

Doktori (Ph.D.) értekezés

**Magasan hiperdiploid akut limfoblasztos leukémia
gyermekkorban**

Dr. Vojcek Ágnes

Doktori iskola: Klinikai Orvostudományok

Doktori iskola vezetője: Prof. Dr. Bogár Lajos

Program: Molekuláris patomorfológia

Program és témavezető: Prof. Dr. Pajor László

Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar

Gyermekgyógyászati Klinika



Pécs, 2021.

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	3
1. Bevezetés, irodalmi áttekintés	4
1.1. A gyermekkori akut limfoblasztos leukémia (ALL) története	4
1.2. A gyermekkori ALL – a gyógyulás fő prognosztikai tényezői	6
1.2.1. Életkor	7
1.2.2. Kezdeti fehérvérsejtszám	7
1.2.3. Genetikai tényezők	7
1.2.3.1. Strukturális eltérések	8
1.2.3.2. Numerikus eltérések	10
1.2.3.3. Genetikai alcsoportok	12
1.2.4. Terápiás válasz, minimális reziduális betegség	13
1.3. A magasan hiperdiploid (HeH) ALL	14
1.3.1. A HeH ALL első leírása	14
1.3.2. A HeH ALL citogenetikai és molekuláris genetikai jellemzői	14
1.3.3. A HeH ALL epidemiológiai jellemzői	17
1.3.4. A HeH ALL klinikai jellemzői	18
1.3.5. A HeH ALL klinikai prognosztikai tényezői	19
1.3.6. A HeH ALL genetikai prognosztikai tényezői	20
1.3.7. A HeH ALL kialakulása, patomechanizmusa	23
1.3.8. A HeH ALL kialakulására hajlamosító tényezők	26
1.3.9. A HeH ALL kedvező prognózisának lehetséges okai	28
2. Célkitűzések	31
3. Betegek és módszerek	33
3.1. Betegek	33
3.2. Módszerek	34
3.2.1. iFISH technológia rövid ismertetése	34
3.2.2. iFISH próbák	35
3.2.3. Hibridizációs eljárás	37
3.2.4. A multiplex iFISH jelek kiértékelése	38
3.2.5. Statisztikai feldolgozás	39
4. Eredmények	41
4.1. A magasan hiperdiploid leukémiák azonosítása iFISH vizsgálattal	41
4.2. A kópiaszám-növekedés mintázata a magasan hiperdiploid csoportban	42
4.3. A magasan hiperdiploid betegek klinikai adatai és prognosztikai jellemzői	42
4.4. A kópiaszám-növekedés prognosztikai jelentősége	46
4.5. Kromoszómaszám és kariotípus szintű genetikai heterogenitás	49
5. Megbeszélés	56
6. Az új eredmények összefoglalása	62
7. Irodalomjegyzék	64
8. Közlemények jegyzéke	80
9. Köszönetnyilvánítás	82

Rövidítések jegyzéke

ABL-1	c-abl onkogén 1, receptor tirozin-kináz
ALL	akut limfoblasztos leukémia
AS	aszparagin szintetáz
B-ALL	B-sejtvonal eredetű ALL
BCR	breakpoint cluster region
BFM	Berlin-Frankfurt-Münster német munkacsoport
CD	cluster of differentiation
CEP	centromér specifikus próba (centromer enumeration probe)
COG	Children's Oncology Group
CCLG	Children's Cancer and Leukaemia Group
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DI	DNS-index
DNS	dezoxi-ribonukleinsav
EFS	eseménymentes túlélés (event free survival)
ETV6	ETS variant gén (rég neve TEL)
FCM	áramlási citometria (flow cytometry)
FISH	fluoreszcens in situ hibridizáció
HeH	magasan hiperdiploid (high hyperdiploid)
HeL	alacsonyan hiperdiploid (low hyperdiploid)
HR	magas rizikócsoporthoz (high risk)
I-BFM	nemzetközi BFM (international BFM)
iFISH	interfázis fluoreszcens in situ hibridizáció
iMN ₈	modális kromoszómaszám 8-paraméteres iFISH alapján
IR	közepes rizikócsoporthoz (intermediat risk)
KIR	központi idegrendszer
LSI	lókusz specifikus próba (locus specific identifier)
MAPK	mitogén aktivált protein kináz
MLL	mixed-lineage leukaemia
MN	modális szám (modal number)
MRD	minimális reziduális betegség (minimal residual disease)
NGS	újgenerációs szekvenálás (next generation sequencing)
OS	teljes túlélés (overall survival)
PCR	polimeráz lánreakció (polymerase chain reaction)
pEFS	eseménymentes túlélés valószínűsége (probability of event free survival)
pOS	teljes túlélés valószínűsége (probability of overall survival)
PGR	jó prednizonon válasz (prednisone good response)
POG	Pediatric Oncology Group
RUNX1	runt-related transcription factor 1 gén (rég neve AML1)
PTE-KK	Pécsi Tudományegyetem Klinikai Központ
RNS	ribonukleinsav
SNP	egy-nukleotid polimorfizmus (single nucleotide polymorphism)
SR	standard rizikócsoporthoz (standard risk)
T-ALL	T-sejtvonal eredetű ALL
TKI	tirozin kináz inhibitor
TP53	tumor protein P53 (tumorsuppresszor gén)
WHO	Egészségügyi Világszervezet (World Health Organization)

1. Bevezetés – Irodalmi áttekintés

1.1. A gyermekkori akut limfoblasztos leukémia (ALL) története

A leggyakoribb gyermekkori rosszindulatú megbetegedés az akut limfoblasztos leukémia (ALL). Magyarországon évente 60-70 új beteg kerül felismerésre (1). Bár napjainkban a fejlett országokban alkalmazott protokollokkal a gyógyulás 85-90%, a rosszindulatú betegségek közül továbbra is az egyik leggyakoribb halálok az 1-18 év közötti korosztályban.

Gyermek-hematológiai osztályon dolgozó fiatal klinikusként különösen értékes lehetőség volt számomra 2010-ben csatlakozni a Pécsi Tudományegyetem Pathológiai Intézetének munkacsoportjához, ahol a gyermekkori ALL leggyakoribb alcsoportjának citogenetikai eltéréseit, prognózist befolyásoló jellegzetességeit vizsgálták. Dolgozatomban a mai napig tartó kutatómunka eredményeinek egy részét mutatom be.

A gyermekkori ALL a limfoid progenitor sejtek malignus transzformációjának következményeként alakul ki. Az éretlen limfoblasztok csontvelői felszaporodása a fiziológiás hemopoezis visszaszorulásához, anémiához, trombocitopéniához és neutropéniához vezet. A csontvelőn kívül nyirokcsomó-, lép-, máj- érintettség is kialakulhat, a blasztok infiltrálhatják a heréket, a csontokat és ízületeket, a központi idegrendszert, a liquorban is megjelenhetnek, előrehaladott stádiumban pedig a perifériás vér útján csaknem minden szerv érintetté válik.

Az 50-es évek előtt gyógyíthatatlan betegségnek számított: sugárkezeléssel, arzén alkalmazásával próbálkoztak, a vérzéseket transfúzióval lehetett átmenetileg uralni, azonban a betegség két-három hónapon belül halálhoz vezetett. A világháború előtti években az éretlen alakos elemeket mutató, főleg várandósokban és csecsemőkben jelentkező vérszegénység esetén sikerrel alkalmaztak folsav-pótlást, ezért a harvardi egyetem gyermekpatológusa és kutatóorvosa, Sidney Farber, a hasonló vérkép-eltéréseket mutató leukémiás gyermekeknél is megpróbálta a folsav-kezelést. A tünetek azonban nem javultak, sőt gyorsan progrediáltak, így 1948-ban Farber - feltételezván, hogy a folsav a vörösvérsejteken túl a leukémiás sejteket is stimulálja - folsav-antagonista aminopterint (mely a későbbi metotrexát analógja) alkalmazva átmeneti, rövid ideig tartó remissziót ért el (2). Farbert a modern kemoterápia atyjának tartjuk, a metotrexát pedig ma is alappillére az ALL kezelésének. Az aszparagináz, a 6-merkaptopurin, a prednizolon, majd a vinka-alkaloidák bevezetése megalapozta a napjainkban is alkalmazott kemoterápiát. A 60-as évek közepétől, a rezisztencia megelőzése céljából - a tuberkulózis elleni

antimikrobás kezelés analógiájára - kombinációban kezdték alkalmazni a citosztatikumokat, így hosszabb ideig, akár egy évig tartó remissziót értek el (3). Ritka betegségről lévén szó, a tapasztalatok megosztása céljából az orvosok, kutatók munkacsoportokba tömörültek és egy-egy gyógyszer, gyógyszerkombináció hatását párhuzamosan vizsgálva, összehasonlítva jöttek létre az első terápiás algoritmusok. A 70-es évek elején áttörést jelentett a központi-idegrendszeri relapszus megelőzésére bevezetett koponya-besugárzás és intratekális kemoterápia: a vér-agy-gáttal védett leukémiás sejtek is elpusztíthatókká váltak (4). Már nem csak átmeneti remisszióról lehetett beszélni: a gyermekkori leukémia gyógyítható betegséggé vált (5). A 10-15%-os gyógyulási arány a hetvenes évek végére 50% fölé emelkedett. A súlyos mellékhatásokkal is járó, toxikus citosztatikus kezelés intenzitásának fokozását, a csontvelő-transzplantáció bevezetését a szupportív terápia fejlődése (trombocita-transzfúziók, újabb antibiotikumok, ápolási algoritmusok) tette lehetővé. 1994-ben megalakult a Childhood ALL Collaborative Group, mely az egyre kedvezőbb túlélési eredmények háttérében lévő tényezőket, illetve az egyes munkacsoportok eredményeit meta-analízisek, szisztematikus közlemények formájában rendszeresen értékelte. A 90-es évektől a molekuláris biológia módszerei robbanásszerű fejlődésnek indultak (PCR-, FISH-, kromoszómális microarray-technológiák, génexpressziós vizsgálatok, újgenerációs szekvenálás). Ez tette lehetővé - és napjainkban is a tumorkutatás élvonalába tartozik - a citogenetikailag és prognosztikailag is elkülöníthető alcsoportok azonosítását, a betegség kialakulásában-, a gyógyszerrezisztencia- és a toxikus mellékhatások háttérében álló genetikai polimorfizmusok felderítését, mely előrelépés a személyre szabott terápia irányába. A túlélést várhatóan tovább növeli majd a hagyományos kemoterápia kiegészítése célzott terápiával és immunterápiával (pl. monoklonális antitestek, kiméra antigén receptor T-sejtek). A fejlett országokban jelenleg alkalmazott terápiás protokollokkal a gyermekkori limfoblasztos leukémia gyógyulása napjainkban 85-90% (6,7), így a modern orvostudomány egyik siker-történetének tekinthető.

Hazánkban Schuler Dezső Professzor Úr kezdeményezésére 1971-ben alakult meg a Magyar Gyermekonkológiai Munkacsoport. A leukémiás gyermekek adatait 1971 óta, az összes rosszindulatú megbetegedésben szenvedő gyermek adatát 1973 óta rögzíti az Országos Gyermektumor Regiszter, mely az egyik legrégebbi népesség-alapú rákregiszter Európában (8,9). Jelenleg minden rosszindulatú daganatos és vérképzőszervi megbetegedésben szenvedő gyermeket a hét hazai ellátó centrum egyikében, egységes, nemzetközileg elfogadott, korszerű diagnosztikus és terápiás elvek szerint kezelünk és követünk. Akut limfoblasztos leukémia esetén 1988 óta alkalmazzuk a nemzetközi Berlin-Frankfurt-Münster (I-BFM) munkacsoport által folyamatosan fejlesztett protokollokat, melyeket világszerte több, mint 30 országban

átvettek. A kezelés gerincét a fél év intenzív és másfél év fenntartó kezelés során alkalmazott kombinált kemoterápia képezi.

A citosztatikus kezelés során azonban korai és hosszútávú súlyos mellékhatások is felléphetnek. A hosszú kemoterápia, az elhúzódó mieloszupresszió fő szövődményeként fertőzés, szepszis alakulhat ki, amely akár halálos kimenetelű is lehet („kezeléssel összefüggő mortalitás”). Gyakorló orvosként az egyik legfájdalmasabb helyzet olyan gyermeket elveszíteni a kezelés toxikus mellékhatásainak következtében, akinek a betegsége már remisszióban van. A gyógyult gyermekek felnőnek, a társadalom aktív tagjaiként munkát vállalnak, családot alapítanak. Nemzetközi felmérések (pl. az európai PanCare SurfUp) azt igazolják, hogy a túlélők között nem ritka a késői szövődmények aránya: elsősorban csonttritkulás, kardiomiopátia, endokrinopátiák, pszichés problémák, második malignitás (10,11). Felmerül hát a kérdés: hogyan lehet tovább növelni a betegség gyógyulási esélyét úgy, hogy közben a kezelés korai és hosszútávú súlyos mellékhatásai mérsékelhetőek legyenek?

1.2. A gyermekkori ALL - a gyógyulás fő prognosztikai tényezői

Számos törekvés irányult azon biológiai és klinikai prognosztikai faktorok feltárására, amelyek meghatározóak a betegség lefolyásában, kimenetelében (12-53). A betegek kockázati csoportokba történő besorolása meghatározza a terápia intenzitását. A standard rizikójú betegek (standard risk, SR) esetében a legnagyobb az esély a gyógyulásra, és a legalacsonyabb a recidíva kockázata. Ők már két héttel a kezelés megkezdését követően remisszióba kerülnek, így esetükben kevésbé intenzív konvencionális terápia alkalmazásával is tartós remisszió biztosítható, és csökkenthetőek a kezelés korai és hosszútávú mellékhatásai. A magas kockázati csoportba (high risk, HR) sorolt betegeknél azonban erőteljes kemoterápia és esetenként az első remisszióban elvégzett allogén csontvelő transzplantáció alkalmazásával is nagyobb a recidíva esélye. Jelenleg a legtöbb nemzetközi protokoll az alábbi prognosztikai faktorokat veszi figyelembe a kezelés intenzitásának meghatározásakor: 1. életkor, 2. kezdeti fehérvérsejtszám, 3. a limfoblasztok specifikus genetikai eltérései, 4. a kezelésre adott korai terápiás válasz. A terápiát a központi idegrendszeri érintettség is befolyásolja. A betegség kimenetelében az immunfenotípusnak is van szerepe: a B-sejtes ALL prognózisa kedvezőbb. Korszerű protokollokkal, T-sejtes ALL esetében alkalmazott intenzívebb kezeléssel (pl. nagy dózisú metotrexát) azonban ez az eltérés már nem szignifikáns.

