Doktori (Ph.D.) értekezés

Prognosztikai vizsgálatok krónikus myeloid leukémiában

Dr. Kajtár Béla

Doktori iskola: Klinikai Orvostudományok

Doktori iskola vezetője: Prof. Dr. Komoly Sámuel

Program: Molekuláris patomorfológia

Program és témavezető: Prof. Dr. Pajor László

Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar,

Pathológiai Intézet

Pécs, 2011.

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék ... **2**
1. Bevezetés ... **4**
1.1. A krónikus myeloid leukémia története ... 4
1.2. A krónikus myeloid leukémia klinikopatológiája ... 6
1.3. A krónikus myeloid leukémia citogenetikája ... 8
1.4. A krónikus myeloid leukémia molekuláris patológiája ... 11
1.5. A krónikus myeloid leukémia prognózisa ... 15
1.6. Imatinib rezisztencia krónikus myeloid leukémiában ... 19
2. Célkitűzések ... **21**
3. Anyag és módszerek ... **22**
3.1. Betegek és minták ... 22
3.2. Karyotipizálás ... 24
3.3. Fluoreszcencia in situ hibridizáció ... 24
3.4. PCR vizsgálatok ... 26
4. Eredmények ... **28**
4.1. A FISH szerepének meghatározása a CML monitorizálása kapcsán ... 28
4.2. Az automatizált és a manuális FISH analízis összehasonlítása ... 30
4.3. Az imatinib rezisztencia okainak vizsgálata ... 33
4.4. A ritka BCR-ABL1 töréspontok prognosztikai jelentőségének vizsgálata ... 36
4.5. Egy konstitúcionális eltéréseket hordozó CML-es beteg története ... 40
4.6. Ph-pozitív és negatív sejtekben egyszerre jelentkező 8-as triszómia ... 42
5. Megbeszélés ... **47**
5.1. A FISH szerepének meghatározása a CML monitorizálása kapcsán ... 47
5.2. Az automatizált és a manuális FISH analízis összehasonlítása ... 48
5.3. Az imatinib rezisztencia okainak vizsgálata ... 50
5.4. A ritka BCR-ABL1 töréspontok prognosztikai jelentőségének vizsgálata ... 52
5.5. Egy konstitucionális eltéréseket hordozó CML beteg története ... 53
5.6. Ph-pozitív és negatív sejtekben egyszerre jelentkező 8-as triszómia ... 54
6. Új eredmények összefoglalása ... **58**
7. Köszönetnyilvánítás ... **59**
8. Irodalomjegyzék ... **60**
9. Az értekezés alapját képező publikációk ... **71**

Rövidítések jegyzéke

ABL1	c-abl onkogén 1, receptor tirozin-kináz
AP	akcelerált fázis
ATM	ataxia teleangiectasia mutált
BC	blasztos krízis
BCR	breakpoint cluster region
BCR-ABL DF	duplafúziós *BCR-ABL1* FISH szonda
BCR-ABL SF	egyszerűfúziós *BCR-ABL1* FISH szonda
CCyR	teljes citogenetikai válasz (0/20 metafázis Ph+)
CEP8	8-as kromoszóma centromerikus régiójára specifikus FISH szonda
CHR	teljes hematológiai válasz
CML	krónikus myeloid leukémia
CMR	teljes molekuláris válasz (≤ 0,01 v. 0,0032% *BCR-ABL1/ABL1* arány)
CP	krónikus fázis
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
ELN	Európai Leukémia Hálózat
e13a2	M-Bcr-nek megfelelő, *BCR-ABL1* töréspont (b2a2)
e14a2	M-Bcr-nek megfelelő, *BCR-ABL1* töréspont (b3a2)
e19a2	μ-Bcr-nek megfelelő *BCR-ABL1* töréspont (p230 fehérjét eredményez)
e1a2	m-Bcr-nek megfelelő *BCR-ABL1* töréspont (p190 fehérjét eredményez)
FISH	fluoreszcencia *in situ* hibridizáció
MCyR	major citogenetikai válasz (0-7/20 metafázis Ph+)
mCyR	minor citogenetikai válasz (8-13/20 metafázis Ph+)
minCyR	minimális citogenetikai válasz (14-19/20 metafázis Ph+)
MMR	major molekuláris válasz (≤ 0,1% BCR-ABL1 a nemzetközi skálán)
NCyR	nincs citogenetikai válasz (20/20 metafázis Ph+)
OCT1	organikus kationtranszporter 1
PCR	polimeráz láncreakció
PCyR	parciális citogenetikai válasz (1-7/20 metafázis Ph+)
Ph^1	Philadelphia-kromoszóma
RB1	retinoblastoma 1
ROC-analízis	„receiver operating characteristic” analízis
RQ-PCR	valós idejű, kvantitatív PCR
RT-PCR	reverz transzkripciót követő polimeráz láncreakció
SD-1	Ph+ ALL-s beteg vérsejtjeiből származó B lymphoblastos sejtvonal
XPB	xeroderma pigmentosum B

1. Bevezetés

1.1. A krónikus myeloid leukémia története

A leukémia – különösen a krónikus myeloid leukémia (CML) – története az orvostudomány egyik legtanulságosabb és leginspirálóbb története. Bemutatja, hogy fiatal, elkötelezett tehetségek a tudomány aktuális újdonságait felhasználva, alapos megfigyelésekkel és a szakma ellenszegülésével kitartóan dacolva, hogyan képesek előmozdítani az orvoslás fejlődését. A folyamat nem állt meg, sőt, csak felgyorsult az elmúlt 150 év alatt, de talán éppen napjaink robbanásszerű fejlődése mellett fontos visszatekinteni és megőrizni a múlt értékeit.

Az első, alapos részletességgel dokumentált, és meggyőzően leukémiának megfelelő betegség mai szemmel CML-nek felelhetett meg. 1844-ben Edinburghben David Craigie egy 28 éves férfit vizsgált, aki lépmegnagyobbodással, hosszú hónapok óta tartó letargiával jelentkezett. Nagyjából három hónappal később a beteg elhunyt, hasonlóan Craigie egy három évvel korábban észlelt betegéhez. Az eset hasonlósága miatt alapos kórbonctani vizsgálatra került sor, amit egy 33 éves patológus, John Hughes Bennett végzett el. Esetét 1845-ben *Lép és máj hypertrophiájának az esete a vér halálos gennyedésével* címmel (***1***) publikálta. Ez a munka tekinthető a leukémia, mint különálló betegségentitás első felismerésének.

A második leukémiás esettanulmány az akkor 24 éves Rudolf Virchow-hoz, a modern patológia atyjához fűződik. Egy 50 éves nő kórboncolását végezte el, akit 4 éve húzódó, krónikus betegség, súlyos orrvérzések miatt kezeltek. Leleteit 1845-ben, 6 héttel Bennett cikke után publikálta *Weisses Blut* címmel (***2***). A fehérvérűség, vagyis a leukémia kifejezés tehát Virchowtól ered, aki a jelenség részeként a vérben a „*vörös sejtek*” és a „*színtelen sejtek*” normális arányának megfordulását írta le. Későbbi kijelentése – „ezennel kinyilvánítom a színtelen vértestecskék létjogosultságát a patológiában”, a történelem távlatából minden hematológusban és hematopatológusban tiszteletet ébreszt (***3***).

1960 igazi mérföldkő volt nemcsak a CML, de az onkológia történetében is. Bár Boveri már 1914-ben feltételezte, hogy a rosszindulatú daganatoknak genetikai alapja lehet, 1960-ban Nowell és Hungerford első ízben írt le egy CML-hez társítható kromoszómális eltérést, a Philadelphia-kromoszómát (Ph-kromoszóma) (***4***). Az apró, Y-kromoszómára emlékeztető

kromoszómát Ph[1]-nek nevezték el. 1967-ben Fialkow vetette fel, hogy a CML a csontvelői őssejtek klonális betegsége, 10 évvel később kimutatta a Ph-kromoszóma jelenlétét a myeloid, a monocytoid, az erythroid és a megakaryocytoid sejtvonalakban egyaránt (***5***).

A Ph-kromoszóma igazi természetére csak a kromoszóma sávozási technikák további fejlődése után derült fény. A quinacrin, illetve Giemsa-festékek bevezetését követően, 1973-ban Janet Rowley ismerte fel, hogy a citogenetikai eltérés valójában egy reciprok transzlokáció a 9-es és a 22-es kromoszómák között – t(9;22)(q34;q11) –, a Ph-kromoszóma a derivált 22-es kromoszómának felel meg (***6***).

A CML molekuláris biológiájának további fejlődésében a következő lépést egy egérleukémiát okozó retrovírus, az *Abelson murine leukemia virus* (***7***), majd a v-abl felismerése jelentette. 1982-ben merült fel, hogy a t(9;22)(q34;q11) transzlokáció során a v-abl emberi megfelelője, az *ABL1* átkerül a 22-es kromszómára (***8***). 1984-ben karakterizálták a 22-es kromoszóma töréspontját (***9***), mely a töréspontról elnevezett *BCR* (*breakpoint cluster region*) nevet kapta, majd egy szokatlanul hosszú, Abl-analóg fehérjét mutattak ki CML-es sejtekben (***10***). Egy évvel később CML-es betegekben a *BCR* és *ABL1* gének fúziós transzkriptumát észlelték (***11***).

1990-ben Daley és munkatársai egér haemopoeticus őssejteket *BCR-ABL1* génnel transzfektálva CML-szerű betegséget váltott ki bizonyítva, hogy a transzlokáció és terméke önmagában is képes a betegséget kiváltani (***12***). Évekkel később igazolódott, hogy a BCR-ABL1 tirozin-kináz aktivitása szükséges a CML-szerű betegség kiváltásához, hiszen az aktivitás megszűnését eredményező K1176R mutációt hordozó *BCR-ABL1* génnel végezve a transzfekciót, nem jelentkezett betegség (***13***).

A CML biológiájának fokozatos megismerése mellett a betegség kezelése alig fejlődött a felismerés utáni első száz évben. Bár a busulphan, majd a hydroxyurea hatékonynak bizonyultak a kezelésben, egyik sem nyújtotta meg jelentősen a betegek túlélését. Az interferon-alfa volt az első gyógyszer, ami nem csak a Ph-transzlokáció eltűnését tudta kiváltani, de a korábbi gyógyszerekhez képest 1-2 évvel hosszabb túlélést tett lehetővé (***14***). Ezután, csaknem 20 éven keresztül a krónikus fázisú CML-es betegek elsődlegesen választandó gyógyszere az interferon volt.

Az első tirozin-kináz gátló, az imatinib kifejlesztése új fejezetet nyitott nemcsak a CML kezelésében, de az onkológiában is. Ez a történet nemcsak annak iskolapéldája, hogy az alapkutatás, valamint a molekuláris biológiai ismeretek hogyan kamatoztathatók hatékony gyógyszerek kifejlesztésére, de a leukémia felismerésének kezdeti időszakához hasonlóan remekül példázza azt is, hogy a legnagyobb akadály mindig a szkepticizmus és a szakma

ellenállása a változásokkal szemben (***15***). A 80-as és 90-es években sokan úgy gondolták, hogy szelektív tirozin-kináz gátlás nem lehetséges, túl sok mellékhatással járna, de amúgy sem lenne eredményes kezelés.

Brian Druker és munkatársai 1996-ban igazolták, hogy egy új hatóanyag, az imatinib mezilát (GCP-57148B, STI-571, Glivec®, Gleevec®) szelektíven gátolja a *BCR-ABL1* pozitív sejtvonalak proliferációját (***16***). 1998-ban indult az a fázis I-es tanulmány, ami az imatinib hatékonyságát vizsgálta interferon-rezisztens CML-es betegek esetében. 54 beteg közül 53 a kezelés utáni 1 hónapon belül teljes hematológiai választ mutatott, mely válaszok tartósnak bizonyultak (***17***). Ez a hihetetlen eredmény azután fázis II-es és III-as vizsgálatokhoz vezetett, majd hamarosan az imatinib a krónikus fázisú CML-es betegek elsődleges gyógyszerévé vált (***18***).

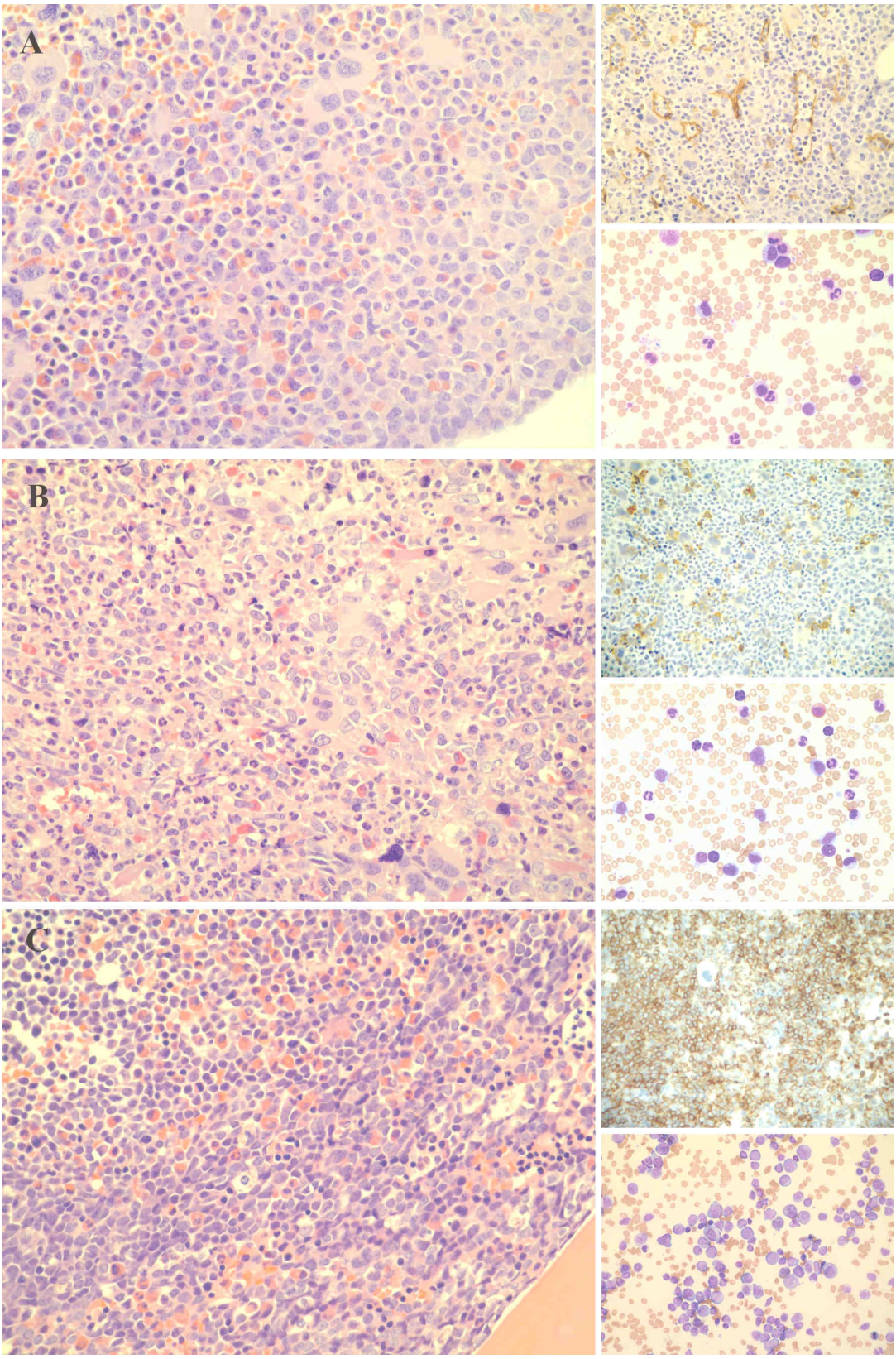
A folyamat azonban nem állt meg, 2004-ben második generációs tirozin-kináz gátlók – a dasatinib és a nilotinib – jelentek meg kezdetben imatinib-rezisztens, vagy intoleráns betegek kezelése kapcsán; ma már elsővonalbeli kezelésben is alkalmazhatók. További szerek fejlesztése és klinikai vizsgálatai jelenleg is zajlanak, megjelenésük a mindennapi gyógyászatban hamarosan várható.

1.2. A krónikus myeloid leukémia klinikopatológiája

A CML a felnőttkori leukémiák mintegy 20%-át teszi ki, incidenciája 1-2 / 100000, jelentős földrajzi különbségeket nem mutat (***19***). A betegség felismerésekor a betegek átlagos életkora 55-65 év, gyermekekben ritka, de bármilyen életkorban előfordulhat. Az ionizáló sugárzás növeli az előfordulás gyakoriságát (***20***), egyéb etiológiai faktor nem ismert.

A CML lefolyása jellemzően két-, vagy háromfázisú. A legtöbb esetben diagnóziskor krónikus fázis észlelhető. A tünetek rendszerint a megnövekedett fehérvérsejtszámhoz, a splenomegaliához, illetve az anémiához társulnak; fáradtság, fogyás, hasi fájdalom, illetve gyengeség a jellemző, de sokszor a diagnózis tünetek hiányában végzett laborvizsgálat során születik meg (***19***).

A perifériás vérkép jellegzetes: a teljes myeloid érési sor megfigyelhető, általában basophilia mellett. A csontvelő rendszerint hypercellularis, myeloid túlsúlyt mutat, a megakaryocyták száma emelkedett, jellemzően kisméretű, lebenyezettséget nem mutató maggal rendelkező sejtek láthatók (**1. ábra**).



1. ábra: A CML szövettani és citológiai képe

A: Krónikus fázis. A csontvelő sejtdús, benne myeloid túlsúly látható, a kiérés kissé balratolt, a CD34+ blasztok aránya normális. Mononuclearis micromegakaryocyták figyelhetők meg. A perifériás vérben leukocytosis látható, a teljes myeloid érési sor megfigyelhető. B: Akcelerációs fázis. A csontvelőben megnőtt a CD34+ blasztok aránya, a kiérés kifejezettebben balratolt. A

perifériás vérben a blasztok aránya emelkedett, a basophilia fokozódott. C: Blasztos krízis. A csontvelőben 30% feletti a blasztok aránya, a kiérés korlátozottan felismerhető. A perifériás vérben nagyszámú, kék citoplazmájú blaszt (lymphoblast) figyelhető meg.

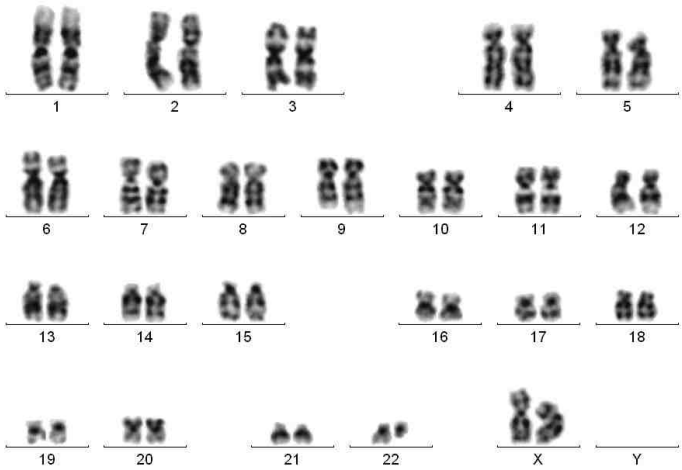
A krónikus fázist kezelés nélkül 3-6 év után csaknem kivétel nélkül akcelerációs fázison keresztül, vagy anélkül akut leukémiának megfelelő, rossz prognózisú, blasztos krízis követi. Az Európai Leukémia Hálózat (ELN) ajánlása alapján krónikus fázisú a betegség, ha a blasztok aránya mind a vérben, mind a csontvelőben 15% alatti, ha a blasztok és a promyelocyták együttes aránya 30% alatti, és a vérben a basophil granulocyták aránya 20% alatti, és nincs a terápiával nem megmagyarázható, perzisztáló thrombocytopenia ($< 100 \times 10^9$ /l). Blasztos krízisről akkor beszélhetünk, ha extramedullaris blasztos proliferáció igazolható, vagy a blasztok aránya a vérben, vagy a csontvelőben 30% feletti. Minden egyéb eset akcelerációs fázisnak felel meg (***18***).

1.3. A krónikus myeloid leukémia citogenetikája

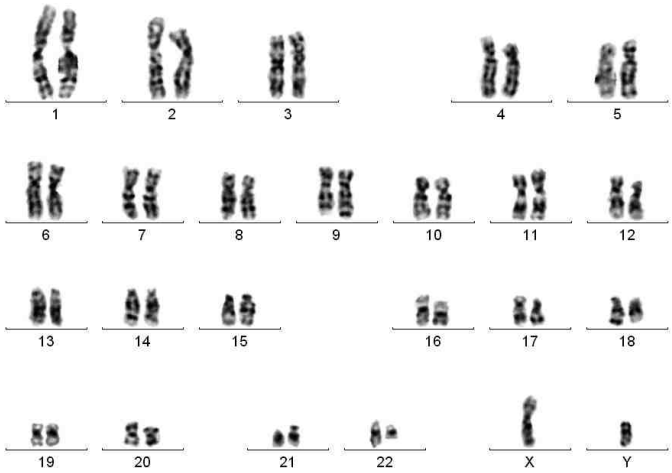
A tumorcitogenetikában a legismertebb struktúrális kromoszómaaberráció a t(9;22)(q34;q11), más néven Ph-transzlokáció (**2. ábra**), mely a *BCR* és az *ABL1* gének fúzióját eredményezi. Ez volt az első reciprok transzlokáció, melyet malignus betegséggel összefüggésben leírtak (***6***). A CML-es betegek 90-95%-ában kimutatható a Ph-transzlokáció, vagy valamelyik variánsa (***19***). Induláskor, a csontvelőben – 20 metafázist vizsgálva – rendszerint 100% a pozitivitás. Az esetek 5-10%-ában variáns transzlokáció mutatható ki, ami a legtöbbször egy harmadik, vagy negyedik kromoszóma érintettségét jelenti (**3. ábra**). A variáns Ph-transzlokációknak nincs egyértelmű prognosztikai jelentősége (***21***).

Egyes tanulmányok CML-es betegek endothelsejtjeiben is leírták az aberráció jelenlétét, ezért feltételezhető, hogy a közös haemopoeticus-endothel őssejt (haemangioblast) a *BCR-ABL1* transzlokációt hordozó klón forrása (***22***).

A Ph-transzlokációt kiváltó okok nem tisztázottak, az ionizáló sugárzás mindenestre növeli a *BCR-ABL1* transzlokáció kialakulásának kockázatát. A hirosimai és nagasaki tragédiák után a régióban jelentősen növekedett a transzlokáció incidenciája (***22***). Ráadásul, *in vitro* kísérletek tanúsága szerint különböző haemopoeticus sejtvonalakban ionizáló sugárzással *BCR-ABL1* mRNS megjelenését lehet előidézni (***23***).



2. ábra: Philadelphia-transzlokációt mutató karyogram – t(9;22)(q34;q11)



3. ábra: Egy variáns Ph-transzlokáció – t(9;22;18)(q34;q11;q21)

A Ph-negatív CML esetekben molekuláris technikákkal kimutatható a *BCR-ABL1* fúzió, ilyen esetekben vagy rejtett – karyotipizálással nem látható – transzlokáció áll a háttérben, vagy az *ABL1* gén inzertálódik a 22-es kromoszómán a *BCR* gén mellé (***24***). A Ph-negativitás jelentősége az, hogy a diagnózis és a nyomonkövetés során a karyotipizálás nem alkalmazható, külön prognosztikai jelentősége nem ismert. A *BCR-ABL1* negatív esetek egy jelentős része – amikor molekuláris módszerekkel sem mutatható ki *BCR-ABL1* fúzió – valójában atípusos CML-nek felel meg, ami a WHO klasszifikáció alapján önálló entitás, nem pedig a CML altípusa (***25***).

1.3.1. Interstíciális deléciók a derivált 9-es kromoszómán

Az esetek 10-15%-ában interstíciális deléció igazolható a transzlokációban érintett 9-es kromoszómán, az *ABL1* közelében (***26***). A deléciókra az extraszignálos, illetve a duplafúziós FISH szondák alkalmazása hívta fel a figyelmet, hiszen ezekben az esetekben az interfázis magokban a várttól eltérő, atípusos jelmintázat figyelhető meg. A deléciók vélhetően a transzlokáció kialakulásával egyidőben keletkeznek, egyelőre nincs meggyőző adat arról, hogy a deléció klonális evolúció jelenségeként a betegség előrehaladtával is megjelenhet. Csupán két tanulmányban írtak le olyan eseteket, ahol a deléció a Ph-transzlokációhoz képest másodlagos eltérésnek tűnt, a Ph+ sejtek csupán kis részében volt megfigyelhető (***27, 28***).

