

Ewelina Gowin¹ , Danuta Januszkiewicz-Lewandowska²

¹Chair and Department of Health Promotion, Poznan University of Medical Sciences, Poznan

²Department of Oncology, Hematology and Pediatric Transplantology, Poznan University of Medical Sciences, Poznan

TP53 mutation in children with therapy-related myelodysplastic syndrome/acute myeloid leukemia after rhabdomyosarcoma treatment

Abstract

After successful treatment of childhood malignancy, development of second malignancy (SM) is the most devastating and potentially life-threatening sequelae of it. In the past 12 years there have been no cases of therapy-related myelodysplastic syndrome/acute myeloid leukemia (t-MDS/AML) among 80 children treated for soft tissue sarcomas (STS) in the Department of Paediatric Oncology, Haematology, and Bone Marrow Transplantation. Given the rarity of recognition of t-MDS/AML in children after treatment of cancers, it was decided to analyse in detail the therapy and cytogenetic and molecular results in two boys aged 9 and 10 years old, diagnosed with t-MDS/AML secondary to rhabdomyosarcoma. In both of them TP53 mutation was found.

Palliat Med Pract 2020; 14, 1: 58–62

Key words: acute myeloid leukaemia, children, myelodysplastic syndrome, rhabdomyosarcoma, TP53 mutation.

Introduction

After successful treatment of childhood malignancy, development of second malignancy (SM) is the most devastating and potentially life-threatening sequelae of it. Intensive multimodal therapy including chemotherapy and radiotherapy is necessary to cure the patients, but it increases risk of second malignancy in survivors of childhood malignancy [1].

Myelodysplastic syndrome (MDS) is a clonal disorder causing ineffective haematopoiesis, often leading to acute myeloid leukaemia (AML) [2, 3]. Minimal diagnostic criteria for MDS are at least two of the following: cytopaenia, morphologic myelodysplasia

(present in two different myeloid cell lines or exceeding 10% in a single cell line), acquired clonal cytogenetic abnormality in haematopoietic cells, and blasts increased $\geq 5\%$. Secondary MDS refers to MDS following neoplasms or bone marrow failure and MDS in familial diseases. Other cases of MDS are classified as primary.

According to 2016 WHO Criteria of classifications of myelodysplastic syndromes there are nine subtypes: MDS with single lineage dysplasia, MDS with ring sideroblasts (MDS-RS), MDS-RS and single lineage dysplasia, MDS-RS and multilineage dysplasia, MDS with multilineage dysplasia, MDS with excess blasts, MDS with isolated del(5q), MDS unclassifiable, and refractory cytopaenia of childhood [4–6]. Refractory

Address for correspondence:

Ewelina Gowin

Chair and Department of Health Promotion Poznan University of Medical Sciences

ul. Świącickiego 6, 60-781 Poznan, Poland

e-mail: ewego@poczta.onet.pl



Palliative Medicine in Practice 2020; 14, 1, 58–62

Copyright © Via Medica, ISSN 2545–0425

DOI: 10.5603/PMPI.2020.0007

cytopenia of childhood (RCC), being the most common subtype of paediatric MDS, is characterised by hypocellular bone marrow, absence of chromosomal aberrations, and low risk of progression.

Therapy-related myelodysplastic syndrome (t-MDS) or therapy-related acute myeloid leukaemia (t-AML) was recognised in the 1980s as a result of somatic mutation in haematopoietic stem and progenitor cells induced by cytotoxic therapy. Diagnosis of t-MDS is based on the presence of typical cytogenetic abnormalities, which appear at least six months after introduction of leukaemogenic therapy. The incidence of t-MDS/AML ranges from 0.8% to 6.3% of all children receiving chemotherapy. The incidence of t-MDS in the UK is 0.8 per million children, and 7–18% of all MDS in children is therapy related [1, 3]. The median time to development of t-MDS is 3–5 years after exposure to cytotoxic therapy [7–9]. Therapy-related risk factors include exposure to alkylating agents, topoisomerase II inhibitors, and radiation therapy.

In the past 12 years there have been no cases of t-MDS/AML among 80 children treated for soft tissue sarcomas in the Department of Paediatric Oncology, Haematology, and Bone Marrow Transplantation. Given the rarity recognition of t-MDS/AML in children after treatment of cancers, we decided to analyse in detail the therapy and cytogenetic and molecular results in two boys aged 9 and 10 years old, diagnosed with t-MDS/AML secondary to rhabdomyosarcoma. In both of them TP53 mutation was found.

Case series

Patient 1

A 10-year-old boy was diagnosed with embryonal RMS of the right cheek in March 2008. Two weeks before the diagnosis there was an injury of this region and it caused swelling in the right orbital and temporal area. Because of reported pain and jaw abduction difficulties, a tumour was suspected, and a biopsy was taken, which confirmed the diagnosis of embryonal RMS. The patient was stratified as high risk due to the infiltration of meninges in the tumour localisation. No other localisation of disease was found in radiological examinations. The patient received chemotherapy according to CWS-2002. In the meantime, he underwent complete resection, radiotherapy with a dose of 54 Gy. He ended the therapy in October 2008. In January 2011, due to persistent anaemia and thrombocytopenia, bone marrow biopsy was taken and t-MDS was diagnosed (16% of myeloblasts with immunophenotype: CD117+, CD34+, CD33+, CD13+, HLA-DR+). The FISH confirmed monosomy of chromosome 7. The boy was qualified for allogeneic

HSCT. Due to the lack of a matched, related donor, MUD was searched. Another bone marrow puncture revealed a transformation of t-MDS into t-AML (27% of myeloblasts). The boy started treatment according to protocol AML-BFM 2004 INTERIM. After the first block of chemotherapy (AIE) there was no reduction of leukaemic blasts in the bone marrow. He received another chemotherapy cycle (HAM), followed by a profound neutropenia complicated by *Streptococcus mitis* sepsis. The patient died due to dysfunction of multiple organs (eight months after t-MDS and 3.5 years after RMS diagnosis).