1.2.1. Életkor

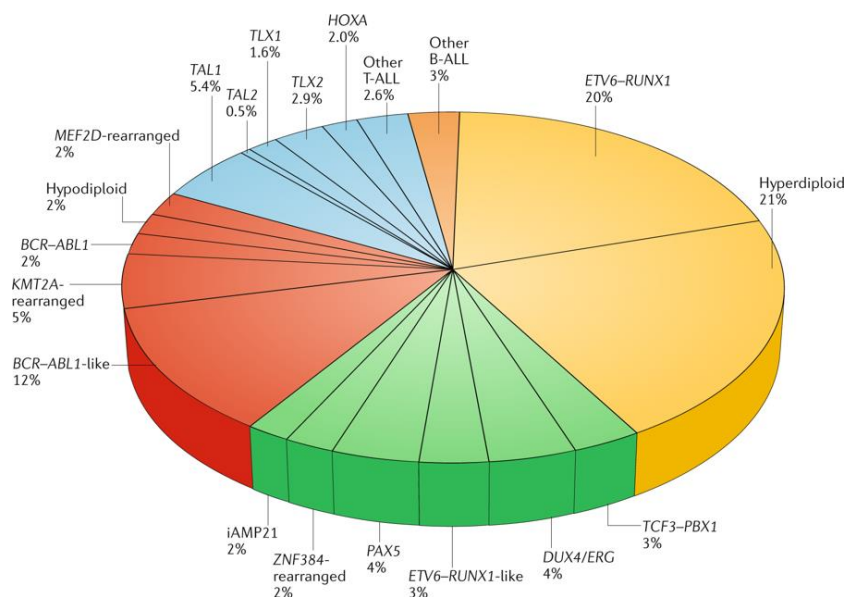
Kedvező prognosztikai faktor a fiatal életkor: a legtöbb munkacsoport a diagnóziskor 1-6, illetve 1-10 év közötti gyerekeket sorolja ide (12,13). A csecsemőkori ALL prognózisa kedvezőtlen (14,15).

1.2.2. Kezdeti fehérvérsejtszám

A diagnóziskor mért alacsony fehérvérsejtszám (I-BFM protokolloknál 20 G/l alatt, más munkacsoportoknál, pl. COG, CCLG 50 G/l alatt) régóta ismert, kedvező marker (16,17).

1.2.3. Genetikai tényezők

A limfoid hemopoetikus progenitor sejtek csökkent differenciálódása és fokozott proliferációja mögött szerzett aberrációk, szomatikus mutációk állnak. Számos, jól ismert kromoszóma-eltérés vizsgálata ma már rutinszerű és a betegek rizikó csoportba történő besorolásánál is meghatározó. Standard citogenetikai és molekuláris genetikai módszerekkel a betegek közel 80%-ánál, nagy felbontású microarray-vel, szekvenálással kiegészített analízis során azonban lényegében minden betegnél azonosíthatók mikroszkópikus/szubmikroszkópikus elváltozások, szekvenciamutációk (18-20). A strukturális aberrációk a kromoszómák szerkezetét érintik, a numerikus aberrációk pedig a kromoszómák számát (1. ábra).



1. ábra. Specifikus mikroszkópikus és szubmikroszkópikus genetikai eltérések gyermekkori ALL esetén (20).

1.2.3.1. Strukturális eltérések

A strukturális eltérések leggyakrabban kiegyensúlyozott transzlokációk, ritkábban inverziók, deléciók, duplikációk, pont-mutációk. A gyakori és jól ismert strukturális eltérések a normál hemopoézist és a limfoid elemek fejlődését szabályozó géneket érinthetik (pl. *ETV6*), onkogéneket aktiválhatnak (pl. *MYC*), a tirozin-kináz rendszert indukálhatják (pl. *ABL1*). Egy részük jól ismert prognosztikai alcsoportokat azonosít és a fejlett országokban alkalmazott protokollok esetén meghatározó a rizikócsoportha történő besorolásnál.

Az elmúlt évtizedben az új-generációs szekvenálás (NGS) módszerével bepillantást nyertünk a gyermekkori ALL molekuláris rétegébe is. Teljes genom szekvenálással mind a kódoló, mind a nem-kódoló régiókban detektálhatóak mutációk, kis inzerciók és deléciók, kópiaszám variációk és génátrendeződések. Teljes exom szekvenálással a genom 1,5%-át alkotó kódoló régiókat vizsgálják, míg az RNS szekvenálás (transzkriptom szekvenálás) a génexpresszió szintjén mutatja az eltéréseket. Ezen vizsgálatok új, a betegség kimenetelére szempontból is jelentős aberrációkat azonosítottak, bár esetenként ezek prognosztikai jelentőségét másik munkacsoport vizsgálatai nem erősítették meg. Ennek háttérében a különböző munkacsoportok valamelyest eltérő rizikó-besorolása, a kezeléseket eltérő intenzitása, illetve a betegek eltérő etnikai jellemzői is állhatnak.

B-sejtes ALL esetén 6 fő genetikai alcsoportba sorolható a gyermekkori leukémiák 70-75%-a: ezek közül négy strukturális eltérés (*ETV6-RUNX1*, *BCR-ABL1*, *TCF3-PBX1*, *KMT2A* géneket érintő fúzió) és kettő numerikus aberráció (magasan hiperdiploid és hipodiploid leukémia) (21). Ezen hat kromoszóma-eltérés elsődleges leukemogén aberrációként alapvetően meghatározza a betegség biológiai jellegzetességeit és kimenetelét. A *t(12;21)(p13;q22) ETV6-RUNX1*, (régebbi nomenklatúra szerint *TEL-AML1*) az egyik leggyakoribb génátrendeződés, kb. 20-25%-ban mutatható ki. A transzlokáció hemopoetikus transzkripciós faktorok (*ETV6*, *RUNX1*) fúzióját eredményezi. A fúzió már in utero jelen lehet a csontvelői sejteken (22). A betegséget leggyakrabban 1-10 éves kor között diagnosztizálják, az életkori csúcs 2-5 év. Kedvező prognózisú, de késői relapszus akár 20%-ban is jelentkezhet (23). A *KMT2A* génátrendeződés (korábban *MLL*) - mely a 11q23 régiót érinti és számos fúziós partnere ismeretes - gyermekkori ALL esetén 5%-ban, csecsemőkorban azonban 80%-ban igazolódik. Magas fehérvérsejt-számmal, központi idegrendszeri (KIR) érintettséggel társul. Prognózisa igen kedvezőtlen (24). A *t(1;19)(q23;p13.3) E2A-PBX1 (TCF3-PBX1)* transzlokáció a betegek 3-5%-ban mutatható ki, diagnóziskor magas FVS-szám, KIR érintettség jellemző. A transzlokáció egy másik variánsa, a *t(17;19)(q22;p13) E2A-HLF (TCF3-HLF)* egy ritka,

hiperkalcémiával, alvadási zavarokkal társuló leukémiára jellemző, melynek lefolyása során korán terápia-refrakter recidíva jelentkezik (25). A *t(9;22) BCR-ABL1* transzlokáció az ABL1 tirozin kináz fokozott aktivitását eredményezi. Gyermekkorban 2-4%-ban fordul elő, diagnóziskor idősebb életkor és magas FVS-szám jellemzi. Prognózisa korábban igen kedvezőtlen volt, azonban a tirozin kináz inhibitorok alkalmazásának bevezetése óta jelentősen javult (26).

A B-sejtes ALL közel 30%-ban nem mutatható ki a fent említett 6 fő kromoszóma-aberráció, ezt a heterogén csoportot korábban „egyéb B-sejtes ALL”-nek, „B-other ALL”-nek nevezték. Génexpressziós mintázat alapján azonban napjainkban több alcsoportot is sikerült elkülöníteni. A korábban „B-other” leukémiák 15-35%-át ma már „*BCR-ABL1 like*”-nak tartjuk: a génexpressziós profil a *BCR-ABL1*+ ALL-re emlékeztető, de fúziós gén nincs jelen. Kedvezőtlen prognózis jellemzi, azonban minimális reziduális betegség (MRD) alapú intenzifikált kezelés alkalmazásakor a kimenetel jelentősen javulhat. Napjainkban is folyamatban lévő tanulmányok a hagyományos kemoterápia molekuláris inhibitor kezeléssel történő kiegészítésének hatékonyságát vizsgálják (ABL-osztályba tartozó génátrendeződés esetén tirozin kináz inhibitorok, *JAK-STAT* jelátviteli út érintettsége esetén JAK inhibitorok, a Ras jelátviteli út mutációi esetén MEK inhibitor kezelés) (27). A „B-other” leukémiák további 5-12%-a az „*ETV6-RUNX1 like*” csoportba sorolható: génexpressziós profiljuk hasonlít az *ETV6-RUNX1*+ leukémiára, azonban a jellegzetes transzlokáció nem mutatható ki. Gyakori a társuló *ETV6*, *IKZF1* aberráció. Prognózisa -jelen ismereteink alapján- kedvező (28). *DUX4*-génátrendeződés további 15-30%-ban igazolható. A DUX4 transzkripció faktor fokozott expressziója és gyakori *ERG* deléción jellemzi, mely az Erg transzkripció regulátor funkcióvesztésével jár. Prognózisa kedvező, bár további nagyobb esetszámú tanulmányok szükségesek ennek alátámasztására (29). *ZNF384* génátrendeződés a „B-other” leukémiák 5-10%-ért felelős. A hemopoetikus őssejtekre jellemző gyenge CD10-, és gyakori mieloid marker (CD13, CD33) - expresszió jellemzi. Több partnergén is ismeretes, és ez meghatározó a klinikai kimenetel szempontjából, ami a legtöbb esetben kedvező-intermedier (30). *MEF2D*-génátrendeződés esetén szintén jellegzetes immunfenotípus észlelhető: gyenge/hiányzó CD10- és magas CD38 expresszió. Diagnóziskor rendszerint idősebbek a gyermekek (átlag: 12 év), a klinikai kimenetel kedvezőtlen (31).

A 21-es kromoszóma intrakromoszómális amplifikációja (*iAMP21*) a hemopoetikus betegségek 2016-os WHO klasszifikációjának egyik új entitása (32), a B-sejtes ALL 2%-ban mutatható ki. Fluorescens in situ hibridizáció során legalább három extra *RUNX1* jel detektálható, azaz legalább öt *RUNX1* jel sejtenként. Diagnóziskor a gyermekek idősebbek

(átlag: 9 év), a FVS szám többnyire alacsony. Nagy a relapszus esélye, ezért intenzifikált elsővonalbeli terápia szükséges (33).

A WHO klasszifikáció külön entitásként mutatja be a *t(5;14)(q31.1;q32.3) IL3-IGH* leukémiát is, mely hiper-eozinofíliával társul (32,34). Az interleukin-3 gén promóter régiójához csatlakozó *IGH* lókuszt megváltozott *IL3* expressziót eredményez. Egyelőre nem teljesen egyértelmű az *IL3-IGH* fúzió prognosztikai jelentősége.

T-sejtes ALL a gyermekkori akut limfoblasztos leukémiák 10-15%-ban igazolódik. Gyakran társul hiperleukocitózissal és extramedulláris érintettséggel. Korábban a B-ALL-hez képest kedvezőtlenebb kimenetelű betegségnek tartották, azonban korszerű, intenzifikált kezeléssel a különbség már nem szignifikáns. Gyakran (60%-ban) a *NOTCH1* jelátviteli út mutációi mutathatóak ki (*NOTCH1*, *FBXW7*), melyek a T-sejt fejlődéssel kapcsolatos transzkripció aktivációját eredményezik. A WHO 2016-os besorolásnál új entitásként szerepel a korai T-prekurzor-sejtes ALL (ETP-ALL), melybe a T-ALL betegek 15%-a sorolható (32,35). Sajátos immunfenotípus jellemzi: limitált korai T-sejt differenciáció mellett megtartott őssejt- és mieloid-jellegzetességek figyelhetők meg mind az immunfenotípus, mind a génmutációk szintjén. Bár kezdetben kedvezőtlen kimenetelűnek tartották, nagy betegszámú vizsgálatok alapján, MRD alapú intenzifikált kezelés esetén a prognózisa jó (35).

DNS microarray és újgenerációs szekvenálás technológiáknak köszönhetően az elmúlt években egyre több szubmikroszkópikus, szekunder, ún. kooperatív mutációt és mikrodéliót ismertünk meg gyermekkori akut limfoblasztos leukémiában, melyek leggyakrabban szubklonálisak és a betegség progressziója során, illetve relapszusakor különösen gyakran mutathatóak ki (6,20,21,36). Ezek érinthetik a limfoid fejlődési vonal transzkripcionális regulátorait (pl. *PAX5*, *IKZF1*, *EBF1*, *RUNX1*, *NOTCH1* gének), a Ras-jelpálya utat (*NRAS*, *KRAS*, *PTPN11*, *FLT3*), epigenetikai módosítókat (*CREBBP*, *WHSC1*, *EP300*), sejtciklus-szabályozó tumorszupresszor géneket (*CDKN2A*, *CDKN2B*, *PTEN*, *RB1*) illetve a JAK/STAT jelátviteli utat (*JAK2*, *CRLF2*). Klinikai jelentőségük az esetek egy részében már ismert és célzott terápiára ad lehetőséget (pl. *ABL1*-gátló imatinib, dasatinib, *JAK2*-gátló ruxolitinib).

1.2.3.2. Numerikus eltérések

A numerikus eltérések érinthetik az egész kromoszóma állományt (pl. triploid, tetraploid), vagy bizonyos kromoszómák többletét/hiányát okozhatják (aneuploiditás).