Az interstíciális deléciók kedvezőtlen prognózissal társultak interferon-alfa kezelés esetén, imatinib kezelés mellett több tanulmány is arról számolt be, hogy nincs különbség a túlélésben (***29***). Azonban más tanulmányokban a progresszió-mentes túlélés rövidebbnek, a citogenetikai válasz aránya kisebbnek tűnt (***30***). Úgy tűnik, a méret befolyásolja az interstíciális deléció prognosztikai jelentőségét; a *BCR* gén deléciója, illetve nagy, > 1,5 Mb szakaszt érintő deléció az *ABL1* gén közelében kedvezőtlen kimenetellel társítható (***26***).

1.3.2. Addicionális citogenetikai eltérések

CML-es betegekben változó gyakorisággal a Ph-transzlokáción kívül egyéb citogenetikai abnormalitások is megfigyelhetők. A diagnóziskor, krónikus fázisban, az esetek 8-10%-ában látható egyéb eltérés, mely vélhetően genetikai instabilitásra utal, jelentősége nem tisztázott; az imatinib-éra előtt rövidebb túléléssel társult (***21***), jelenleg az ELN ajánlása alapján csupán figyelmeztető jelként értékelendő (***31***).

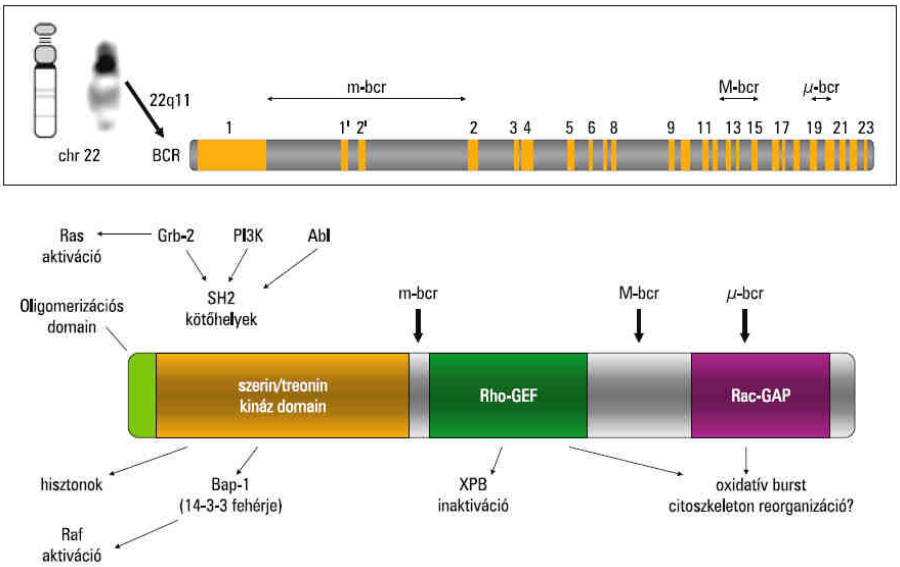
A betegség előrehaladtával a másodlagos eltérések gyakoribbakká válnak, rendszerint a közelgő progressziót jelzik előre, blasztos krízisben gyakoriságuk 60-80% körüli (***21***). Az eltérések nem véletlenszerűek, a leggyakrabban a +8, +der(22), i(17q), +19, -Y, +21, +17, illetve -7 eltérések fordulnak elő, ezeket „major útvonal eltéréseknek” nevezzük (***32***). Az alkalmazott terápia befolyásolja a jelentkező eltérések típusát; különböző abnormalitások gyakoriak interferon és imatinib kezelés, illetve transzplantáció után (***33***).

1.4. A krónikus myeloid leukémia molekuláris patológiája

A Ph-transzlokáció eredményeképpen létrejött fúziós gén, a *BCR-ABL1* terméke egy abnormális tirozinkináz aktivitással rendelkező fehérje. A BCR-ABL1 fehérje központi szerepet játszik a CML kialakulásában és progressziójában, hiszen a BCR-ABL1 transzkriptum gyakorlatilag valamennyi CML-es esetben kimutatható (***34***).

1.4.1. *BCR* gén

A *BCR* gén a 22-es kromoszóma hosszúkarján, a 22q11 régióban található, 23 exonból áll, melyről egyféle fehérje íródik át (**4. ábra**). A BCR egy szerin-treonin kináz, melynek pontos fiziológiás funkciója nem tisztázott, szerepe van a sejtváz reorganizációjában, illetve a neutrophil granulocytákban az oxidatív fellángolás szabályozásában. A BCR képes hisztonfehérjékhez kötődni, illetve asszociálódni a repair-mechanizmusokban szerepet játszó XPB (*xeroderma pigmentosum B*) fehérjével, bár ennek fiziológiás jelentősége nem tisztázott (***35***).

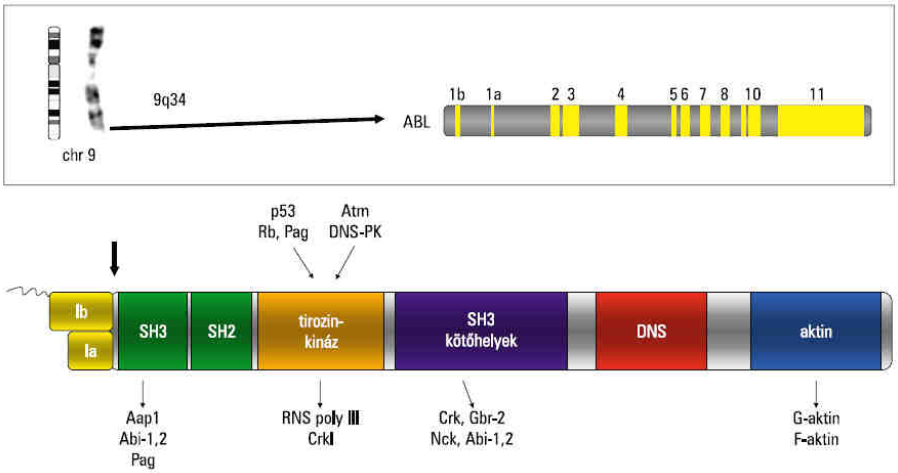


4. ábra: *BCR* gén

A Ph-transzlokáció létrejöttekor a *BCR* gén különböző régiókban szenvedhet el törést, ezáltal a BCR-ABL1 fúziós fehérje alkotásában a BCR fehérje különböző hosszúságú, C-terminális része vesz részt (***36***).

1.4.2. *ABL1* gén

Az *ABL1* gén a 9-es kromoszóma hosszúkarján helyezkedik el (9q34). 11 exonból áll, két alternatív 1-es exonnal rendelkezik, melynek következtében a génről két, eltérő hosszúságú fehérje íródik át (**5. ábra**). Ez a különbség a fehérje intracellularis lokalizációjának szabályozásában játszik szerepet, amelynek alapvető jelentősége van a fehérje funkciójának szempontjából. Az ABL1 egy nonreceptor tirozin-kináz, több SH doménnel is rendelkezik. A molekula számos kapcsolódási felülettel bír több, fontos jelátviteli molekula számára, rendelkezik továbbá DNS- illetve aktin-kötő helyekkel. Ezen doménjei révén részt vesz a transzkripció, illetve az aktin polimerizáció szabályozásában (***37***).



5. ábra. *ABL1* gén

ABL1-et nem átíró transzgénikus egerekre (ABL1-/-) a korai perinatális halálozás jellemző, valamint számos csont- illetve neurális fejlődési rendellenesség, lymphopenia, osteoporosis kialakulása figyelhető meg (***38***).

Az ABL1 aktin-kötő képessége révén szerepet játszik az integrin jelátvitelben, a stressz rostok kialakításában, a sejtmotilitás szabályozásában. Ezen funkciója mellett szerepe van a sejtciklus szabályozásában is. G1 fázisban az RB1 (*retinoblastoma 1*) fehérjéhez kapcsolódik, ilyenkor kináz aktivitása gátlás alá kerül. A sejtciklus S fázisába lépve felszabadul az RB1 gátlása alól, és mind DNS-kötő képessége, mind az RNS polimerázok foszforilációja révén hozzájárul az S-fázis gének transzkripciójának előmozdításához. DNS károsodás hatására látszólag ellentétes hatást fejt ki, együttműködve az ATM-mel (*ataxia-teleangiectasia mutált*)

és a TP53-mal a G1 fázisban történő elakadást idéz elő. A TP53 funkciójának érvényesülését képes segíteni azáltal, hogy gátolja a fehérje degradációját (***39***).

1.4.3. A *BCR-ABL1* gén és fehérje

A BCR-ABL1 fehérje kialakításában csaknem a teljes ABL1 részt vesz az 1-es exon kivételével. A BCR-ABL1 fehérje molekuláris hatásmechanizmusával kapcsolatban hatalmas mennyiségű adat gyűlt össze az elmúlt évtizedek során. Ezen adatok többsége különböző, transzformált, vagy inherensen *BCR-ABL1* pozitív sejtvonalak *in vitro* vizsgálataiból, illetve transzgénikus állatkísérletekből származik. Az így nyert adatok értelmezése és szintézise rendkívül nehéz feladat. Egy sejtvonalban megfigyelhető jelátviteli útvonalak nem felelnek meg teljes mértékben egy CML-ben szenvedő beteg csontvelői progenitor sejtjeire jellemzőekkel. A BCR-ABL1 más mechanizmusokkal vezet transzformációhoz például fibroblast, illetve haemopoeticus sejtvonalak esetében. A transzgénikus modellek egy részében nem CML-szerű betegség, akut leukémia fejlődik ki (***37, 40***). A leghasznosabb adatokat CML-es betegek csontvelői sejtjeinek in vitro vizsgálata nyújtja, azonban a jelátviteli mechanizmusok változnak a sejt differenciációja során, ami tovább nehezíti a megfigyeltek értelmezését.

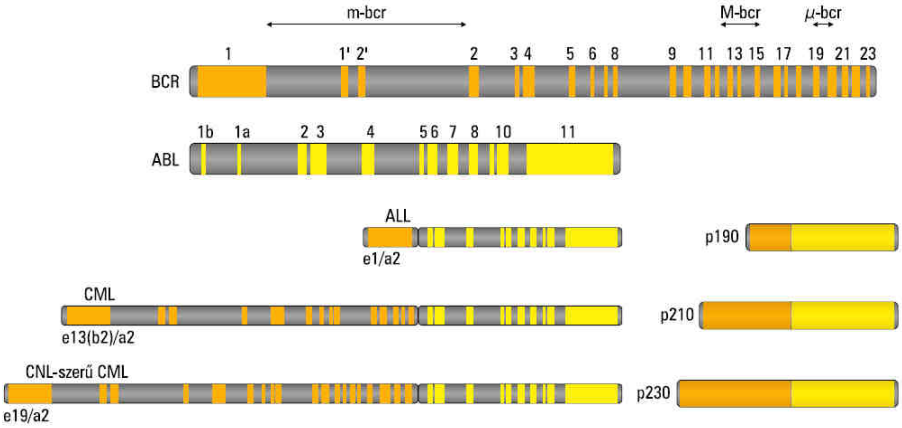
A fenti nehézségek ellenére a BCR-ABL1 molekuláris hatásait három fő szempont köré lehet csoportosítani: a proliferáció serkentése, az apoptosis gátlása és a sejtadhézió megváltoztatása (***41***). Ezen hatások lényegében a növekedési faktorok hatását szimulálják. Annak ellenére, hogy számos haemopoeticus sejtvonal BCR-ABL1 expresszió hatására növekedési faktortól független növekedést mutat, a CML-es betegek csontvelői progenitorainak továbbra is szükségük van külső növekedési stimulusra. Válaszkészségük azonban jelentősen eltér a normális előalakokétól; míg fiziológiásan többféle faktor együttes jelenléte szükséges a haemopoesishez, a BCR-ABL1 pozitív progenitorok már egyedül SCF (*stem cell factor*) jelenlétében is növekednek (***42***).

Tekintve, hogy a BCR-ABL1 expresszió a BCR-hez és az ABL1-hez hasonlóan a legmagasabb a korai progenitorokban, a BCR-ABL1 hatás elsősorban ebben a sejtpopulációban érvényesül (***43***). A BCR-ABL1 fokozza az őssejtek és a korai progenitorok aktiválódását, sejtciklusba lépését, az önmegújítás és a differenciáció kritikus egyensúlyát az utóbbi irányába tolja el. Az elkötelezett progenitorok több sejtosztódás során jutnak el a terminális differenciációig, amely útvonalat már kevésbé befolyásolja a BCR-ABL1. Ezen

hatások eredményezik a krónikus fázisú CML-re jellemző csontvelői képet: az őssejtek száma csak minimálisan emelkedett, míg az elkötelezett progenitorok illetve az érett myeloid sejtek jelentős expanziója figyelhető meg (***42***).

A *BCR* génen belül a töréspont variabilitása változó hosszúságú mRNS, és eltérő méretű BCR-ABL1 fehérjék megjelenését eredményezi. Az 1-es és 2-es exon közötti, m-bcr-nek (*minor breakpoint cluster region*) nevezett régió törése esetén 190 kDa molekulatömegű BCR-ABL1 fehérje (p190) képződik, mely akut lymphoid leukémiára jellemző (e1a2 töréspont). CML-ben leggyakrabban M-bcr (*major breakpoint cluster region*) töréspont figyelhető meg (12-15-ös exonok), ami 210 kDa-os fehérjét (p210) eredményez (leggyakrabban e13a2 (b2a2), illetve e14a2 (b3a2) töréspontokkal). Ritkán, az esetek kevesebb, mint 1%-ában az úgy nevezett µ-bcr (19-20-as exonok) töréspontot látjuk, melynek következtében a legnagyobb, 230 kDa-os molekula (p230) jelenik meg (e19a2 töréspont) (***19, 37, 42***). Ez a töréspont indolens lefolyású, krónikus neutrophil leukémia-szerű CML esetekre jellemző (***44***).

A különböző méretű fehérjék lényegében ugyanakkora ABL1 szakaszt tartalmaznak, a különbség a BCR-részlet méretében rejlik (**6. ábra**). Az eltérő szerkezet következtében a BCR-ABL1 molekulák molekuláris hatásai különbözőek lehetnek, transzformációs képességük is eltérő: a legnagyobb a p190 molekulának, a legkisebb a p230 Bcr-abl fehérjének.



6. ábra: *BCR-ABL1* típusok

Az eltérő BCR-ABL1 molekulák által kiváltott hatások pontos különbségeit azonban nem ismerjük. A három leggyakoribb molekula egyike sem mutat egyértelmű összefüggést a fenotípussal. Az akut leukémiák egy részében M-bcr töréspont, valamint az annak megfelelő

p210 BCR-ABL1 figyelhető meg. Ismertek m-bcr pozitív CML esetek is – a CML esetek kb. 0,3%-a (***19***) –, ahol kizárólag a p190 fehérje van jelen. Az ilyen BCR-ABL1 transzkriptum az irodalom alapján monocytosissal, valamint rosszabb prognózissal társul (***45, 46***). Ráadásul, mivel hosszabb mRNS-ből *alternative splicing* révén rövidebb mRNS is képződhet, a CML esetek túlnyomó többségében mindkét mRNS jelen van, bár nem egyforma mennyiségben. Ennek biológiai és klinikai jelentősége vitatott.

1.5. A krónikus myeloid leukémia prognózisa

A prognózis egy korábbi tapasztalatokon nyugvó valószínűség, mely a várható túlélést, a további klinikai viselkedést jelzi előre. A prognózis alapját képezhetik a diagnóziskor meghatározható paraméterek, illetve a terápiára adott válasz mértéke.

CML esetében prognosztikai értéke van a betegség fázisának a diagnóziskor; blasztos krízisben jelentkező betegség esetén a túlélés sokkal kedvezőtlenebb, mint krónikus fázis esetén. Az utóbbi esetén, a diagnóziskor egyszerűen meghatározó paraméterek alapján klinikai rizikóbecslés történhet a Sokal, illetve a Hasford pontrendszer alapján (***18***). A pontrendszerek, melyek az életkoron, a lép méretén, a perifériás vérben látott blasztok arányán, a thrombocytaszámon, illetve a basophilek és az eosinophilek arányán alapszik, a daganatos betegségek esetén használatos stádiummal mutatnak analógiát; a neoplasticus klón méretével és kiterjedtségével arányosak.

CML esetében gyakorlati hasznosíthatósága elsősorban a terápiára adott válasz mérésének van. Ennek vizsgálatát értjük a CML komplex monitorozása alatt. A terápiás válasz prognosztikai értékét az a feltételezés adja, hogy minél kisebb a reziduális leukémiás tömeg, annál kisebb az esélye a progresszió kialakulásának, ezáltal hosszabb a túlélés. A terápiás válasznak CML esetében három szintje van; hematológiai, citogenetikai és molekuláris (***18***). Ez a három szint egymásra épül, de az alkalmazott vizsgálatok eltérő természete miatt nem vetíthetők egy skálára. A terápiás válaszok kétféleképpen szolgáltathatnak prognosztikai adatot. Egyrészt, egy adott időpontban a terápiás válasz mélysége előrevetítheti a kedvezőtlen kórlefolyást. Ha ez nem ér el egy meghatározott szintet, elsődleges rezisztenciáról beszélhetünk. Másrészt, a már kialakult válasz megszűnése, illetve romlása korai jele lehet a későbbi progressziónak. Ezt a jelenséget másodlagos rezisztenciának nevezzük.

Az ELN ajánlása foglalja össze azt, hogy a különböző terápiás válaszok mélysége mely időpontban hordoz prognosztikai információt, valamint azt, hogy egy adott válasz esetén mi a javasolt teendő. Az ajánlás folyamatos vita tárgya, általános érvényű konszenzus még nincs (***31***).

1.5.1. A hematológiai válasz

A hematológiai válasz a perifériás vérkép normalizálódását, valamint a lépmegnagyobbodás megszűnését jelenti, függetlenül a csontvelő citológiai, illetve szövettani képétől. Elsővonalbeli imatinib kezelés mellett a krónikus fázisú betegek csupán nagyjából 3-4%-a nem ér el megfelelő választ, 60 hónap kezelés után pedig 10-12%-uk veszíti el a már kialakult hematológiai választ (***18***).

1.5.2. A citogenetikai válasz

A citogenetikai válasz meghatározásának módszere a csontvelő karyotipizálása, melynek során 20 metafázis alapján kerül meghatározásra a Ph-transzlokáció pozitív (Ph+) sejtek aránya. Ez a vizsgálat nem csak mennyiségi, de funkcionális vizsgálat is, hiszen az eredményt nem csak a megmaradt leukémiás populáció mérete, de proliferációs aktivitása is befolyásolja. A mindössze 20 megvizsgált sejt alacsony reprezentativitást jelent, nagyjából 35%-nyi konfidencia intervallummal (amennyiben $\alpha = 0{,}05$) lehet számolni a binomialis eloszlás alapján. Ennek ellenére, a legtöbb és a legmegbízhatóbb prognosztikai adattal a karyotipizálás kapcsán rendelkezünk; még mindig ez a vizsgálat képezi a terápiás válasz nyomonkövetésének alapját (***47***). Ha 12 hónap kezelés után teljes citogenetikai válasz (CCyR, 20 metafázisból 0 Ph+) áll fenn, 97% 60 hónapos progressziómentes túléléssel számolhatunk. A betegek 12-15%-a nem ér el legalább major citogenetikai választ (MCyR, 20 metafázisból $\leq$ 7 Ph+) a 12. hónapig, esetükben a progressziómentes túlélés 81% (***48***).

A fenti statisztikai összefüggések következtében az ELN a terápiás kudarc definíciójaként a kezelés meghatározott időpontjaiban a megfelelő citogenetikai válasz hiányát határozza meg (**1. táblázat**).

Kezelés ideje (hónap)	Optimális válasz	Szuboptimális válasz	Terápiás kudarc
3.	mCyR	NCyR	nincs CHR
6.	PCyR	nincs MCyR	NCyR
12.	CCyR	PCyR	nincs MCyR
18.	MMR	CCyR + nincs MMR	nincs CCyR
bármikor	stabil MMR	MMR elvesztése mutációk	CHR elvesztése CCyR elvesztése Klonális evolúció mutációk

1. táblázat. Az ELN 2009-es ajánlása

Optimális válasz esetén a beteg az adott kezelés mellett a lehető legkedvezőbb túlélésre számíthat; túlélése alig tér el a hasonló korú egészséges felnőttekétől. Terápiás kudarc esetén a kedvező túlélés nem valószínű, a terápia változtatása javasolt. A szuboptimális válasz jelenti a két kategória közötti „szürke zónát". CHR: teljes hematológiai válasz, CCyR: teljes citogenetikai válasz (0/20 Ph+ metafázis), PCyR: parciális citogenetikai válasz (1-7/20 Ph+ metafázis), MCyR: major citogenetikai válasz (0-7/20 Ph+ metafázis), mCyR: minor citogenetikai válasz (8-13/20 Ph+ metafázis), NCyR: nincs citogenetikai válasz (16-20/20 Ph+ metafázis), MMR: major molekuláris válasz (0,1% BCR-ABL1), mutációk: Az ABL1 kináz doménben megjelenő pontmutációk; attól függően, hogy ezek milyen mértékű imatinib rezisztenciát váltanak ki, a mutáció megjelenése szuboptimális válasznak, vagy terápiás kudarcnak tekintendő.

A citogenetikai relapszus, vagyis a válasz elvesztése többféleképpen definiálható, a különböző meghatározások eltérő prognosztikai tartalommal bírnak. Ha a Ph+ sejtek arányának legalább 30%-os emelkedését tekintjük relapszusnak, akkor ennek gyakorisága 16%, az esetek 11%-ában a betegség progressziója várható. Ha a CCyR bármilyen megszűnését relapszusnak tekintjük, a gyakoriság 26%, viszont az esetek 81%-ában a relapszus csupán átmeneti (***49***).

A citogenetikai válasz meghatározásának alternatív módszere a fluoreszcencia *in situ* hibridizáció (FISH) lehet. A FISH előnye, hogy nem igényel sejttenyésztést, akár perifériás vérmintán is eredményesen alkalmazható. A nemzetközi ajánlásokban a FISH szerepe nem tisztázott, az általa szolgáltatott eredmény nem egyenértékű a karyotipizálás eredményével, hiszen a FISH esetében csupán mennyiségi meghatározásról van szó, függetlenül a sejtek proliferációs aktivitásától.

1.5.3. A molekuláris válasz

A vizsgálat során a BCR-ABL1 mRNS mennyiségét egy kontroll transzkriptum, Európában a leggyakrabban az ABL1 mRNS mennyiségéhez viszonyított arányként, a legtöbbször százalékban határozzuk meg. A vizsgálat érzékenysége 0,01 – 0,001% körüli érték, bár a mintából izolálható RNS mennyisége, illetve minősége alapján az érzékenység mintáról mintára eltérő (***50***). A vizsgálat nehezen standardizálható, a különböző laboratóriumokban eltérő műszerekkel, eltérő vegyszerekkel, eltérő protokoll szerint történnek a vizsgálatok, így az adatok nehezen összevethetők. Az ELN szervezésében a módszer nemzetközi harmonizációjára történt kísérlet, melynek során kijelölt referencialaborok eredményeihez viszonyítva a programban résztvevők számára úgynevezett Nemzetközi Konverziós Faktort határoztak meg (***51***). Ezekkel a faktorokkal a kapott eredmények standardizálhatók, így az adatok már összehasonlíthatók, nagy, nemzetközi tanulmányokban is felhasználhatók.

A molekuláris válasz szempontjából kiemelt jelentősége a major molekuláris válasznak (MMR) van, mely a nemzetközi skálán mérve 0,1% alatti RQ-PCR eredménynek felel meg. A kezelés 18. hónapjában MMR fennállta esetén 60 hónap után 100% a progressziómentes túlélés, azonban a CCyR megszerzéséhez képest ez nem jelent szignifikánsan jobb prognózist (***48, 52***). Ha a CCyR későbbi elvesztésének valószínűségét is figyelembe vesszük, mint kedvezőtlen esemény, akkor az eseménymentes túlélés szignifikánsan jobb MMR, mint MMR nélküli CCyR esetében (***53***). A fentiek alapján az ELN ajánlás szuboptimálisnak minősíti a CCyR fennállta esetén az MMR hiányát a kezelés 18. hónapjában.