Patient 2

A nine-year-old boy was diagnosed in February 2007 with a soft tissue tumour located in the right femoral region. Radiological tests (MRI) revealed metastases in lymph nodes in the pelvis. Histological sections from tumour biopsy revealed alveolar rhabdomyosarcoma. Therapy according to CWS-2002 was started. Subsequently the surgery was performed, and because of lack of complete resection it was decided to continue treatment according to the second-line chemotherapy of CWS-2002. Then the patient received radiotherapy with dose of 54 Gy of the affected area and full courses of maintenance therapy. In February 2009, four months after the end of treatment, relapse of the tumour in the primary localisation was clinically diagnosed and radiologically confirmed. The patient received second-line chemotherapy according to CWS-2006. Treatment was completed in August 2009. Two months later, a routine blood examination revealed hyperleukocytosis with accompanying anaemia and thrombocytopenia. Hepatosplenomegaly was also observed. Bone marrow aspiration was taken, and refractory anaemia with excess blasts was diagnosed. One month later the bone marrow aspiration revealed transformation to leukaemia with approximately 30% of myeloblasts with immunophenotype: CD117+, CD34+, HLA-DR+, CD33+, CD13+, CD11b+, CD15-. Cytogenetic analysis revealed complex karyotype, including abnormalities of chromosomes 7 and 5. At the same time, not only t-MDS/AML but also the second relapse of RMS in the lymph nodes of the pelvis was diagnosed. Intensive treatment with IDA-FLAG and FLAG protocols was introduced, complicated by fungal pneumonia. Another bone marrow biopsy revealed 35% of myeloblasts, and the progression of AML was diagnosed. The patient died in April 2010, five months after AML and three years and two months after RMS diagnosis.

The detailed data concerning cumulative doses of the chemotherapeutic drugs given due to RMS to each patient are presented in Table 1, and the

Table 1. Cumulative doses of the chemotherapeutic drugs given due to rhabdomyosarcoma to each patient

Chemotherapeutic agent	Patient 1	Patient 2
Alkylating agents		
Cyclophosphamide [mg/m ²]	–	1 000
Iphosphamide [mg/m ²]	54 000	54 000
Trophosphamide [mg/m ²]	–	12 000
Temozolomide [mg/m ²]	–	–
Anthracyclines		
Doxorubicin [mg/m ²]	320	160
Idarubicin [mg/m ²]	–	80
Inhibitors of topoisomerase I		
Topotecan [mg/m ²]	–	28
Irinotecan [mg/m ²]	–	65
Inhibitors of topoisomerase I		
Etoposide (i.v.) [mg/m ²]	–	3 600
Etoposide (p.o.) [mg/m ²]	–	2 000
Peptide antibiotics		
Actinomycin [mg/m ²]	7.5	3
Platinum-based agents		
Carboplatin [mg/m ²]	–	6 600
Vinca alkaloids		
Vincristine [mg/m ²]	19.5	16.5

Table 2. Cytogenetic and molecular analyses in bone marrow cells of both patients with t-MDS/AML

	Patient 1	Patient 2
Karyotype	46,XY,-7 [20]	46,XY,del(5)(q31),-del(7)(?:p14.q21::?) [15]/46,XY,der(7)(?:p14.q21::?) [5]
BCR/ABL1	Negative	Negative
del 7 q	Positive (in 90% nucleus)	Positive (in 90% nucleus)
del 5q	Negative	Positive (in 50% nucleus)
MLL rearrangement	Negative	Negative
FLT3 ITD.	Negative	Negative
JAK2	Negative	Negative
TP53 mutation	c.626G->C (exon 6)	c.404G->C (exon 5)

cytogenetic and molecular analyses of both boys are shown in Table 2.

Discussion

The toxic effect of chemotherapy is regarded as the main t-MDS/AML causing factor. Metabolically active bone marrow is more prone than other tissues to the carcinogenic effect of the treatment [3]. Myelodysplastic syndrome is frequently diagnosed in therapy-related disease because most patients are followed thoroughly after intensive treatment, in de novo AML such information is often lacking [11]. Both patients received alkylating agents, the second one in combination with topoisomerase II inhibitors. In adult patients, the course of MDS depends on the chemotherapeutics used. After exposure to alkylating agents MDS occurs in the next 4–7 years, appearing as cytopaenia, and abnormalities in chromosome 5 are detected. In t-MDS/AML that develops after topoisomerase II inhibitors, the myelodysplastic stage is often absent, the first symptom is AML, the latency period lasts 2–3 years, and balanced translocations 11q23 or 21q22 are detected [7]. Such differences are not observed in children.

The toxicity of used drugs is dose dependent, but threshold doses are difficult to define. It is also difficult to collect a homogenic group of patients because t-MDS/AML is a rare condition, developed on a background of different diseases. Patients usually receive combined chemotherapy, with additional radiotherapy. Bhatia et al., based on retrospective analysis of 578 patients with Ewing sarcoma, observed higher risk of t-MDS/AML, with an increasing total dose of ifosfamide from 90 g/m² to 140 g/m², cyclophosphamide from 9.6 to 17.6 g/m², and doxorubicin from 375 to 450 mg/m² [8–9].

Radiotherapy is the next identified risk factor for t-MDS/AML that is present in both patients. A potent, dose-dependent effect of radiotherapy on t-MDS/AML development has not been proven. Since common use of alkylating drugs, the sole effect of radiotherapy is difficult to assess. Sans-Sabrafen et al., based on an analysis of patients with t-MDS after therapy of solid tumour, did not found a role for radiotherapy in the risk of t-MDS [12].

Both patients in the treatment protocol received G-CSF. Short courses of haematopoietic cytokines during intensive chemotherapy may also predispose to t-MDS/AML development [10]. The mechanism of this action is not clear. G-CSF may protect myeloid stem cells that undergone lethal mutations and allow them to undergo malignant transformation and proliferation.