A leggyakoribb aberráns kariotípus a hiperdiploid: a limfoblasztok kromoszómakészlete a normál diploidnál (=46 kromoszóma) nagyobb. Két alcsoportja

ismeretes: az alacsony (47-50 kromoszóma) és a magas hiperdiploiditású (51-67 kromoszóma, illetve a legújabb WHO klasszifikáció úgy fogalmaz: >50, általában <66 kromoszóma) (37). A kedvező klinikai kimenetellel jellemezhető alacsonyan hiperdiploid csoportban mindössze néhány többlet kromoszóma figyelhető meg, a leggyakrabban a +21 és +X. A magasan hiperdiploid leukémia a későbbiekben kerül majd részletes bemutatásra a dolgozatomban. A közel-triploid (68-79 kromoszóma), és a közel-tetraploid (>80 kromoszóma) leukémiák ritkák, az összes gyermekkori ALL kevesebb, mint 1%-át alkotják. Gyakoriak a társuló egyéb citogenetikai eltérések (pl. *ETV6-RUNX1* fúzió) ezért a szakirodalom külön entitásként kezeli őket a hiperdiploid leukémiákon belül. Modern protokollok alkalmazásakor a kimenetelük - ellentétben azzal, amit korábban leírtak - nem kedvezőtlen (38,39).

Hipodiploid leukémia (≤ 45 kromoszóma) egy heterogén alcsoport, a gyermekkori ALL 5%-ánál mutatható ki (40-46). A betegek négyötödénél 45 a modális kromoszómaszám és mindössze egyötödük jellemezhető 44, vagy annál kevesebb kromoszómaszámmal. A 44-nél kevesebb kromoszómaszámú leukémiák kimenetele kedvezőtlen és egy nagy esetszámú, randomizált tanulmány alapján az allogén transzplantáció sem javítja a kimenetelt (41). A hipodiploid leukémiákon belül három alcsoportot különíthetünk el: a magasan hipodiploid, az alacsonyan hipodiploid és közel-haploid leukémiát. A magasan hipodiploid (40-45 kromoszóma) csoporton belül a WHO 2016-os klasszifikációja a 44 és 45 kromoszómaszámú leukémiákat közel-diploidnak nevezi és nem sorolja a hipodiploid alcsoportba, a diploid leukémiákhoz hasonló kedvező kimenetel miatt (37). Az ennél alacsonyabb kromoszómaszám egy rendkívül ritka és heterogén biológiai, prognosztikai jellegzetességeket mutató alcsoportra jellemző. A magasan hipodiploid leukémiás gyermekek többnyire idősebbek, a leukémia nem ritkán T-sejtes, és a heterogén kimenetelt a 7, 9 és 12-es kromoszómákat érintő komplex kromoszóma rendellenességek is magyarázzák. Az alacsonyan hipodiploid (30-39 kromoszóma) leukémiák kedvezőtlen prognózisának lehetséges magyarázatát az elmúlt évek NGS vizsgálatai adták: közel 100%-ban a *TP53* tumorszupresszor gén mutációja igazolódott (42,43). Ezen esetekben csírasejtes mutáció-szűrés és az érintett család genetikai vizsgálata javasolt, mivel a hipodiploid ALL Li-Fraumeni szindróma egyik manifesztációja lehet (43,44). A közel-haploid leukémiában (23-29 kromoszóma) szenvedő betegek teljes genom- és exon-szekvenálása társuló szubmikroszkópikus aberrációkat igazolt: transzkripciós faktor gének lehetnek érintettek (pl. *IKZF3*), esetenként a Ras és foszfátidilinozitol 3 kináz szignál-transzdukciós út aktiválása figyelhető meg (42,45). A rendkívül kedvezőtlen kimenetel miatt ezen betegek mindig magas rizikónak megfelelő, erélyes kezelésben részesülnek. PI3K és PI3K/mTOR inhibitorok potenciális célzott terápiát jelenthetnek a jövőben. A hipodiploid

populáció mellett párhuzamosan jelenlévő, a hipodiploid kromoszómák megduplázódásaként létrejövő hiperdiploid populáció gyakran mutatható ki közel-haploid ALL esetén, és megtévesztően hiperdiploid leukémia diagnózisát eredményezheti. A két entitás megkülönböztetése azonban elengedhetetlen, tekintve a klinikai kimenetel közötti éles ellentétet (46).

1.2.3.3. Genetikai alcsoportok

A fentiekben felsorolt strukturális és numerikus aberrációkat figyelembevéve a 2016-os WHO klasszifikáció (37) az alábbi genetikai csoportosítást alkalmazza prekursor limfoid neopláziák esetén (1. táblázat).

Prekursor limfoid neopláziák
B-limfoblasztos leukémia/limfóma (NOS, továbbiakban nem tipizálható)
B-limfoblasztos leukémia/limfóma, ismétlődő genetikai rendellenességekkel
B-limfoblasztos leukémia/limfóma, (9;22)(q34;q11.2) <i>BCR-ABL1</i>
B-limfoblasztos leukémia/limfóma, t(v;11q23); <i>KMT2A</i>
B-limfoblasztos leukémia/limfóma t(12;21)(p13;q22) <i>TEL-AML1 (ETV6-RUNX1)</i>
B-limfoblasztos leukémia/limfóma, hiperdiploid
B-limfoblasztos leukémia/limfóma, hipodiploid
B-limfoblasztos leukémia/limfóma, t(5;14)(q31;q32) <i>IL3-IGH</i>
B-limfoblasztos leukémia/limfóma, t(1;19)(q23;p13.3) <i>TCF3-PBX1</i>
Provizórikus entitás: B-limfoblasztos leukémia/limfóma, <i>BCR-ABL1</i> -like
Provizórikus entitás: B limfoblasztos leukémia/limfóma, <i>iAMP21</i>
T-limfoblasztos leukémia/limfóma
Provizórikus entitás: Korai T-sejt prekursor limfoblasztos leukémia
Provizórikus entitás: NK-sejtes limfoblasztos leukémia/limfóma

1. táblázat. 2016-os WHO klasszifikáció, vérképzőszervi és limfoid szövetek tumorai (37).

A hazánkban jelenleg alkalmazott ALL IC BFM 2009 protokoll magas kockázati csoportba sorolja a t(9;22) [*BCR/ABL1*], vagy t(4;11) [*MLL/AF4*] transzlokációt hordozó, illetve a hipodiploid leukémiát. A gyermekkori ALL egynegyedét képező magasan hiperdiploid leukémia a legkedvezőbb klinikai kimenetellel jellemezhető. Egyes munkacsoportok (pl. St. Jude Children's Research Hospital, Children's Oncology Group) standard rizikójú, magasan hiperdiploid leukémia esetén a kezelés intenzitásának csökkentését, dózisredukciót alkalmaznak (17,47).

1.2.4. Terápiás válasz, minimális reziduális betegség (MRD)

A kezelésre adott megfelelő terápiás választ a tumorvolumen csökkenése jelenti, melyet az első hónap során a perifériás vér, a csontvelő, illetve a diagnóziskor infiltrált szervek (központi idegrendszer, herék, nyirokcsomók stb.) ismételt vizsgálatával ítélünk meg. Minél gyorsabb a remisszió, annál kisebb az esély rezisztens szubklónok kialakulására, mely a terápia sikertelenségéhez, illetve recidívához vezethet. A múltban fontos terápiás mérföldkönek tekintették a hematológiai remisszió elérését, melyet morfológiai alapon ítéltek meg (csontvelői blasztarány <5%). Az ALL BFM 95 és ALL IC BFM 2002 protokollok 5% alatti csontvelői blasztarány esetén remisszióban lévőknek tekintették a betegeket, amennyiben extramedulláris érintettség sem állt már fenn. Napjainkban flow citometriával illetve molekuláris vizsgálómódszerekkel 10^{-3} - 10^{-5} nagyságrendben határozzuk meg a csontvelői minimális reziduális blasztarányt, melyet MRD-ként értelmezünk (48,49). A kezelés első hónapjának (protokolltól függően az első 28-35 nap) a célja a remisszió elérése, a remisszió indukció. Bár az egyes munkacsoportok protokolljai nem teljesen egységesek az MRD detektálásának időpontját és annak mértékét illetően, az indukciós kezelés során, de legkésőbb a végére kialakuló, 0,01% alatti MRD értéket kedvező prognózisúnak tekintik (48-54). Ugyanakkor az indukció végén mért 0,01-0,05% feletti MRD magas rizikójú betegségre utal, mely a terápia intenzitásának fokozását teszi szükségessé (50,55). A BFM munkacsoport egyértelmű összefüggést igazolt a kezelés 33. és 78. napján mért MRD érték és a túlélés között (51).

A reziduális blasztarányal jellemezhető korai terápiás válasz a kemoterápiának az adott, konkrét betegre gyakorolt individuális hatását tükrözi, farmakokinetikai és farmakodinamikai tényezők is befolyásolják és mai tudásunk szerint prognosztikai jelentősége meghaladja minden egyéb biológiai vagy klinikai rizikó-tényező prognosztikai jelentőségét.

1.3. A magasan hiperdiploid (HeH) akut limfoblasztos leukémia

A magasan hiperdiploid gyermekkori ALL (high hyperdiploid ALL) rövidítése esetén a nemzetközi szakirodalomban a HD, HHD, HeH jelölés egyaránt használatos (56-58). Dolgozatomban a továbbiakban a HeH rövidítést alkalmazom.

1.3.1. A HeH ALL első leírása

A magas hiperdiploiditás az egyik legkorábban felismert genetikai aberráció prekursor-B-ALL esetén. Lampert és mtsai (59) már 1967-ben felfigyeltek a magas kromoszómaszámú gyermekkori limfoblasztos leukémia kedvező prognózisára. Kaneko és mtsai írták le 1981-ben az összefüggést a modális kromoszómaszám (MN) és a betegség kimenetele között: a 45-47 modális kromoszómaszámú leukémiás betegeknél átmeneti remisszió után recidíva jelentkezett, az 50-59 kromoszómaszámú betegek azonban tartós remissziót értek el (60). További vizsgálataik során körvonalazódott a magasan hiperdiploid leukémia számos, ma is érvényes jellemzője: elsősorban gyermekkorban fordul elő, "non-B, non-T" fenotípusú (mai nomenklatúrával: prekursor-B-sejtes), diagnóziskor fiatal életkor és alacsony kezdeti fehérvérsejtszám jellemzi, mediasztinális/központi idegrendszeri érintettség nélküli, a prognózisa pedig - a 70-es évek végén alkalmazott protokollokkal is - kimagaslóan jó (61). 1982-ben a Third International Workshop on Chromosomes in Leukemia is rögzítette magas hiperdiploiditás és a gyermekkori ALL közötti összefüggést, és megjelent Look és mtsai publikációja, melyben flow citometriai vizsgálataik eredményét összegezték: a DNS tartalomban mért eltérés nagyban korrelált a kariotípus analízissel igazolt teljes kromoszóma-többlettel/hiánnyal (62). A 80-as évek közepére a hiperdiploid ALL klinikai és citogenetikai jellemzőinek vizsgálata több, különböző protokollt alkalmazó munkacsoport kutatásának is a középpontjába került (63-66).

1.3.2. A HeH ALL citogenetikai és molekuláris genetikai jellemzői

A gyermekkori HeH ALL a prekursor-B-ALL leggyakoribb citogenetikai alcsoportja, T-sejtes leukémiában nagyon ritkán mutatható ki (56). T-sejtes ALL esetén diploidnál magasabb kromoszómaszám előfordulásakor leggyakrabban közel tetraploid a kariotípus és nem is sorolják ezen betegeket a klasszikus HeH alcsoportba (37). A magasan hiperdiploid leukémiát a limfoblasztok magas kromoszómaszáma jellemzi, a WHO 2016-os klasszifikációja 51-65 közötti (37), egyes összefoglaló közlemények, tanulmányok 51-67 közötti értéket

határoznak meg (56,58,67). A leggyakoribb modális szám (MN) az 55. Az aneuploiditás az X, 4-es, 6-os, 10-es, 14-es, 17-es, 18-as, és 21-es, ritkábban az 5-ös és 8-as kromoszómák jellegzetes, non-random mintázat szerinti kópiaszám-növekedésének a következménye. Extra 21-es kromoszóma közel 100%-ban kimutatható, jelenléte egyes szerzők szerint a magasan hiperdiploid ALL elengedhetetlen feltétele (56). Standard citogenetikai vizsgálatokkal tri/tetraszómia a 6-os, 14-es és az X kromoszóma esetében 70-80%-ban, a 4-es, 18-as esetében 60-70%-ban, a 10-es és 17-es esetében pedig közel 60%-ban azonosítható (56). Egy-nukleotid polimorfizmus vizsgálat (SNP) a többlet kromoszómák arányát még magasabbnak mutatja; a 21-es kromoszóma 100%-ban, az X 95%-ban, a 14-es és 6-os több, mint 90%-ban, a 18-as 86%-ban, a 4-es, 10-es és a 17-es többlet kromoszómák is közel 80%-ban vannak jelen (68). A többletek döntően triszómiák, fiúknál X diszómia. Emellett tetraszómia is előfordul, a 4, 8, 10, 14, 18 és X kromoszómák esetén ritkán (1,4-16%-ban), a 21-es esetén azonban gyakran (70%-ban) mutatható ki (56,67,68). Pentaszómia csak a 21-es kromoszómára jellemző, SNP vizsgálattal 6,8%-ban fordul elő (68). Ezen karakterisztikus kromoszómák részleges többlete ritka jelenség, a 17q és még ritkábban a 21q esetében került leírásra (68). A többlet kromoszómák mintázata is jellegzetes: +4, +6, +10, +14, +17, +18, +21 az 51-54 modális kromoszómaszámú csoportban már gyakoriak, a +5, +8, +11, +12 kromoszómák a magasabb modális számnál (MN 57-60) jelennek meg, míg a +2, +3, +9, +16 és +22-es extra kromoszómák a MN 63-67 betegeknel figyelhetőek meg (69). Uniparenterális diszómia - amikor a beteg egy adott kromoszómájának mindkét homológja ugyanattól a szülőtől származik - nem ritka jelenség HeH ALL esetén, 25-30%-ban fordul elő (68,70,71). Paulsson SNP vizsgálata alapján a betegek 27%-ban volt megfigyelhető teljes uniparenterális diszómia, leggyakrabban a 9, 11, 12, X és 1-es kromoszómák érintettségével (68).