Az ideális kezelés a teljes gyógyuláshoz vezet. Minél kisebb a reziduális betegség, látszólag annál közelebb vagyunk az ideális célhoz. A hatékony kezelések elérhetősége a „teljes molekuláris válasz” (CMR) fogalmának elterjedéséhez vezetett. A fogalom azonban ellentmondásos, egységes definíciója egyelőre nincs. Egy kvantitatív vizsgálat során észlelt negativitás az érzékenységi határnál kisebb reziduális betegséget jelent, vagyis az eredmény csupán korlátozottan kvantitatív. A CMR-t legtöbbször 0,01% (CMR4.0), 0,0035% (CMR4.5), illetve 0,001% (CMR5.0) alatti RQ-PCR eredményként értelmezik (***51***). A CMR jelentősége abban rejlik, hogy stabil fennállta esetén a betegek egy részében a tirozinkináz-gátló kezelés felfüggeszthető (***54***).

Az RQ-PCR eredménye szoros összefüggést mutat a citogenetikai válasszal. Általánosan elterjedt nézet, hogy 1% RQ-PCR eredmény CCyR-nek, 10% pedig MCyR-nek felel meg

(***55***). Az összefüggésnek azonban alacsony a szenzitivitása; különösen a terápia elején, amikor a CCyR először jelentkezik (**2. táblázat**).

TKI kezelés (hónap)	Esetszám	CCyR-t mutató betegek (%)	
		≤ 0,1% RQ-PCR	≤ 1,0% RQ-PCR
3	51	33,3	74,5
6	127	48,0	89,7
9	138	47,1	87,0
12	177	62,1	94,9
18	163	77,9	94,5

2. táblázat. Az RQ-PCR és a CCyR összefüggése

Az adatok *Hughes/Hochhaus* Blood 2010;116:3758-3765 munkájából származnak (***50***). A táblázatból kiolvasható, hogy a kezelés elején az 1% RQ-PCR és a CCyR közötti összefüggés kevésbé szoros, mint a kezelés későbbi időpontjainál. Ha egy beteg citogenetikai válasza elhúzódó, valószínűleg a táblázatban feltüntetett összefüggések is későbbre tolódnak. *Rövidítések*: TKI: tirozin-kináz gátló kezelés; CCyR: teljes citogenetikai válasz; RQ-PCR: valósidejű kvantitatív PCR.

A molekuláris válasz meghatározása ugyan nagy biztonsággal azonosítja azokat a betegeket, akik kedvező túlélésre számíthatnak – jelentős molekuláris válasz, csökkenő, vagy stabil BCR-ABL1 relatív mennyiség –, a kedvezőtlen túlélést, a progressziót azonban csupán alacsony pozitív prediktív értékkel jelzi előre. Bár kézenfekvőnek tűnhet, egyelőre nincs kellő bizonyíték arra, hogy a molekuláris szintű reziduális betegség kedvezőtlenebb a túlélés szempontjából, mint a molekuláris módszerekkel mért teljes remisszió (***47***). Hasonlóan nem egyértelmű, hogy a molekuláris válasz romlása – a citogenetikai és a hematológiai válasz romlása nélkül – mennyi idővel előre, és milyen biztonsággal jelzi a betegség progresszióját.

1.6. Imatinib rezisztencia krónikus myeloid leukémiában

A legnagyobb nemzetközi tanulmány adatai alapján, 7 év imatinib kezelést követően a krónikus fázisú betegek 5%-a mellékhatások következtében, 15%-a nem kellő terápiás hatás, 20% pedig egyéb okok miatt kilépett a tanulmányból (***47***). A krónikus fázisú betegek legalább 20%-ának számára tehát a kezelés nem megfelelő; az előrehaladott fázisokban az arány rosszabb.

Az imatinib rezisztencia hátterében számos tényező állhat, a leggyakoribb vélhetően az, hogy a kívánt dózis nem jut el a megcélzott sejtekhez. Ennek hátterében farmakogenetikai

tényezők mellett gyakran a betegek korlátozott együttműködése állhat. Egy elegáns vizsgálat kimutatta, hogy a betegek 14%-a az előírt dózis csupán 80%-át alkalmazta (***56***), ami nem meglepő, tekintve, hogy egy hatékony gyógyszerről van szó, ami csökkenti a betegségtudatot, azonban mellékhatásokkal jár és határozatlan ideig, mindennap kell szedni.

A rezisztenciát okozhatja az, hogy a gyógyszer nem jut be a csontvelői sejtekbe, vagy a sejtek kipumpálják magukból (***57***). Ezeknek a tényezőknek a vizsgálata a terápiás döntéseket segítheti, például a plazma imatinib-koncentrációjának mérése, valamint a leukémiás sejtek OCT1 (*organikus kationtranszporter 1*) aktivitásának mérése (***58***) segíthet dönteni az imatinib dózisának emelése, illetve másik gyógyszer indítása között. Ezek a vizsgálatok még nem tekinthetők a mindennapi gyakorlat részének.

Az imatinib rezisztencia hátterében állhat a leukémiás sejtek változása is. A két leggyakoribb tényező az *ABL1* kináz domén szerzett pontmutációja, valamint a Ph+ sejtek klonális evolúciója. Az előbbi a BCR-ABL1 olyan konformációváltozását idézi elő, ami a gyógyszer kevésbé hatékony kötődését okozza, az utóbbi BCR-ABL1 független túlélést és növekedést tehet lehetővé (***57***, ***59***).

Imatinib rezisztencia esetében, az optimális terápiás válasz elérésének érdekében a terápia változtatása lehet indokolt. Ez jelentheti az imatinib szokványos dózisának emelését, illetve második generációs tirozin-kináz gátló kezelés indítását. Jelenleg két ilyen TKI érhető el a mindennapi gyakorlatban, már akár elsővonalbeli kezelésként is: a dasatinib, és a nilotinib.

A dasatinib (Sprycel®) a SRC és az ABL kinázok effektív gátlója, mely néhány kivételével a leggyakoribb ABL1 kináz domén pontmutációkkal szemben, valamint Ph+ ALL eseteiben is hatékony (***31***). A gyógyszer a BCR-ABL1 aktív konformációjához is képes kötődni. Klinikai vizsgálatok alapján elsővonalbeli kezelésként a betegek nagyobb hányadában, és hamarabb érhető el CCyR, illetve MMR, mint imatinib kezeléssel, a hosszútávú eredmények értékeléséhez még több időre van szükség.

A nilotinib (Tasigna®) az imatinibnál hatékonyabb, és szelektívebb BCR-ABL1 gátló. Az imatinibhez hasonlóan csupán az inaktív konformáció esetén képes a BCR-ABL1-hez kötődni, ám a legtöbb ABL1 kináz domén pontmutációval szemben is hatékony. A klinikai vizsgálatok gyorsabb, és mélyebb terápiás válaszokról számolnak be elsővonalbeli alkalmazása esetén, az imatinibhez viszonyítva (***31***).

Az allogén csontvelői őssejt transzplantáció még mindig az egyetlen, igazoltan kuratív terápiás lehetőség CML esetén. Alkalmazására jelenleg elsősorban több tirozin-kináz gátlóval szembeni rezisztencia, illetve előrehaladott fázis esetén kerül sor (***18***).

2. Célkitűzések

1. A FISH szerepének meghatározása a CML-es betegek nyomonkövetésében.

2. Az automatizált FISH analízis előnyeinek meghatározása a manuális FISH vizsgálathoz képest a CML-es betegek nyomonkövetésének szempontjából.

3. Az imatinib-rezisztens esetekben a rezisztencia genetikai, illetve molekuláris hátterének vizsgálata.

4. A CML-ben ritkán előforduló *BCR-ABL1* töréspontok prognosztikai jelentőségének vizsgálata.

5. A másodlagos citogenetikai eltérések értelmezési nehézségeinek bemutatása egy CML-es beteg követése kapcsán.

6. A Philadelphia-kromoszóma pozitív (Ph+) és negatív sejtekben egyidejűleg jelentkező, másodlagos citogenetikai eltérések jelentőségének meghatározása két CML-es beteg kapcsán.

3. Anyag és módszerek

3.1. Betegek és minták

A vizsgálatok alapját laboratóriumunkba 2003 és 2011 között érkezett 356 CML-es beteg összesen 2900 csontvelői és/vagy perifériás vérmintája képezte. A minták a dunántúli régióból, elsősorban Pécsről, Szekszárdról, Szombathelyről, Zalaegerszegről, Tatabányáról, illetve Veszprémből érkeztek.

3.1.1. A FISH szerepének meghatározása során használt minták

A karyotipizálás és egyidejű perifériás vérmintán végzett FISH eredményeit egyszerű fúziós BCR-ABL1 szonda esetében 150, dupla fúziós szonda esetén 120 esetben hasonlítottuk össze.

Emellett 307 esetben vetettük össze a perifériás vérmintán elvégzett RQ-PCR vizsgálat és a csontvelői karyotipizálás eredményét.

3.1.2. Az automatizált és a manuális FISH értékelésének összehasonlítása során használt minták

18 CML-es beteg kis arányú *BCR-ABL1* pozitivitást (5 – 25%) mutató perifériás vérmintáját vizsgáltuk. Negatív kontrollként 3 egészséges felnőtt perifériás vérmintáját, pozitív kontrollként egy *BCR-ABL1* pozitív SD-1 sejtvonalat, valamint három olyan CML-es beteg mintáját használtuk, akikben a Ph-kromoszóma duplikációja jelent meg.

3.1.3. Az imatinib rezisztencia kapcsán vizsgált betegek és minták

48 olyan CML-es beteg mintáit vizsgáltuk, akik hematológiai (24 beteg), vagy citogenetikai (24 beteg) rezisztencia jeleit mutatták. Hematológiai rezisztenciának a CHR hiányát, vagy elvesztését tartottuk, citogenetikai rezisztenciának tekintettük azokat az

eseteket, amikor 12 hónap kezelés után nem alakult ki CCyR, vagy a már kialakult CCyR elveszett, de hematológiai rezisztencia nem jelentkezett.

A betegek egy része elsővonalban, másik része interferon kezelést követően másodvonalban kapott imatinibet. 43 beteg krónikus fázisban, 2 akcelerált fázisban, 3 pedig blasztos krízisben került felismerésre, átlagos életkoruk 50 év volt.

Elvégeztük az *ABL1* kináz domén mutációs analízisét szekvenálással, meghatároztuk a derivált 9-es kromoszómát érintő interstíciális deléció meglétét vagy hiányát a FISH jelmintázat alapján. RT-PCR vizsgálattal meghatároztuk a BCR-ABL1 transzkriptum típusát (e13a2, e14a2, vagy mindkettő), valamint FISH vizsgálatok, illetve karyotipizálás alapján az addicionális eltérések jelenlétét, illetve hiányát.

A rezisztens betegek molekuláris és citogenetikai jellemzőit 98 rezisztenciát nem mutató CML-es betegével vetettük össze.

3.1.4. A ritka *BCR-ABL1* töréspontú betegek

Három krónikus fázisú CML-es beteg imatinib kezelését követtük 3 – 5 éven át, akiknél kizárólag m-bcr (e1a2) BCR-ABL1 transzkriptum igazolódott. Egy további, μ-bcr (e19a2) BCR-ABL1 transzkriptumot hordozó krónikus fázisú CML-es beteget 39 hónapon át követtünk.

3.1.5. Egy konstitúcionális eltéréseket hordozó CML-es beteg kapcsán vizsgált minták

Egy 44 éves krónikus fázisú CML-es férfi esetét vizsgáltuk, akinél diagnóziskor a Philadelphia-transzlokáció mellett komplex citogenetikai eltérések igazolódtak. 7 családtagjának perifériás vérmintáin is végeztünk konvencionális citogenetikai vizsgálatot a megfigyelt eltérések családi halmozódásának kimutatása végett.

3.1.6. Ph-pozitív és negatív sejtekben jelentkező 8-as triszómia kapcsán vizsgált betegek

Egy 40 éves nő és egy 50 éves férfi CML-es beteget követtünk 65, illetve 55 hónapon keresztül, akik elsővonalban imatinib, második vonalban dasatinib kezelésben részesültek.

Karyotipizálást, illetve RQ-PCR vizsgálatot 11, illetve 9 alkalommal végeztünk. 14 minta esetén CEP8, majd BCR-ABL DF szondával egymást követő, kombinált FISH vizsgálat is történt.

3.2. Karyotipizálás

A csontvelői mintákon 24, illetve 48 órás tenyésztést követően, valamint tenyésztés nélkül végeztünk G-sávozással citogenetikai vizsgálatot. Minden minta esetén legalább 20 metafázist igyekeztünk értékelni. A karyotípusokat a Nemzetközi Humán Cytogenetikai Nomenklatúra (***61***) alapján írtuk le.

3.3. Fluoreszcencia in situ hibridizáció

3.3.1. Manuális FISH

A FISH vizsgálatok kereskedelmi forgalomban kapható, kétszínű, egyszerű, illetve dupla fúziós szondákkal (BCR-ABL SF, BCR-ABL DF, Vysis Inc., Downers Grove, IL) történtek perifériás vér, és/vagy csontvelői mintákon. A sejteket az erythrocyták lízisét követően methanol/jégecet oldatban (3:1 v/v%) fixáltuk, majd lemezre cseppentettük és levegőn szárítottuk. A lemezeket pepszinnel kezeltük (0,01% pepszin / 0,02 M HCl oldat) 10 percen át 37 ºC-on. A sejteket és a szondákat együttesen denaturáltuk 78 ºC-on 10 percig, a hibridizáció egy éjszakán át 37 ºC-on zajlott. A poszthibridizációs mosás 50%-os formamidot tartalmazó 2×SSC oldatban történt 3×5 percen át, 42 ºC hőmérsékleten, amit két további mosás követett 2×SSC oldattal, 7 percig 42 ºC-on. A lemezeket 0,5 μg/ml DAPI-t tartalmazó Vectashield-ben (Vector Laboratories, Burlingame, CA) fedtük le.

A manuális értékelés során 200 sejtet vizsgálatunk, az álpozitivitást 10 egészséges felnőtt mintái alapján határoztuk meg, melynek felső határa duplafúziós szonda (BCR-ABL DF) esetén 1,0% volt.

3.3.2. Automatizált FISH

Az automatizált FISH analízishez a digitális képek Metafer 4.0 képfelvevő és képanalizáló szoftverrel, valamint egy Zeiss Axioplan2ie MOT motorizált, epifluoreszcens mikroszkóppal készültek (Metasystems, Altlussheim, Germany), mely szűk tartományú sávszűrőkkel (Spectrum Green-FITC, Spectrum Orange és DAPI), Plan-Neofluar 40x/0,75 objektívvel, valamint nagy felbontású fekete-fehér CCD kamerával (CV-M1, JAI, Denmark) volt felszerelve. A rendszer végigpásztázta a lemez egy előre kijelölt területét, az analízis három lépésben történt: sejtmag szelekció, FISH jel felismerés, jelmintázat értékelés.

A felvételeken a digitális képkorrekciók után számos DAPI objektum mutatkozott, melyek közül a rendszer az előzetesen beállított paraméterek alapján automatizáltan elkülönítette a nagyméretű, összetapadt sejtcsoportokat, a kicsi magtörmelékeket, illetve a látótérről részben kilógó, ezért egészében nem értékelhető sejtmagokat. Az elkülönítés az alábbi paraméterek alapján történt: *counterstain object threshold*: 20%, *minimum object area*: 50 μm^2, *maximum object area*: 500 μm^2; *maximum relative concavity depth*: 0.5; *maximum aspect ratio*: 3.5.

Ha a látótérben sejtmagnak megfelelő DAPI objektum mutatkozott, akkor a látótérről a piros (Spectrum Orange) és a zöld (Spectrum Green) fluoreszcens csatornában, 5 különböző, egymástól 0,5 µm-ról elhelyezkedő fókuszsíkban is készültek felvételek. Digitális háttérkorrekció, illetve képélesítést követően a FISH jeleket méretük, intenzitásuk, kontrasztjuk, illetve a többi, azonos színű jeltől való távolságuk alapján ismerte fel a rendszer. A jelek optikai középpontjának meghatározása a különböző fókuszsíkok figyelembe vételével, 3D-ben vált lehetségessé. A jelfelismerés paraméterei az alábbiak voltak: *spot measurement area*: 0.1 μm^2; *minimum relative spot intensity*: 40 %; *minimum spot distance* (azonos színű jelek között): 1 µm; *maximum relative spot area*: 50/1000; *minimum spot contrast*: 20%.

A rendszer a jelek száma alapján, illetve a különböző színű jelek közötti legrövidebb távolság alapján határozta meg, hogy egy sejtmag *BCR-ABL1* transzlokáció pozitív, vagy negatív. A jelek közötti távolságot a rendszer pixelben határozta meg, egy pixel 40x objektív használata mellett 0,168 µm-nek felelt meg.

3.3.3. Konszekutív FISH vizsgálatok

A konszekutív FISH vizsgálatok során először kereskedelmi forgalomban kapható, 8-as centromerikus szondával (CEP8, Vysis Inc.) végeztünk vizsgálatot a fent leírt módon. A Metafer 4.0 rendszerrel felvételeket készítettünk a lemezekről, majd a jelölés eltávolítását követően rehibridizáció történt BCR-ABL DF szondával. A korábban készült felvételek alapján a három, és a két 8-as centromernek megfelelő jelet mutató sejteket külön-külön vizsgáltuk a *BCR-ABL1* transzlokáció szempontjából, törekedtünk 200-200 sejt vizsgálatára.

A CEP8 szonda álpozitivitását 4 egészséges felnőtt perifériás vérmintáján határoztuk meg. Az átlagos álpozitivitás 1,5% volt, a felső határérték (átlag + 2×SD) 2,6%.

3.4. PCR vizsgálatok

3.4.1. RNS-izolálás

Az RNS izolálás lehetőleg 2×10^7 fehérvérsejtet tartalmazó szuszpenzióból indult TRIZOL reagens használatával (Life Technologies, Gaithersburg, MD) a gyártó ajánlásának megfelelően.

3.4.2. Reverz transzkripció (RT)

A kvalitatív RT-PCR-hez a reverz transzkripció Kereskai és munkatársai (***62***) alapján történt. Maloney Murine Leukaemia Virus (MMLV) reverz transzkriptáz enzimet (Appligene-Oncor, Franciaország) használtunk.

A kvantitatív PCR vizsgálathoz High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystem) reverz transzkripciós összeállítást használtunk, a gyártó ajánlásának megfelelően.

3.4.3. Kvalitatív RT-PCR

A kvalitatív vizsgálat nested PCR-rel történt, a *Europe Against Cancer* programban javasolt primerek használatával (***63***). Az RNS minőségének ellenőrzése végett *ABL1* 2-es és 3-as exonoknak megfelelő primerekkel is történt vizsgálat.

3.4.4. Kvantitatív RT-PCR

A kvantitatív *BCR-ABL1* vizsgálatot Ipsogen BCR-ABL1 FusionQuant kittel, a gyári protokollnak megfelelően végeztük, reverz transzkripciót követően. Laboratóriumunk 2010-ben egy országos standardizációs programban vett részt, módszerünk Nemzetközi Konverziós faktora 0,9253.

3.5. *ABL1* kináz domén mutációjának vizsgálata

Az *ABL1* kináz domén pontmutációinak kimutatása direkt, bidirekcionális szekvenálással történt BigDye 1.1 „cycle sequencing kit" felhasználásával. A jelölés reverz transzkripciót, majd hemi-nested PCR-t követően történt (***59***). A reakció első lépésében *BCR* 13-as exon, illetve *ABL1* 7-es exon primerekkel a *BCR-ABL1*-nek megfelelő szakasz került felsokszorozásra, majd a második lépés során az *ABL1* exon 4 és exon 7 primerekkel az *ABL1* kináz domént sokszoroztuk fel. Ez utóbbi termék bidirekcionális jelölése, majd szekvenálása történt ABI PRISM 310 (Applied Biosystems, CA, USA) automata kapilláris elektroforézis készülékkel.

4. Eredmények

4.1. A FISH szerepének meghatározása a CML monitorizálása kapcsán

Krónikus CML-es betegek követéses mintái közül 150 perifériás vérminta esetén végeztünk BCR-ABL SF szondával FISH vizsgálatot, és vetettük össze a csontvelői karyotipizálás eredményével. A FISH eredmény átlagosan 12,9 %-kal volt alacsonyabb, mint a Ph+ metafázisok aránya. A CCyR 47 esetben állt fenn, a FISH vizsgálatok eredménye CCyR esetén 0 – 13,0 % közötti tartományban szórt (átlag 5,0 %). Reciever operating characteristic (ROC) analízis alapján 7 %-os FISH határérték bizonyult a legjobbnak CCyR fennálltának, vagy hiányának megítélése szempontjából. Ezzel a határértékkel 81%-os szenzitivitással és 84%-os specificitással lehetett a CCyR jelenlétét megítélni.

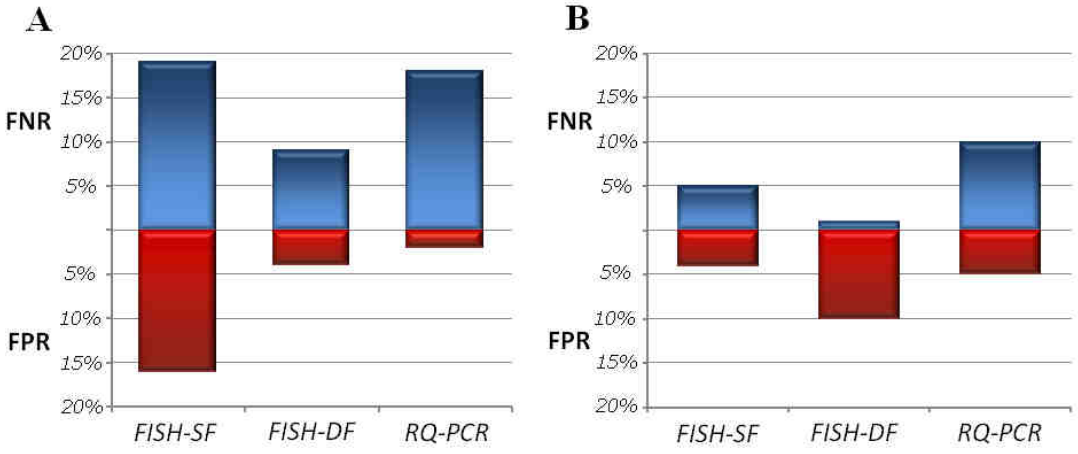
Tekintettel arra, hogy a CCyR és a parciális citogenetikai válasz (PCyR, 20 metafázisból 1-7 Ph+) között jelentős az átfedés, megvizsgáltuk, hogy mi az MCyR (CCyR vagy PCyR) és a FISH kapcsolata. 15 %-os határértéket használva az MCyR fennállta 95%-os szenzitivitással és 96%-os specificitással határozható meg a perifériás vérmintán elvégzett FISH segítségével, BCR-ABL SF szondát használva.

120 perifériás mintát vizsgáltunk a fentiekhez hasonlóan BCR-ABL DF szondával. CCyR fennállta esetén a FISH eredmények 0 – 10,7% közötti tartományban szórtak (átlag 0,7%). 1% határérték bizonyult a legjobbnak, ezt használva a CCyR fennállta 91%-os szenzitivitással és 96% specificitással volt meghatározható, 15%-os határérték mellett az MCyR 99% szenzitivitással, és 90%-os specificitással (**7. ábra**).

A dupla fúziós szondával végzett FISH vizsgálatok során eltérő jelmintázatok mutatkoztak. A *BCR-ABL1* pozitív sejtek 75%-a mutatta a típusos, Ph-transzlokációra utaló 2F1R1G (2 fúziós, 1 piros és 1 zöld jel) jelmintázatot. A többi esetben, különböző citogenetikai események – pl. variáns Ph-transzlokáció, vagy interstíciális deléció az érintett kromoszómákon – következtében ettől eltérő mintázat mutatkozott. A különböző jelmintázatok jelentősen eltérő álpozitivitási határt eredményeznek, így esetükben a fenti összefüggés a citogenetikai válasszal csak korlátozottan áll fenn (**8. ábra**).