The cytogenetic results are the strongest prognostic factor for t-MDS/AML. Any changes in chromosome 7 or complex karyotype abnormalities are related to poor

prognosis, while detection of 5q-, 20q-, and Y- gives a more positive prognosis [3, 13]. TP53 mutation is a first and important step towards tumourigenesis, but molecular mechanisms triggering the development of overt malignant tumours are complex [14–16]. According to Andersen et al. there are eight genetic pathways leading to leukemogenesis [2, 14]. In pathway II, closely associated with exposure to alkylating agents, the mechanism is based on centromeric breakage [14]. One of patients represents pathway II with 5q-/-5b abnormalities, induced by alkylating agents, which gave a poor prognosis [4, 17]. Unbalanced abnormalities in chromosomes 5 and 7, detected in our patients, are more common in secondary MDS compared with de novo MDS. Unbalanced 5q-/-5, 7q-/-7, and +8 mutations are detected in 50–70% of t-MDS and 40–50% of t-MDS/AML cases [17]. Multiple genes on 5q31.2 and 7q contribute to t-MDS/AML by haploinsufficiency. Chromosome 7 abnormalities are associated with mutations in CDKN2B and RUNX1, and chromosome 5 abnormalities are associated with mutations of TP53.

Mutations of the tumour suppressor gene TP53 are the most frequent single abnormality in t-MDS or t-AML. In patients with de novo MDS and AML TP53 mutations are detected in less than 10% of patients [1]. Pedersen-Bjergaard et al. observed mutations of TP53 in 27% of patients with t-MDS or t-AML [2]. Mutations in TP53 are also detected in about 5% of sarcomas [18–20]. Sarcomas are the second most common tumours detected in that group of patients and together with breast cancer constitute 50% of tumours detected in patients with germline TP53 mutations. Up to 30% of children carrying a TP53 germline mutation will suffer from cancer [21]. In our patients, there was no increased incidence of cancer in the family, which may exclude the suspicion of Li-Fraumeni syndrome.

Most TP53 mutations are missense localised at DNA binding domain, caused by single amino-acid changes [18]. Both detected mutations in our patients were inactive, but their localisation on the DNA binding domain reflects their involvement in transcription regulation and DNA replication, according to the database of TP53 mutations: http://p53.fr/TP53_database_download/TP53_tumor_database/tumor_database.html These mutations are typical in t-MDS/AML after treatment with alkylating agents as well as after topoisomerase II inhibitors. Both TP53 mutations found in our patients included a transversion from G to C, which is more often described in STS. Our analysis was retrospective, carried out on bone marrow cells during the t-MDS diagnosis. So, the major difficulty is the lack of knowledge of whether the TP53 mutation was constitutional (meaning Li-Fraumeni syndrome)

or acquired-somatic, which is common in treatment-induced malignancies. The coincidence of STS in childhood and undetermined-origin TP53 mutation can fulfil the LFS criteria, but family history is not confirmative. Analysis in parents should be performed, but wild-type status of TP53 does not exclude de novo mutation in offspring.

Conclusions

In the presented patients, secondary malignancies were detected almost three years after the introduction of chemotherapy of RMS. This is in accordance with the literature [1, 2]. In the second patient, t-MDS was diagnosed simultaneously with relapse of primary disease. Such a finding worsens the prognosis due to the need for further exposure to toxic chemotherapy. Kobos et al., in a group of 18 patients with t-MDS, observed seven patients with relapse at the moment of t-MDS diagnosis [22]. All patients required further cycles of chemotherapy. The poor outcome in the presented patients illustrates how severe t-MDS is. The European Group for Blood and Marrow Transplant reported 35% of three-year survival in patients with t-MDS [22]. An up-front HSCT is recommended in t-MDS, but the choice of conditioning regimen and the role of cytoreductive therapies are not established. To define the optimal treatment regimen Kobos et al. analysed 21 patients with t-MDS [22]. Induction with a high dose of cytarabine or HSCT with BU-MEL-FLU in cytoreduction decreases toxicity without increasing relapse risk. In paediatric settings, the EWOG-MDS recommendations are different [22–25]. Unfortunately, the patients failed to perform HSCT. Each year standard chemotherapy treatment is given to many patients, but only a few develop t-MDS/AML; thus, genetic factors may play a role [26]. Identification of patients with high risk of developing t-MDS/AML before chemotherapy enables optimal treatment and careful follow-up.

Conflict of interests

Authors declare no conflict of interest.

Funding

This study has no funding.

No identifiable information about the patients are included in the paper.

References

1. Hijjiya N, Ness KK, Ribeiro RC, et al. Acute leukemia as a secondary malignancy in children and adolescents: current findings and issues. *Cancer*. 2009; 115(1): 23–35, doi: [10.1002/cncr.23988](https://doi.org/10.1002/cncr.23988), indexed in Pubmed: [19072983](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19072983/).