A leukémiás sejtek kromoszómaszámának változása áramlási citometriai méréssel is követhető. A sejtek összesített DNS tartalmának a változását a DNS index (DI) fejezi ki, eltérés hiányában $DI = 1$, magasan hiperdiploid esetben $DI > 1,16$.

A numerikus eltérések mellé strukturális, illetve szubmikroszkópikus aberrációk is társulhatnak. Konvencionális citogenetikai vizsgálattal az esetek több, mint 50%-ban mutathatóak ki szekunder abnormalitások (56,57,72), SNP analízis azonban jóval magasabb arányban, közel 80%-ban igazol társuló anomáliákat, melyek rendkívül heterogén mintázatot mutatnak (68). A HeH ALL betegek közel 5%-nál ALL-specifikus kiegyensúlyozott transzlokációk vannak jelen, leggyakrabban $t(1;19)$, $t(12;21)$ és $t(9;22)$, ez utóbbi jelenlétekor a 2-es kromoszóma triszómiája különösen gyakori (57,73). Újabban nem javasolják ezen

betegeket a klasszikus magasan hiperdiploid csoportba sorolni (57,74). A legtöbb szekunder strukturális elváltozás kiegyensúlyozatlan. Az 1q részleges nyérése a HeH betegek közel 15%-ban figyelhető meg és fokozott génexpressziót (*B4GALT3*, *DAP3*, *RGS16*, *MEM183A* és *UCK2* gének) eredményez (75). Gyakran társul 5-ös kromoszóma triszómiához (68). További kiegyensúlyozatlan aberrációként a 6q deléció fordulhat elő (57,68). Az esetek 1-5%-ban izokromoszómák detektálhatóak: i(7q) és i(17q) (56,57,72). A 17-es kromoszóma triszómiája - mely az egyik leggyakoribb numerikus eltérés HeH ALL-ben - jellegzetes módon szinte sohasem jár együtt i(17q)-el, mely valószínűsíti, hogy a 17-es kromoszóma-többlet funkcionális következményét a hosszú kar adja (56,73). A 17-es izokromoszómánál gyakoribb jelenség a 17-es kromoszóma részleges duplikációja (68).

Kromoszómális microarray technikák a finom kópiaszám variációk kimutatására is alkalmasak, így egyre több, jellegzetes mikrodeléció azonosítható gyermekkori ALL esetén. A magasan hiperdiploid alcsoportban a többi alcsoporthoz képest alacsonyabb a mikrodeléciók gyakorisága (68,71), azonban relapszus esetén a számuk szignifikánsan emelkedik (75). Paulsson vizsgálatai alapján a leggyakoribb az *ETV6* deléció, mely 15%-ban mutatható ki, hemizigóta formában. A *CDKN2A* (11%) és *IKZF1* (6,8%), illetve *PAX5* deléciók (6,8%) szintén jóval ritkábban fordulnak elő a magasan hiperdiploid alcsoportban, mint általában gyermekkori ALL esetén (68). A mikrodeléciók SNP vizsgálattal történő azonosítását technikailag nem akadályozzák a többlet kromoszómák, mivel a leggyakrabban érintett kromoszómák - 12p13.2 (*ETV6*), 9p21.3 (*CDKN2A*), 7p12.2 (*IKZF1*), 9p13.2 (*PAX5*), 13q14.2 (*RBI*), 19p13.3 (*TCF3*) - ritkán tri/ tetraszómiások HeH leukémiában (56).

Molekuláris vizsgálómódszerekkel kimutatható szubmikroszópikus mutációk ugyanakkor magasabb arányban fordulnak elő a magasan hiperdiploid alcsoportban, mint a nem-HeH ALL esetén. A RTK-Ras szignáltranszdukciós út génmutációi (*KRAS*, *NRAS* és *PTPN11*, *FLT3*) különösen gyakoriak, a betegek egyharmadánál-felénél kimutathatóak (70,71,76-83). Ezen jelátviteli út elsősorban a proliferációban és differenciációban játszik fontos szerepet, és a mutációk onkogén hatást eredményeznek. HeH leukémiában leggyakrabban a *KRAS* érintett (81), és a *PTPN11* mutáció is szignifikánsan gyakoribb, mint a többi genetikai alcsoportban (83). Malinowska és mtsai teljes exom-, majd célzott szekvenálást követően azt tapasztalták, hogy a RTK-Ras mutációk diagnóziskor általában kisebb szubklónokban mutathatóak ki, és recidíva esetén ezek részben el is tűnhetnek, illetve újak igazolódhatnak (81). Smith a RTK-Ras mutációkat illetően nagyfokú klonális és mikroklonális intratumoralis heterogenitást észlelt (82). A betegek egyharmadánál epigenetikai regulátor géneket érintő mutációk is igazolhatóak (*CPEBPP*, *DOT1L*) (82,84). A *CREBBP* koaktivátor

szerepű a DNS-kötő transzkripció faktor és az RNS polimerázok között, illetve hiszton acetiltransferázként is működik. Aberrációja a transzkripció kontrolljának zavarához vezethet. A CREB-kötő fehérje mutációk szerzett formája gyakoribb HeH leukémia esetén a többi akut limfoblasztos leukémiához képest és jóval gyakrabban mutatható ki relapszusakor, mint a betegség elsődleges diagnózisakor (30-60% vs. 18%) (81,84). Jelenléte fokozott glükokortikoid rezisztenciával hozható összefüggésbe.

Ugyanazon HeH ALL diagnosztikus és relapszus mintáit összehasonlítva Davidsson és mtsai azt tapasztalták, hogy döntően ugyanazon többlet kromoszómák voltak jelen a relapszuskor vizsgált csontvelőben, esetenként azonban 1-5 kromoszóma számában változás következett be (85). A mikrodeléciók száma egyértelműen növekedett, a mutációk nagy része is relapszuskor vált kimutathatóvá. Összességében a két időpontban vizsgált minták ~20%-ban identikusak voltak, ~20%-ban klonális evolúció igazolódott (a diagnózisakor észlelt eltérések relapszus esetén is mind kimutathatóak voltak, és további aberrációk is megjelentek), illetve ~65%-ban tumor-össejt jelenléte volt feltételezhető (ebből származhatott mind a diagnosztikus mind a relapszusért felelős klón). A strukturális kromoszóma-eltérések illetve a RTK-Ras mutációk mind másodlagos eseményeknek bizonyultak a kromoszóma-többletek kialakulásához képest (85). Kiss és mtsai diagnosztikus és relapszus csontvelőminták digitális MLPA (multiplex ligációs alapú próba amplifikáció) vizsgálataik során a magasan hiperdiploid betegeknél három esetben klonális evolúciót, két esetben tumor-össejt jelenlétét valószínűsítették a relapszus hátterében (86).

1.3.3. A HeH ALL epidemiológiai jellemzői

A gyermekkori akut limfoblasztos leukémia legnagyobb citogenetikai alcsoportja a magasan hiperdiploid: a betegek 25-30%-nál mutatható ki. Az incidencia csúcsa 2-4 éves korban van: csecsemőkorban és 7 éves kor felett ritkábban fordul elő (73). A 2-7 éves korosztályban - a másik leggyakoribb alcsoporttal, az *ETV6/RUNX1* pozitív leukémiával együtt - az összes ALL közel 80%-át adja (87). Serdülő és felnőtt akut limfoblasztos leukémia esetén mintegy 10%-ban igazolható. Chilton és mtsai serdülőkorú és felnőtt hiperdiploid ALL betegek citogenetikai és klinikai jellemzőit vizsgálva ugyanazon kromoszómák non-random nyerését tapasztalták, mint a gyermekeknél, és a kimenetel ebben a korosztályban is kedvezőbb volt a nem-hiperdiploid betegekhez képest (88). A HeH ALL prevalenciája nem mutat jelentős különbséget a földrajzi elosztás szempontjából (56), bár figyelembe kell vennünk, hogy a nagyobb tanulmányok elsősorban a fejlett országok betegeinek adatait dolgozták fel. A

betegség incidenciája alacsonyabb (11%) az afrikai-amerikai populációban (18,73). A két nem közel egyformán érintett, enyhe fiú predominancia mellett (72,73,89-91).

1.3.4. A HeH ALL klinikai jellemzői

Már 1981-ben Kaneko is megfigyelte, hogy a hiperdiploid leukémiás gyermekek fehérvérsejtszáma jellegzetesen alacsony a diagnózis idején (60). Azóta lényegében minden nagy tanulmány megerősíti ezt az összefüggést, 10 G/l alatti medián értéket adva meg (72,74,89,91-94). Az extramedulláris-, mediasztinális-, illetve központi idegrendszeri érintettség ritka, 0,5-4% között fordul elő (72,74,89,91-94). Diagnóziskor jellegzetes a magas csontvelői blasztarány (90-95%), a limfoblasztok legtöbbször kisméretűek, morfológiájuk FAB L1, ritkán L2. Az immunfenotípus nem jellegzetes: a prekursor-B sejtekre jellemző: CD10+, CD19+, CD22+, CD24+, CD34+, CD13-, CD33-, CD45-, CD65-, cIg-, sIg-, HLA-DR+, és TdT+. Nemrégiben HeH leukémiával asszociált, erős CD123 expresszióról számoltak be (95). A fiatal életkor, az alacsony kezdeti fehérvérsejtszám, a prekursor-B fenotípus egymástól független, kedvező prognosztikai marker ALL-ben és mindhárom jellemző a magasan hiperdiploid alcsoportra. A betegek nagyobb hányada ennek megfelelően standard intenzitású kemoterápiában részesül. A HeH ALL prognózisa igen kedvező. Az indukció végi remisszió 95% feletti, és a teljes túlélés (overall survival, OS) meghaladja a 90%-ot (57,74,92,96,97), az elmúlt években egyes munkacsoportok 95% feletti értékekről számoltak be (93,94). Mindezen kiváló eredmények ellenére nem ritka a relapszus, akár évekkel a terápia befejezését követően sem: így az eseménymentes túlélés (event free survival, EFS) ennél jóval alacsonyabb: korábban 70-75% közötti (57,92), az elmúlt évtizedben 80-89% közötti (74,94,96,97). Mivel ez a legnagyobb citogenetikai alcsoport gyermekkori leukémia esetén, így a relapszusok jelentős része is a HeH betegeket érinti. A relapszusok jellemzően későiek, a tervezett kemoterápia befejezését követően jelentkeznek és gyakran extramedulláris érintettségűek (92).

A HeH ALL tehát prognosztikai szempontból heterogén csoport: a betegek döntő többsége alacsony intenzitású, standard protokollal kezelve is gyorsan remisszióba kerül és meggyógyul, 20%-nál azonban később relapszus jelentkezik. A múltban és jelenleg is élénk kutatás tárgya azon klinikai és citogenetikai tényezők feltárása, amelyek segítségével már diagnóziskor kiszűrhetőek a fokozott relapszus-rizikót mutató gyermekek, akik esetében intenzívebb elsővonalbeli kezeléssel esetleg növelhető lenne a tartós remisszió esélye.

1.3.5. A HeH ALL klinikai prognosztikai tényezői

Egymástól független, nagy esetszámú, retrospektív tanulmányok bizonyították, hogy HeH ALL esetén az eseménymentes túlélés szignifikánsan alacsonyabb fiúk esetében, és a nemek közötti különbség - ha nem is minden tanulmány szerint szignifikáns mértékben - a teljes túlélésben is megmutatkozik (57,74,92). Egyes munkacsoportok a 10 évnél idősebb betegek esetén alacsonyabb eseménymentes- (57,92) és teljes túlélést (57,92,97), nagyobb relapszus-rátát (92) észleltek, bár a skandináv munkacsoport ezt nem erősítette meg (74). Magas kezdeti fehérvérsejtszám (>50G/l) esetén is kedvezőtlenebb a kimenetel (74). A különböző munkacsoportok eredményei közötti enyhe diszkrepanciát az alkalmazott protokollok, rizikócsoportha történő besorolási kritériumok közötti különbségek is magyarázhatják, melyek eltérő intenzitású kezelést eredményezhetnek.

Az elmúlt években fontos és sokat vizsgált kérdés a terápiára adott válasz, a minimális reziduális betegség prognosztikai jelentősége. A St. Jude Total Therapy Study XV protokollban a kezelés intenzitását az indukciós fázis során észlelt MRD értékhez igazították. A HeH betegek 16%-nál a kezelés 19. napján magas ($\geq 1\%$) MRD értéket mértek, ezen csoportban magasabb kumulatív relapszus-ráta (23,5%) és kedvezőtlenebb eseménymentes túlélés (76,5%) igazolódott. Kiváló korai terápiás válasz (MRD<0,01%) esetén különösen alacsony volt a recidíva esélye (3,8%), és magas az EFS (94,3%) (120). A szintén MRD alapú terápia-intenzifikációt alkalmazó AIEOP-BFM 2000 tanulmányban is prognosztikai jelentőséggel bírt az MRD-érték, melyet két időpontban (a kezelés 33. és 78. napján) is elemeztek. A HeH betegek 5 éves eseménymentes túlélése 93,7% volt, amennyiben mindkét időpontban MRD negativitást észleltek (MRD szenzitivitás 10^{-4}) és 79,8%, amennyiben valamelyik, vagy mindkét időpontban pozitív, de 10^{-3} alatti volt az MRD érték (51). A brit munkacsoport szintén megerősítette az MRD jelentőségét HeH ALL esetén. A hiperdiploid leukémiás gyermekek eseménymentes túlélése kiváló (96%) volt, kivéve azokat, akiknél az indukció végi MRD 0,01% feletti volt és ehhez nem társult kedvező kromoszóma-többlet mintázat (17-18-as kromoszómák többlete, de diploid 5-ös és 20-as kromoszómák) (96).

Norén-Nyström és mtsai felhívták a figyelmet a csontvelő-fibrózis, mint prognosztikai marker szerepére HeH ALL esetén. CML betegek blasztos kríziséhez hasonlóan magasan hiperdiploid ALL esetén is kedvező prognózissal asszociált a diagnóziskor észlelt alacsony mértékű retikulin-rost denzitás (98).