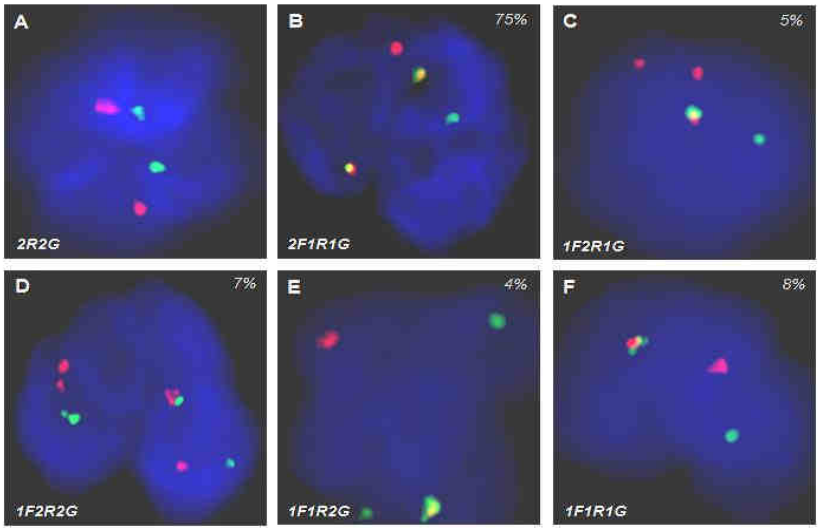
A CCyR és az 1% *BCR-ABL1/ABL1* arány között szoros korrelációt figyeltünk meg: az RQ-PCR eredmény alapján a CCyR fennállta ugyan 98%-os specificitással, de csupán 82%-os

szenzitivitással volt megbecsülhető. Az MCyR és a 10% RQ-PCR összefüggése szempontjából a specificitás és a szenzitivitás 95%, illetve 90% volt (**7. ábra**).



7. ábra. A karyotipizálás és a molekuláris vizsgálatok összefüggése

Az A ábrán a molekuláris módszerek és a CCyR, a B ábrán az MCyR összefüggése látható. Bár az RQ-PCR vizsgálat specificitása (1 – FPR) jobb, a szenzitivitása (1 – FNR) jelentősen elmarad a FISH-DF-hez képest mind a CCyR, mind az MCyR meghatározásának szempontjából. *Rövidítések*: FPR: álpozitivitási ráta; FNR: álnegativitási ráta; FISH-SF: egyszerű fúziós szondával végzett FISH vizsgálat; FISH-DF: dupla fúziós szondával végzett FISH vizsgálat; RQ-PCR: valósidejű kvantitatív PCR.



8. ábra. FISH jelmintázatok duplafúziós szonda használata esetén

A: normális sejt jelmintázata, B-F: *BCR-ABL1+* sejtek lehetséges jelmintázatai. A jobb felső sarokban 183 beteg vizsgálata alapján meghatározott gyakoriság látható. A különböző jelmintázatok esetén az álpozitivitás felső határa jelentősen eltérő, 10 egészséges felnőtt vérmintája alapján az értékek a következők (B-F): 0,8%, 3,1%, 1,5%, 2,4%, és 15,8%.

4.2. Az automatizált és a manuális FISH összehasonlítása

4.2.1. A sejtmagok felismerése

A rendszer betanítása során beállított pásztázási paraméterekkel a sejtfelismerés szenzitivitása 88,7%-nak (375/423 sejt) adódott. A sejtmagként felismert objektumok átlagosan 10,4%-a bizonyult több, kisebb sejt csoportjának. Ezeket a sejtcsoportokat egyszerű morfológiai paraméterek alapján pontdiagramon ábrázolva manuális kapuzással könnyen el lehetett különíteni az egyedi sejtmagoktól. A sejtcsoportok kizárása után a sejtfelismerés specificitása 99,9%-ra javult.

4.2.2. FISH jelek felismerése

A kontrollok vizsgálata során a sejtek piros fluoreszcens jeleinek számát 84,9%, míg a zöldekét 80,9% arányban ismerte fel helyesen a rendszer. A jelszám tévesztésének leggyakoribb okai a jelek sejtciklusfüggő hasadása, két jel véletlen összefekvése, magas háttérfluoreszcencia, a jelek intenzitása közötti jelentős különbség, valamint autofluoreszkáló műtermékek voltak. Ugyanezen jelenségek okozzák a nehézségeket a manuális értékelés során is. A jelfelismerési hibák csaknem minden esetben a vártnál több, vagy kevesebb zöld, illetve piros jelet eredményeztek. A két-két jelnél többet, vagy kevesebbet tartalmazó sejtek kizárását követően hibás jelfelismerés csupán a sejtek 0,4%-ában mutatkozott.

A **3. táblázat** mutatja, hogy a negatív és a pozitív kontroll mintákban mennyi sejtmagot ismert fel a rendszer, és ebből mennyi maradt a sejtcsoportok, illetve a hibás jelfelismerések kizárása után. Az SD-1 sejtvonal tetraploid; a kétszer annyi zöld és piros jel lényegesen több jelfelismerési hibával járt. Az SD-1 sejtvonalat leszámítva a negatív és pozitív minták a kizárt sejtek számában nem mutattak szignifikáns különbséget, így nem várható, hogy a kizárás a betegminták vizsgálata során az eredmények torzulásához vezetne.

	Sejtek száma	Analizált sejtek száma[a] (%)	Jeltávolság[b] átlaga (µm) (tartomány)
Negatív minták			
Neg#1	2708	1085 (40,1)	3,24 (0,17 – 12,26)
Neg#2	1930	865 (44,8)	3,19 (0,17 – 11,42)
Neg#3	2781	1276 (45,9)	3,34 (0,17 – 13,27)
átlag	*2473*	*1075 (43,6)*	*3,26*
Pozitív minták			
Poz#1	2,263	966 (42,7)	0,67 (0,00 – 1,51)
Poz#2	2,805	1346 (48,0)	0,50 (0,00 – 1,51)
Poz#3	4,377	1797 (41,1)	0,66 (0,00 – 1,68)
SD-1	344	91 (24,0)	0,62 (0,17 – 1,51)
átlag	*2,447*	*3148 (43,9)*[c]	*0,61*

3. táblázat. Az automatizált analízis eredményei a pozitív és negatív kontrollokon

Rövidítések: Neg#1-3, Negatív kontrollok; Poz#1-3, pozitív kontrollok; SD-1, BCR-ABL1+ sejtvonal

[a]A negatív kontrollok esetében csupán a két-két, a pozitív kontrollok esetében a három-három, az SD-1 setjvonal esetében pedig a négy-négy piros, illetve zöld jelet mutató sejtek kerültek analízisre, mivel ezekben a sejtekben lehetett helyes a jelfelismerés.

[b]A jeltávolság a piros és a zöld jelek közötti legkisebb távolságot jelentette.

[c]A pozitív minták átlaga az SD-1 mintát nem tartalmazza; a jelfelismerés a sejtvonal sejtjein a CML-es betegek mintáihoz képest jóval alacsonyabb hatásfokkal történt.

4.2.3. A jelmintázat értékelése

A pozitív és negatív sejtek a különböző színű jelek közötti legrövidebb távolság alapján különíthetők el. Az optimális határértéket a pozitív és negatív sejtekben mért távolságok eloszlása alapján határoztuk meg. Ehhez olyan mintákra volt szükség, melyek 100%-ban negatív, illetve pozitív sejtekből állnak. Az utóbbi kritériumnak az SD-1 sejtvonal megfelel, ám a fent említett okok miatt a jelfelismerés hatékonysága ebben a mintában lényegesen rosszabb, mint a többiben.

A két Ph-kromoszómát tartalmazó sejtek három piros és három zöld jelet tartalmaznak. Ennyi jelet a Ph-negatív sejtek mindössze 1,9%-a (± 0,6%) mutatott, hibás jelfelismerés következtében. A jeltávolság szempontjából tehát pozitív kontrollként a 4 piros és 4 zöld jelet tartalmazó SD-1 sejteket, illetve a három piros és három zöld jelet tartalmazó Ph+ sejteket

használtuk. A pozitív és negatív sejtek a legjobb elkülönítése 5 pixeles (0,84 µm) határértéknél valósult meg.

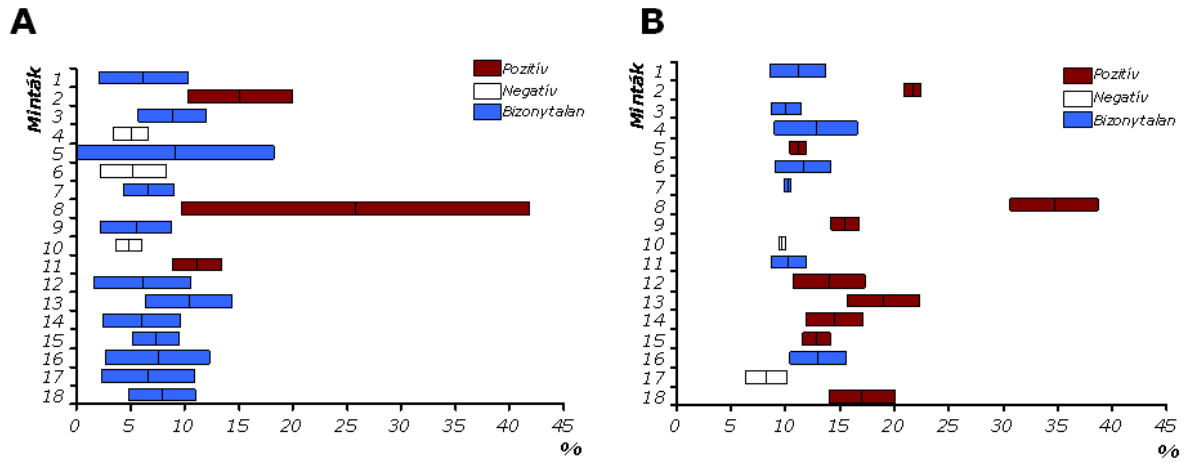
4.2.4. A manuális és az automatizált értékelés eredményeinek összevetése

A 6 kontroll mintát, valamint a 18 CML-es beteg mintáit három értékelő egymástól függetlenül manuálisan vizsgálta. Az álpozitivitás és az álnegativitás átlagosan 5,8%, illetve 2,7% volt, míg ezek az értékek az automatizált analízis során 6,7%-nak, illetve 5,5%-nak adódtak. A kimutathatóság alsó határa – az a legkisebb pozitivitás a mintában, amit 95%-os biztonsággal ki tudunk mutatni – tekintetében csupán 1,5%-nyi különbség mutatkozott: manuális vizsgálat esetén 10,5%, automatizált analízissel 12,0%, abban az esetben, ha 200 sejtet vizsgálunk.

A manuális és az automatizált analízis eredményei szoros lineáris korrelációt mutattak (Pearson-korreláció, R^2 = 0,989). A két módszer eredményei között átlagosan 3,7 (± 7,4) % eltérés mutatkozott.

A három vizsgáló manuális eredményei egymáshoz képest eltérést mutattak. A betegminták vizsgálata során a manuális eredmények átlagához képest a három vizsgáló 20,7, 11,4 illetve 20,8%-os tartományban tért el. A különbségek azt eredményezték, hogy 18 betegmintából 12 esetben az egyik vizsgáló nem értett egyet a másik kettővel abban a kérdésben, hogy vajon a mintában van-e az álpozitivitási határt meghaladó pozitivitás (**9. ábra**).

A manuális analízis során 200 sejt vizsgálata történt, az automatizált analízis során a megvizsgált sejtek száma csaknem hatszor nagyobb volt (átlagosan 1177 db, tartomány: 680 – 3520 db). Annak érdekében, hogy a manuális és az automatizált eredmények pontosságát hasonló sejtszám szintjén is összehasonlíthassuk, az automatizált analízist három-három 200 db sejtet tartalmazó csoportra osztottuk. Ezeket a részpopulációkat külön-külön vizsgáltuk, majd az eredményeket összevetettük éppúgy, mint ahogy azt a három független vizsgáló eredményeivel tettük (**9. ábra**). A részpopulációk eredményei az átlagostól 7,8, 6,0, illetve 8,2% tartományban tért el, mely tartományok gyakorlatilag megfelelnek a mintavételi hibából fakadó bizonytalanságnak. Összehasonlításképpen, 15%-os pozitivitást tartalmazó minta és 200 megvizsgált sejt esetén a binomiális eloszlás alapján az eredmény 10,4 – 20,7% között várható (95%-os konfidencia intervallum); ami 10,3%-os tartománynak felel meg.



9. ábra. A manuális és az automatizált analízis eredményeinek szórása

A: A manuális analízis eredméyei. B: Az automatizált analízis eredményei. A hasábok a három manuális vizsgáló, illetve az automatizált analízis három részpopuláció eredményeinek tartományát (átlag ± 2×SD) jelzik. Az automatizált analízis során a vizsgálati eredmények tartománya kisebb volt, mint a manuális esetén (átlagosan 4,2% vs 8,6%). A manuális vizsgálat során három olyan minta volt, melyet mindhárom vizsgáló pozitívnak („pozitív"), három, melyet negatívnak („negatív"), és 12, melyet különbözőnek („bizonytalan") látott. Az automatizált analízis esetén csupán **7** volt a „bizonytalan" minták aránya.

A három részpopuláció eredményei csupán 7 esetben mutattak diszkrepanciát annak tekintetében, hogy az észlelt pozitivitás meghaladja-e az álpozitivitás felső határát.

Az automatizált analízis sebessége átlagosan 36,5 perc volt 200 db sejtenként. Bár a manuális vizsgálat 5 – 10 percet vett igénybe 200 sejt számolása esetén, ha az értékelés során valamennyi sejtről felvételt kellett volna készíteni, az ennek az időnek a többszörösét vette volna igénybe.

4.3. Az imatinib rezisztencia okainak vizsgálata

4.3.1. Kiindulási molekuláris és citogenetikai tényezők

25 beteg esetében b2a2 (e13a2), 17 esetben b3a2 (e14a2), 5 esetben mindkét töréspontú *BCR-ABL1* transzkriptum kimutatható volt, 1 esetben pedig e1a2 (m-bcr) *BCR-ABL*1 mRNS jelenléte igazolódott (**10. ábra**). A 86 rezisztenciát nem mutató esetből 36-ban b2a2, 37-ben

b3a2, 13-ban pedig mindkét töréspontú transzkriptum megfigyelhető volt. A rezisztens és a nem rezisztens esetek között a különböző töréspontok gyakorisága nem mutatott szignifikáns különbséget (Fisher próba, p = 0,490).

A rezisztens esetek közül 35-ben a típusos Ph-transzlokációnak megfelelő 2F1R1G FISH jelmintázat mutatkozott, három esetben variáns Ph-transzlokációra utaló 1F2R2G, két-két esetben 1F1R2G, illetve 1F2R1G jelmintázatot észleltünk, melyek der(9), illetve der(22) deléciónak felelnek meg. Öt további esetben 1F1R1G igazolódott, egy esetben három kromoszómát érintő, vélhetően két lépcsőben kialakult variáns Ph-transzlokáció – t(9;22), majd t(1;9) – következtében 2F1R2G jelmintázat volt megfigyelhető.

A különböző jelmintázatok gyakorisága nem mutatott szignifikáns különbséget a nem rezisztens esetekhez képest (Fisher próba, p = 0,685).

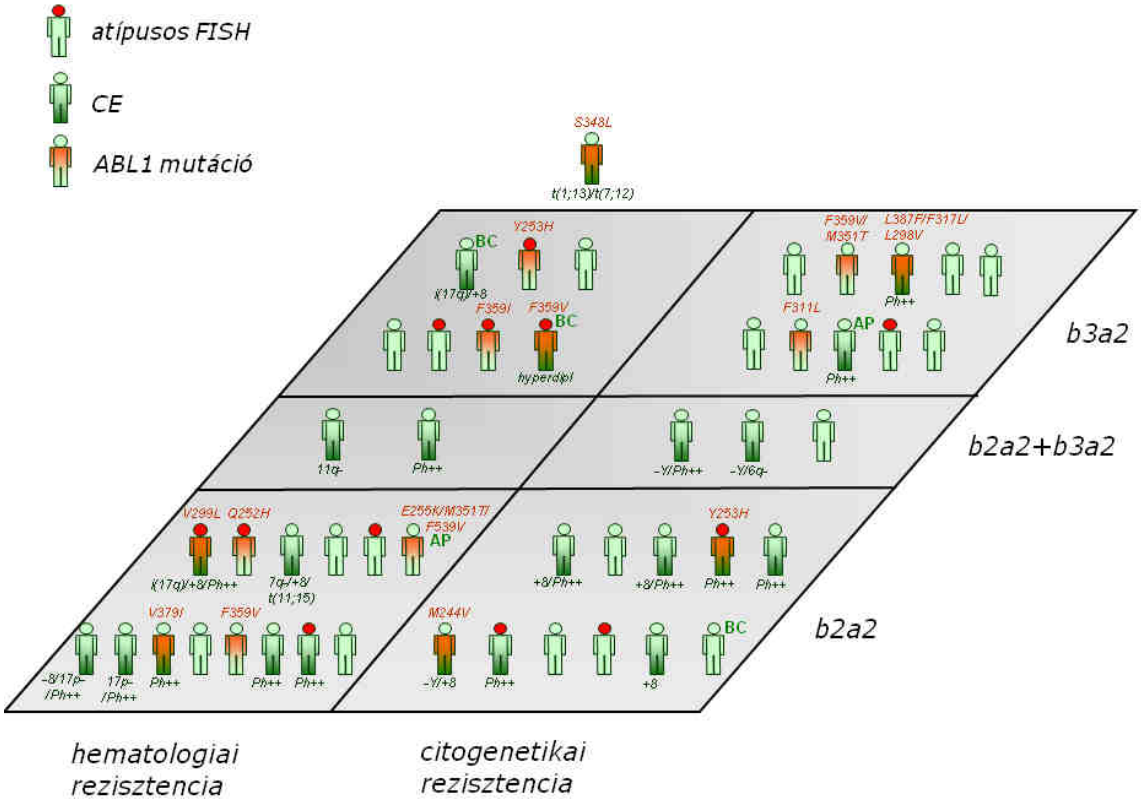
4.3.2. Szerzett molekuláris és citogenetikai tényezők

22 rezisztenciát mutató betegnél a Ph-transzlokáció mellett másodlagos eltérések is mutatkoztak, 11 citogenetikai, és 11 hematológiai rezisztenciát mutató esetben. 14 betegnél a Ph-kromoszóma duplikációja volt megfigyelhető, 11 esetben egynél több eltérés jelentkezett.

14 beteg mintáiban igazolódott *ABL1* kináz domént érintő pontmutáció, két betegben három különböző, egyben két mutáció volt észlelhető. 13 különböző, az irodalomban fellelhető, korábban leírt pontmutáció igazolódott, a leggyakoribb F359V volt, mely négy esetben jelentkezett.

A *BCR-ABL1* túlexpressziójának meglétét Bianchini által javasolt módszer alapján vizsgáltuk (***64***). 146 vérminta esetében meghatároztuk az RQ-PCR és a FISH eredmények hányadosát, majd a túlexpressziót jelző határértékként a 90-es percentilnek megfelelő 4,30 értéket jelöltük meg. Ezzel a módszerrel 7 beteg mutatott *BCR-ABL1* túlexpressziót, míg 46 rezisztenciát nem mutató beteg közül csupán 3 mutatott hasonló mértékű *BCR-ABL1* expressziót, a különbség azonban statisztikai szempontból nem szignifikáns (Fisher próba, p = 0,317).

14 esetben sem ABL1 kináz domén mutáció, sem klonális evolúció, sem *BCR-ABL1* túlexpresszió nem volt kimutatható a rezisztencia okaként. Ezek közül 5 esetben hematológiai rezisztencia volt megfigyelhető.



10. ábra. Az imatinib rezisztens esetek molekuláris és citogenetikai jellemzői

A hematológiai rezisztencia csoportban a rombuszon kívüli beteg m-bcr (e1a2) töréspontú *BCR-ABL1* transzkriptumot tartalmazott. *Rövidítések*: CE, klonális evolúció; *ABL1* mutáció, *ABL1* kináz domén pontmutációja; atypusos FISH, az 1R1G2F-től eltérő FISH jelmintázat; b3a2 (e14a2) töréspontú *BCR-ABL1* transzkriptum; b2a2 (e13a2) töréspontú *BCR-ABL1* transzkriptum; b2a2+b3a2 töréspontú *BCR-ABL1* transzkriptumok együttes jelenléte; BC, blasztos krízis diagnóziskor; AP, akcelerációs fázis diagnóziskor.

20 beteg a rezisztencia kialakulása után átlagosan 30 hónappal (0 – 67 hónap) kikerült a nyomonkövetésből, további történetük nem ismert. A többi 28 beteg közül 8 elhunyt, 2 CML-től független okból (myeloma multiplex, illetve rectum adenocarcinoma), 6 blasztos krízis kialakulásának következtében.

Két beteg az imatinib dózis emelésének hatására CCgR-t ért el, egyikük MMR-t is mutatott. 15 beteg dasatinib kezelésben részesült, 6 beteg CCgR-t ért el (5 ezen belül MMR-t is), 3 beteg esetében CCgR nélkül CHR alakult ki. 6 beteg esetében a dasatinib terápia nem volt megfelelő; négy rezisztenciát mutatott, kettő pedig intoleranciát. 11 beteg nilotinib kezelésben részesült, 4 esetben CCgR, 2 esetben CCgR nélkül CHR alakult ki. Egy beteg intoleranciát mutatott, három pedig rezisztenciát.

4.3.3. A pontmutációk és a klonális evolúció megjelenésének dinamikája

Megvizsgáltuk, hogy az *ABL1* kináz domén mutáció megjelenése egybeesett-e a terápia-rezisztencia jelentkezésével. 14 beteg közül csupán 7 esetében volt kimutatható a pontmutáció a rezisztencia jelentkezésének idején, 7 esetben átlagosan 16 hónappal (7 – 31 hónap) később igazolódott először az eltérés.

22 esetben, amikor addicionális citogenetikai eltérés igazolódott, 10 esetben a rezisztencia jeleivel egyidőben mutatkozott először az eltérés, két esetben már előbb, 10 esetben pedig átlagosan 20 hónappal később (5 – 36 hónap).

4.4. A ritka BCR-ABL1 töréspontok prognosztikai jelentőségének vizsgálata

4.4.1. 50 éves nő története

Az 50 éves nő kivizsgálása 1999 júliusában indult lépmegnagyobbodás okozta hasi diszkomfort miatt. A perifériás vér, illetve a csontvelő vizsgálatok krónikus fázisú CML fennálltát igazolták, a karyotipizálás a sejtek 100%-ában Philadelphia-transzlokációt mutatott. Az RT-PCR vizsgálatok során M-Bcr töréspontú *BCR-ABL1* transzkriptum nem igazolódott, m-Bcr-nek megfelelő e1a2 transzkriptum mutatkozott.

Interferon kezelés indult, melynek során a fehérvérsejtszám normalizálódott, azonban thrombocytopenia jelentkezett és perzisztált. 2001 januárjában a betegség progressziója volt megfigyelhető a perifériás vérben jelentős leukocytosissal és emelkedett blasztaránnyal (69 G/l fehérvérsejtszám, 12% blaszt). A citogenetikai vizsgálat addicionális eltérést nem igazolt, emelt dózisú imatinib (600 mg/nap) kezelés indult. A kezelés további öt évében a thrombocytopenia perzisztált, citogenetikai, illetve molekuláris válasz nem jelentkezett, de a fehérvérsejtszám normalizálódott (**4. táblázat**).

4.4.2. 62 éves nő története

A 62 éves nő gyengeség, fogyás és láz miatt került kivizsgálásra, melynek során krónikus fázisú CML igazolódott. A karyotipizálás egyedül Ph-transzlokációt igazolt, az RT-PCR vizsgálat kizárólag e1a2 töréspontú *BCR-ABL1* transzkriptum jelenlétét mutatta.

400 mg/nap dózisú imatinib kezelés indult, mely mellett teljes hematológiai válasz jelentkezett. A 6. hónapban MCyR volt megfigyelhető (10/30 Ph+ metafázis, FISH: 26% *BCR-ABL1* pozitivitás). A terápiás válasz fokozatos javulást mutatott, a harmadik év végére CCyR jelentkezett (**4. táblázat**).

Eset	CML fázisa	Kezelés	FISH	RQ-PCR
50 év, ♀	CP	IM, 4. év	88%	15,3%
	CP	IM, 5. év	83%	21,8%
62 év, ♀	CP	diagnózis	86%	11,6%
	CP	IM, 1. év	10%	2,9%
	CP	IM, 2. év	5%	1,6%
	CP	IM, 3. év	neg.	0,2%
44 év, ♂	CP	diagnózis	64%	
	CP	IM, 1. év	neg.	
	AP	IM, 2. év	70%	
	BC	IM, 30. hónap	88%	78,5%
36 év, ♂	CP	diagnózis	100% (40% Ph++)	1,8%
	CP 2.	7+3 IM, 6. hó	10%	0,2%
	BP 2.	IM, 9 hó	93% (78% Ph++)	15,2%
	CP 3.	Flag-Ida, IM, SCT, 1 hó	neg.	neg.
	CP 3.	SCT, 4 hó	neg.	0,3%
	BP 3.	SCT, 4,5 hó	79% (64% Ph++)	19,6%
	CP 4.	SCT, 7 hó, Flag, DLI	neg.	0,1%
	CP 4.	SCT, 19 hó, DLI	neg.	neg.

