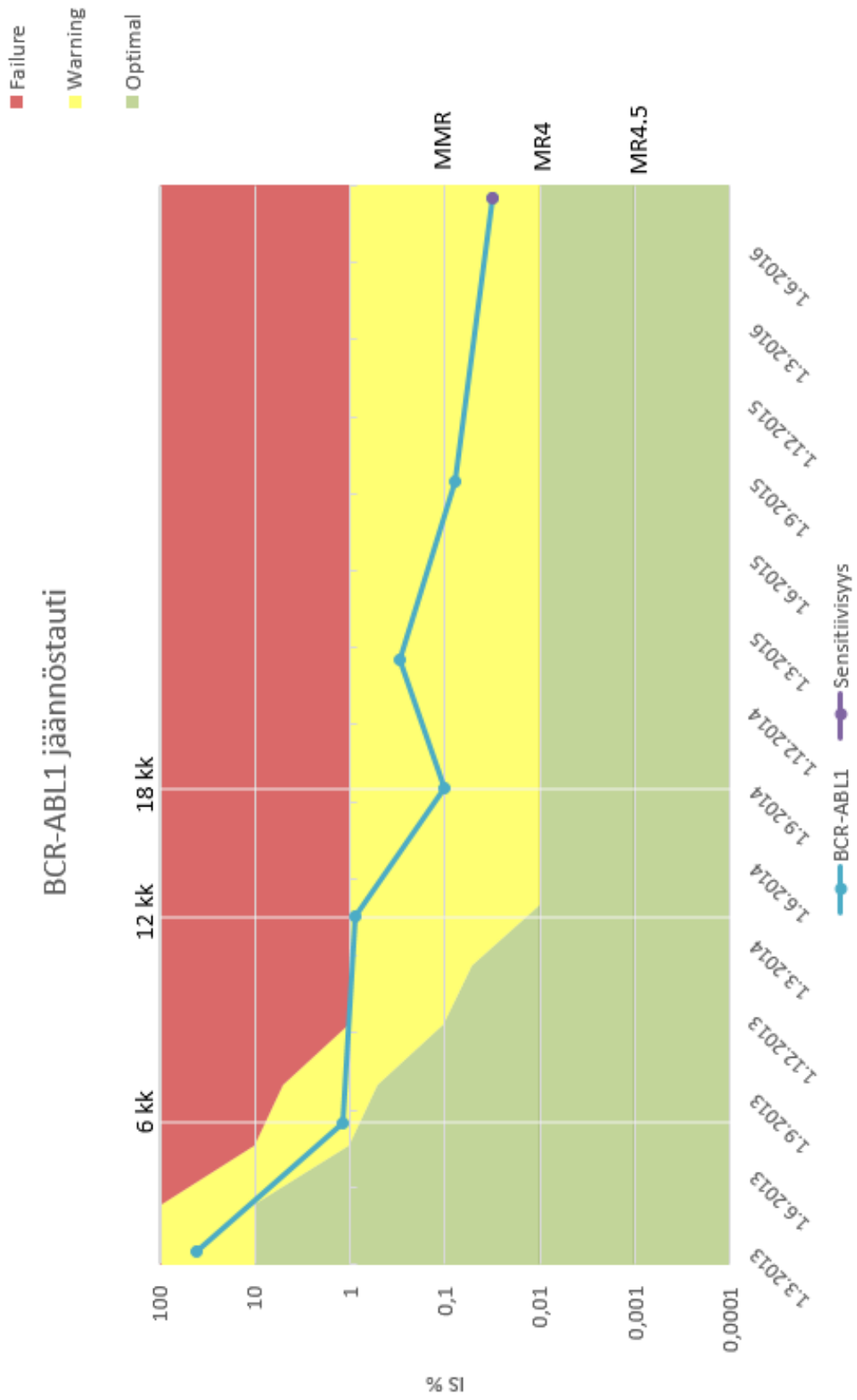
Potilas 7. Jännöstautikuvaaja



Potilas 8. Tiedot jäännöstautikuvaajaa varten

Näytteenottopvm	MRD suht. GUS % (Jäännöstauti)	Sensitiivisyys %
12.3.2013	42,1	
14.8.2013	1,2	
2.4.2014	0,88	
15.9.2014	0,1	
18.2.2015	0,3	
7.9.2015	0,08	
11.8.2016	0,03	0,031622777