2. Pedersen-Bjergaard J, Andersen MK, Christiansen DH. Therapy-related acute myeloid leukemia and myelodysplasia after high-dose chemotherapy and autologous stem cell transplantation. *Blood*. 2000; 95(11): 3273–3279, indexed in Pubmed: [10828005](#).
3. Pedersen-Bjergaard J, Andersen MK, Andersen MT, et al. Genetic pathways in therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Blood*. 2002; 99(6): 1909–1912, doi: [10.1182/blood.v99.6.1909](#), indexed in Pubmed: [11877259](#).
4. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016; 127(20): 2391–2405, doi: [10.1182/blood-2016-03-643544](#), indexed in Pubmed: [27069254](#).
5. Hasle H. Myelodysplastic and myeloproliferative disorders of childhood. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2016; 2016(1): 598–604, doi: [10.1182/asheducation-2016.1.598](#), indexed in Pubmed: [27913534](#).
6. Hong M, He G. The 2016 Revision to the World Health Organization Classification of Myelodysplastic Syndromes. *J Transl Int Med*. 2017; 5(3): 139–143, doi: [10.1515/jtim-2017-0002](#), indexed in Pubmed: [29085786](#).
7. Ogasawara T, Yasuyama M, Kawauchi K. Therapy-related myelodysplastic syndrome with monosomy 5 after successful treatment of acute myeloid leukemia (M2). *Am J Hematol*. 2005; 79(2): 136–141, doi: [10.1002/ajh.20329](#), indexed in Pubmed: [15929101](#).
8. Navid F, Billups C. Second Cancers in patients with ESFT. *Eur J Cancer*. 2008; 44: 983–991.
9. Bhatia S, Krailo MD, Chen Z, et al. Therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia after Ewing sarcoma and primitive neuroectodermal tumor of bone: A report from the Children’s Oncology Group. *Blood*. 2007; 109(1): 46–51, doi: [10.1182/blood-2006-01-023101](#), indexed in Pubmed: [16985182](#).
10. Andersen MK, Christiansen DH, Pedersen-Bjergaard J. Centromeric breakage and highly rearranged chromosome derivatives associated with mutations of TP53 are common in therapy-related MDS and AML after therapy with alkylating agents: an M-FISH study. *Genes Chromosomes Cancer*. 2005; 42(4): 358–371, doi: [10.1002/gcc.20145](#), indexed in Pubmed: [15645489](#).
11. Sans-Sabrafen J, Buxó-Costa J, Woessner S, et al. Myelodysplastic syndromes and malignant solid tumors: analysis of 21 cases. *Am J Hematol*. 1992; 41(1): 1–4, doi: [10.1002/ajh.2830410102](#), indexed in Pubmed: [1503093](#).
12. el Rouby S, Thomas A, Costin D, et al. p53 gene mutation in B-cell chronic lymphocytic leukemia is associated with drug resistance and is independent of MDR1/MDR3 gene expression. *Blood*. 1993; 82(11): 3452–3459, indexed in Pubmed: [8241511](#).
13. Andersen MK, Christiansen DH, Pedersen-Bjergaard J. Centromeric breakage and highly rearranged chromosome derivatives associated with mutations of TP53 are common in therapy-related MDS and AML after therapy with alkylating agents: an M-FISH study. *Genes Chromosomes Cancer*. 2005; 42(4): 358–371, doi: [10.1002/gcc.20145](#), indexed in Pubmed: [15645489](#).
14. Nadji M, Meng L, Lin L, et al. Detection of p53 gene abnormality by sequence analysis of archival paraffin tissue. A comparison with fresh-frozen specimens. *Diagn Mol Pathol*. 1996; 5(4): 279–283, doi: [10.1097/00019606-199612000-00009](#), indexed in Pubmed: [8955620](#).
15. Meng L, Lin L, Zhang H, et al. Multiple mutations of the p53 gene in human mammary carcinoma. *Mutat Res*. 1999; 435(3): 263–269, doi: [10.1016/s0921-8777\(99\)00053-1](#), indexed in Pubmed: [10606817](#).
16. Belickova M, Vesela J, Jonasova A, et al. TP53 mutation variant allele frequency is a potential predictor for clinical outcome of patients with lower-risk myelodysplastic syndromes. *Oncotarget*. 2016; 7(24): 36266–36279, doi: [10.18632/oncotarget.9200](#), indexed in Pubmed: [27167113](#).
17. Ruijs MWG, Verhoef S, Rookus MA, et al. TP53 germline mutation testing in 180 families suspected of Li-Fraumeni syndrome: mutation detection rate and relative frequency of cancers in different familial phenotypes. *J Med Genet*. 2010; 47(6): 421–428, doi: [10.1136/jmg.2009.073429](#), indexed in Pubmed: [20522432](#).
18. Seki M, Nishimura R, Yoshida K, et al. Integrated genetic and epigenetic analysis defines novel molecular subgroups in rhabdomyosarcoma. *Nat Commun*. 2015; 6: 7557, doi: [10.1038/ncomms8557](#), indexed in Pubmed: [26138366](#).
19. Hettmer S, Archer NM, Somers GR, et al. Anaplastic rhabdomyosarcoma in TP53 germline mutation carriers. *Cancer*. 2014; 120(7): 1068–1075, doi: [10.1002/cncr.28507](#), indexed in Pubmed: [24382691](#).
20. Takahashi Y, Oda Y, Kawaguchi KI, et al. Altered expression and molecular abnormalities of cell-cycle-regulatory proteins in rhabdomyosarcoma. *Mod Pathol*. 2004; 17(6): 660–669, doi: [10.1038/modpathol.3800101](#), indexed in Pubmed: [15098008](#).
21. Kobos R, Steinherz PG, Kernan NA, et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for pediatric patients with treatment-related myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2012; 18(3): 473–480, doi: [10.1016/j.bbmt.2011.11.009](#), indexed in Pubmed: [22079789](#).
22. Niemeyer CM, Kratz CP, Hasle H. Pediatric myelodysplastic syndromes. *Curr Treat Options Oncol*. 2005; 6(3): 209–214, doi: [10.1007/s11864-005-0004-3](#), indexed in Pubmed: [15869732](#).
23. Strahm B, Locatelli F, Bader P, et al. Reduced intensity conditioning in unrelated donor transplantation for refractory cytopenia in childhood. *Bone Marrow Transplant*. 2007; 40(4): 329–333, doi: [10.1038/sj.bmt.1705730](#), indexed in Pubmed: [17589538](#).
24. Welch JS, Petti AA, Miller CA, et al. TP53 and Decitabine in Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplastic Syndromes. *N Engl J Med*. 2016; 375(21): 2023–2036, doi: [10.1056/NEJMoa1605949](#), indexed in Pubmed: [27959731](#).
25. Cseh AM, Niemeyer CM, Yoshimi A, et al. Therapy with low-dose azacitidine for MDS in children and young adults: a retrospective analysis of the EWOG-MDS study group. *Br J Haematol*. 2016; 172(6): 930–936, doi: [10.1111/bjh.13915](#), indexed in Pubmed: [26766110](#).
26. Singhal D, Wee LiY, Kutyna MM, et al. The mutational burden of therapy-related myeloid neoplasms is similar to primary myelodysplastic syndrome but has a distinctive distribution. *Leukemia*. 2019; 33(12): 2842–2853, doi: [10.1038/s41375-019-0479-8](#), indexed in Pubmed: [31089247](#).