4. táblázat. A ritka töréspontú *BCR-ABL1* transzkriptummal rendelkező CML-es betegek nyomonkövetése

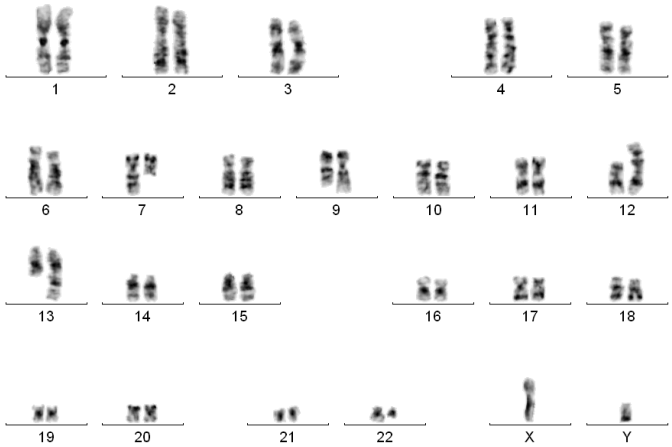
Rövidítések: CP, krónikus fázis, AP, akcelerált fázis, BP, blasztos krízis; IM, imatinib; SCT, csontvelő transzplantáció; Ph++, duplikált Ph-kromoszóma; neg., negatív vizsgálat

4.4.3. 44 éves férfi története

A 44 éves férfi esetében 2003 májusában krónikus fázisú CML igazolódott. A karyotipizálás során valamennyi sejtben Ph-transzlokáció, valamint addicionális citogenetikai eltérések (**11. ábra**) mutatkoztak, az RT-PCR vizsgálat csupán e1a2 töréspontú *BCR-ABL1* transzkriptumot mutatott.

400 mg/nap dózisú imatinib kezelés indult, mely mellett CHR, illetve MCyR alakult ki. A 21. hónapban a CHR megszűnt, a karyotipizálás során ismét 100%-ban Ph-transzlokáció igazolódott a korábban megfigyelt addicionális eltérések mellett. 7 hónappal később akcelerált fázis alakult ki (15% blaszt a perifériás vérben), az imatinib dózisát 800 mg/nap-ra emelték. A 31. hónapban myeloblastos krízis jelentkezett, ezért 7+3 protokoll szerinti indukciós kezelés indult. 5 hónappal később hónalji nyirokcsomóban extramedullaris blasztos proliferáció igazolódott, mely miatt lokális radioterápiában is részesült, majd újabb indukciós kezelés indult. A 39. hónapban szepszis klinikai tünetei mellett a beteg elhunyt (**4. táblázat**).

A blasztos krízis első jelentkezésekor, a 30. hónapban az *ABL1* kináz domén szekvenálás S348L mutáció jelenlétét igazolta, mely a 38. hónapban is perzisztált, de a 15. és a 21. hónapban még nem volt kimutatható.



11. ábra. A beteg citogenetikai eltérései a diagnóziskor

A 44 éves férfi esetében a diagnóziskor a Ph-transzlokáció mellett két egyéb abnormalitás is megfigyelhető volt; 1-es és 13-as kromoszómák kiegyensúlyozatlan transzlokációja, valamint 7-es és 12-es transzlokáció látható [46,XY,t(7,12)(q11;p13),t(9;22)(q34;q11),der(13)t(1;13)(q21;q21)].

4.4.4. 36 éves férfi története

A 36 éves férfi hasi panaszainak hátterében 2002 júliusában lépmegnagyobbodással járó krónikus fázisú CML igazolódott. A karyotipizálás során valamennyi metafázisban Ph-transzlokáció, 30%-ban az Y-kromoszóma vesztése igazolódott, a FISH vizsgálat a sejtek 40%-ában a Ph-kromoszóma duplikációjára utaló jelmintázatot mutatott. Az RT-PCR vizsgálat sem M-Bcr, sem m-Bcr töréspontú *BCR-ABL1* transzkriptumot nem igazolt, további molekuláris analízis a diagnóziskor nem történt.

Hydroxyurea, majd interferon kezelés indult, de 2002 szeptemberében generalizált nyirokcsomó megnagyobbodás jelentkezett, melynek hátterében a szövettani vizsgálat myeloblastos infiltrációt igazolt. 2003 februárjában a csontvelő vizsgálata myeloblastos krízist mutatott ki. A beteg „7+3” sémájú kemoterápiában részesült, majd 2003 áprilisában imatinib (600 mg/nap) kezelés indult.

2003 novemberében csontvelői transzplantáció előkészítése történt, az imatinib kezelés 6. hónapjában CHR és MCyR állt fenn (2/30 Ph+ metafázis, FISH: 10% *BCR-ABL1* pozitivitás). Az ekkor elvégzett RT-PCR vizsgálat, illetve szekvenálás μ-Bcr töréspontnak megfelelő e19a2 *BCR-ABL1* transzkriptumot igazolt, mely mellett egy fehérjét nem kódoló, eltolódott olvasási keretű, e18a2 transzkriptum is megfigyelhető volt. A betegség felismerésekor vizsgált minta retrospektív analízise azonos transzkriptumokat igazolt.

2004 februárjában a második blasztos krízis jelentkezett, mely miatt FLAG-Ida protokoll szerinti kemoterápia indult. A karyotipizálás informatív eredményre nem vezetett, a FISH vizsgálat a sejtek 78%-ában a Ph-kromoszóma duplikációját igazolták (**4**. **táblázat**). A kemoterápiát követően 800 mg/nap dózisú imatinib kezelés folytatódott.

2004 júliusában allogén csontvelő-transzplantációra került sor, teljes hematológiai és citogenetikai válasz alakult ki. 2004 decemberében azonban a harmadik blasztos krízis jelentkezett, melynek kezelése FLAG protokoll szerinti kemoterápiával, valamint donor lymphocyta infúzióval történt. Ezeket követően súlyos *graft versus host* betegség (grade 3) jelentkezett a bőrt és a májat érintve. 2005-ben több infekció, köztük agyi aspergillosis, illetve számos bakteriális fertőzés jelentkezett. 2006 áprilisában CCyR állt fenn, májusban Staphylococcus szepszis következtében a beteg elhunyt.

4.5. Egy konstitúcionális eltéréseket hordozó CML-es beteg története

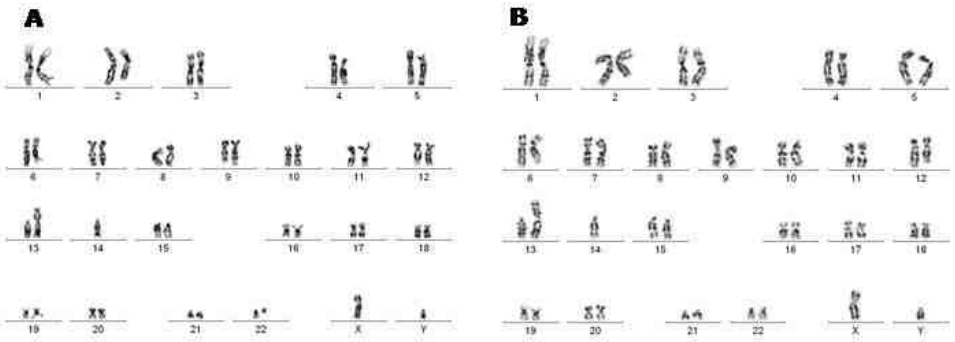
A 44 éves férfi hematológiai kivizsgálása splenomegalia, valamint lépinfarktus miatt indult. A laboratóriumi, a citológiai, valamint a csontvelő szövettani vizsgálata krónikus fázisú CML-t igazoltak. Az RT-PCR vizsgálat b2a2 töréspontú *BCR-ABL1* transzkriptum jelenlétét mutatta, az interfázis FISH vizsgálat a perifériás vérben a sejtek 54 %-ban *BCR-ABL1* transzlokációt igazolt. A csontvelői minta karyotipizálása során Ph-transzlokáció mellett a 2-es, az 5-ös, a 6-os, a 12-es, a 13-as és a 14-es kromoszómákat is érintő további eltérések igazolódtak. A karyotípust a kromoszómák korlátozottan értékelhető morfológiája miatt az alábbiként határoztuk meg: 45,XY,t(2;5)(q31;p13),t(6;12)(q16;q14), t(9;22)(q34;q11),-13,-14,+mar[11].

A klinikai prognosztikai osztályozás alapján a betegség alacsony kockázatbesorolást kapott (Hasford 770,0, Sokal 1,47), az addicionális eltérések jelenléte miatt 600 mg/nap imatinib kezelés indult. Neutro- és thrombocytopenia miatt a dózist 400 mg/napra kellett csökkenteni, mely mellett a perifériás sejtszámok normalizálódtak.

A kezelés 3. hónapjában a csontvelő szövettani és citológiai vizsgálata normális haematopoesist mutatott. A karyotipizálás során 30 metafázisból 14-ben mutatkozott a Ph-transzlokáció, ami mCyR-nak felelt meg. Meglepetésre a korábban leírt kromoszóma aberrációk valamennyi sejtben megfigyelhetők voltak. A preparátum jobb minősége következtében az eltérések pontosabb karakterizálására volt lehetőség: 45,XY,t(2;5)(q31;p13),t(6;12)(q16;q14),der(13;14)(q10;q10) (**12. ábra**). A korábban markerként megjelölt kromoszóma a 13-as és 14-es kromoszómák klasszikus robertsoni transzlokációja kapcsán jött létre.

A fenti jelenség felvetette annak a lehetőségét, hogy a megfigyelt eltérések a Ph-transzlokáció előtt alakultak ki. A 20. hónapban CCyR jelentkezett, a fenti eltérések azonban valamennyi sejtben perzisztáltak. A beteg perifériás vérmintáján, B-sejt mitogénnel, tetradecanoyl-forbol-acetáttal (TPA) történt 3 napos stimulációt követően elvégezve a vizsgálatot az eltérések valamennyi sejtben megfigyelhetőek voltak a Ph-transzlokáció nélkül.

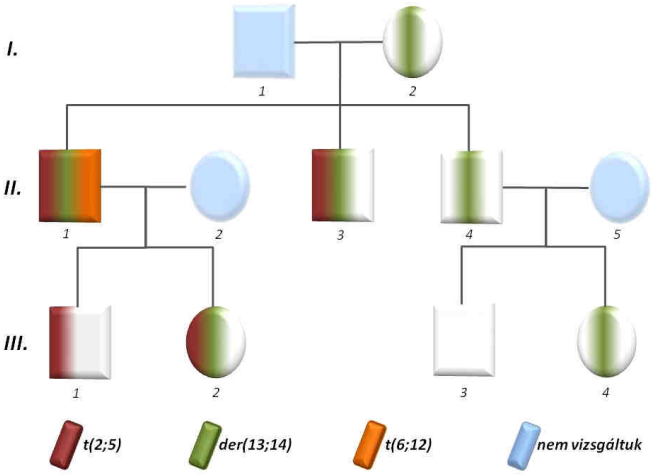
A beteg további követése során CCyR mellett a molekuláris válasz fokozatos csökkenést mutatott, a 76. hónapban major molekuláris válasz alakult ki, mely a követés legutóbbi alkalmakor, a 96. hónapban is fennállt.



12. ábra. A beteg citogenetikai eltérései

A: A kezelés 12. hónapjában elvégzett karyotipizálás. A Ph-transzlokáció mellett t(2;5), t(6;12), valamint der(13;14) mutatkoztak. B: A perifériás vér TPA-stimulációját követő vizsgálata a 20. hónapban. A korábban a Ph-transzlokáció mellett megfigyelt valamennyi transzlokáció valamennyi Ph-negatív sejtben is megfigyelhető volt.

Tekintettel arra, hogy a Ph-transzlokáció mellett megfigyelt három transzlokáció konstitúcionális jellegű eltérésnek tűnt, a beteg 7 családtagjának – édesanyjának, két testvérének, két gyermekének, valamint kisebbik fivére két gyermekének – perifériás vérmintáját is megvizsgáltuk TPA-stimulációt követően (**13. ábra**). Egy kivételével valamennyi családtag legalább egy konstitucionális eltérést hordozott, a der(13;14) öt, a t(2;5) három családtagban volt kimutatható, míg a t(6;12) kizárólag a beteg sejtjeiben volt észlelhető.



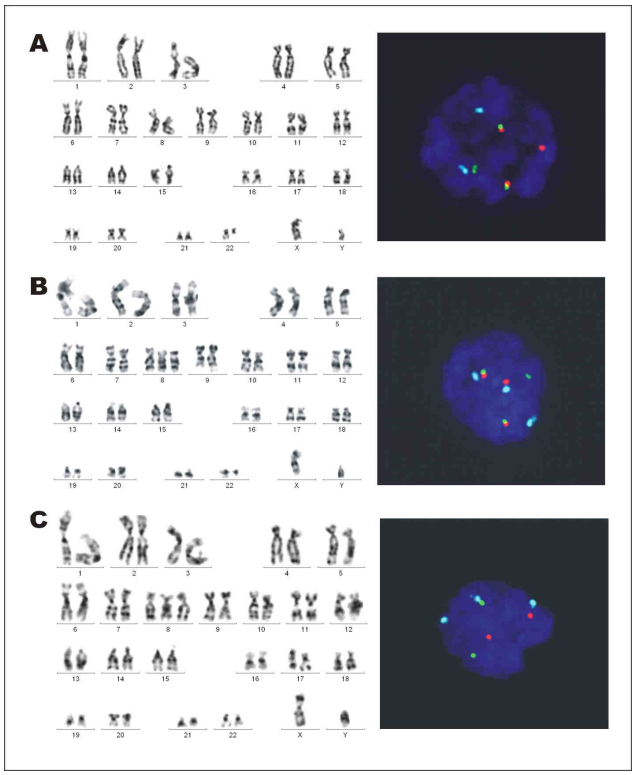
13. ábra. A beteg családfája

A beteg (II.1.) családjának három generációjában 7 családtagot vizsgáltunk. A perifériás vérminták TPA-stimulációját követően legalább 10 metafázist elemeztünk.

4.6. Ph-pozitív és negatív sejtekben egyszerre jelentkező 8-as triszómia

4.6.1. 50 éves férfi esete

Az 50 éves férfi extrém leukocytosis, súlyos splenomegalia, valamint hepatomegalia miatt került kivizsgálásra 2005 decemberében, melynek során krónikus fázisú CML igazolódott. Plazmaferezis, majd 2 hetes hydroxyurea kezelést követően imatinib terápia indult 400 mg/nap dózissal. A kezelés első 6 hónapja során teljes hematológiai válasz elérése mellett leukopenia és thrombocytopenia alakult ki, ezért többször is a dózis csökkentésére volt



14. ábra: A három abnormális klón

A karyogrammokon Ph+, Ph+/+8, valamint Ph-/+8 metafázisok figyelhetők meg. A FISH ábrákon a zöld és a piros jelek a BCR-ABL DF, a világoskék a CEP8 szondának felel meg.
A: Ph+ sejt +8 nélkül. B: Ph+ és +8-at tartalmazó sejt. C: Ph- és +8-at tartalmazó sejt.

szükség. A sejtszámok rendeződését követően a 6. hónapban vissza lehetett térni a 400 mg/nap dózishoz. Ekkor, mCyR fennállta mellett 8-as triszómia (+8) jelentkezett Ph+ és Ph- sejtekben egyaránt (**14. ábra, 5. táblázat**). A 13. hónapban a citogenetikai válasz megszűnése mellett egy új klón jelent meg, mely duplikált Ph-kromoszómát tartalmazott.

A 25. hónapban csupán mCyR állt fenn, +8 mind a Ph+, mind a Ph- sejtekben továbbra is megfigyelhető volt, ekkor dasatinib kezelés indult. 6 hónappal később CCyR jelentkezett, a +8 triszómia továbbra is megfigyelhető volt a Ph- sejtekben.

A 45. hónapban, a dasatinib kezelés 20. hónapjában hydrothorax és leukopenia jelentkezett, melyek miatt átmenetileg szüneteltetni kellett a kezelést. 2 hónappal később a molekuláris vizsgálatok a terápiás válasz romlását mutatták, a dasatinib kezelés csökkentett dózisban újraindult. A legutóbbi alkalommal, a kezelés 55. hónapjában a FISH vizsgálat a perifériás vérben 2,6% *BCR-ABL1* pozitív sejtet mutatott ki, az RQ-PCR vizsgálat során 4,96% *BCR-ABL1/ABL1* arány igazolódott.

Retrospektíven kettő kivételével valamennyi mintán konszekutív FISH vizsgálatot végeztünk egyedi sejt szinten +8 és *BCR-ABL1* transzlokáció irányában. A diagnóziskor a 8-as triszómiát hordozó sejtek aránya nem haladta meg a vizsgálat álpozitivitásának felső határát, ám az összes többi időpontban az eltérés mind a Ph+, mind a Ph- sejtekben kimutatható volt (**5. táblázat**).

A 13., a 19. és a 25. hónapban *ABL1* kináz domén mutáció irányában szekvenálást végeztünk, negatív eredménnyel. A követés során 12 alkalommal történt cristabiopsia, melynek kapcsán a szövettani vizsgálat változó súlyosságú hypocellularitást írt le, de myelodysplasiás szindrómára utaló jel nem mutatkozott.

Idő (hónap)	Karyotípus	FISH eredmények			
		Ph+	Ph+ / +8	+8	Egyik sem
0	46,XY, t(9;22)(q34;q11)[31] 46,XY[1]	96,2%	*1,4%**	*0,4%**	2,0%
6	46,XY,t(9;22)(q34;q11)[13] 47,XY,idem,+8[5] 47,XY,+8[1] 46,XY[2]	45,8%	19,9%	2,5%	31,8%
13	46,XY,t(9;22)(q34;q11)[2] 47,XY,idem,+8[14] 47,XY,idem,+der(22)t(9;22)[2] 48,XY,idem,+8,+der(22)t(9;22)[2]	2,0%	11,0%	10,8%	76,2%
19	46,XY,t(9;22)(q34;q11)[4] 47,XY,idem,+8[12] 47,XY,+8[3] 46,XY[1]	12,3%	8,5%	6,5%	72,7%
25[#]	46,XY,t(9;22)(q34;q11)[4] 47,XY,idem,+8[11] 47,XY,+8[1] 46,XY[4]	15,5%	30,9%	5,7%	47,9%
31	47,XY,+8[2] 46,XY[18]	0,9%	2,7%	4,3%	92,1%
36	46,XY,t(9;22)(q34;q11)[1] 47,XY,idem,+8[1] 47,XY,+8[3] 46,XY[4]	NT	NT	NT	NT
42	NI	NT	NT	NT	NT
47[§]	NI	20,7%	0,8%	21,6%	56,9%

5. táblázat. Az 1. eset kapcsán végzett citogenetikai vizsgálatok

Rövidítések: IM, imatinib; DA, dasatinib; NI, nem informatív vizsgálat; NT, nem történt vizsgálat.

* Ezek az eredmények nem haladják meg a FISH álpozitivitásának felső határát (2,2 %).

[#]A dasatinib kezelés indulásának időpontja.

[§]Hydrothorax és cytopenia miatt a dasatinib dózisát csökkenteni kellett.

4.6.2. 40 éves nő esete

A 40 éves nőbeteg esetében ízületi fájdalmak hátterében extrém mértékű leukocytosissal (400 G/l), valamint lép-, és májmegnagyobbodással járó, krónikus fázisú CML igazolódott. Plazmaferezis, illetve egy hetes hydroxyurea kezelés után 400 mg/nap dózisú imatinib kezelés indult. A kezelés 6. hónapjában teljes hematológiai válasz lépett fel citogenetikai válasz nélkül, ezért az imatinib dózisát 800 mg/nap-ra emelték. Két héttel később súlyos cytopenia miatt a dózist csökkenteni kellett. A 12. hónapban továbbra sem volt citogenetikai válasz, így a dózist ismét 800 mg/nap-ra emelték.

A 16. hónapban mCyR mellett +8 jelent meg Ph+ és Ph- sejtekben egyaránt (**6. táblázat**). A 29. hónapban továbbra is csak mCyR állt fenn, ezért dasatinib kezelés indult. 7 hónappal később továbbra is csupán mCyR volt megfigyelhető, a +8 kizárólag Ph- sejtekben volt látható. A citogenetikai válasz csupán az 55. hónapban javult PCyR-re, ekkor a +8 ismét megfigyelhető volt mind a Ph+, mind a Ph- sejtekben. A követés legutóbbi alkalmával, a 65. hónapban a FISH és az RQ-PCR MCyR hiányát jelezték (17,9 % és 20,82 % *BCR-ABL1* pozitivitás, illetve *BCR-ABL1/ABL1* arány).

A terápia első 36 hónapjának 7 mintáján, valamint a legutolsó mintán konszekutív FISH vizsgálatot végeztünk +8 és *BCR-ABL1* transzlokáció irányában. A diagnóziskor, illetve a 6. hónapban a +8-at hordozó sejtek aránya nem haladta meg a FISH vizsgálat álpozitivitásának felső határát, a többi mintában azonban mind a Ph+, mind a Ph- sejtekben kimutatható volt az eltérés (**6. táblázat**).

Négy alkalommal (6., 23., 29. és 36. hónap) történt *ABL1* kináz domén mutáció irányában szekvenálás negatív eredménnyel. 9 minta kapcsán a csontvelő szövettani vizsgálatára is sor került. A változó súlyosságú sejtszegénységet mutató mintákban myelodysplasiás szindrómára, vagy csontvelői fibrosisra utaló jelek nem mutatkoztak.

Idő (hónap)	Karyotípus	FISH eredmények			
		Ph+	Ph+ / +8	+8	Egyik sem
0	46,XX,t(9;22)(q34;q11)[9]	84,3%	*1,3%**	*0,1%**	14,3%
6[#]	46,XX,t(9;22)(q34;q11)[26] 46,XX[1]	70,8%	*1,0%**	*1,4%**	26,8%
12	46,XX,t(9;22)(q34;q11)[19] 46,XX[1]	69,7%	1,5%	1,7%	27,1%
16	46,XX,t(9;22)(q34;q11)[10] 47,XX,idem,+8 [1] 47,XX,+8[3] 46,XX[5]	52,9%	1,6%	6,4%	39,1%
23	47,XX,+8[1]	1,8%	0,1%	9,1%	89,0%
29[§]	46,XX,t(9;22)(q34;q11)[7] 47,XX,idem,+8 [1] 47,XX,+8[7] 46,XX[5]	6,7%	1,3%	34,7%	57,3%
36	46,XX,t(9;22)(q34;q11)[9] 47,XX,+8[4] 46,XX[8]	19,8%	0,6%	17,0%	62,6%
43	NI	NT	NT	NT	NT
49	46,XX,t(9;22)(q34;q11)[10] 47,XX,+8[2] 46,XX[8]	NT	NT	NT	NT
55	46,XX,t(9;22)(q34;q11)[4] 47,XX,idem,+8 [1] 47,XX,+8[8] 46,XX[6]	NT	NT	NT	NT
65	NI	9,8%	9,1%	1,3%	79,8%

6. táblázat. A 2. eset kapcsán végzett citogenetikai vizsgálatok

Rövidítések: IM, imatinib; DA, dasatinib; NI, nem informatív vizsgálat; NT, nem történt vizsgálat.

* Ezek az eredmények nem haladják meg a FISH álpozitivitásának felső határát (2,2 %).

[#]Az imatinib dózisát 800 mg/nap-ra emelték, de 2 héttel később 400 mg/nap-ra kellett csökkenteni.

[§]A dasatinib kezelés indulásának időpontja.

5. Megbeszélés

5.1. A FISH szerepének meghatározása a CML monitorizálása kapcsán

A CML nyomonkövetésének alapja a citogenetikai válasz meghatározása, melynek módszere a csontvelői sejtek karyotipizálása. A teljes citogenetikai válasz elérése kedvező, hosszútávú túléléssel társul (***47***). A vizsgálathoz a csontvelő aspirációjára van szükség, ami invazív és kellemetlen beavatkozás. Ráadásul, az esetek 15 – 20%-ában nem születik informatív eredmény, különösen a terápia elején, amikor gyakori a sejtszegény csontvelői kép.

A karyotipizálás mellett a nemzetközi ajánlások az RQ-PCR vizsgálatot írják elő a CML-es betegek nyomonkövetéséhez. Az RQ-PCR perifériás vérmintán is végezhető, így elkerülhető a csontvelői aspiráció. A vizsgálat rendkívül érzékeny, így a CCyR elérését követően is nyerhető prognosztikai információ.