1.3.6. A HeH ALL genetikai prognosztikai tényezői

A magasan hiperdiploid ALL heterogén kimenetelének háttérében citogenetikai és molekuláris genetikai tényezők is állhatnak. A magasabb modális szám, illetve bizonyos tri-, tetraszómiák jelenléte kedvező prognózissal asszociált. A numerikus kromoszóma-aberrációkhoz társuló strukturális abnormalitások prognosztikai jelentősége nem egyértelmű.

Jackson és mtsai már a 90-es évek elején leírták, hogy a 6-os triszómia jelenléte kedvezőbb eseménymentes túléléssel jár (99).

Harris és mtsai a 4-es és 10-es kromoszóma szimultán triszómiája esetén észlelt kedvezőbb kimenetelt (100).

Raimondi munkacsoportja ezt nem erősítette meg, ugyanakkor a modális szám alapján két, biológiailag és klinikailag különböző alcsoportot különített el: az 51-55 és az 56-67 modális kromoszómaszámú betegeket. Az MN 51-55 csoportban magasabb kezdeti fehérvérsejtszámot, alacsonyabb +4, +10 triszómia prevalenciát, gyakoribb 17q izokromozómát és kedvezőtlenebb kimenetelt tapasztalt (72).

Heerema és mtsai +10, +17 és +18 kromozómák jelenlétekor szignifikánsan kedvezőbb kimenetelt észleltek, a +5 kromozóma pedig kedvezőtlenebb prognózissal volt összefüggésbe hozható. Az 54-58 modális kromoszómaszámú betegek kimenetele szintén kedvezőbb volt az ennél alacsonyabb (51-53) illetve magasabb (59-68) modális számhoz képest. Multivariancia analízisben az 5-ös, 10-es, 17-es többlet kromozómák, illetve a MN 54-58 jelentősége továbbra is szignifikáns tényezőnek bizonyult (90).

Moorman és mtsai az addigi legnagyobb betegszámú európai tanulmányban 700 magasan hiperdiploid leukémiás gyermeknél szignifikánsan kedvezőbb eseménymentes és teljes túlélést észlelt magas modális szám esetén (MN 54-65 vs. MN 51-53). Specifikus kromoszóma- többletek (+4, +10, és +18) jelenléte szintén kedvező kimenetellel járt, multivariancia analízis (életkor, nem, MN, specifikus kromoszóma-többletek, társuló strukturális abnormalitások) során azonban a modális szám nem, csak az életkor, a nem, a +4 és +18 kromozóma jelenléte tűnt független releváns prognosztikai tényezőnek. Klinikai és citogenetikai rizikófaktorok alapján két csoportot különítettek el: a 10 évesnél fiatalabb, 4-10 dupla triszómiával rendelkező gyermekek 5 éves teljes túlélése 96% volt, amely szignifikánsan ($p < 0,0001$) kedvezőbb a többi magasan hiperdiploid leukémiához (OS: 84%) képest (57).

Sutcliffe és mtsai több, mint 5000 prekursor-B-sejtes ALL gyermek bevonásával végzett retrospektív citogenetikai vizsgálata során azt tapasztalták, hogy az alacsony rizikócsoportba tartozó gyermekek eseménymentes túlélése egyértelműen korrelált a

triszómiák számával: kedvezőbb volt 4-10-17 tripla triszómia együttes jelenlétekor, mint dupla triszómia, vagy egy kromoszóma triszómia jelenlétekor (101). A modális szám prognosztikai jelentősége elmaradt a specifikus triszómiák szerepéhez képest. A 4-10-17 tripla triszómia kedvező hatása a különböző kezelési algoritmusok (CCG illetve POG protokollok) alkalmazásakor is érvényesült (101). Mindez alapján az Egyesült Államokban a Children's Oncology Group protokollok alkalmazása során az alacsony rizikójú betegek redukált dózisu kezelésben részesülnek a 4-10-17 tripla triszómia együttes jelenlétekor (17,47).

Sharathkumar és mtsai vizsgálata alapján POG protokollokkal kezelt HeH ALL gyermekek eseménymentes túlélése nem különbözött a nem magasan hiperdiploid ALL gyermekekétől, azonban a teljes túlélésük szignifikánsan kedvezőbb volt, mely felveti a recidív HeH ALL fokozott kemoszenzitivitásának lehetőségét. A 4-10-17 tripla triszómia jelenléte szignifikánsan csökkentette a recidíva rizikóját, ezen tripla triszómiával nem rendelkező HeH ALL betegek között pedig magasabb volt az extramedulláris recidíva aránya (92).

Kawamata munkacsoportjának BFM protokollal kezelt gyermekek mintáin elvégzett SNP vizsgálatai során azon HeH leukémiás gyermekek eseménymentes túlélése volt kedvezőtlenebb, akiknél sem 17-es, sem 18-as triszómia nem volt igazolható (70).

Paulsson és mtsai NOPHO protokollal kezelt skandináv gyermekek esetében úgy találták, hogy mind a 4-10-17 tripla triszómia, mind a magas modális szám ($MN > 53/55$) szignifikáns prognosztikai tényezőként szerepel magasan hiperdiploid ALL gyermekek eseménymentes túlélése estén. Paulsson hipotézise szerint ezen két citogenetikai csoport ugyanazon betegpopulációt reprezentálja, és nem önmagukban a specifikus triszómiáknak, hanem magának a magas modális kromoszómaszámnak tulajdonítja a prognosztikai jelentőséget (74).

Dastugue és mtsai 541 magasan hiperdiploid leukémiás gyermek retrospektív citogenetikai vizsgálata során a modális szám egyértelműen korrelált a kimenetellel: az MN 51-53, MN 54-57, illetve MN 58-66 csoportban az eseménymentes túlélés 80%, 89%, illetve 99%-nak adódott. Az MN 58-66 alcsoportba tartozó betegek gyógyulása kimagaslóan kedvező volt (EFS:99%, OS:100%), annak ellenére, hogy minden ötödik beteg kedvezőtlen klinikai rizikófaktorról is rendelkezett. Bár bizonyos triszómiák és kombinációik (18, 4-10, 4-10-17, 4-18, 4-10-18) jelenléte szignifikánsan kedvezőbb kimenetellel járt, többszemponos analízisben a modális szám maradt a legerősebb prognosztikai tényező (93).

Kato és mtsai két különböző protokollal kezelt (TCCSG L95-14 és JACLS ALL 97 protokoll) magasan hiperdiploid leukémiás gyermekcsoport esetében kedvezőtlenebb eseménymentes túlélést figyelt meg a 11-es és 17-es triszómiák hiányában. Mivel a tanulmány

döntően ázsiai gyermekekre vonatkozott, így az eredményeket etnikai különbségek is befolyásolhatták (94).

Enshaei és mtsai 1181 gyermek adatait feldolgozó analízisében (UK MRC Childhood Leukaemia Working Party) igazolták, hogy az MRD-n kívül a többlet kromoszómák összetétele a legfontosabb prognosztikai tényező HeH ALL esetén. Szignifikánsan kedvezőbb a kimenetel a 17-18 dupla triszómia jelenléte és az 5-ös, illetve 20-as triszómia egyidejű hiánya esetén (96).

Reismüller és mtsai a BFM protokollal Ausztiában kezelt magasan hiperdiploid leukémiás gyermekek klinikopatológiai adatait vizsgálták. Univariáns analízis során a 17-es kromoszóma triszómiája társult kedvezőbb eseménymentes és teljes túléléssel, míg a 10-es kromoszóma triszómia és a magas modális szám ($MN > 53$) kedvező prognosztikai szerepe csak a teljes túlélésben mutatkozott meg. A triszómiák prognosztikai jelentősége multivariáns analízis során is szignifikánsnak bizonyult (97).

A numerikus aberrációkhoz társuló strukturális aberrációk prognosztikai jelentősége nem egyértelmű. Pui és mtsai kedvezőtlenebb kimenetelről számoltak be társuló strukturális eltérések esetén (89), újabb, nagy esetszámú vizsgálatok eredménye szerint azonban nem befolyásolják a prognózist (57,72,74,93,102). Kivételt képeznek a ritkán, 5% alatt előforduló kiegyensúlyozott transzlokációk pl. $t(1;19)$, $t(9;22)$, $t(8;14)$, ahol a kimenetel közel áll a nem-hiperdiploid, transzlokáció-pozitív betegekéhez (57,74). Paulsson SNP vizsgálata során öt gyermeknél észlelt a 21-es kromoszóma tri/tetraszómiája mellett részleges többletet a 21q22 régióban, egy rövid, kb. 7 Mb szakaszon. Ezen régió intrakromoszómális amplifikációja (iAMP21) kedvezőtlen kimenetellel asszociált, Paulsson beteganyagában azonban a 21q részleges többlete nem járt kedvezőtlen prognózissal (103).

Molekuláris eltérések is befolyásolhatják a HeH leukémia kimenetelét, azonban ezzel kapcsolatban még nem áll rendelkezésre kellő számú vizsgálat. Inthal és mtsai SNP vizsgálatai során a *CREBBP* mutációk prognosztikai szempontból igen relevánsnak bizonyultak: a tartós remissziót elérő betegeknél nem igazolódott a mutáció, még a később recidívált betegek 19%-nál már a diagnóziskor is fennállt (84). Ugyanakkor Paulsson beteganyagában nem volt megfigyelhető relapszus azon hat HeH beteg esetében, akiknél *CREBBP* mutáció/ deléción volt kimutatható a betegség diagnóziskor (104). A Ras jelátviteli út génmutációi - melyek magas rizikójú gyermekkori ALL-ben gyakoriak - szintén nagy arányban mutathatóak ki HeH leukémia relapszusakor (105). A *KRAS* + *CREBBP* „dupla mutációt” hordozó HeH betegeknél korán jelentkezik a recidíva és a prognózis különösen kedvezőtlen. A jelenség hátterében a két mutáció szinerigista hatása állhat, mely következtében a klón kemorezisztenssé válik (81).

Gyermekkori ALL esetén kedvezőtlen kimenetellel, magas rizikójú betegséggel asszociált *IKZF1* deléció jelenléte egyes tanulmányok szerint nem befolyásolja a magasan hiperdiploid leukémia kimenetelét (85), Clappier és mtsai azonban szignifikánsan kedvezőtlenebb prognózist tapasztalt *IKZF1* deléció jelenlétekor (106). Hamadeh és mtsai retrospektív, nemzetközi vizsgálatában 3239, BFM protokollal kezelt prekursor-B-sejtes ALL beteg esetében vizsgálta a kópiaszám-eltérések prognosztikai jelentőségét. Azt tapasztalták, hogy a 745 beteget magába foglaló magasan hiperdiploid alcsoportban szignifikánsan kedvezőtlenebb volt a kimenetel *IKZF1*, *PAR1*, *RBI*, *PAX5*, *CDKN2A/B* deléció fennállta esetén (107).

1.3.7. A HeH ALL kialakulása, patomechanizmusa

Bár aneuploiditás igen gyakran figyelhető meg a különböző eredetű daganatos sejtekben, a tumorok kialakulásában betöltött szerepe még napjainkban sem egyértelmű. Magasan hiperdiploid leukémia esetén az is sokáig kérdéses volt, hogy maga a hiperdiploiditás-e a tumorigenezis fő oka („driver event”), vagy pedig csak egy járulékos esemény („passanger event”) a leukemogenezis során. Több vizsgálómódszerrel igazolták, hogy a HeH leukémiák döntő többségénél a kromoszóma-többleteken kívül egyéb, a leukemogenezisben fontos szerepet játszó primer abnormalitás (pl. fúziós génhez vezető transzlokáció) nem mutatható ki (56,103). Az a megfigyelés, hogy a kromoszóma-többletek korán, a manifeszt betegséget évekkel megelőzően alakulnak ki, illetve - számos másodlagos aberrációval ellentétben - egy esetleges relapszus esetén is megmaradnak, amellet szól, hogy HeH leukémia kialakulásának az oka a magas hiperdiploiditásban keresendő.

Újszülöttkori anyagcsere-szűrőkártyák (Guthrie-kártya), illetve leukémiára konkordáns ikrek citogenetikai vizsgálata arra utal, hogy HeH ALL esetén a leukemogenezis többlépcsős folyamat. Az iníciáló lépés, a magas hiperdiploiditás, in utero keletkezik, majd posztnatálisan további mutációk, genetikai "hit"-ek szükségesek a manifeszt betegség kialakulásához (104,108-110). Leukémiás gyermekek újszülöttkori szűrőkártyáit retrospektíven megvizsgálva a betegek egy részénél detektált preleukémiás sejtek ugyanazon specifikus klonális markereket hordozták, mint a csontvelői limfoblasztok a betegség diagnózisakor. Először a t(4;11) transzlokációt, majd a t(12;21) transzlokációt hordozó ALL esetén igazoltak klonotipikus elváltozásokat (111,112). Kromoszóma transzlokációt nem mutató betegségnél leukémia-specifikus fúziós gén szekvenciák analízise nem lehetséges. Ugyanakkor szinte minden prekursor-B-sejtes leukémia egyedi immunoglobulin nehéz-lánc génátrendeződés-mintázattal bír, mely a csontvelői limfoblasztokon beazonosítható a betegség diagnózisakor. Az

újszülöttkori szűrő-kártya DNS szekvenálását és beteg-specifikus primerekkel történő amplifikálását követően több kutatócsoportnak is sikerült a HeH leukémia prenatalis eredetét bizonyítani (113-116). Maia és mtsai pedig egy 15-17 triszómiát hordozó hiperdiploid leukémiás gyermek köldökzsinór-vérsejtjeinek retrospektív vizsgálatakor magukat a triszómiákat is azonosították, interfázis fluorescens in situ (iFISH) vizsgálataik során (113).