Ewelina Gowin¹ , Danuta Januszkiewicz-Lewandowska²¹Katedra i Zakład Profilaktyki Zdrowotnej, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu²Klinika Onkologii, Hematologii i Transplantologii Pediatricznej, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Mutacja TP53 u dzieci ze związanym z terapią zespołem mielodysplastycznym/ ostrą białaczką szpikową po zakończonym leczeniu mięsaka prążkowanokomórkowego

Artykuł jest tłumaczeniem pracy: Gowin E., Januszkiewicz-Lewandowska D. TP53 mutation in children with therapy-related myelodysplastic syndrome/acute myeloid leukemia after rhabdomyosarcoma treatment.

Palliat. Med. Pract. 2020 tom 14, nr 1: 58–62.

Należy cytować wersję pierwotną.

Piśmiennictwo znajduje się na stronach 61–62.

Streszczenie

Po skutecznym leczeniu nowotworu złośliwego u dzieci, rozwój wtórnego nowotworu (SM, *second malignancy*) jest najbardziej niszczącym i potencjalnie zagrażającym życiu powikłaniem. W ciągu ostatnich 12 lat nie stwierdzono przypadków związanego z leczeniem zespołu mielodysplastycznego/ostry białaczki szpikowej (t-MDS/AML) wśród 80 dzieci leczonych z powodu mięsaka tkanek miękkich (STS, *soft tissue sarcoma*) w Klinice Onkologii, Hematologii i Transplantologii Pediatricznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Ze względu na rzadkie rozpoznawanie t-MDS/AML u dzieci po skończonym leczeniu nowotworów, zdecydowano się na szczegółową analizę terapii oraz wyników badań cytogenetycznych i molekularnych u dwóch chłopców w wieku 9 i 10 lat, u których rozpoznano t-MDS/AML, wtórny do mięśniakomięsaka prążkowanego. W obu nowotworach stwierdzono mutację TP53.

Palliat Med Pract 2020; 14, 1: 63–67

Słowa kluczowe: ostra białaczka szpikowa, dzieci, zespół mielodysplastyczny, mięsak prążkowanokomórkowy, mutacja TP53

Wstęp

Po skutecznym leczeniu nowotworu złośliwego u dzieci, rozwój wtórnego nowotworu (SM, *second malignancy*) jest jego najbardziej niszczącym i potencjalnie zagrażającym życiu powikłaniem. Intensywna terapia multimodalna, obejmująca chemioterapię

i radioterapię, jest konieczna do wyleczenia pacjentów, jednakże zwiększa ryzyko wystąpienia wtórnej choroby nowotworowej u osób, które przechodziły chorobę nowotworową w dzieciństwie [1].

Zespół mielodysplastyczny (MDS, *myelodysplastic syndrome*) jest zaburzeniem klonalnym, powodującym nieskuteczną hematopoezę, często prowadzącym do

Adres do korespondencji:

Ewelina Gowin

Katedra i Zakład Profilaktyki Zdrowotnej, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

ul. Święcickiego 6, 60-781 Poznań

e-mail: ewego@poczta.onet.pl



Palliative Medicine in Practice 2020; 14, 1, 63–67

Copyright © Via Medica, ISSN 2545–0425

ostrej białaczki szpikowej (AML, *acute myeloid leukemia*) [2, 3]. Istnieją co najmniej dwa minimalne kryteria diagnostyczne dla MDS: niedobór krwinek, (morfologiczna) mielodysplazja (obecna w dwóch różnych liniach komórek szpikowych lub przekraczająca 10% w jednej linii komórkowej), nabyta klonalna nieprawidłowość cytogenetyczna w komórkach krwiotwórczych, zwiększona liczba blastów $\geq 5\%$. Wtórny MDS odnosi się do MDS następującym po nowotworach lub niewydolności szpiku kostnego oraz MDS w chorobach rodzinnych. Inne przypadki MDS klasyfikowane są jako pierwotne.

Zgodnie z kryteriami klasyfikacji zespołów mielodysplastycznych Światowej Organizacji Zdrowia (WHO, *World Health Organization*) z 2016 roku istnieje dziewięć podtypów: MDS z dysplazją jednoliniową, MDS z syderoblastami pierścieniowatymi (MDS-RS), MDS-RS i dysplazja jednoliniowa, MDS-RS i dysplazja wieloliniowa, MDS z dysplazją wieloliniową, MDS z nadmiarem blastów, MDS z izolowanym del(5q), MDS nieklasyfikowalny oraz oporna cytopenia dziecięca [4–6]. Oporna cytopenia dziecięca (RCC, *refractory cytopenia of childhood*), będąca najczęstszym podtypem dziecięcego MDS, charakteryzuje się hipokomórkowym szpikiem kostnym, brakiem aberracji chromosomowych i niskim ryzykiem progresji.

Zespół mielodysplastyczny związany z terapią (t-MDS) lub ostra białaczka szpikowa związana z terapią (t-AML) rozpoznano w latach 80. XX wieku w wyniku mutacji somatycznej zachodzącej w komórkach macierzystych i progenitorowych hemopoezy, wywołanej terapią cytotoksyczną. Rozpoznanie t-MDS oparte jest na stwierdzeniu obecności typowych nieprawidłowości cytogenetycznych, które pojawiają się co najmniej 6 miesięcy po wprowadzeniu terapii skutecznej w białaczce. Zachorowalność na t-MDS/AML wynosi 0,8–6,3% u wszystkich dzieci poddawanych chemioterapii. Zachorowalność na t-MDS w Wielkiej Brytanii wynosi 0,8 na milion dzieci, a 7–18% wszystkich przypadków MDS u dzieci ma związek z terapią [1, 3]. Mediana czasu rozwoju t-MDS wynosi 3–5 lat po ekspozycji na terapię cytotoksyczną [7–9]. Czynniki ryzyka związane z terapią obejmują ekspozycję na środki alkilujące, inhibitory topoizomerazy II oraz radioterapię.