Az RQ-PCR és a karyotipizálás eredményei szoros korrelációt mutatnak, általánosan elfogadott, hogy a Nemzetközi Standardizált Skálán a <1%-os *BCR-ABL1* expresszió CCyR-nek, a <10%-os MCyR-nek felel meg (***53***). Az összefüggés azonban alacsony szenzitivitással bír, >1% *BCR-ABL1* esetén is fennállhat CCyR, különösen a terápia kezdeti szakaszában, amikor a citogenetikai válasznak kiemelt prognosztikai szerepe van (**2. táblázat**). Ha a molekuláris vizsgálatra alapozva határozzuk meg a citogenetikai válasz mértékét, és ezáltal a terápia hatékonyságát, az esetek egy részében indokolatlanul kerül sor terápiás váltásra.

Számos tanulmány számolt be a FISH és a karyotipizálás közötti eredmények szoros lineáris korrelációjáról (***65, 66, 67***). A lineáris korreláció fennállta azonban nem feltétlenül jelent a mindennapi gyakorlatban hasznosítható prediktív értéket. A legtöbb tanulmány a karyotipizáláshoz képest a FISH fokozott érzékenységére összpontosít, további prognosztikai információ kinyerését reméli, noha a nagyobb érzékenység nem feltétlenül jelent pontosabb prognózist.

Eredményeink alapján megállapítottuk, hogy perifériás vérmintán dupla fúziós szondával végzett FISH vizsgálat során 1%, illetve 15%-os határértéket használva a CCyR, illetve az MCyR fennállta megfelelő biztonsággal megítélhető. A FISH esetében ritkábban fordul elő álnegativitás a CCyR felismerésének tekintetében, mint RQ-PCR esetén, így FISH vizsgálatot használva kevesebb beteg esetében jelentjük ki tévesen a terápiás kudarcot.

A dupla fúziós FISH szonda esetében a leukémiás sejtek jelmintázata alapvető fontosságú. A különböző jelmintázatok esetében a normális sejteken végzett vizsgálatok alapján az álpozitivitás felső határa több mint egy nagyságrendnyi különbséget mutat (**8. ábra**). A kiindulási FISH jelmintázat ismerete nélkül végzett nyomonkövetés súlyos diagnosztikus tévedéseket eredményezhet.

A karyotipizálás továbbra is a legfontosabb vizsgálat a CML-es betegek nyomonkövetése során, prognosztikai értéke nem váltható ki más vizsgálatokkal. Abban az esetben azonban, amikor a karyotipizálás nem kellően informatív, a perifériás vérmintán végzett FISH az RQ-PCR-hez képest megbízhatóbban képes megjósolni a CCyR, illetve az MCyR fennálltát.

5.2. Az automatizált és a manuális FISH analízis összehasonlítása

A FISH segítségével interfázisban lévő sejtekben is kimutathatók kiegyensúlyozott transzlokációk, a sejtek tenyésztése nélkül. A módszer segítségével a minimális reziduális betegség nyomonkövetése is lehetséges, hiszen a karyotipizáláshoz képest jóval több sejt vizsgálható (***67, 68, 69***). A FISH vizsgálat eredményeinek konfidencia intervallumát alapvetően befolyásolja a megvizsgált sejtek száma, aminek növelésével a vizsgálat precizitása emelkedik. A manuális analízis azonban időigényes, a jelmintázatok értékelése tapasztalatot igényel és némileg szubjektív, továbbá a megvizsgált sejtek számának növelése rendkívül munka-, és időigényessé teszi a vizsgálatot.

Munkánk során megvizsgáltuk az automatizált FISH analízis lehetőségeit és korlátait, meghatároztuk a sejt-, a jelfelismerés, valamint a jeltávolságok mérésének precizitását, és összehasonlítottuk az analízis eredményeit a manuális értékelésével.

Az automatizált analízis a sejtek nagyjából 11%-át nem ismerte fel helyesen. Ezek a sejtek kilógtak a vizsgált látótérből, vagy DAPI jelölődésük intenzitása nem volt megfelelő. Bár a manuális értékelés során a vizsgálatból kizárt sejtmagok aránya alacsonyabb, ez önmagában nem befolyásolja a vizsgálat eredményét, hiszen a sejtmagok kihagyása a pozitivitástól függetlenül történt. A sejtmagként felismert objektumok jelentős hányada valójában egynél több, egymáshoz tapadt sejtmagnak felelt meg. Ezek az objektum területét és az excentricitását mutató pontdiagram alapján könnyen felismerhetőnek bizonyultak, interaktív kizárásuk gyors és egyszerű volt.

A jelfelismerés a sejtmagok 69%-ában volt sikeres. A tévedések az esetek 99,7%-ában két piros, két zöld jelszámtól eltérőt eredményeztek, ezek kizárása után a sejtmagok 99,6%-ában a jelek helyesen kerültek felismerésre.

A fúziós jel felismerésének alapja a különböző színű jelek közötti legkisebb távolság volt. A távolság optimális határértékének meghatározásához teljes mértékben negatív, illetve pozitív sejtpopulációra volt szükség. A Ph+ sejtvonalak szuszpenziói várhatóan 100%-ban pozitív sejtmagokat tartalmaznak, de rendszerint az addicionális eltérések komplex jelmintázatot eredményeznek, melyek felismerése alacsony hatásfokú az automatizált rendszerrel. Az általunk használt SD-1 sejtvonal mintájában volt a legalacsonyabb a helyesen felismert jeleket tartalmazó sejtek aránya. Alternatív pozitív kontrollként olyan CML-es betegek mintáit használtuk, melyekben a Ph-kromoszóma duplikációja is jelen volt. Az ezt az addicionális eltérést tartalmazó sejtek kizárólag a jelek száma – 3 piros 3 zöld – alapján is felismerhetők voltak, hiszen a normális sejtekben ilyen jelszám előfordulásának minimális a valószínűsége.

Az automatizált analízis álpozitivitási aránya (6,7%) megfelel az irodalomban fellelhető, manuális álpozitivitási arányoknak (***70, 71, 72***). A vizsgálatunk során észlelt manuális álpozitivitási arány (5,8%) ehhez az értékhez közeli. A gépi és a manuális álnegativitási arány 5,5%, illetve 2,7% volt. Feltételezhető, hogy a manuális vizsgálat alacsonyabb álpozitivitási és álnegativitási arányának hátterében a vizsgáló elfogultsága állt; az irodalomban is jól ismert és tárgyalt jelenség, hogy a manuális értékelés során a mintában gyakori sejtek helyes felismerése nagyobb valszínűséggel történik, mint a ritkábbaké (***73***).

A manuális vizsgálat során a három független értékelő eredményei jelentős interobszerver variabilitást igazoltak, mely meghaladja a mintavételből fakadó, várható hibákat. Az automatizált analízis esetében az eredmények variabilitását kizárólag a 200 sejt vizsgálatából fakadó pontatlanság magyarázta (**9. ábra**).

Az irodalomban egy munkacsoport két, hasonló, automatizált FISH analízist részletesen leíró publikációját találtuk. Lukasova és munkatársai (***74***) 3D méréseket végeztek BCR és ABL jelek között. Tanulmányukban 0,5 μm-es határértéket használtak, mely a mi munkánkban megállapított, optimális határértékénél kevesebb. Ennek magyarázata az lehet, hogy az általuk vizsgált sejtmagok átlagosan kisebbek voltak, mint a mi tanulmányunkban vizsgált sejtmagok (4,7 vs 8,0 μm). Álnegativitási adatokat, illetve a hibás jelfelismerés arányát nem közölték, álpozitivitási arányuk 17,6% volt. Kozubek (***75***) 2D automatizált FISH analízist alkalmazott a *BCR-ABL1* transzlokáció kimutatására. A jeltávolság határértéke itt is 0,5 μm volt. Az álpozitivitás aránya 5% volt, a sejt-, illetve a jelfelismerés hibáit nem

közölték. Az automatizált és manuális analízis összehasonlítására egyik publikációban sem került sor.

Összefoglalásképpen kijelenthető, hogy elfogadható pontosságú automatizált FISH analízis lehetséges. Bár az álpozitivitási és álnegativitási arányok nem jobbak, mint a manuális analízis esetében, de kiküszöbölhető a vizsgálók közötti variabilitás, így az eredmény precizitása már 200 vizsgált sejt esetében is javul. Az automatizáció a vizsgált sejtszám jelentős növelését is lehetővé teszi, aminek határt csupán az informatikai háttér szab. Ráadásul, az automatizált analízis során minden megvizsgált sejtmagról digitális felvétel is készül, így nem csak az értékelés, de a dokumentáció is megvalósul. A sejtmagok koordinátáinak rögzítésével relokalizációs vizsgálatok is lehetővé válnak, így akár immunfenotipizálással, vagy további FISH vizsgálatokkal kombinálható a FISH analízis.

5.3. Az imatinib rezisztencia okainak vizsgálata

A 48 imatinib-rezisztenciát mutató beteg vizsgálata alapján a Ph-transzlokáció típusa, a töréspontok közelében kialakult interstíciális deléciók nem mutattak eltérő gyakoriságot a rezisztenciát nem mutató, krónikus fázisú CML-es betegekhez képest. Ez alapján feltételezhető, hogy a fentieknek nincs prognosztikai jelentősége. Ez a következtetés egyezik az irodalmi adatokkal (***76***).

A fentiekhez hasonlóan a b2a2, illetve a b3a2 *BCR-ABL1* transzkriptumok jelenléte, illetve hiánya sem mutatott eltérő gyakoriságot a rezisztens, illetve a rezisztenciát nem mutató esetek között, így vélhetően nem mutat összefüggést a terápiás válasszal. Hasonló következtetésre jutott Polampalli (***77***). Néhány tanulmány azonban felveti annak a lehetőségét, hogy az b3a2 pozitív esetekben a terápiás válasz lassabban következik be (***78***, ***79***).

A rezisztens betegek 29%-ában figyeltünk meg *ABL1* kináz domén pontmutációt. Az irodalomban a mutációk gyakorisága tág tartományban, 21 – 90% között változik, attól függően, hogy milyen fázisban, milyen szintű (citogenetikai, vagy hematológiai) rezisztenciát vizsgáltak (***60***; ***80, 81, 82, 83***).

A betegek csupán 13%-ában (6/48) lehetett a megfigyelt pontmutáció felelős az imatinib rezisztenciáért, hiszen a többi esetben később jelent meg, mint maga a rezisztencia. Nem

zárható ki annak a lehetősége, hogy az adott mutáció vizsgálatunk érzékenységi határa alatti mennyiségben már a rezisztencia észlelése előtt is jelen volt. A rezisztencia azonban a reziduális leukémiás klón felszaporodását jelenti; ha ilyenkor nem domináns egy mutációt hordozó sejtklón, akkor aligha lehet felelős a nem megfelelő terápiás válaszért.

A fenti eredmény meglepő annak fényében, hogy az *ABL1* kináz domén mutációkat a TKI-rezisztencia egyik leggyakoribb okaként tartják számon, de számos tanulmány felveti annak a lehetőségét, hogy a mutációk nem közvetlen okozói a rezisztenciának, inkább a rezisztenciához vezető genetikai instabilitás indikátorai (***84***). Willis (***85***) TKI-kezelés előtti mintákban mutatott ki pontmutációkat. Az esetek csupán 40%-ában volt megfigyelhető a betegek nyomonkövetése során a kiinduláskor észlelt mutáció, amit a mutáns klón szelekciója kapcsán várnánk. A pontmutációk jelenléte összefüggést mutatott addicionális citogenetikai eltérések megjelenésével, de a várható terápiás válasszal nem. Előfordul, hogy olyan pontmutáció figyelhető meg, mely *in vitro* imatinib szenzitív (***86***). Khorashad és munkatársai 12 eset közül 4-ben nem észlelték a korábban kimutatott pontmutáció klonális szelekcióját, ami pedig minden olyan esetben elvárható lenne, amikor a jelenség a rezisztencia kialakulásáért felelős (***87***).

A rezisztenciát mutató betegek 46%-ában (22/48) a Ph-transzlokáció mellett megjelenő, addicionális citogenetikai eltérés igazolódott. 14/48 esetben a Ph-kromoszóma duplikációját, 1/48 esetben *BCR-ABL1* amplifikációt figyeltünk meg, mely gyakoriságok hasonlóak Hochhaus által leírt gyakoriságokhoz: 7/32, illetve 2/32 (***59***).

Számos tanulmány gyakori rezisztenciát okozó molekuláris jelenségként tartja számon a *BCR-ABL1* túlexpresszióját (***88***), bár a definíciója nem egységes, időnként a túlexpresszió és az amplifikáció fogalma is összemosódik (***57***). Hochhaus a kiindulási értékhez képest >10× növekedést tekintett túlexpressziónak, *BCR-ABL1/G6PDH* arányt számolva (***59***). Bianchini meghatározta az expressziós index (RQ-PCR/FISH eredmény) megoszlását CML-es betegekben. Azokat tekintették túlexprimáltnak, ahol az expressziós index meghaladta a 90 percentilist (***64***). Hasonló módszerrel végezve vizsgálatot 7 esetben észleltünk *BCR-ABL1* túlexpressziót, míg a rezisztenciát nem mutató esetekben a gyakoriság 3/46 volt. A gyakoriságok között statisztikailag szignifikáns eltérés nem igazolódott, eredményeink nem támasztják alá a *BCR-ABL1* túlexpressziójának ezzel a módszerrel történő meghatározásának létjogosultságát.

Az imatinib rezisztenciát mutató esetekben a leggyakrabban klonális evolúció, illetve az ABL1 kináz domén pontmutációi mutathatók ki, de nem egyértelmű ezek oki szerepe. 14 esetben semmilyen citogenetikai, vagy molekuláris eltérést sem sikerült igazolni.

Feltételezhető, hogy a nem megfelelő terápiás válasz hátterében gyakran a mindennap használandó, enyhe mellékhatást gyakran okozó gyógyszer nem kellő rendszerességű szedése állhat.

5.4. A ritka BCR-ABL1 töréspontok prognosztikai jelentőségének vizsgálata

Az *in vitro* vizsgálatok alapján a p190 (m-BCR-ABL1), és a p230 (µ-BCR-ABL1) fehérjék a szokványos, p210 (M-BCR-ABL1) fehérjéhez képest eltérő transzformációs képességgel bírnak. Ezek, és némely klinikai megfigyelés alapján felmerül a lehetősége annak, hogy a különböző *BCR* töréspontok, és ezáltal a fúziós fehérjében megjelenő, eltérő hosszúságú BCR fragmensek befolyásolhatják az okozott betegség fenotípusát, valamint klinikai lefolyását.

Melo (***89***) tanulmánya arra utalt, hogy a p190 pozitív CML számos vonásában a krónikus myelomonocytás leukémiára hasonlít; jelentős monocytosis jellemzi. Egy másik vizsgálatban 25 eset közül (***45***) 12-ben figyelték meg a fenti jelenséget. Az általunk észlelt három p190 pozitív CML-es beteg egyike sem mutatott monocytosist.

Verma (***46***) 1292 CML-es beteg közül 14-ben figyelt meg e1a2 (p190 fehérjének megfelelő) transzkriptumot. Ezek a betegek tirozinkináz-gátló kezelés mellett a szokványos transzkriptumot hordozó esetekhez képest kedvezőtlenebb terápiás választ mutattak, prognózisuk rosszabb volt.

A p230-nak megfelelő e19a2 *BCR-ABL1* transzkriptumot eredetileg a krónikus neutrophil leukémiához hasonló CML-hez társították, melyre enyhe leukocytosis, minimális balratoltság, thrombocytosis, és kedvező klinikai lefolyás jellemző. Nemrégiben azonban több e19a2+ CML eset került ismertetésre, ahol a klinikai kép gyorsan progrediált (***44***). Az általunk észlelt e19a2 pozitív beteg is ez utóbbi csoportba tartozhat, hiszen a kórlefolyás kedvezőtlen volt.

Extramedulláris blasztos krízis e19a2 transzkriptum mellett korábban nem került leírásra, esetünk az első az irodalomban. Az irodalomban fellelhető 42 e19a2 pozitív beteg közül 18 akcelerált fázisba, vagy blasztos krízisbe került. Néhány tanulmány alapján a kockázatbecslés során figyelembe kell venni az e19a2 mRNS, illetve p230 fehérje mennyiségét, valamint a transzkripciós heterogenitást is. Esetünkben az e19a2 transzkriptum mellett e18a2 is megfigyelhető volt. Három hasonló beteg közül kettő gyorsan blasztos krízisbe transzformált,

ami arra utalhat, hogy az alternatív transzkriptumok jelenléte genetikai instabilitás, és ezáltal kedvezőtlen prognózis jele lehet (***90, 44***).

Stabil CCyR négy betegünk közül csupán egy esetében (2. beteg) jelentkezett imatinib kezelés mellett. A harmadik és negyedik beteg relapszusának és progressziójának hátterében a *BCR-ABL1* transzlokáció mellett megfigyelt addicionális eltérések is állhattak, bár a harmadik beteg esetében ezek az eltérések már diagnóziskor is jelen voltak. *ABL1* kináz domén mutáció csupán a harmadik beteg esetében volt kimutatható, de a progresszióért ebben az esetben sem tehető egyértelműen felelőssé, hiszen csupán a blasztos krízis megjelenésekor vált kimutathatóvá, a teljes hematológiai válasz elvesztésekor még nem volt bizonyítható jelenléte.

Vizsgálataink arra utalnak, hogy az e1a2 transzkriptum egyedüli jelenléte kedvezőtlen prognosztikai tényező. A ritka *BCR* töréspontok pontos jelentősége továbbra sem tisztázott, a prognózis megítélése során az egyéb, már ismert prognosztikai faktorokat is figyelembe kell venni.

5.5. Egy konstitucionális eltéréseket hordozó CML beteg története

Vizsgálatunkban egy különleges CML-es beteg történetét és családfáját mutattuk be. Diagnóziskor a *BCR-ABL1* transzlokáció mellett hat kromoszómát érintő, három különböző, addicionális citogenetikai eltérés is megfigyelhető volt, melyek a későbbi kórlefolyást érdemben nem befolyásolták. Az eltérések közül kettő a beteg családjában három generációban is kimutathatónak bizonyult. Az eltérések valamennyi sejtben jelen voltak egyéb abnormalitások, kromoszóma fragilitás jelei nélkül. Egyik családtag sem mutatott semmilyen hematológiai, vagy egyéb betegségre utaló jelet, a családban a spontán vetélések magas aránya nem volt jellemző.

A megfigyelt eltérések közül a robertsoni transzlokáció – der(13;14) – a beteg édesanyjából származhatott, és magas penetranciával öröklődött a családban. A robertsoni transzlokációk, melyek az akrocentrikus kromoszómák centromerikus fúzióját és a rövidkarok elvesztését jelenti, a leggyakoribb konstitucionális, betegséggel nem társuló citogenetikai aberrációk. A klasszikus robertsoni transzlokáció, illetve a többi, konstitucionális reciprok transzlokáció incidenciája az élveszületettek között 0,1% (***91***).

A betegben megfigyelt t(2;5) vélhetően apai eredetű, penetranciája magas, hiszen a beteg mindkét gyermeke örökölte. A harmadik konstitucionális eltérés, a t(6;12) kizárólag a betegben volt megfigyelhető, neki viszont valamennyi megvizsgált sejtjében jelen volt.

CML esetekben egy-egy konstitucionális eltérés ritkaságként korábban is leírásra került, a leggyakrabban robertsoni transzlokációk voltak megfigyelhetők (***92, 93, 94***). A 21-es triszómiát leszámítva a konstitucionális eltérések és a klonális hematológiai betegségek között összefüggés nem igazolható (***95, 96***).

A betegben megfigyelt három konstitucionális eltérés genetikai instabilitásra hívja fel a figyelmet, mely állhatott a Ph-transzlokáció megjelenése mögött is. Ez esetben a családon belül a malignus betegségek rizikója várhatóan magasabb, mint az átlagos; erre utaló családi anamnesztikus adat azonban nincs.

Esetünkben a konstitucionális eltérések a Ph-transzlokáció mellett jelentkező, kedvezőtlen prognosztikai értékkel bíró, addicionálisan szerzett abnormalitásoknak tűntek, a 4.4.3. fejezetben ismertetett esethez hasonlóan. A hematológiai malignitások citogenetikai diagnosztikája során gondolni kell a ritkán előforduló konstitucionális eltérésekre is, melyek pontos biológiai jelentősége, és a betegségekkel való összefüggése egyelőre nem tisztázott.

5.6. Ph-pozitív és negatív sejtekben egyszerre jelentkező 8-as triszómia

Tanulmányunk során két CML-es beteget vizsgáltunk, akik esetében 8-as triszómia egyszerre jelent meg Ph-pozitív és negatív sejtekben. A három abnormális klón – Ph+, Ph+ és +8, valamint +8 – a kezelés 6., illetve 16. hónapjában jelent meg a két beteg esetében. Ebben az időszakban mindkét betegnél az imatinib dózisának csökkentését indokló cytopenia volt megfigyelhető. Mindkét beteg esetében az ELN (***31***) ajánlása alapján terápiás kudarc volt megállapítható, mindkét betegnél dasatinib kezelés indult. A legutolsó észlelésnél egyik beteg sem mutatott teljes citogenetikai választ.

A CML-es esetek 2 – 17%-ában citogenetikai abnormalitások jelentkeznek a Ph-negatív sejtekben az imatinib kezelés átlagosan 3 – 47. hónapjában (***97, 98***). A leggyakrabban –Y, +8, -7/del(7q), illetve del(5q) fordulnak elő (***99***). Bár a jelenség nem befolyásolja a betegek túlélését, az esetek kis hányadában myelodysplasias szindróma, illetve akut myeloid leukemia alakul ki (***97***).

Nem tisztázott, hogy mi a Ph-negatív sejtekben jelentkező citogenetikai abnormalitások eredete. A tirozinkináz-gátlók genetikai instabilitást okozhatnak többek között a normális ABL1 funkciójának gátlása révén, mely Ph-negatív klonális haematopoesist eredményezhet. Ebben az esetben azt várnánk, hogy a tirozinkináz-gátló kezelés időtartamával arányosan nő a jelenség gyakorisága; ez azonban nem felel meg a gyakorlatban észleltnek. Ritkán, de interferon terápia mellett is előfordulhatnak hasonló abnormalitások (***100***), így a tirozinkináz-gátlók közvetlen hatása megkérdőjelezhető. Lehetséges, hogy szerepük csupán annyi, hogy a Ph-pozitív klón elnyomásával felfedik a már korábban kialakult Ph-negatív klónokat.

A Ph-negatív és pozitív sejtekben egyaránt kialakuló 8-as triszómia ritka jelenség, ezidáig mindössze 10 eset került leírásra az irodalomban. Három esetben az egyik abnormális klón csupán egyetlen metafázisban volt felismerhető, így különálló klónként csupán korlátozottan értékelhető (**7. táblázat**). Hat esetben a Ph-negatív abnormalitás 7 – 12 hónappal az imatinib kezelés megkezdése után jelentkezett, egy esetben már diagnóziskor megfigyelhető volt valamennyi abnormális klón. Egy beteg nem részesült tirozinkináz-gátló kezelésben. Egy beteg a kezelés 11. hónapjában 8-as triszómiát hordozó, Ph-negatív blasztos krízisben elhunyt.

A Ph-negatív és pozitív sejtekben ugyanaz az eltérés jelenléte felveti annak a lehetőségét, hogy a Ph-transzlokáció lehet másodlagos eltérés CML-ben. Ennek lehetősége már korábban is felmerült akut leukémia ritka eseteiben, amikor a Ph-transzlokáció a diagnózist követően, progresszióval társulva jelentkezett (***101***). Fialkow már 30 évvel ezelőtt kimutatta, hogy CML-ben a Ph-negatív B-sejtek között a leukémiás sejtekkel azonos mintázatú X inaktivációt mutató, genetikailag instabil sejtek lehetnek jelen (***102***). Ez a jelenség is utal arra, hogy a Ph-transzlokáció egy abnormális, genetikailag instabil sejtben másodlagos eltérésként jelentkezik.

Egy genetikai instabilitást hordozó, csontvelői preleukémiás klónban megjelenhet 8-as triszómia és Ph-transzlokáció is egymás után, vagy egymástól függetlenül (***99, 103***). Ennek a lehetőségnek óriási a terápiás relevanciája, hiszen ebben az esetben a genetikai instabilitás nem szűnik meg a BCR-ABL1 pozitív sejtek elpusztításával, így a hatékony tirozinkináz-gátlás mellett is számíthatunk a betegség visszesésére, illetve progressziójára.