További bizonyítékot szolgáltatott 2015-ben Bateman és mtsainak hiperdiploid leukémiában szenvedő ikerpárok egy-nukleotid polimorfizmus vizsgálata (109). Monozigóta ikrek esetében ismert jelenség, hogy az egyik félben kialakuló premalignus /malignus klón - a közös transzplacentális keringés révén - átjuthat a másik fél szervezetébe. Ez a patomechanizmusa a monozigóta ikreknél szimultán jelentkező szolid tumorok (pl. csecsemőkori neuroblasztóma) szokatlan manifesztációjának: az egyik félnél a primer tumort, a másikonál az áttéket lehet kimutatni. Monozigóta ikerpár mindkét tagjánál kialakuló ALL viszonylag ritka jelenség, és lehetőséget ad a korai - mindkét félnél kimutatható - klonális aberrációk, és a másodlagos, posztnatális aberrációk vizsgálatára, azonosítására. Bateman munkacsoportja egy, magasan hiperdiploid ALL-re diszkordáns ikerpár egészséges tagjánál alacsony arányú, perzisztáló CD34+/CD19+ hiperdiploid sejtet igazolt, melyek nem hordozták azon kópiaszám változásokat, melyek a leukémiás félnél jelen voltak. Két másik, HeH ALL-re konkordáns ikerpárnál PCR vizsgálattal identikus IgH/L és TCR átrendeződést igazoltak, ugyanakkor a kópiaszám változások és a Ras jelpálya mutációi különböztek az ikerfelek között (109). Ezzel összhangban áll Wiemels és mtsai PCR vizsgálata, mely 14, magasan hiperdiploid, Ras mutációt hordozó leukémiás gyermek esetén igazolta, hogy a születéskor azonosítható preleukémiás klón még nem hordoz *KRAS* mutációt, így az valószínűsíthetően posztnatális eredetű, szekunder mutáció a leukemogenesis során (110). Mindez alátámasztja, hogy az iníciáló transzformáló lépés intrauterin keletkezik, majd további, másodlagos események triggerelik a klonális expansziót és a klinikailag manifeszt betegség kialakulását.

Mutáció-analízis és a kópiaszám-változás vizsgálatok során további megfigyelések is alátámasztották, hogy HeH ALL esetén maga az aneuploiditás a tumorgenezis vezető eseménye („driver event”). A kromoszóma-többletek mellett csupán a HeH ALL betegek egy részénél igazolhatóak addicionális mutációk, mikrodeléciók, és ezek gyakran szubklonálisak, illetve számuk relapszus esetén jelentősen változhat, akár el is tűnhetnek, míg maga az aneuploiditás stabilan perzisztál (82,104,117).

A kromoszóma-többletek kialakulásának patomechanizmusa kevésbé ismert, legalábbis az adatok ellentmondásosak. Négy potenciális, teoretikus patomechanizmus útvonalat említ a szakirodalom. Az első szerint a kezdeti közel-haploid genom állapot után kromoszóma

duplikáció következik be. A második alapján a kezdeti genom tetraploidizációt követően kromoszómákat veszít. A harmadik teoretikus útvonalon az egyes kromoszómák szekvenciálisan nyerődnek az egymást követő sejtoszlások során, végül egy további lehetséges patomechanizmus alapján a kromoszómák többlete egyidejűleg alakul ki, egyetlen kóros mitózis folyamán (56, 118).

Az sem egyértelmű, hogy a többlet kromoszómák pontosan milyen mechanizmussal járulnak hozzá a leukemogenezishez, ezért a kópiaszám-növekedést és a fehérjék szintjén érvényesülő következményeit Yang és mtsai proteogenom analízissel tanulmányozták (119). Ez volt az első ilyen tanulmány gyermekkori ALL esetén: több, mint 8000 gént és fehérjét vizsgáltak. A többlet kromoszómák nem pusztán fokozott gén-, de fokozott fehérje-expressziót is eredményeztek (gene dosage effect). Ugyanakkor a vizsgált gének 16%-ában, a fehérjék 25%-ában az expresszió negatívan korrelált a kromoszómák kópiaszámával: ennek háttérében az expressziót és a fehérje-katabolizmust szabályozó visszacsatolási mechanizmusok szerepét valószínűsítették. A HeH ALL leukemogenezisében feltételezhetően fontos szerepet játszó további mechanizmust is feltártak: aberráns kromatin-organizációt igazoltak. A kromatin-szerkezet két fő regulátorának, a kohezinnek és a CTCF transzkripciós faktornak az alacsony expresszióját tapasztalták HeH ALL esetén, ami genom-szintű transzkripciós regulációzavart eredményez. A CTCF transzkripciós faktor interfázisban kapcsolódik a kromatinhoz, és a kohezin komplex-el együtt részt vesz a topológiailag asszociált domének (TAD-ok) kialakításában. A TAD-ok a DNS sejtmagba történő becsomagolása során játszanak fontos szerepet. Különböző hosszúságú DNS szakaszokat foglalnak magukba, melyek a kromoszómákat funkcionális egységekre osztják. A TAD-ok további részekre tagolódnak, DNS hurkokat alkotnak, melyekben disztális DNS régiók kerülnek közel egymáshoz. Az interfázisban lévő sejtekben ezen hurkok horgony régióit a CTCF és kohezin gyűrű komplex tartja köti össze, így a genom térbeli organizációjában is fontos szerepet játszik (3D genom). A többlet kromoszómákkal rendelkező leukémiákban igazolódott alacsony CTCF és kohezin expresszió okozta aberráns DNS csomagolás meghatározza a gének regulációját (melyik aktív és melyik nem), a diszregulált gének pedig hozzájárulhatnak a leukemogenezishez.

Menendez és mtsai a hiperdiploid leukémia kialakulásában potenciálisan szerepet játszó kromoszóma-szegregációs defektusokat vizsgálták. A HeH blasztok szignifikánsan lassabban voltak tenyésztethetőek, mint a nem-HeH blasztok. A mitózis fázisainak vizsgálata során a HeH sejtek prometáfázis/metáfázisban akkumulálódtak és a metafázikus lemezen aberráns kromoszóma biorientációt mutattak. RNS szekvenálás során eltérő expressziós képet kaptak HeH sejtek esetében, mint a többi citogenetikai alcsoportnál, és ennek háttérében mitotikus

defektusokat észleltek (korai kromatid szeparáció a metafázis kromoszómákban, illetve a „kromoszóma passenger komplex” kóros lokalizációja a prometáfázisban) (121).

1.3.8. A HeH ALL kialakulására hajlamosító tényezők

Genetikai tényezők

Korábbi ismereteink szerint konstitucionális genetikai eltéréseknek nincs döntő szerepe sem általában a gyermekkori ALL, sem a HeH ALL kialakulásában (56). ALL-ben szenvedő gyermekek testvéreinél nem áll fenn jelentősen fokozott rizikó a betegség kialakulására az átlagpopulációhoz képest (122,123). Örökletes, akut limfoblasztos leukémiára hajlamosító betegségek (pl. Bloom szindróma, Down szindróma, Fanconi anémia, neurofibromatózis, ataxia telangiectázia, Li-Fraumeni szindróma) kevesebb, mint 5%-ban igazolhatóak. Down szindróma esetén mintegy húszszoros az ALL rizikója az átlagpopulációhoz képest, ugyanakkor a Down szindrómás, leukémiás gyermekeknél szignifikánsan ritkább a magasan hiperdiploid kariotípus (10%), mint a nem-Down szindrómásaknál (25%) (124).

Az elmúlt évek kutatásai azonban felvetették magasan hiperdiploid ALL kialakulására hajlamosító konstitucionális DNS eltérések lehetőségét. Teljes genom-asszociációs vizsgálatok az adott betegségben gyakori genetikai variánsok kimutatásával a betegségre való fokozott fogékonyságot, hajlamot igazolhatják. 2009-ben két független tanulmányban is azonosítottak HeH ALL-el erős asszociációt mutató *ARID5B* alléleket (AT-rich interactive domain 5B) a 10q21.2 régióban, melyek alapján a magasan hiperdiploid leukémia elkülöníthető a többi ALL alcsoporttól (125,126). Az ARID géncsalád a transzkripció regulációban és a B-sejt progenitor differenciációban játszik szerepet, a 10-es kromoszóma triszómia pedig a HeH ALL kb. 70%-ban van jelen. Trevino és munkacsoportja az *ARID5B* allélek (rs 10821936 és rs 10994982) jelenléte esetén magasabb intracelluláris metotrexát poliglutamát akkumulációt mért, mely összhangban van a magasan hiperdiploid blasztok ismert kimagasló metotrexát érzékenységgel. Mindez valószínűsíti, hogy egyazon genetikai eltérés áll a hiperdiploid leukémiára való fokozott genetikai hajlam, és a terápiára adott kiváló válasz mögött (126). 2017-ben Studd és munkacsoportja SNP vizsgálattal ugyanezen régió polimorfizmusait tanulmányozta (127). A 10q21.2 régióban azonosított rs7090445 polimorfizmus erős asszociációt mutatott ($p=1.54 \times 10^{-38}$) a HeH ALL kialakulásával. Igazolták, hogy az rs7090445-C allélt (=risk allél) hordozó egyéneknél az *ARID5B* expresszió csökkent. Feltételezik, hogy a 10-es kromoszóma többlete az *ARID5B* expresszió csökkenésével hozzájárul a normál limfocita differenciáció gátlásához és ez elősegíti a klonális expansziót (127). Walsh és mtsai teljes genom

asszociációs vizsgálattal szintén a 10-es kromoszómán (10p12.30-12.2) lokalizálódó, magasan hiperdiploid leukémia kialakulására hajlamosító variánst azonosított (*BMI1-PIP4K2A*) (128).

Hussin, majd Woodward felvetették a meiotikus rekombináció egyik regulátorának, a PRDM9 (PR domain containing 9) fehérjét kódoló gén ritka alléleinek a szerepét magasan hiperdiploid leukémia kialakulásában (129,130).

Csírsejtes *ETV6* mutáció jelenléte esetén kialakuló gyermekkori ALL esetén szignifikánsan gyakoribb a magasan hiperdiploid altípus (131,132). Predisponáló csírsejtes mutációk irányában 2019-ben Smith és mtsai 57 magasan hiperdiploid gyermeknél szekvenálás során a betegek 15%-nál azonosított ismert vagy valószínűsíthetően ALL predispozíciós gént érintő ritka és feltehetően funkcionális csíravonalbeli mutációt. Mindez alapján felvetik, hogy a gyermekkori leukémiákon belül a magasan hiperdiploid alcsoport kialakulásánál különösen jelentős szerepe van a genetikai predispozíciónak. Ennek egyik lehetséges magyarázata, hogy bizonyos csíravonalbeli mutációk jelenléte fokozza az aneuploid sejtvonal kialakulásának esélyét. Másik teoretikus lehetőségként felvetik, hogy csak bizonyos genetikai predispozíció esetén képes a sejt tolerálni az aneuploiditást okozta stresszt, illetve ilyen környezetben képes a preleukémiás klón fennmaradni addig, amíg további szekunder mutációk alakulnak ki, melyek végül a manifeszt betegséghez vezetnek (133).

Környezeti tényezők

A leukemogenezis irányába ható környezeti tényezők vizsgálatok leggyakrabban nem elemezték, hogy melyik specifikus citogenetikai alcsoport kialakulásában játszik szerepet. Nem specifikusan a HeH ALL, hanem a gyermekkori ALL kialakulásában lehet szerepe a pre- és posztnatális ionizáló sugárzásnak, a korábbi citosztatikus kezelésnek, az „immundiszregulációnak”, azaz a csecsemőkori túlzott higiénia, majd a kisdedkorban fellépő, banális infekcióra adott abnormális válasznak (134,135). Az influenza-vírus potenciális szerepét, az anyatejes táplálás védő hatását szintén nem specifikusan a HeH alcsoportra vonatkozóan írták le, bár tekintettel arra, hogy ez a legnagyobb citogenetikai alcsoport, az összefüggés a HeH ALL-re specifikusan is fennállhat (136,137).

Wiemels és mtsai (138) Ras génmutáció és gyermekkori leukémia epidemiológiai és citogenetikai vizsgálata során multivariancia analízisben is szignifikánsnak bizonyuló összefüggést írtak le a Ras génmutáció gyakorisága, a 30 évesnél fiatalabb anyai életkor és a magasan hiperdiploid kariotípus között. További érdekes összefüggést tártak fel az apai dohányzási szokások és a magasan hiperdiploid leukémia gyakorisága között: a HeH leukémiás gyermekek édesapái szignifikánsan alacsonyabb arányban dohányoztak, a nem-HeH leukémiás

gyermekekéhez képest, mely felveti a dohányzás toxikus hatásának lehetőségét a magasan hiperdiploid klónra.

Hjalgram és mtsai igazolták, hogy a 4 kg feletti születési súly fokozott rizikót jelent akut limfoblasztos leukémia, azon belül a magasan hiperdiploid és a t(12;21) pozitív leukémia kialakulására. Ennek pontos magyarázata nem ismert, a magasabb arányú inzulinszerű növekedési faktor (IGF-1) szerepe vetődik fel, mely hatására – a nagyobb számú sejtosztódás miatt – fokozott proliferatív stressz érné a progenitor/ preleukémiás sejteket (139).

1.3.9. A HeH ALL kedvező prognózisának lehetséges okai

A kemoterápiára adott kiváló válasz régóta ismert jellemzője a magasan hiperdiploid leukémiának. Kaneko már 1981-ben beszámolt hat HeH ALL-ben szenvedő gyermekről, akik vinkrisztin és prednizolon tartalmú indukciós kezelés hatására tartós remissziót értek el (60). A magasan hiperdiploid blasztok négy citosztatikum esetében bizonyultak szignifikánsan érzékenyebbnek a többi citogenetikai alcsoporthoz képest: a 6-merkaptopurin ($p=0,00003$), 6-tioguanidin ($p=0,023$), a citarabin ($p=0,016$), illetve aszparagináz ($p=0,022$) esetében (140). A különböző citogenetikai alcsoportok közötti eltérő mértékű gyógyszer-rezisztenciát Steeghs és mtsai is megerősítették: a magasan hiperdiploid sejtek - különösen társuló *IKZF1* deléció esetén - a többi alcsoporthoz képest kifejezett prednizolon- és aszparagináz-rezisztenciát mutattak (141). Az aszparaginázt már a 60-as évek óta alkalmazzák ALL kezelése során. Nem a klasszikus értelemben vett citosztatikumról van szó: az aszparagináz az aszparagint ammóniára és aszpartámsavvá hidrolizáló enzim. Az aszparagin nem-esszenciális aminosav: glutaminból szintetizálódik aszparagin szintetáz (AS) által. A limfoblasztok specifikus aszparagináz-érzékenységét az alacsony aszparagin-szintetáz génexpressziójuk magyarázhatja. Intracelluláris aszparagin-szintézisre kevésbé képesek, exogén aszparagin-depléció esetén is csökkent az AS gének fokozott átírása (up-reguláció), így az aszparagináz terápia apoptózishoz vezet. Génexpressziós profil vizsgálat során a B-limfoblasztok AS aktivitása alacsonyabbnak bizonyult a T-limfoblasztokénál, a magasan hiperdiploid blasztok aktivitása pedig különösen alacsony volt ($p<0,0001$), mely fokozott aszparagináz-érzékenységüket támasztja alá (142).