W ciągu ostatnich 12 lat nie odnotowano przypadków t-MDS/AML wśród 80 dzieci leczonych z powodu mięsaka tkanek miękkich w Klinice Onkologii, Hematologii i Transplantologii Pediatrycznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Ze względu na rzadkie rozpoznawanie t-MDS/AML u dzieci po skończonym leczeniu nowotworów, zdecydowano się na szczegółową analizę terapii oraz wyników badań cytogenetycznych i molekularnych u dwóch chłopców w wieku 9 i 10 lat, u których rozpoznano t-MDS/AML, wtórny

do mięśniakomięsaka prążkowanego. W obu nowotworach stwierdzono mutację *TP53*.

Opis przypadków

Pacjent 1

W marcu 2008 roku, u 10-letniego chłopca rozpoznano zarodkowego mięsaka prążkowanokomórkowego (RMS, *rhabdomyosarcoma*) prawego policzka. Na dwa tygodnie przed postawieniem diagnozy doszło do urazu tej okolicy, który spowodował obrzęk w prawym obszarze oczodołu i skroni. Z powodu zgłaszanych dolegliwości bólowych i trudności z odwodzeniem szczęki, podejrzewano nowotwór i wykonano biopsję, która potwierdziła rozpoznanie zarodkowego RMS. Pacjenta zakwalifikowano do grupy wysokiego ryzyka z powodu infiltracji opon mózgowych w miejscu nowotworu. W badaniach radiologicznych nie stwierdzono innej lokalizacji choroby. Pacjenta poddano chemioterapii zgodnie z CWS-2002. W międzyczasie przeszedł on całkowitą resekcję, radioterapię z dawką o wartości 54 Gy. Terapię zakończył w październiku 2008 roku. W styczniu 2011 roku z powodu utrzymującej się niedokrwistości i małopłytkowości wykonano biopsję szpiku kostnego i rozpoznano t-MDS (16% mieloblastów z immunofenotypem): CD117+, CD34+, CD33+, CD13+, HLA-DR+). Fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (FISH, *fluorescent in situ hybridization*) potwierdziła monosomię chromosomu 7. Chłopca zakwalifikowano do allogenicznego przeszczepienia szpiku kostnego (HSCT, *hematopoietic stem cell transplantation*). Ze względu na brak zgodnego dawcy spokrewnionego, zgodny dawca niespokrewniony był poszukiwany. Kolejne nakłucie szpiku kostnego ujawniło przekształcenie t-MDS w t-AML (27% mieloblastów). Chłopiec rozpoczął leczenie zgodnie ze schematem postępowania AML-BFM 2004 INTERIM. Po pierwszej chemioterapii blokowej (AIE) nie nastąpiła redukcja blastów białaczkowych w szpiku kostnym. Pacjenta poddano kolejnemu cyklowi chemioterapii (HAM), po którym nastąpiła głęboka neutropenia powikłana *Streptococcus mitis sepsis*. Pacjent zmarł z powodu niewydolności wielonarządowej (8 miesięcy po t-MDS i 3,5 roku po rozpoznaniu RMS).

Pacjent 2

W lutym 2007 roku, u 9-letniego chłopca rozpoznano nowotwór tkanki miękkiej w prawej części udowej. Badania radiologiczne (MRI) wykazały przerzuty do węzłów chłonnych w miednicy. Wycinki histologiczne z biopsji nowotworu wykazały mięsaka pęcherzykowego. Rozpoczęto terapię zgodnie z CWS-2002. Następnie wykonano operację. Z powodu braku całkowitej resekcji zdecydowano o kontynuowaniu

leczenia zgodnie z drugą linią chemioterapii — CWS-2002. Pacjent został poddany następnie radioterapii w dawce o wartości 54 Gy dla obszaru dotkniętego chorobą oraz przeszedł pełne serie terapii podtrzymującej. W lutym 2009 roku, 4 miesiące po zakończeniu leczenia, rozpoznano klinicznie i potwierdzono radiologicznie nawrót nowotworu w pierwotnej lokalizacji. Pacjenta poddano chemioterapii drugiej linii zgodnie z CWS-2006. Leczenie zakończono w sierpniu 2009 roku. Dwa miesiące później rutynowe badanie krwi wykazało hiperleukocytozę z towarzyszącą jej niedokrwistością i małopłytkowością. Zaobserwowano również hepatosplenomegalię. Dokonano aspiracji szpiku kostnego i rozpoznano oporną anemię z nadmiarem blastów. Miesiąc później aspiracja szpiku kostnego wykazała przemianę w białaczkę z ilością około 30% mieloblastów z immunofenotypem: CD117+, CD34+, HLA-DR+, CD33+, CD13+, CD11b+, CD15-. Analiza cytogenetyczna wykazała złożony kariotyp, w tym nieprawidłowości chromosomu 7 i 5. W tym samym czasie rozpoznano nie tylko t-MDS/AML, ale również drugi nawrót RMS w węzłach chłonnych miednicy. Wprowadzono intensywne leczenie zgodnie ze schematem postępowania IDA-FLAG i FLAG, skomplikowane z powodu grzybiczego zapalenia płuc. Kolejna biopsja szpiku kostnego wykazała 35% mieloblastów oraz stwierdzono progresję ostrej białaczki szpikowej (AML, *acute myeloid leukemia*) Pacjent zmarł w kwietniu 2010 roku, 5 miesięcy po AML oraz 3 lata i 2 miesiące po rozpoznaniu RMS.

Szczegółowe dane dotyczące skumulowanych dawek leków chemioterapeutycznych, podawanych z powodu RMS każdemu pacjentowi przedstawiono w tabeli 1, natomiast analizy cytogenetyczne i molekularne obu chłopców przedstawiono w tabeli 2.