A két bemutatott esetben a megfigyelt cytopenia a Ph-negatív haematopoesis korlátozott regeneratórikus képességére utalhat, ami lehet a 8-as triszómiát hordozó klón korábbi felszaporodásának a következménye. Érdekes módon, mindkét beteg esetében a cytopenia idején a csontvelői mintákon elvégzett karyotipizálás, illetve interfázis FISH vizsgálat jelentős eltérést mutatott. Mindkét esetben a karyotipizálás jóval magasabb arányú Ph-

pozitivitást mutatott, mint a FISH. Egy lehetséges magyarázat a jelenségre az, hogy bár a Ph+ sejtek túlélése jelentősen lecsökkent, a Ph-negatív sejtek csökkent proliferációs aktivitása következtében az osztódó sejtek között a Ph-pozitivitás magas maradt. A csontvelő csökkent proliferációs képességére utal a mindkét beteg esetében megfigyelt sejtszegény csontvelői kép is.

A látottak alapján felmerül annak a lehetősége is, hogy a Ph-negatív haematopoesis korlátozott regeneratív képessége állhat a teljes hematológiai válasz mellett megfigyelt lassú, elnyújtott citogenetikai válasz hátterében olyan esetekben is, amikor Ph-negatív klonális citogenetikai eltérés nem mutatható ki.

Szerzők	Nem, kor (év)	Kezelés	+8 klón megjelenése (hó)	Követés (hó)	Megjegyzés
Gozetti et al., 2003 (***104***)	F, 59	IM^{2nd}	12	6	Ph+ és +8 csupán egyetlen sejtben
Braziel et al., 2002 (***105***)	F, 64	IM^{2nd}	14	14	Ph+/+8 és Ph-/+8 csupán egy-egy sejtben mutatkoztak, külön mintában
Deiniger et al., 2007 (***97***)	F, NA	IM	8,3	61,3	Ph+ és +8 csupán egyetlen sejtben
Zaccaria et al., 2010 (***103***)	F, 65	IM	0	11	blasztos krízis 8 hónapnál Ph-/+8 sejtekkel
	N, 43	IM	7	11	Ph+/+8 és Ph-/+8 külön mintában
Casali et al., 1992 (***106***)	N, NA	IFN, BUS	NA	NA	
Andersen et al., 2002 (***107***)	F, 37	IM^{2nd}	10	14	Ph+/+8 és Ph-/+8 külön mintában
Bacher et al., 2005 (***109***)	N, 53	IM	12	NA	
	F, 46	IM^{2nd}	8	28	Ph-/+8 klón a követés végén 100%-ban volt jelen
Lin et al., 2006 (***110***)	F, 61	IM^{2nd}	23	30	akceleráció a +8 klón megjelenésekor

6. táblázat. Hasonló esetek az irodalomban

Rövidítések: N, nő; F, férfi; IM, elsővonalbeli imatinib; IM^{2nd}, másodvonalbeli imatinib, IFN, interferon, BUS, busulphan; NA, nincs adat

Összefoglalásként a bemutatott két eset arra utal, hogy a Ph-transzlokáció lehet másodlagos citogenetikai eltérés is CML-ben, legalábbis az esetek egy részében. Mindkét beteg imatinib és dasatinib rezisztenciát is mutatott, bár *ABL1* kináz domén mutáció nem volt jelen. Mindkét beteg esetében klonális evolúció volt megfigyelhető a Ph+ sejtekben, de egyértelmű klonális szelekció, illetve progresszió nem volt észlelhető az 54, illetve 64

hónapos nyomonkövetés során. Mindkét beteg Ph-negatív klonális eltéréseket mutatott több mint 30 hónapon keresztül, anélkül, hogy myelodysplasiás szindróma jelei jelen lettek volna. További hasonló esetek vizsgálata szükséges ahhoz, hogy kiderüljön, az ilyen betegek kezelése kapcsán milyen stratégia a leghatékonyabb.

6. Új eredmények összefoglalása

1. Meghatároztuk a FISH lehetséges szerepét a CML nyomonkövetésének során. A módszer segítségével akár perifériás vérminta alapján is nagy biztonsággal meg lehet határozni, hogy fennáll-e major, illetve teljes citogenetikai válasz, vagy sem. A kezelés kezdetén a szuboptimális válasz, illetve a terápiás kudarc pontosabban azonosítható a karyotipizálás sikertelensége esetén FISH segítségével, mint RQ-PCR-t használva.

2. Igazoltuk, hogy a FISH vizsgálat érzékenysége és megbízhatósága javítható az értékelés automatizálásával, hiszen az automatizáció a vizsgált sejtek számának jelentős növelését teszi lehetővé, a ráfordított idő növekedése nélkül. Ráadásul az interobszerver variabilitást kiküszöböli. Meghatároztuk az automatizált *BCR-ABL1* FISH analízis rendszerének részletes specifikációit, mely egyéb transzlokációk, illetve genetikai eltérések automatizált értékelésének is alapja lehet.

3. Megvizsgáltuk saját beteganyagon az imatinib rezisztencia hátterében álló molekuláris, illetve genetikai tényezőket. A leggyakoribb oknak a klonális citogenetikai evolúció bizonyult, az *ABL1* kináz domén mutáció az irodalmi adatoknál némileg kisebb arányban volt észlelhető. Számos eset kapcsán azt tapasztaltuk, hogy az *ABL1* kináz domén mutáció nem feltétlenül okozója az imatinib rezisztenciának, sokszor inkább csupán az indikátora a rezisztencia hátterében álló genetikai instabilitásnak.

4. Megállapítottuk, hogy a ritkán előforduló *BCR-ABL1* töréspontok nem jelentenek egyértelműen kedvezőtlenebb prognózist. A különböző *BCR-ABL1* mRNS és a megfigyelhető fenotípus összefüggése továbbra sem tisztázott.

5. Egy CML-es beteg, és családjának vizsgálata során a konstitucionális citogenetikai eltérések lehetséges szerepére, valamint az ezek kapcsán felmerülő differenciál diagnosztikai nehézségekre mutattunk rá.

6. Két eset alapos vizsgálatával alátámasztottuk azt a feltételezést, mely szerint a Philadelphia-transzlokáció lehet másodlagos eltérés CML-ben.

7. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, prof. Pajor Lászlónak, aki nem csupán elindította tudományos tevékenységemet, de folyamatosan támogatta is azt, akitől megtanultam a tudományos igényű, tiszta gondolkodás fontosságát.

Hálásan köszönöm a Pathologiai Intézet minden munkatársának a mindennapokban nyújtott segítségért. Külön köszönettel tartozom Lacza Ágnesnek, László Renátának, Rozsnyai Blankának és Kiss Robertának, akik a molekuláris biológiai vizsgálatok terén nyújtottak pótolhatatlan segítséget. Köszönöm Hermesz Juditnak és Kalász Verának a kitartó és áldozatos munkát a citogenetikai vizsgálatok terén.

Köszönettel tartozom dr. Méhes Gábornak, amiért a citogenetika rejtelmeibe betekintést nyerhettem, köszönöm dr. Kereskai Lászlónak a baráti segítségnyújtást. Hálásan köszönöm dr. Alpár Donátnak azt a kollegiális segítséget, amit mind a munkám során, mind a dolgozat írása alatt folyamatosan nyújtott.

Továbbá köszönet illeti valamennyi hematológus kollégámat, akikkel a nap, mint nap beküldött minták kapcsán folyamatos munkakapcsolatban álltam és állok, illetve akik klinikai tapasztalatára a tudományos munkám során mindig is számíthattam.

Végezetül szeretném hálámat kifejezni szerető családomnak, akik támogatása és megértése nélkül ez a munka nem valósulhatott volna meg.

8. Irodalomjegyzék

1. Bennett JH. Case of hypertrophy of the spleen and liver in which death took place from suppuration of the blood. Edinburgh Medical and Surgical Journal. 1845;64:413-23.
2. Virchow R. Weisses Blut. Froriep's Notizen. 1845;36:151-6.
3. Rather LJ. A commentary on the medical writings of Rudolf Virchow: based on Schalbe's 'Virchow-bibliographie'. Jeremy Norman Co., 1990.
4. Nowell PC, Hungerforf DA. A minute chromosome in human granulocytic leukemia. Science 1960;132:1497.
5. Fialkow PJ, Jacobson RJ, Papayannopoulou T. Chronic myelocytic leukemia: clonal origin in a stem cell common to the granulocyte, erythrocyte, and platelet, and monocyte/macrophage. Am J Med 1977;63:125-30.
6. Rowley JD. A new consistent chromosome abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa banding. Nature 1973;243:290-3.
7. Abelson HT, Rabstein LS. Lymphosarcoma: virus induced thymic independent disease in mice. Cancer Res 1970;30:2213-22.
8. de Klein A, van Kessel A, Grosveld G, Bartram CR, Hagermeijer A, Bootsma D, Spurr NK, Heisterkamp N, Groffen J, Stephenson JR. A cellular oncogene is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. Nature 1982;300:765-7.
9. Groffen J, Stephenson JR, Heisterkamp N. Philadelphia chromosome breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. Cell 1984;36:93-9.
10. Konopka JB, Watanabe SM, Witte ON. An alteration of the human c-abl protein in K562 leukemia cells unmasks associated tyrosine kinase activity. Cell 1984;37:1035-42.
11. Shtivelman E, Lifshitz B, Gale RP, Roe BA, Canaani E. Fused transcript of bcr and abl genes in chronic myelogenous leukaemia. Nature 1985;550-4.
12. Daley QG, van Etten RA, Baltimore D. Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210 BCR/ABL gene of the Philadelphia chromosome. Science 1990;247: 824-30.
13. Zhang X, Ren R. Bcr-Abl efficiently induces a myeloproliferative disease and production of excess interleukin-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in mice: a novel model for chronic myelogenous leukemia. Blood 1998;92:3829-40.

14. Talpaz M, McCredie KB, Malvigit GM, Gutterman JU. Leukocyte interferon-induced myeloid cytoreduction in chronic myelogenous leukaemia. Ann Intern Med 1983;62:689-92.
15. Goldman JM, Daley GQ. Chronic myeloid leukemia – a brief history. In: Melo JV, Glodman JM, editors. Myeloproliferative disorders. Springer. 2007, pp.1-13.
16. Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, Ohno S, Segal GM, Fanning S, Zimmermann J, Lydon NB. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. Nature Medicine 1996;2:561-6
17. Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, Peng B, Buchdunger E, et al. 2001. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCRABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. N Engl J Med 2001;344:1031–7.
18. Baccarani M, Saglio G, Goldman J, Hochhaus A, Simonsson B, Appelbaum F, Apperley J, Cervantes F, Cortes J, Deininger M, Gratwohl A, Guilhot F, Horowitz M, Hughes T, Kantarjian H, Larson R, Niederwieser D, Silver R, Hehlmann R. Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. Blood 2006;108:1809-20.
19. Hasserjian RP. Chronic myelogenous leukemia. In: Jones D, editor. Neoplastic Hematology. Humana Press, 2010, pp. 193-211.
20. Bizzozero OJ Jr, Johnson KG, Ciocco A, Kawasaki S, Toyoda S. Radiation-related leukemia in Hiroshima and Nagasaki 1946–1964. II. Ann Intern Med 1967;66:522–30.
21. Chase A, Huntly BJ, Cross NCP. Cytogenetics of chronic myeloid leukaemia. Best Pract Res Clin Haematol 2001;14:553-71.
22. Virgili A, Brazma D, Reid AG, Howard-Reeves J, Valgañón M, Chanalaris A, De Melo VA, Marin D, Apperley JF, Grace C, Nacheva EP. FISH mapping of Philadelphia negative BCR/ABL1 positive CML. Mol Cytogenet 2008;1:14-26.
23. Swerdlow S, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri AS, Stein H, Thiele J, Vardiman JW, editors. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissue. WHO, 4th ed., 2008.
24. Fourouclas N, Campbell PJ, Bench AJ, Swanton S, Baxter EJ, Huntly BJ, Green AR. Size matters: the prognostic implications of large and small deletions of the derivative 9 chromosome in chronic myeloid leukemia. Haematologica 2006; 91: 952-5.
25. Grand F, Kulkarni S, Chase A, Goldman JM, Gordon M, Cross NC. Frequent deletion of hSNF5/INI1, a component of the SWI/SNF complex, in chronic myeloid leukemia. Cancer Res. 1999;59:3870-4.

26. Xinh PT, Vu HA, Nghia H, Binh NT, Van Be T, Van Binh T, Tokunaga K, Sato Y. Coexistence of Philadelphia chromosome positive cells with and without der(9) deletion in a patient with chronic myelogenous leukemia. Cancer Genet Cytogenet 2006;164:122-7.
27. Quintas-Cardama A, Katarjian H, Talpaz M, O'Brien S, Garcia-Manero G, Verstovsek S, et al. Imatinib mesylate therapy may overcome the poor prognostic significance of deletions of derivative chromosome 9 in patients with chronic myelogenous leukemia. Blood 2005;105: 2281-6.
28. Huntly BJP, Guilhot F, Reid AG, Vassiliou G, Hennig E, Franke C, et al. Imatinib improves but may not fully reverse the poor prognosis of CML patients with derivative chromosome 9 deletions. Blood 2003;102:2205-12.
29. Fourouclas N, Campbell PJ, Bench AJ, Swanton S, Baxter EJ, Huntly BJ, Green AR. Size matters: the prognostic implications of large and small deletions of the derivative 9 chromosome in chronic myeloid leukemia. Haematologica 2006;91:952-55.
30. Baccarani M, Cortes J, Pane F, Niederwieser D, Saglio G, Apperley J, Cervantes F, Deininger M, Gratwohl A, Guilhot F, Hochhaus A, Horowitz M, Hughes T, Kantarjian H, Larson R, Radich J, Simonsson B, Silver RT, Goldman J, Hehlmann R. Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet. J Clin Oncol 2009;27:6041-51.
31. Johansson B, Fioretos T, Mitelman F. Cytogenetic and molecular genetic evolution of chronic myeloid leukemia. Acta Haematol 2002;107:76-94.
32. Karrman K, Sallerfors B, Lenhoff S, Fioretos T, Johansson B. Cytogenetic evolution patterns in CML post-SCT. Bone Marrow Transplantation 2007;39:165-171.
33. Green AR: Haemangioblast origin of chronic myeloid leukaemia? Lancet. 2000; 355: 1659-60.
34. Deininger MW, Bose S, Gora-Tybor J, Yan XH, Goldman JM, Melo JV. Selective induction of leukemia-associated fusion genes by high-dose ionizing radiation. Cancer Res 1998;58:421-5.
35. Laurent E, Talpaz M, Kantarjian H, Kurzrock R. The BCR gene and Philadelphia chromosome-positive leukemogenesis. Cancer Res 2001;61:2343-55.
36. Chissoe SL, Bodenteich A, Wang YF, Wang YP, Burian D, Clifton SW, Crabtree J, Freeman A, Iyer K, Jian L, Ma Y, McLaury HJ, Pan HQ, Sarhan OH, Toth S, Wang Z, Zhang G, Heisterkamp N, Groffen J, Roe BA. Sequence and analysis of the human ABL

gene, the BCR gene, and regions involved in the Philadelphia chromosomal translocation. Genomics 1995;27:67-82.

37. Deininger MW, Goldman JM, Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. Blood 2000;96:3343-56.

38. Marcucci G, Perrotti D, Caligiuri MA. Understanding the molecular basis of imatinib mesylate therapy in chronic myelogenous leukemia and the related mechanisms of resistance. Clin Cancer Res 2003;9:1248-52.

39. Levav-Cohen Y, Goldberg Z, Zuckerman V, et al.: C-Abl as a modulator of p53. Biochem Biophys Res Commun 2005;331:737-49.

40. Inokuchi K. Chronic myelogenous leukemia: from molecular biology to clinical aspects and novel targeted therapies. J Nippon Med Sch 2006;73:178-92.

41. Goldman JM, Melo JV. Chronic myeloid leukemia – advances in biology and new approaches to treatment. N Engl J Med 2003;349:1451-64.

42. Clarkson B, Strife A, Wisniewski D, Lambek CL, Liu C. Chronic myelogenous leukemia as a paradigm of early cancer and possible curative strategies. Leukemia 2003;17:1211-62.

43. Quintás-Cardama A, Cortes J. Molecular biology of bcr-abl-positive chronic myeloid leukemia. Blood 2009;19:1619-30.

44. Verstovsek S, Lin H, Kantarjian H, Saglio G, De Micheli D, Pane F, Garcia-Manero G, Intrieri M, Rotoli B, Salvatore F, Guo JQ, Talpaz M, Specchia G, Pizzolo G, Liberati AM, Cortes J, Quackenbush RC, Arlinghaus RB. Neutrophilic-chronic myeloid leukemia: low levels of p230 BCR/ABL mRNA and undetectable BCR/ABL protein may predict an indolent course. Cancer 2002;94:2416-24.

45. Ravandi F, Cortes J, Albitar M, Arlinghaus R, Qiang Guo J, Talpaz M, Kantarjian HM. Chronic myelogenous leukaemia with p185(BCR/ABL) expression: characteristics and clinical significance. Br J Haematol 1999;107:581-86.

46. Verma D, Kantarjian HM, Jones D, Luthra R, Borthakur G, Verstovsek S, Rios MB, Cortes J. Chronic myeloid leukemia (CML) with P190 BCR-ABL: analysis of characteristics, outcomes, and prognostic significance. Blood 2009;114:2232-5.

47. Kantarjian H, Cortes J. Considerations in the Management of Patients With Philadelphia Chromosome–Positive Chronic Myeloid Leukemia Receiving Tyrosine Kinase Inhibitor Therapy. J Clin Oncol 2011;29:1512-6.

48. Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG, Gathmann I, Kantarjian H, Gattermann N, Deininger MW, Silver RT, Goldman JM, Stone RM, Cervantes F, Hochhaus A, Powell BL,

Gabrilove JL, Rousselot P, Reiffers J, Cornelissen JJ, Hughes T, Agis H, Fischer T, Verhoef G, Shepherd J, Saglio G, Gratwohl A, Nielsen JL, Radich JP, Simonsson B, Taylor K, Baccarani M, So C, Letvak L, Larson RA; IRIS Investigators. Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. N Engl J Med 2006;355:2408-17.

49. Müller MC, Gattermann N, Lahaye T, Deininger MW, Berndt A, Fruehauf S, Neubauer A, Fischer T, Hossfeld DK, Schneller F, Krause SW, Nerl C, Sayer HG, Ottmann OG, Waller C, Aulitzky W, le Coutre P, Freund M, Merx K, Paschka P, König H, Kreil S, Berger U, Gschaidmeier H, Hehlmann R, Hochhaus A. Dynamics of BCR-ABL mRNA expression in first-line therapy of chronic myelogenous leukemia patients with imatinib or interferon alpha/ara-C. Leukemia 2003;17:2392-400.

50. Hughes T, Deininger M, Hochhaus A, Branford S, Radich J, Kaeda J, Baccarani M, Cortes J, Cross NC, Druker BJ, Gabert J, Grimwade D, Hehlmann R, Kamel-Reid S, Lipton JH, Longtine J, Martinelli G, Saglio G, Soverini S, Stock W, Goldman JM. Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results. Blood 2006;108:28-37.

51. Müller MC, Cross NCP, Erben P, Schenk T, Hanfstein B, Ernst T, Hehlmann R, Branford S, Saglio G, Hochhaus A. Harmonization of molecular monitoring of CML therapy in Europe. Leukemia 2009;23:1957-63.

52. de Lavallade H, Apperley JF, Khorashad JS, Milojkovic D, Reid AG, Bua M, Szydlo R, Olavarria E, Kaeda J, Goldman JM, Marin D. Imatinib for newly diagnosed patients with chronic myeloid leukemia: incidence of sustained responses in an intention-to-treat analysis. J Clin Oncol 2008;26:3358-63.

53. Hughes TP, Hochhaus A, Branford S, Müller MC, Kaeda JS, Foroni L, Druker BJ, Guilhot F, Larson RA, O'Brien SG, Rudoltz MS, Mone M, Wehrle E, Modur V, Goldman JM, Radich JP; IRIS investigators. Long-term prognostic significance of early molecular response to imatinib in newly diagnosed chronic myeloid leukemia: an analysis from the International Randomized Study of Interferon and STI571 (IRIS). Blood 2010;116:3758-65.

54. Mahon FX, Réea D, Guilhot J, Huguet F, Nicolini F, Legros L, Charbonnier A, Guerci A, Varet B, Etienne G, Reiffers J, Rousselot P. Discontinuation of imatinib in patients with chronic myeloid leukaemia who have maintained complete molecular remission for

at least 2 years: the prospective, multicentre Stop Imatinib (STIM) trial. Lancet Oncol 2010;11:1029-35.

55. Ross DM, Branford S, Moore S, Hughes TP. Limited clinical value of regular bone marrow cytogenetic analysis in imatinib-treated chronic phase CML patients monitored by RQ-PCR for BCR-ABL. Leukemia 2006; 20: 664-70.

56. Marin D, Bazeos A, Mahon FX, Eliasson L, Milojkovic D, Bua M, Apperley JF, Szydlo R, Desai R, Kozlowski K, Paliompeis C, Latham V, Foroni L, Molimard M, Reid A, Rezvani K, de Lavallade H, Guallar C, Goldman J, Khorashad JS. Adherence is the critical factor for achieving molecular responses in patients with chronic myeloid leukemia who achieve complete cytogenetic responses on imatinib. J Clin Oncol 2010;28:2381-8.

57. Soverini S, Hochhaus A, Nicolini FE, Gruber F, Lange T, Saglio G, Pane F, Müller MC, Ernst T, Rosti G, Porkka K, Baccarani M, Cross NC, Martinelli G. Bcr-Abl kinase domain mutation analysis in chronic myeloid leukemia patients treated with tyrosine kinase inhibitors: recommendations from an expert panel on behalf of European LeukemiaNet. Blood 2011;118(5):1208-15.

58. Engler JR, Frede A, Saunders V, Zannettino A, White DL, Hughes TP. The poor response to imatinib observed in CML patients with low OCT-1 activity is not attributable to lower uptake of imatinib into their CD34+ cells. Blood 2010;116:2776-8.

59. Shaffer LG, Slovak ML, Campbell LJ (eds). An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (2009). S. Karger. Basel 2009.

60. Kereskai L, Vass JA, Kneif M, Pajor L. Correlation between BCR-ABL expression and tumor burden is restricted to the transition from minor to major cytogenetic response in interferon treated CML patients. Pathol Oncol Res. 2003;9:174-9.

61. Gabert J, Beillard E, van der Velden VH, Bi W, Grimwade D, Pallisgaard N, Barbany G, Cazzaniga G, Cayuela JM, Cavé H, Pane F, Aerts JL, De Micheli D, Thirion X, Pradel V, González M, Viehmann S, Malec M, Saglio G, van Dongen JJ. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - a Europe Against Cancer program. Leukemia 2003;17:2318-57.

62. Hochhaus A, Kreil S, Corbin AS, La Rosée P, Müller MC, Lahaye T, Hanfstein B, Schoch C, Cross NC, Berger U, Gschaidmeier H, Druker BJ, Hehlmann R. Molecular and chromosomal mechanisms of resistance to imatinib (STI571) therapy. Leukemia 2002; 16:2190-6.

63. 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 MG, Gozzetti A, Crescenzi B, Carcassi C, Bernasconi P, Cuneo A, Albano F, Fugazza G, Zaccaria A, Martinelli G, Pane F, Rosti G, Baccarani M. 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 2009; 114: 4939-43.

64. Lima L, Bernal-Mizrachi L, Saxe D, Mann KP, Tighiouart M, Arellano M, Heffner L, McLemore M, Langston A, Winton E, Khoury HJ. Peripheral blood monitoring of chronic myeloid leukemia during treatment with imatinib, second-line agents, and beyond. Cancer 2011;117:1245-52.

65. Pelz AF, Kröning H, Franke A, Wieacker P, Stumm M. High reliability and sensitivity of the BCR/ABL1 D-FISH test for the detection of BCR/ABL rearrangements. Ann Hematol 2002;81:147-53.

66. Reinhold U, Hennig E, Leiblein S, Niederwieser D, Deininger MW. FISH for BCR-ABL on interphases of peripheral blood neutrophils but not of unselected white cells correlates with bone marrow cytogenetics in CML patients treated with imatinib. Leukemia 2003;17:1925–9.

67. Paschka P, Müller MC, Merx K, Kreil S, Schoch C, Lahaye T, Weisser A, Petzold A, König H, Berger U, Gschaidmeier H, Hehlmann R, Hochhaus A. Molecular monitoring of response to imatinib (Glivec) in CML patients pretreated with interferon alpha. Low levels of residual disease are associated with continuous remission. Leukemia 2003; 17: 1687-94.

68. Chase A, Grand F, Zhang JG, Blackett N, Goldman J, Gordon M. Factors influencing the false positive and negative rates of BCR-ABL fluorescence in situ hybridization. Gene Chromosome Cancer 1997;18:246–53.