Bár a többlet kromoszómáknak fontos szerepe van a tumorigenezisben, a kemoterápia megkezdése után egyértelműen hátrányt jelentenek a tumorsejtek számára. Az aneuszómia az érintett kromoszómák génjeinek megváltozott expresszóját eredményezheti (gene dosage effect). Andersson, majd Paulsson és mtsai vizsgálatai alapján valóban eltérő génexpressziós

mintázat figyelhető meg HeH leukémiában a többi citogenetikai alcsoporthoz képest, melyet a többlet kromoszómák génjeinek megváltozott, többnyire fokozott expressziója magyaráz (104,143). Lajoie és mtsai a hosszú, nem-kódoló RNS-ek transzkriptom analízise során érdekes eredményre világított rá. Gyermekkori ALL betegek diagnosztikus csontvelőmintáin a hosszú nem-kódoló RNS-expressziót vizsgálva, a HeH alcsoport egyértelműen elkülöníthető volt a többi ALL alcsoporttól. Erős korrelációt találtak a többlet kromoszómák száma és az expressziós mintázat között, mely szintén alátámasztja, hogy a géntömeg mennyisége valóban hozzájárul a HeH specifikus transzkripciós mintázat kialakításához. Ugyanakkor, a többlet kromoszómákból eredő transzkriptumoktól függetlenül is elkülöníthető volt a HeH alcsoport transzkripciós mintázata a többi alcsoporttól, tehát valószínűleg más regulációs mechanizmusok is hozzájárulnak a jellegzetes RNS-expressziós képéhez (144). A „gene dosage effect” magyarázatul szolgálhat a HeH ALL fokozott metotrexát-érzékenységének. A reduced folate carrier (*RFC* vagy *SLC19A1*) gén a sejtek metotrexát felvételét szabályozza. A *RFC* gén a 21-es kromoszómán helyezkedik el, mely szinte mindig tri/tetra/pentaszómiás HeH ALL-ben. Már a 90-es években igazolták, hogy a 21-es kromoszóma többlete fokozott *RFC* génexpressziót és így fokozott intracelluláris metotrexát akkumulációt jelent, mely a HeH leukémia kedvező kimenetelét magyarázhatja (145,146).

Napjainkban az is élénk kutatás tárgya, hogy a többlet kromoszómák mindegyike szerepet játszik-e a kedvező kimenetel alakításában, vagy - figyelembe véve, hogy nem teljesen ugyanazon extra kromoszómák alkotják az aneuploid sejteket minden HeH betegnél - bizonyos kromoszómák kulcsfontosságúak (pl. 21-es kromoszóma), mások pedig járulékos szerepűek („innocent bystandars”) (103).

A hiperdiploid ALL kiváló prognózisának hátterében egyéb tényezők is állhatnak. Ito és mtsai *in vitro* nagyobb mértékű apoptózist észleltek allogen csontvelői stroma-rétegen tenyésztett hiperdiploid limfoblasztokon, mint bármilyen más citogenetikai alcsoport esetén, beleértve a szintén kedvező prognózisú *ETV6-RUNX1+* blasztokat is (147). Az apoptózis mértékét nem befolyásolták addicionális, a hemopoetikus sejteket bizonyítottan stimuláló exogén cytokinek, interleukinok, növekedési faktorok. Mindez a specifikus, komplex csontvelői stroma különös jelentőségét támasztja alá HeH blasztok esetén, illetve magyarázatul szolgál annak a klinikai megfigyelésnek, hogy HeH ALL diagnózisakor ritkán igazolható extramedulláris érintettség. Zhang és mtsai is igazolták, hogy magasan hiperdiploid limfoblasztoknál fokozott a csontvelői spontán apoptózis incidenciája (148). Holleman és mtsai az apoptózis folyamatában kulcsfontosságú 70 gén expresszióját vizsgálta a különböző citogenetikai alcsoportokban. 22 gén expressziója szignifikánsan különbözött a HeH

leukémiákban a nem-HeH leukémiákhoz képest. Három, citokin-receptort kódoló gén (*TNFR1*, *TRAILR2*, *TRAILR4*) szimultán jelentkező, fokozott expresszióját tapasztalták a HeH alcsoportban. Felvetették annak lehetőségét, hogy citokin receptorok megváltozott expressziója hozzájárulhat az allogén csontvelői stroma-rétegen tenyésztett HeH blasztok fokozott apoptózisához, amennyiben a csontvelői stroma egy speciális mikrokörnyezetet képez, mely triggereli ezen a receptorokat (149).

2. Célkitűzések

A gyermekkori ALL egyik legnagyobb alcsoportja a magasan hiperdiploid leukémia, melyet igen kedvező kimenetel jellemez. Ennek ellenére a betegek 20%-ánál később relapszus alakul ki. Fő célkitűzésünk a HeH ALL betegek azon klinikai és citogenetikai prognosztikai jellemzőinek vizsgálata, statisztikai elemzése volt, amelyek meghatározóak a betegség lefolyásában, kimenetelében. A hagyományos vizsgálómódszerekkel ellentétben interfázis fluorescens in situ hibridizációt alkalmaztunk, mellyel egy nagyságrenddel több sejt vizsgálható, mint a konvencionális kariotípus analízissel, így mélyebb betekintést nyerhetünk a HeH ALL citogenetikai struktúrájába. Az iFISH vizsgálat további előnye, hogy a sejtenyésztés nélküli analízis lehetővé teszi, hogy kiküszöböljük a tenyésztés következtében esetlegesen fellépő klonális szelekcióból adódó információvesztést. A flow citometriával történő DNS index meghatározáshoz képest előnye, hogy információt kapunk arról, hogy a többletek mely kromoszómákat érintik.

1. Célként tűztük ki a Pécsi Tudományegyetem Pathológiai Intézetében 1996-2009 között diagnosztizált és archivált prekurzor-B-sejtes ALL betegek diagnosztikus csontvelőjének interfázis FISH vizsgálatát. Betegmintánként 2x4 fluorescens próbát alkalmazva, két hibridizációs körben detektáltuk a magasan hiperdiploid ALL-re leginkább jellemző nyolc kromoszóma (4, 6, 10, 14, 17, 18, 21 és X) kópiaszám változását. Tudomásunk szerint korábban ilyen multiplex, egysejtszintű, korrelált iFISH vizsgálatot gyermekkori ALL mintákon nem végeztek.
2. Munkánk második fázisában összegyűjtöttük és rendszereztük az iFISH vizsgálattal azonosított magasan hiperdiploid betegek releváns klinikai, prognosztikai adatait a PTE Gyermekklinika Onkohematológiai Osztályának betegdokumentumaiból, illetve az Országos Gyermektumor Regiszterből.
3. A jól ismert klinikai prognosztikai tényezők analíziséen túl vizsgáltuk a kromoszóma-többletek számának jelentőségét, az egyes kromoszóma-többség mintázatok prognosztikai szerepét, megkíséreltük a HeH ALL heterogén kimenetelének háttérében lévő lehetséges okok feltárását.

4. Multiplex iFISH vizsgálatunk során az egyes HeH ALL mintákon belül jelentős klonális heterogenitást tapasztaltunk, mely konvencionális citogenetikai vizsgálatokkal eddig nem került felismerésre. Célul tűztük ki, hogy feltárjuk a klonális heterogenitás jellegzetességeit, vizsgáljuk az esetleges prognosztikai szerepét és elemezzük a kromoszóma-többletek kialakulásának hierarchiáját.

3. Betegek és módszerek

3.1. Betegek

A Pécsi Tudományegyetem Klinikai Központ (PTE-KK) Pathológiai Intézetében 1996-2009 között diagnosztizált, 214 prekursor-B-sejtes ALL gyermek (1-18 év) kezelés előtti, 70 %-os etanolban, -20 °C-on archivált csontvelőmintáit vizsgáltuk. A vizsgált kohorsz tagjai negatívak voltak a következő, önálló prognosztikai kategóriát képviselő mutációkra: t(9;22)(q34;q11.2) (*BCR-ABL1* fúzió), t(v;11q23) (*KMT2A* génátrendeződés), t(12;21)(p13;q22) (*ETV6-RUNX1* fúzió), t(1;19)(q23;p13.3) (*TCF3-PBX1* fúzió). Minden gyermek magyarországi centrumban részesült kezelésben, ALL BFM 1995 vagy ALL IC BFM 2002 protokoll alapján (150,151). A két éven át történő kezelés részfolyamatai az indukció, az intenzifikáció, a konszolidáció, a késői intenzifikáció és a fenntartó fázis. A protokollok szerint a betegek három kockázati csoportba (standard, közepes és magas) kerültek besorolásra a relapszus esélyétől függően. A diagnózis minden esetben a PTE-KK Pathológiai Intézetében került felállításra a WHO aktuálisan érvényes morfológiai, fenotípus és genotípus kritériumai alapján. Klinikai követési, prognosztikai vizsgálat csak azon betegeknél történt meg, akiknél az alábbi 8-paraméteres iFISH analízis során magasan hiperdiploid státusz került megállapításra. Down szindrómás beteg ilyen konstellációt nem mutatott. A csoportból kizártuk azon betegeket, akiktől csak a relapszus diagnoszisaikor állt rendelkezésünkre csontvelői minta. A létrehozott adatbázisunk az alábbi klinikai paramétereket foglalta magába: a beteget diagnosztizáló központ azonosítója, nem, születési dátum, a diagnózis időpontja, meningeális érintettség jelenléte, immunfenotípus, kezdeti fehérvérsejtszám, blaszt arány a periférián, kezelési protokoll, prednizolon kezelésre adott válasz, remisszió bekövetkezte (33. napi blasztarány a csontvelőben), rizikócsoport, a betegség kimenetele, relapszus esetén annak dátuma és lokalizációja, a relapszust követő terápia beavatkozások, az utolsó kontroll vizsgálat dátuma, halál esetén annak dátuma és oka. A vizsgálat szakmai-etikai engedéllyel zajlott (PTE KK RIKEB 2010.01.29. ügyiratszám: 3670.316-26235/KK41/2009), Baross Gábor K+F (2009.reg_dd_kfi_09-2-2009-0100) projekt támogatással készült.

ALL BFM 95 protokoll		ALL IC BFM 2002 protokoll	
HR	<u>legalább egy kritérium az alábbiak közül:</u> rossz prednisolon válasz M2/M3 csontvelői blasztarány a 33. napon t(9;22) (<i>BCR-ABL1</i>) mutatható ki t(4;11) (<i>MLL-AF4</i>) mutatható ki	HR	<u>legalább egy kritérium az alábbiak közül:</u> rossz prednisolon válasz M3 csontvelői blasztarány a 15. napon M2/ M3 csontvelői blasztarány a 33. napon t(9;22) (<i>BCR-ABL1</i>) mutatható ki t(4;11) (<i>MLL-AF4</i>) mutatható ki
IR	nem HR és nem SR	IR	nem HR és nem SR
SR	a HR kritériumok nem állnak fenn és kezdeti fehérvérsejtszám <20 G/l és életkor 1-6 év közötti és nem T-ALL	SR	a HR kritériumok nem állnak fenn és kezdeti FVS szám <20 G/L és életkor 1-6 év közötti

2. táblázat. Az ALL BFM 95 protokoll és ALL IC BFM 2002 protokoll rizikócsoport-beosztása (150,151). HR: magas rizikójú betegség, IR: közepes rizikójú betegség, SR: alacsony rizikójú betegség. Rossz prednisolon válasz definíciója: >1 G/L limfoblaszt jelenléte a perifériás vérben a kezelés 8. napján. M1: 5% alatti limfoblaszt, M2: 5-25% közötti limfoblaszt, M3: 25% feletti limfoblaszt a csontvelőben.

3.2. Módszerek

Az iFISH vizsgálatokat a PTE-KK Pathológiai Intézet munkacsoportjának orvosai, biológusai és szakasszisztensei segítségével végeztük. A magasan hiperdiploid ALL-re leginkább jellemző nyolc többlet kromoszómát vizsgáltuk, betegmintánként 4-4 fluorescens festéket használva, két hibridizációs körben (152,153).

3.2.1 iFISH technológia rövid ismertetése

Az interfázis fluorescens in situ hibridizáció egy olyan molekuláris citogenetikai eljárás, mely során a sejtek numerikus és strukturális kromoszóma-eltérései elemezhetőek. Nincs szükség sejtenyészítésre, így bármely citológiai és hisztológiai preparátum analizésére alkalmas, akár archivált anyagokon is, retrospektív módon. Az eljárás lényege, hogy a minta meghatározott nukleinsav szakaszához azzal komplementer szekvenciát, próbát kapcsolunk, mely jelölt és így láthatóvá tehető. Az eljárás során a mintát és a próbát egyszálúvá alakítjuk, ez a folyamat a denaturáció, melyhez általában hőkezelést (ritkábban valamilyen kémiai ágenst, pl. formamid) alkalmazunk. Ezt követően a hőmérséklet csökkentésével megindítjuk a nukleinsav molekulák reasszociációját (renaturáció). A renaturáció során bekötődött jelölt próbák in situ hibridizációs szignálként azonosíthatók. A detektáló műszer típusát a jelölés

módja határozza meg. Fluoreszcencia in situ hibridizáció során az értékeléshez fluoreszcencia mikroszkópia, vagy áramlási citometria használatos.