Dyskusja

Toksyczny efekt chemioterapii jest uznawany za główny czynnik powodujący t-MDS/AML. Aktywny metabolicznie szpik kostny jest bardziej podatny na rakotwórcze działanie leczenia niż inne tkanki [3]. Zespół mielodysplastyczny jest często rozpoznawany w chorobach związanych z terapią, ponieważ większość pacjentów jest gruntownie poddawana analizie po intensywnym leczeniu, w przypadku de novo AML takich informacji często brakuje [11]. Obaj pacjenci otrzymali środki alkilujące, pacjent 2 — w połączeniu z inhibitorami topoizomerazy II. U dorosłych pacjentów przebieg MDS zależy od zastosowanych chemioterapeutyków. Po ekspozycji na środki alkilujące, MDS pojawia się w ciągu następnych 4–7 lat, występuje niedobór krwinek oraz wykrywano nieprawidłowości w chromosomie 5. W t-MDS/AML, rozwijającym po zastosowaniu

Tabela 1. Skumulowane dawki chemioterapeutyków, podawane każdemu pacjentowi cierpiącemu na mięsaka prążkowanokomórkowego

Chemioterapeutyk	Pacjent 1	Pacjent 2
Czynniki alkilujące		
Cyklofosfamid [mg/m ²]	–	1 000
Ifosfamid [mg/m ²]	54 000	54 000
Trofosfamid [mg/m ²]	–	12 000
Temozolomid [mg/m ²]	–	–
Antracykliny		
Doksorubicyna [mg/m ²]	320	160
Idarubicyna [mg/m ²]	–	80
Inhibitory topoizomerazy I		
Topotekan [mg/m ²]	–	28
Irinotecan [mg/m ²]	–	65
Inhibitory topoizomerazy I		
Etopozyd (dożylnie) [mg/m ²]	–	3 600
Etopozyd (doustnie) [mg/m ²]	–	2 000
Antybiotyki peptydowe		
Aktynomycyna [mg/m ²]	7,5	3
Związki platyny		
Karboplatyna [mg/m ²]	–	6 600
Alkaloidy Vinca		
Winkrystyna [mg/m ²]	19,5	16,5

Tabela 2. Analizy cytogenetyczne i molekularne w komórkach szpiku kostnego obu pacjentów z t-MDS/AML

	Pacjent 1	Pacjent 2
Kariotyp	46,XY,-7 [20]	46,XY,del(5)(q31),-del(7)(?:p14.q21::?)[15]/46,XY,der(7)(?:p14.q21::?)[5]
BCR/ABL1	Negatywny	Negatywny
del 7 q	Pozytywny (w 90% jądra)	Pozytywny (w 90% jądra)
del 5q	Negatywny	Pozytywny (w 50% jądra)
Rearanżacja genu MLL	Negatywny	Negatywny
FLT3 ITD.	Negatywny	Negatywny
JAK2	Negatywny	Negatywny
Mutacja genu TP53	c.626G->C (ekson 6)	c.404G->C (ekson 5)

inhibitorów topoizomerazy II, często nie występuje stadium mielodysplastyczne — pierwszym objawem

jest AML; okres utajenia trwa 2–3 lata i wykrywane są równomierne translokacje 11q23 lub 21q22 [7]. Tego typu różnice nie są obserwowane u dzieci.

Toksyczność stosowanych leków jest uzależniona od dawki, jednakże trudno jest określić dawki progu. Trudno jest również zebrać homogeniczną grupę pacjentów, ponieważ t-MDS/AML jest rzadkim schorzeniem, rozwijającym się na tle różnych chorób. Chorzy zazwyczaj zostają poddani chemioterapii skojarzonej, z dodatkową radioterapią. Na podstawie retrospektywnej analizy 578 pacjentów z mięsakiem Ewinga, Bhatia i wsp. zaobserwowali zwiększone ryzyko t-MDS/AML przy wzrastającej całkowitej dawce ifosfamidu z 90 g/m² do 140 g/m², cyklofosfamidu z 9,6 do 17,6 g/m² i doksorubicyny z 375 do 450 mg/m² [8–9].

Radioterapia jest kolejnym zidentyfikowanym czynnikiem ryzyka dla t-MDS/AML, obecnym u obu pacjentów. Nie wykazano silnego, zależnego od dawki, wpływu radioterapii na rozwój t-MDS/AML. Ze względu na powszechne stosowanie leków alkilujących, trudno jest ocenić wyłączny efekt radioterapii. Na podstawie analizy chorych z t-MDS po terapii litego guza, Sans-Sabrafen i wsp. nie wykryli roli radioterapii w ryzyku t-MDS [12].

Obaj pacjenci przyjęli G-CSF zgodnie ze schematem postępowania. Krótkie serie cytokin hemopoetycznych podczas intensywnej chemioterapii mogą również predysponować do rozwoju t-MDS/AML [10]. Mechanizm tego działania nie jest jasny. G-CSF może chronić szpikowe komórki macierzyste, które uległy śmiertelnym mutacjom, a także umożliwić ich złośliwą transformację i proliferację.