69. Amare PS, Baisane C, Saikia T, Nair R, Gawade H, Advani S. Fluorescence in situ hybridization: A highly efficient technique of molecular diagnosis and predication for disease course in patients with myeloid leukemias. Cancer Genet Cytogenet 2001;131:125–34.

70. Garcia-Isidoro M, Tabernero MD, Garcia JL, Najera ML, Hernandez JM, Wiegant J, Raap A, San Miguel J, Orfao A. Detection of the Mbcr/abl translocation in chronic myeloid leukemia by fluorescence in situ hybridization: Comparison with conventional

cytogenetics and implications for minimal residual disease detection. Hum Pathol 1997; 28:154–9.

71. Vrolijk H, Sloos WCR, van de Rijke FM, Mesker WE, Netten H, Young IT, Raap AK, Tanke HJ. Automation of spot counting in interphase cytogenetics using brightfield microscopy. Cytometry 1996;24:158–66.

72. Lukasova E, Kozubek S, Kozubek M, Kjeronska J, Ryznar L, Horakova J, Krahulcova E, Horneck G. Localisation and distance between ABL and BCR genes in interphase nuclei of bone marrow cells of control donors and patients with chronic myeloid leukemia. Hum Genet 1997;100:525–35.

73. Kozubek M, Kozubek S, Lukasova E, Mareckova E, Bartova E, Skalnikova M, Jergova A. High-resolution cytometry of FISH dots in interphase cell nuclei. Cytometry 1999;36:279–93.

74. Kim DH, Popradi G, Sriharsha L, Kamel-Reid S, Chang H, Messner HA, Lipton JH. No significance of derivative chromosome 9 deletion on the clearance kinetics of BCR/ABL fusion transcripts, cytogenetic or molecular response, loss of response, or treatment failure to imatinib mesylate therapy for chronic myeloid leukemia. Cancer 2008;113:772-781.

75. Polampalli S, Choughule A, Negi N, Shinde S, Baisane C, Amre P, Subramanian PG, Gujral S, Prabhash K, Parikh P. Analysis and comparison of clinicohematological parameters and molecular and cytogenetic response of two Bcr/Abl fusion transcripts. Genet Mol Res 2008; 7: 1138-49.

76. Sharma P, Kumar L, Mohanty S, Kochupillai V. Response to Imatinib mesylate in chronic myeloid leukemia patients with variant BCR-ABL fusion transcripts. Ann HEmatol 2010;89:241-7.

77. de Lemos JA, de Oliveira CM, Scerni AC, Bentes AQ, Beltrão AC, Bentes IR, Azevedo TC, Maradei-Pereira LM. Differential molecular response of the transcripts B2A2 and B3A2 to imatinib mesylate in chronic myeloid leukemia. Genet Mol Res 2005;4:803-11.

78. Gorre ME, Mohammed M, Ellwood K, Hsu N, Paquette R, Rao PN, Sawyers CL. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. Science 2001;293:876-80.

79. Deininger M, Buchdunger E, Druker BJ. The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia. Blood 2005;105: 2640-53.

80. Shah NP, Nicoll JM, Nagar B, Gorre ME, Paquette RL, Kuriyan J, Sawyers CL. Multiple BCR-ABL kinase domain mutations confer polyclonal resistance to the tyrosine

kinase inhibitor imatinib (STI571) in chronic phase and blast crisis chronic myeloid leukemia. Cancer Cell 2002;2:117-25.

81. Roche-Lestienne C, Soenen-Cornu V, Grardel-Duflos N, Laï JL, Philippe N, Facon T, Fenaux P, Preudhomme C. Several types of mutations of the Abl gene can be found in chronic myeloid leukemia patients resistant to STI571, and they can pre-exist to the onset of treatment. Blood 2002;100:1014-8.

82. Radich JP. Chronic myeloid leukemia 2010: where are we now and where can we go? Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2010;2010:122-8.

83. Willis SG, Lange T, Demehri S, Otto S, Crossman L, Niederwieser D, Stoffregen EP, McWeeney S, Kovacs I, Park B, Druker BJ, Deininger MW. High-sensitivity detection of BCR-ABL kinase domain mutations in imatinib-naive patients: correlation with clonal cytogenetic evolution but not response to therapy. Blood 2005;106:2128-37.

84. Corbin AS, La Rosée P, Stoffregen EP, Druker BJ, Deininger MW. Several Bcr-Abl kinase domain mutants associated with imatinib mesylate resistance remain sensitive to imatinib. Blood 2003;101:4611-14.

85. Khorashad JS, Anand M, Marin D, Saunders S, Al-Jabary T, Iqbal A, Margerison S, Melo JV, Goldman JM, Apperley JF, Kaeda J. The presence of a BCR-ABL mutant allele in CML does not always explain clinical resistance to imatinib. Leukemia 2006;20:658-63.

86. Martinelli G, Soverini S, Rosti G, Cilloni D, Baccarani M. New tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia. Haematologica 2005;90:534-41.

87. Quintás-Cardama A, Kantarjian HM, Cortes JE. Mechanisms of primary and secondary resistance to imatinib in chronic myeloid leukemia. Cancer Control 2009;16:122-31.

88. Bianchini M, De Brasi C, Gargallo P, Gonzalez M, Bengió R, Larripa I. Specific assessment of BCR-ABL transcript overexpression and imatinib resistance in chronic myeloid leukemia patients. Eur J Haematol 2009;82:292-300.

89. Melo JV: The diversity of BCR-ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype. Blood 1996;88:2375-84.

90. Mittre H, Leymarie P, Macro M, Leporrier M. A new case of chronic myeloid leukemia with c3/a2 BCR/ABL junction. Is it really a distinct disease? Blood 1997; 89: 4239-41.

91. Hsu LY, Yu MT, Richkind KE, Van Dyk DL, Crandall BF, Saxe DF, Khodr GS, Menutti M, Stetten G, Miller WA, Priest JH. Incidence and significance of chromosome mosaicism involving an autosomal structural abnormality diagnosed prenatally through amniocentesis: a collaborative study. Prenat Diagn 1996; 16(1):1-28.

92. Becher R, Mahmoud HK, Schaefer UW, Schmidt CG. Ph-positive CML in a family with a constitutional Robertsonian translocation 14;15. Cancer Genet Cytogenet 1985; 18(3): 229-34.

93. Becher R, Wendt F, Kuhn D. Constitutional Robertsonian t(15;22) in Ph-positive CML. Hum Genet 1987; 76(4):399.

94. Qian J, Xue Y, Sun J, Guo Y, Pan J, Wu Y, Wang W, Yao L. Constitutional Robertsonian translocations in t(9;22)-positive chronic myelogenous leukemia. Cancer Genet Cytogenet 2002;132(1):79-80.

95. Heim S, Johansson B, Mertens F. Constitutional chromosome instability and cancer risk. Mutat Res 1989;221(1):39-51.

96. Cerretini R, Acevedo S, Chena C, Belli C, Larripa I, Slavutsky I. Evaluation of constitutional chromosome aberrations in hematologic disorders. Cancer Genet Cytogenet 2002;134(2):133-7.

97. Deininger MWN, Cortes J, Paquette R, et al.. The prognosis for patients with chronic myeloid leukemia who have clonal cytogenetic abnormalities in Philadelphia chromosome-negative cells. Cancer 2007;110:1509-19.

98. Terre C, Eclache V, Rousselot P, et al.. Report of 34 patients with clonal chromosomal abnormalities in Philadelphia-negative cells during imatinib treatment of Philadelphia-positive chronic myeloid leukemia. Leukemia 2004;18:1340-6.

99. Jabbour E, Kantarjian HM, Abruzzo LV, et al.. Chromosomal abnormalities in Philadelphia chromosome–negative metaphases appearing during imatinib mesylate therapy in patients with newly diagnosed chronic myeloid leukemia in chronic phase. Blood 2007;110:2991-5.

100. Ariyama T, Inazawa J, Uemura Y, et al.. Clonal origin of Philadelphia-chromosome negative cells with trisomy-8 appearing during the course of alpha-interferon therapy for Ph positive chronic myelocytic-leukemia. Cancer Genet Cytogenet 1995;81:20–3.

101. Chen Z, Morgan R, Notohamiprodjo M, et al.. The Philadelphia chromosome as a secondary change in leukemia: Three case reports and an overview of the literature. Cancer Genet Cytogenet 1998;101:148-51.

102. Fialkow PJ, Martin PJ, Najfeld V, et al.. Evidence for a multistep pathogenesis of chronic myelogenous leukemia. Blood 1981; 58(1): 158-63.

103. Zaccaria A, Nicoletta T, Valenti AM, et al.. Chromosome abnormalities additional to the Philadelphia chromosome at the diagnosis of chronic myelogenous leukemia: pathogenetic and prognostic implications. Cancer Genet Cytogenet 2010;199:76-80.

104. Gozzetti A, Tozzuoli D, Crupi R, et al.. Emergence of Ph negative clones in chronic myeloid leukemia (CML) patients in complete cytogenetic remission after therapy with imatinib mesylate (STI). European Journal of Haematology 2003;71:313–14.
105. Braziel RM, Launder TM, Druker BJ, et al.. Hematopathologic and cytogenetic findings in imatinib mesylate–treated chronic myelogenous leukemia patients: 14 months' experience. Blood 2002;100:435-41.
106. Casali M, Truglio F, Maserati E, et al.. Trisomy 8 in philadelphia chromosome (ph1)-negative cells in the course of ph1-positive chronic myelocytic leukemia. Genes, Chromosomes and Cancer 1992;4:269–70.
107. Andersen MK, Pedersen-Bjergaard J, Kjeldsen L, et al.. Clonal Ph-negative hematopoiesis in CML after therapy with imatinib mesylate is frequently characterized by trisomy 8. Leukemia 2002;16:1390-5.
108. Braziel RM, Launder TM, Druker BJ, et al.. Hematopathologic and cytogenetic findings in imatinib mesylate–treated chronic myelogenous leukemia patients: 14 months' experience. Blood 2002;100:435-41.
109. Bacher U, Hochhaus A, Berger U, et al.. Clonal aberrations in Philadelphia chromosome negative hematopoiesis in patients with chronic myeloid leukemia treated with imatinib or interferon alpha. Leukemia 2005;19:460-3.
110. Lin Y, Bruyere H, Horsman DE, et al.. Philadelphia-negative clonal hematopoiesis following imatinib therapy in patients with chronic myeloid leukemia: a report of nine cases and analysis of predictive factors. Cancer Genet Cytogenet 2006;170:16-23.

9. Az értekezés alapját képező publikációk

Eredeti közlemények

1) **Kajtár B**. A BCR-ABL1 transzlokáció molekuláris biológiája. Hemat Transzf. 2007;40:124-34.
2) Andrikovics H, Nahajevszky S, Szilvási A, Bors A, Adám E, Kozma A, **Kajtár B**, Barta A, Poros A, Tordai A. First and second line imatinib treatment in chronic myelogenous leukemia patients expressing rare e1a2 or e19a2 BCR-ABL1 transcripts. Hematol Oncol. 2007;25(3):143-7. IF.: 1,875.
3) **Kajtár B**, Méhes G, Jáksó P, Kereskai L, Iványi J, Losonczy H, Egyed M, Tóth P, Tóth A, Gasztonyi Z, Dömötör M, Pajor L. A krónikus myeloid leukaemia citogenetikai és molekuláris monitorizálása. Orv Hetil. 2006;147(21):963-70.
4) **Kajtár B**, Méhes G, Lörch T, Deák L, Kneif M, Alpár D, Pajor L. Automated Fluorescent In Situ Hybridization (FISH) Analysis of t(9;22)(q34;q11) in Interphase Nuclei. Cytometry A, 2006 Jun;69(6):506-14. IF.: 3,293.
5) **Kajtar B**, Deak L, Kalasz V, Pajor L, Molnar L, Mehes G. Multiple constitutional chromosome translocations of familial nature in Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia: a report on a unique case. Int J Hematol, 2005 Nov;82(4):347-50. IF.: 1,670.

Impakt faktor összesen: 6,838

Idézhető absztraktok

1) **Kajtár B**, Alpár D, Tóth J, László R, Jáksó P, Kereskai L, Nagy Z, Pajor L. Factors of imatinib resistance in chronic myeloid leukemia. Blood Rev. 2007;21(S1):S78. IF.: 5,756.
2) **Kajtár B**, Tóth J, Alpár D, Jáksó P, Kereskai L, László R, Nagy Z, Pajor L. Simultaneous appearance of +8 in Ph+ and Ph- cells during imatinib treatment of CML: a report of two cases. Blood Rev. 2007;21(S1):S123. IF.: 5,756.
3) Méhes G, Deák L, Pajor L, Losonczy H, **Kajtár B**. Quantification of Leukemic Cells with the Philadelphia-translocation: Automated Spot Evaluation. Blood. 2003;102(11):216b. IF.: 10,120.

A témában tartott előadások:

1) A FISh szerepe a CML monitorizálásában. **Kajtár Béla**, Alpár Donát, Hermesz Judit, Kereskai László, Pajor László. Magyar Haematológiai és Transzfúziológiai Társaság XXIII. Kongresszusa. Pécs, 2011. május 26-28.
2) Az imatinib kezelés komplex monitorozása. Klinikai hematológia szintentartó tanfolyam. **Kajtár Béla**. Pécs, 2008. szeptember 18 – 20.
3) 8-as triszómia szimultán megjelenése Ph+ és Ph- sejtekben imatinib kezelés mellett. **Kajtár Béla**, Hermesz Judit, Alpár Donát, Jáksó Pál, Kereskai László, Kiss Roberta, Nagy Ágnes, Pajor László. Magyar Humángenetikai Társaság 2008. évi Konferenciája. Pécs, 2008. július 11 – 13.
4) Genetika a CML diangózisában és követésében. **Kajtár Béla**. Magyar Haematológiai és Transzfúziológiai Társaság CML Munkacsoportjának Ülése. Budapest, 2007. november 9.
5) Factors of imatinib resistance in chronic myeloid leukemia. **Béla Kajtár**, Donát Alpár, Judit Hermesz, Renáta László, Pál Jáksó, László Kereskai, Zsófia Nagy, László Pajor. Congress of the International Society of Haematology, European & African Division. Budapest, 2007. augusztus 29 - szeptember 02.
6) Reziduális betegség CML-ben. **Kajtár Béla**. Magyar Pathológus Társaság 65. Kongresszusa. Hajdúszoboszló, 2006. október 5-7.
7) A BCR-ABL transzlokáció molekuláris biológiája. **Kajtár Béla**. Molekulárisan célzott diagnózis és terápia a hematológiában. Kaposvár, 2006. február 24-25.
8) Automatizáció lehetősége interfázis cytogenetikában: FISH illetve kombinált pheno- és genotypizálás. **Kajtár Béla**, László Renáta, Pajor Gábor, Alpár Donát. Magyar Pathológus Társaság 64. Kongresszusa. Pécs, 2005. szeptember 22-24.
9) BCR/ABL transzlokáció cytogenetikai és molekularis monitorizálása chronicus myeloid leukaemia esetében. **Kajtár Béla**, Kereskai László, Pajor László. Magyar Haematológiai és Transzfúziológiai Társaság XX. Kongresszusa. Budapest, 2005. május 26-28.
10) CML monitorizálás fluorescens in situ hybridizatio segítségével: Javítható a sensitivitás automatizációval? **Kajtár Béla**, Méhes Gábor, Pajor László. Magyar Humángenetikusok V. Munkakonferenciája. Szeged, 2004. nov.11-13.
11) Konstitúcionális kromoszóma transzlokáció halmozódás egy Ph-kromoszóma pozitív chronicus myeloid leukémiás beteg családjában. **Kajtár Béla**, Deák Linda, Pajor László, Molnár Lenke, Méhes Gábor. Magyar Humángenetikusok V. Munkakonferenciája. Szeged, 2004. nov.11-13.

12) Automated Fluorescent In Situ Hybridization (FISH) analysis of translocation markers: Does it improve sensitivity and specificity compared to manual analysis? **Béla Kajtár**, Donát Alpár, László Pajor. XXII. International Congress of Internetional Society of Analytical Cytology. Montpellier, 2004. máj. 22-27.
13) Automated detection of t(9;22) using MetaCyte. **Béla Kajtár**, László Pajor. Metafer User Meeting. Hohwacht, 2004. máj. 12-13.
14) Reciprok transzlokációk 3D vizsgálata interfázis magokon. **Kajtár Béla**, Alpár Donát, Pajor László. Magyar Haematológiai és Transzfúziológiai Társaság XIX. Kongresszusa. Debrecen, 2003. május 22-25.

Egyéb publikációk - eredeti közlemények

1) Váróczy L, Zilahi E, Gyetvai A, **Kajtár B**, Gergely L, Sipka S, Illés A. Fc-Gamma-Receptor IIIa Polymorphism and Gene Expression Profile Do Not Predict the Prognosis in Diffuse Large B-cell Lymphoma Treated with R-CHOP Protocol. Pathol Oncol Res. 2011 Jun 14. [Epub ahead of print]. IF. (2010): 1,483
2) Nagy Z, **Kajtár B**, Jáksó P, Dávid M, Kosztolányi S, Hermesz J, Kereskai L, Pajor L, Alpár D. Evolutionary sequence of cytogenetic aberrations during the oncogenesis of plasma cell disorders. Direct evidence at single cell level. Leuk Res. 2011;35(8):1114-6. IF. (2010): 2,555
3) Pajor G, Somogyi L, Melegh B, Alpar D, **Kajtar B**, Farkas L, Kneif M, Bollmann D, Pajor L, Sule N. Urovysion: Considerations on modifying current evaluation scheme, including immunophenotypic targeting and locally set, statistically derived diagnostic criteria. Cytometry A. 2011;79(5):375-82. IF. (2010): 3,749
4) Csáthy L, Kappelmayer J, Szegedi I, **Kajtár B**, Kiss C, Hevessy Z. Classical and atypical neuroblastoma- Case reports. Cytometry B Clin Cytom. 2011;80(2):134-6. IF. (2010): 2,307
5) Alpár D, Nagy G, Hohoff C, **Kajtár B**, Bartyik K, Hermesz J, Jáksó P, Andrikovics H, Kereskai L, Pajor L. Sex chromosome changes after sex-mismatched allogeneic bone marrow transplantation can mislead the chimerism analysis. Pediatr Blood Cancer. 2010;55(6):1239-42. IF. 1,948
6) László R, Alpár D, **Kajtár B**, Lacza A, Ottóffy G, Kiss C, Bartyik K, Nagy K, Pajor L. Detection of early precursors of t(12;21) positive pediatric acute lymphoblastic leukemia during follow-up. Pediatr Blood Cancer. 2010;54(1):158-60. IF.: 1,948

7) Bedekovics J, Rejtő L, Telek B, Udvardy M, Újfalusi A, Oláh E, Hevessy Z, Kappelmayer J, **Kajtár B**, Méhes G. Mutáns nucleophosmin fehérje kimutatása akut myeloid leukaemiában: az NPMc+ AML biológiai és klinikai jellemzői. Orv Hetil. 2009;150(22):1031-5.
8) **Kajtár B**, Losonczy H. Krónikus lymphocytás leukaemia. Orv Hetil. 2008;149(17):806-7.
9) Alpár D, Hermesz J, Potó L, László R, Kereskai L, Jáksó P, Pajor G, Pajor L, **Kajtár B**. Automated FISH analysis using dual-fusion and break-apart probes on paraffin-embedded tissue sections. Cytometry A. 2008 Jul;73(7):651-57. IF.: 3,259.
10) Pajor G, Süle N, Alpár D, **Kajtár B**, Kneif M, Bolmman D, Somogyi L, Pajor L. Increased efficiency of detecting genetically aberrant cells by UroVysion test on voided urine specimens using automated immunophenotypical pre-selection of uroepithelial cells. Cytometry A. 2008;73(3):259-65. IF.: 3,259.
11) Szendrei T, Magyarlaki T, Kovács G, Nagy A, Szomor A, Molnár L, Dávid M, Tőkés-Füzesi M, Rideg O, Pótó L, Pajor L, **Kajtár B**, Losonczy H. Mutlidrogrezisztencia-vizsgálatok krónikus lymphoid leukémiában. Orv Hetil. 2008;149(4):161-167.
12) **Kajtár B**, Jáksó P, Kereskai L, Lacza A, Méhes G, Bodnár MA, Dombi JP, Gasztonyi Z, Egyed M, Iványi JL, Kovács G, Marton E, Palaczki A, Petz S, Tóth P, Sziládi E, Losonczy H, Pajor L. Prognosztikai faktorok komplex vizsgálata krónikus lymphocytás leukémiában. Orv Hetil. 2007;148(16):737-43.
13) Alpar D, **Kajtar B**, Kneif M, Jakso P, Laszlo R, Kereskai L, Pajor L. Automated detection of residual leukemic cells by consecutive immunolabeling for CD10 and fluorescence in situ hybridization for ETV6/RUNX1 rearrangement in childhood acute lymphoblastic leukemia. Cancer Genet Cytogenet. 2007;173(1):23-30. IF.: 1,544.
14) Pajor L, **Kajtár B**, Jáksó P, Lacza A, László R, Radványi G, Mórocz I, Tóth A, Varga G. Epstein-Barr virus-induced B-cell proliferation of Hodgkin's and Reed-Sternberg cell pheno- and genotype may develop in peripheral T-cell lymphomas. Histopathology 2006;49(5):553-57. IF.: 3,216.
15) Méhes G, Kovács G, **Kajtár B**, Lacza A, Varnai A, Losonczy H, Pajor L. Karyotype complexity and V(H) gene status in B-cell chronic lymphocytic leukemia. Haematologica. 2006;91(10):1430-1. IF.: 5,032.
16) Pajor L, Lacza Á, Jáksó P, **Kajtár B**. Characteristics of TEL/AML-1 positive acute lymphoblastic leukemia in Hungarian children. Med Pediatr Oncol. 2001 Oct;37(4):409-11. IF.: 1,114.

Impakt faktor összesen: 31,414

Egyéb publikációk - idézhető absztraktok

1) Méhes G, Bedekovics J, Rejtő L, Hevessy Zs, Kappelmayer J, Újfalusi A, Kajtár B, Udvardy M. Immunohistochemical demonstration of NPMc plus acute myeloid leukemia: biological and clinical features related to cytoplasmic nucleophosmin expression. Virchows Archiv. 2009;455(S1):260-61. IF.: 2,305.
2) Fazekas F, **Kajtár B**, Török M, Pór Á, Kovács I, Méhes G. Real-time quantitative allele-suppression (clamped) PCR assay for the determination of K-ras mutational status from paraffin embedded tumor samples. Virchows Archiv. 2009;455(S1):399-99. IF: 2,305.
3) Dávid M, Kosztolány Sz, Szomor Á, Alpár D, **Kajtár B**, Nagy Á, Kovács G, Csalódi R, Hermesz J, Tábori J, Szalontay C, Losonczy H, Pajor L. Genetic prognostic factors and the outcome of autologous stem cell transplantation in plasma cell disorders. Bone Marrow Transplant. 2009;43(S1):S149-S49. IF.: 2,998.
4) Szomor Á, Vidra T, Csalódi R, **Kajtár B**, Kereskai L, Losonczy H, Dávid M. Tumour contamination of the gradt predicts poor prognosis in T/0-cell non Hogkin lymphoma after autologous hemopoeitic stem cell transplantation. Retrospective study. Haematologica. 2008;93(S1):560-61. IF.: 5,978.
5) Jáksó P, Nagy Z, Kereskai L, Alpár D, **Kajtár B**, Pajor L. Analysis of polycythemia vera and essential thrombocythaemia by lineage specific investigation of JAK2V617F mutation and X-linked clonality assay. Blood Rev. 2007;21(S1):S123. IF.: 5,756.
6) Alpár D, **Kajtár B**, Tóth J, Nagy Z, Jáksó P, László R, Kereskai L, Pajor L. Automated evaluation of dual fusion and breakapart FISH probes on paraffin-embedded tissue sections. Blood Rev. 2007;21(S1):S124. IF.: 5,756.
7) Losonczy H, Kovács G, **Kajtár B**, Méhes G, Molnár L, Dávid M, Nagy Á, Szomor Á, Szendrei T, Pótó L, Pajor L. Influence of favourABL1e and unfavourABL1e genetic prognostic markers and CD 38 expression in chronic lymphocytic leukemia on treatment free interval and overal survival. Single center expreience between 2002-2006. Blood Rev. 2007;21(S1):S140. IF.: 5,756.
8) Ottóffy G, **Kajtár B**, Kereskai L, Tornóczky T, Csernus K, Kajtár P. Vacuolated alveolar rhabdomyosarcoma cells mimicking FAB L3 lymphoblasts in bone marrow. Blood Rev. 2007;21(S1):S96. IF.: 5,756.