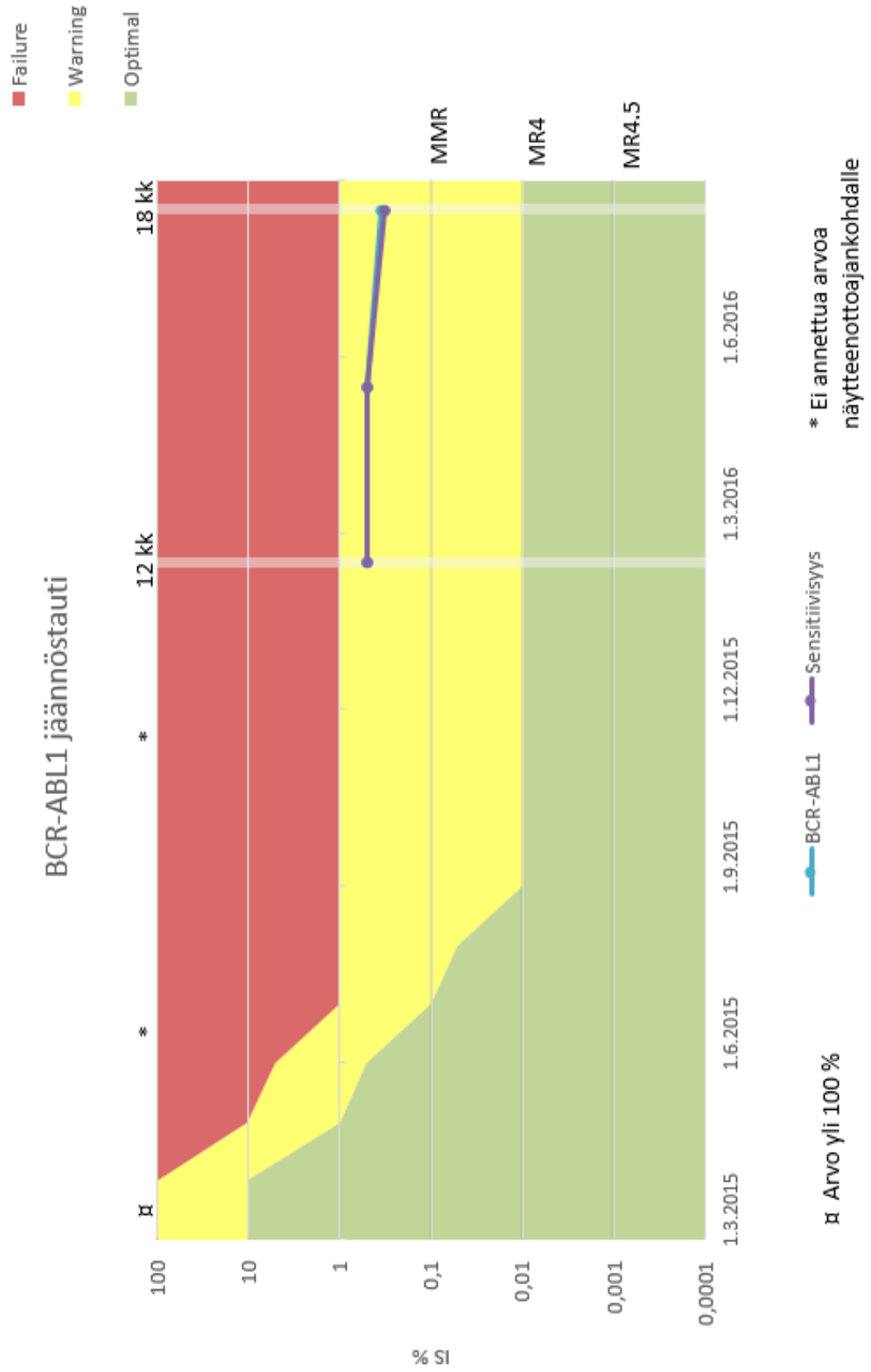
Potilas 8. Jännöstautikuvaaja



Potilas 9. Tiedot jäännöstautikuvaajaa varten

Näytteenottopvm	MRD suht. GUS % (Jäännöstauti)	Sensitiivisyys %
30.3.2015	1147,14	
15.6.2015		
11.11.2015		
15.2.2016	0,5	0,501187234
18.5.2016	0,5	0,501187234
3.8.2016	0,35	0,316227766

Potilas 9. Jännöstautikuvaaja



Potilas 10. Tiedot jäännöstautikuvaajaa varten

Näytteenottopvm	MRD suht. GUS % (Jäännöstauti)	Sensitiivisyys %
19.1.2011	0,36	
5.4.2011	0,4	
21.4.2011	0,17	
2.8.2011	0,4	
24.10.2011		
2.1.2012	0,31	
26.1.2012	0,02	
3.4.2012	0,02	
23.8.2012	0,15	
12.10.2012	0,18	
15.1.2013	0,14	
14.3.2013	0,33	
4.4.2013	0,23	
17.7.2013	0,31	
9.9.2013	0,12	
21.10.2013	0,17	
5.2.2014	0,29	
29.4.2014	0,51	
4.11.2014	0,24	
18.5.2015	0,54	
1.12.2015	0,025	
9.6.2016	0,04	0,039810717

Potilas 10. Jännöstautikuvaaja