Wyniki cytogenetyczne są najsilniejszym czynnikiem prognostycznym dla t-MDS/AML. Wszelkie zmiany w chromosomie 7 lub nieprawidłowości złożonego kariotypu związane są ze złym rokowaniem, natomiast wykrycie 5q-, 20q-, Y- daje bardziej pozytywne rokowanie [3, 13]. Mutacja TP53 jest pierwszym i ważnym krokiem w kierunku rozwoju i tworzenia się nowotworu, jednak mechanizmy molekularne wyzwalające rozwój wyraźnych nowotworów złośliwych są złożone [14–16]. Według Andersena i wsp. istnieje 8 genetycznych mechanizmów prowadzących do rozwoju i tworzenia się białaczki [2, 14]. Mechanizm II jest ściśle związany z ekspozycją na środki alkilujące — mechanizm ten opiera się na centromerycznym pęknięciu [14]. Jeden z pacjentów reprezentuje mechanizm II z nieprawidłowościami 5q-/5b, indukowanymi przez środki alkilujące, co dało złe rokowanie [4, 17]. Niezrównoważone nieprawidłowości w chromosomach 5 i 7, wykrywane u naszych pacjentów, są częściej spotykane we wtórnym MDS niż *de novo* MDS. Niezrównoważone mutacje 5q-/5, 7q-/7 i +8 są wykrywane w 50–70% przy-

padkach t-MDS i w 40–50% przypadkach t-MDS/AML [17]. Wiele genów w 5q31.2 i 7q przyczynia się do t-MDS/AML poprzez haploinsuficjencję. Nieprawidłowości chromosomu 7 wiążą się z mutacjami w CDKN2B i RUNX1, natomiast nieprawidłowości chromosomu 5 związane są z mutacjami TP53.

Mutacje genu supresji nowotworu TP53 są najczęstszą pojedynczą nieprawidłowością w t-MDS lub t-AML. U pacjentów z *de novo* MDS i AML, mutacje TP53 są wykrywane u mniej niż 10% chorych [1]. Pedersen-Bjerggaard i wsp. obserwowali mutacje TP53 u 27% pacjentów z t-MDS lub t-AML [2]. Mutacje w TP53 są również wykrywane u około 5% mięsaków [18–20]. Mięsak jest drugim najczęściej wykrywanym nowotworem w tej grupie pacjentów i razem z rakiem piersi stanowi 50% nowotworów wykrywanych u pacjentów z mutacją linii germinalnej TP53. Aż do 30% dzieci posiadających mutację TP53 będzie chorowało na raka [21]. U opisywanych pacjentów nie stwierdzono zwiększonej zachorowalności na raka w rodzinie, co może wykluczyć podejrzenie wystąpienia zespołu Li-Fraumeni.

Większość mutacji TP53 to mutacje zmiany sensu, zlokalizowane w domenie wiążącej DNA, spowodowane pojedynczymi zmianami aminokwasów [18]. Obie wykryte u opisywanych pacjentów mutacje były nieaktywne, ale ich lokalizacja na domenie wiążącej DNA odzwierciedla zaangażowanie w regulację transkrypcji i replikacji DNA, zgodnie z bazą danych dotyczącą mutacji TP53: http://p53.fr/TP53_database_download/TP53_tumor_database/tumor_database.html. Mutacje te są typowe dla t-MDS/AML po zakończeniu leczenia środkami alkilującymi, jak również po zastosowaniu inhibitorów topoizomazy II. Obie odkryte u opisywanych pacjentów mutacje TP53 obejmowały transwersję z G do C, którą częściej określa się w sekwencjach oznaczonych (STS, *sequence-tagged sites*). Analiza autorów niniejszej pracy była retrospektywna, przeprowadzona na komórkach szpiku kostnego w trakcie diagnostyki t-MDS. Dlatego główną przeszkodą jest brak wiedzy, czy mutacja TP53 była konstytutywna (tzn. zespół Li-Fraumeni), czy nabyta (somatyczna), to znaczy typowa dla nowotworów indukowanych leczeniem. Zbieżność STS w dzieciństwie z mutacją TP53 o nieustalonym pochodzeniu może spełniać kryteria zespołu Li-Fraumeni (LFS, *Li-Fraumeni syndrome*), jednakże historia zachorowań w rodzinie nie jest potwierdzona. Należy przeprowadzić analizę u rodziców, jednak stan TP53 typu dzikiego nie wyklucza mutacji *de novo* u potomstwa.

Wnioski

U pacjentów niniejszego badania wykryto nowotwory wtórne prawie trzy lata po wprowadzeniu

chemioterapii RMS. Jest to zgodne z literaturą [1, 2]. U drugiego pacjenta rozpoznano t-MDS jednocześnie z nawrotem choroby pierwotnej. Taki wynik pogarsza rokowania z powodu konieczności dalszego kontaktu z toksyczną chemioterapią. W grupie 18 pacjentów z t-MDS Kobos i wsp. zaobserwowali 7 chorych z nawrotem choroby w momencie rozpoznania t-MDS [22]. Wszyscy pacjenci wymagali kolejnych cykli chemioterapii. Słabe wyniki u pacjentów niniejszego badania wykazują, jak poważną chorobą jest t-MDS. Europejska Grupa ds. Przeszczepiania Krwi i Szpiku (*European Group for Blood and Marrow Transplant*) donosi o przeżyciu 3 lat u 35% pacjentów z t-MDS [22]. W t-MDS zaleca się stosowanie terapii HSCT typu „upfront”, przy czym nie określono wyboru protokołów mieloablacji lub roli cytoredukcji. W celu określenia optymalnego schematu leczenia Kobos i wsp. przeprowadzili analizę 21 pacjentów z t-MDS [22]. Indukcja dużą dawką cytarabiny lub terapia HSCT z zastosowaniem busulfanu w skojarzeniu z fluda-

rabiną i melfalanem w cytoredukcji zmniejsza toksyczność bez zwiększania ryzyka nawrotu choroby. W warunkach pediatrycznych zalecenia EWOG-MDS są inne [22–25]. Niestety pacjenci nie wykonali HSCT. Każdego roku u wielu chorych stosuje się standardowe leczenie chemioterapią, ale tylko u nielicznych dochodzi do rozwoju t-MDS/AML, a więc pewną rolę mogą odgrywać czynniki genetyczne [26]. Identyfikacja pacjentów z wysokim ryzykiem rozwoju t-MDS/AML przed chemioterapią umożliwi optymalne leczenie i dokładną obserwację.

Konflikt interesów

Autorzy deklarują brak konfliktu interesów.

Finansowanie

Badanie nie było finansowane.

Artykuł nie zawiera żadnych informacji pozwalających na zidentyfikowanie pacjenta.