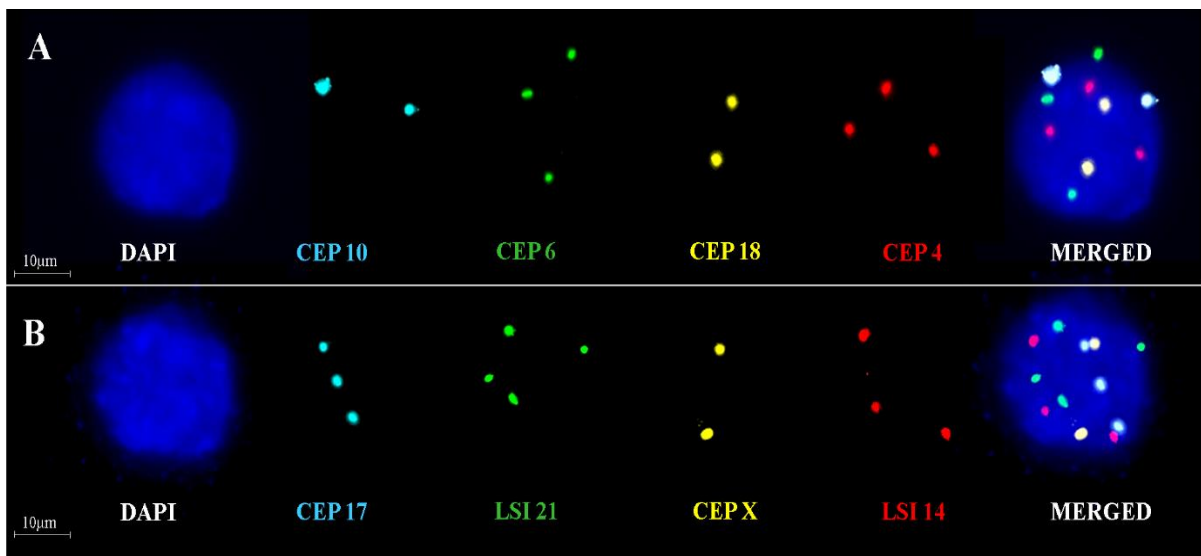
A FISH próbák a mintához hasonlóan egyaránt lehetnek DNS vagy RNS molekulák. A próbákat lehet direkt, vagy indirekt módon jelölni. Direkt eljárás esetén a próbához közvetlenül kapcsolódik a fluorokróm, indirekt módszer során a próba közvetlenül egy haptén molekulával jelölt, melyhez különböző fluorokrómok kapcsolhatók. A DNS próbák klónozását rekombinációs technológiával végzik. A fragmentumokat valamilyen gazdasejtben (leggyakrabban *Escherichia coli*) sokszorosítják: a próba kapcsolódik egy, a gazdasejtben autonóm replikációra képes vektorhoz. A vektor gazdasejtbe történő transzformálását a gazdasejt felszaporítása és az inszertet tartalmazó vektorok izolálása követi. A próbák fluorokrómokkal való jelölése leggyakrabban nick-transzlációval, illetve random priming eljárással történik. Az 1980-as évek elején a FISH vizsgálatokat egyetlen színnel végezték, később bevezették a multicolour, „többszínű” in situ hibridizációt, melynek során több próbát különböző színű fluoreszcens festékkel megjelölve egyidejűleg lehetett hibridizálni és detektálni a preparátumon.

3.2.2. iFISH próbák

A FISH próbák a minta más-más részéhez kapcsolódhatnak, ez alapján ismereteseek ismétlődő szekvenciákhoz kapcsolódó próbák, lókuszciszefikus próbák és a teljes kromoszómát festő próbák. Az ismétlődő szekvenciákhoz kapcsolódó próbák a genomban sok ezerszer ismétlődő, rövid szekvenciákhoz kapcsolódnak. Ide tartoznak a kromoszómaszefikus centromer próbák (CEP – centromer enumeration probe). A kromoszómák centromer régióit egy, vagy több szatellita DNS család építi fel, leggyakrabban alfa-szatellita DNS. Az alfa-szatellita DNS alegységek restrikciós enzimek által hasított pontjai eltérnek a különböző kromoszómák esetében, így megfelelő próba alkalmazásakor egy adott kromoszóma azonosítható. A szatellita és kromoszóma szefikus DNS próbákkal fény vagy fluoreszcens mikroszkóposan azonosítható szignál képződik, mely normál kromoszómakészlet esetén autoszómális kromoszómánként két hibridizációs jelet jelent. A 4, 6, 10, 17, 18 és az X kromoszómák numerikus abberációit kimutató centromer próbák a PTE-KK Pathológiai Intézetben rendelkezésre álltak a korábbi publikációknak megfelelően (154-160).

Tekintettel arra, hogy a 14-es és a 21-es kromoszómák esetében a centromer szefikus próbák két másik kromoszómával is átfedést mutatnak (14/22, illetve 13/21), ezen két

kromoszómára lókuszt specifikus próbát (LSI - locus specific identifier) terveztünk (152). A lókuszt-specifikus próbák a haploid kromoszómakészlet egyetlen kópiában jelenlévő nukleinsav szakaszaihoz kapcsolódnak, elsősorban szerkezeti átrendeződések (transzlokációk, deléciók, amplifikációk) kimutatását szolgálják. A CEP és az LSI próbák szenzitivitását, specificitását és a szignálok minőségét nemzetközileg elfogadott előírások szerint határoztuk meg (161). Az iFISH jelek intenzitását, a fluoreszcencia erősségét, a próbák hibridizációjának sorrendjét valamint a próbák mennyiségét a próbák valamint az egyes fluorokrómok számos kombinációjában teszteltük annak érdekében, hogy az iFISH reakciókat optimalizáljuk. Ennek eredményeként két próbasetet alkalmaztunk, 4 - 4 kromoszóma numerikus aberrációinak azonosítására. Az első kör próbaset (CEP szet) a 4-es, 6-os, 10-es és 18-as kromoszómák vizsgálatát célozta (CEP 4-vörös, CEP 6-zöld, CEP 10-aqua és CEP 18-gold), a 2. próbaset (LSI+CEP szet) a 14-es, 21-es, 17-es és X kromoszómákét (LSI 14-vörös, LSI 21-zöld, CEP 17-aqua és CEP X-gold) (2. ábra).



2. ábra. Ugyanazon target sejt egymást követő, 2 x 4 próbás iFISH jelölése (152,153). Hat kromoszóma többlete látható (4 triszómia, egy tetraszómia). A: az első próbaset: CEP 4 (vörös), CEP 6 (zöld), CEP 10 (aqua), CEP 18 (arany); B: ugyanazon target rehibridizációja a 2. Próbasettel: LSI 14 (vörös), LSI 21 (zöld), CEP 17 (aqua), CEP X (arany). Negatív kontroll mag, DAPI háttér magfestés, 63x.

3.2.3. Hibridizációs eljárás

A minta előkészítése

A 70%-os etanolban fixált leukémia sejtmintákat valamint a kontroll perifériás sejteket Carnoy oldatban átfixáltuk (24h, - 2°C) a citoplazma eltávolítása, illetve a kromatin lazítása végett, majd kis alikvótokat tárgyelemzre cseppentettünk és levegőn hagytuk száradni. Ezután a mintákat RNázal kezeljük, 37 °C-on, pára kamrában, 10 µg/ml koncentráció mellett, 2xSSC oldatban (2xSSC: 0,3 M NaCl, 0,03 M nátrium-citrát, pH=7). Ezt követően 3x5 percig váltott mosás történt 2xSSC oldatban. Refixálás 1% paraformaldehid-PBS-ben (10 perc, 4 °C), majd 2x5 perc mosás következett PBS-ben (PBS: 0,13M NaCl, 0,007M Na₂HPO₄, 0,003M NaH₂PO₄). A fehérjementesítés érdekében emésztés következett 0,01% pepszin-10 mM HCl-ban, majd újabb mosás 2x5 perc PBS-ben. Végül posztfixálás 1% paraformaldehid-PBS-ben (10 perc, 4 °C), és 2x5 perc mosás PBS-ben. A minta dehidrációját felszálló alkohol sorban (70 -90- 100% etanol) 5-5 percig végeztük, majd légszárítás következett.

Denaturálás, hibridizáció

A jelöléshez az első körben 3 µl CEP próba-elegyet (4, 6, 10, 18-as kromoszómák próbái) tettünk minden mintára, melyeket 12 mm-es kerek fedőlemezzel fedtünk. A minta és próba DNS-t együtt denaturáltuk 80 °C-on, 3 percig, majd a hibridizációt egy éjszakán keresztül Abbott ThermoBrite kamrában, 37 °C-on hajtottuk végre. Poszthibridizációs mosásokat végeztünk a nem kötődött próbák eltávolítása céljából: 2x5 perc 2xSSC/ 0,1% Tween 20, 37 °C; 2x5 perc 50% formamid / 2xSSC, pH=7,00, 44 °C; 1x5 perc 2xSSC/ 0,1% Tween 20, 44 °C; 2x5 perc 0,1xSSC, 60 °C végül desztillált vizes mosás. A sejtmagok jelzésére DAPI oldatot (4',6-diamidino-2-fenilindol) használtunk, amelyet a fluorescens szignál kioltódásának lassítására Vectashield (Vysis, Downers Grove, IL, USA) lefedő oldatban oldottunk. A mintát végül fedőlemezzel fedtük és sötétben tartottuk az analízisig.

A kiértékelést követően, a második hibridizációs kör előtt a fedőlemezeket 0,1% Tween 20 / 1xPBS oldatban leáztattuk. A preparátumokat refixáltuk, dehidrációját felszálló alkoholban a fentiek szerint és levegőn megszárazítottuk. Ezután 3 µl LSI+CEP elegyet (a 14, 17, 21, X kromoszómák próbái) adagoltunk mintánként. A denaturációs és hibridizációs lépések megegyeztek az első körben alkalmazottakkal. Poszthibridizáció: 2xSSC/ 0,1% Tween 20, 2x5 perc, 37 °C; 50% formamid / 2xSSC, pH= 7,00, 2x5 perc, 37 °C; 2xSSC / 0,1% Tween 20, 1x5

perc, 37 °C. A preparátumokat végül desztillált vízben öblítettük és DAPI / Vectashield (0,005 µl/ml) oldattal, fedőlemezzel fedtük, sötétben tároltuk. A rehibridizációs eljárást úgy is ellenőriztük, hogy a második körben próbákat nem alkalmaztunk. Sem a kontroll, sem a leukémiás sejteken nem észleltünk az első körből származó négyszínű fluorokrómnak megfelelően reziduális jelet (152).

3.2.4. A multiplex iFISH jelek kiértékelése

Mindegyik próbaszettel történő jelölés után a lemezeket motorizált multifunkciós mikroszkóp rendszerrel (Zeiss Axioplan-MOT II., Feldbach, Németország) analizáltuk (152). A mikroszkóp komputer kontrollált, motorizált, pásztázó tárgyasztallal, X-Cyte lámpával, kvarc optikai szálal megvilágítással, motorizált fluoreszcens szűrőtartóval és hűtött CCD kamerával volt felszerelve. Az első próbaszettel történő hibridizációt követően lemezenként 1000 sejtet beszkeneltünk a korábban meghatározott alapvető sejtmag felismerési morfológiai paraméterek alapján és a sejtmagok képét a DAPI csatornában, a 3D koordinátákkal együtt tároltuk. Csak az összetapadás nélküli, sejtörmelék nem tartalmazó, mononukleáris, nem-mieloid, interfázisú magok kerültek analízisre, melyek egyenként, a monitoron látható galériában voltak megjeleníthetőek. Az értékelés során az alkalmazott fluoreszcens festékeknek megfelelő filtereket használtuk. A hibridizáció eredményeként a kromoszómák centromer régiójának megfelelő számú kerek, pontszerű jelet kaptunk (2. ábra). A szignál mintázatot manuálisan értékeltük ki. A leolvasás során a mikrométer állítása segítette a jelek számának megállapításában (három szignál: triszómia, négy szignál: tetraszómiai stb), melyet minden egyes sejtmag esetén táblázatban rögzítettünk. A kiértékelést addig folytattuk, amíg egyértelmű, mind a négy színcsatornában azonosítható jeleket tartalmazó, legalább 300 sejtmagot regisztráltunk. Az egy vagy több csatornában nem egyértelműen azonosítható jeleket tartalmazó sejtmagokat kizártuk. A multifunkciós, motorizált mikroszkóp rendszer az analizált sejtmagok X/Y/Z koordinátáit rögzítette, így a második próbaszettel történő hibridizációt követően a korábban azonosított és regisztrált sejtmagokat relokalizáltuk. A szignál mintázat kiértékelését a második próbaszettel történő jelölés után is ugyanúgy végeztük el. Végül minden beteg minden egyes vizsgált sejtjében a nyolc kromoszóma kópiaszámát rögzítve, sejtenként egy nyolc karakterből álló számsort, *egyedi kariotípust* kaptunk. Ily módon 8-próbás, korrelált iFISH analízisre volt lehetőségünk, melyben egysejt szinten vizsgálhattuk a kromoszóma-többletek mintázatát és a szubklonális heterogenitást. Az adatfeldolgozás során csak azon sejtmagokat vettük figyelembe, melyekben mind a nyolc FISH próba adott legalább egy

értékelhető jelet. A hibridizáció megbízhatóságának ellenőrzésére kontrollként 19 egészséges felnőtt perifériás vérsejtjeit vizsgáltuk a 2x4 DNS markerrel, a kromoszóma iFISH jeleket 600 - 600 sejtben három vizsgáló értékelt ki.

3.2.5. Statisztikai feldolgozás

A szignál álpozitivitás határát Poisson eloszlás (SPSS 15.0, SPSS Inc., Chicago, IL) alapján, normál diploid kontroll sejteken határoztuk meg. A betegminták esetében az aneuploidia kombinációkat csak akkor tartottuk valódinak, ha mindegyik kromoszóma aneuszómia szintje az álpozitivitás felett volt. Fals monoszómia a nyolc kromoszóma vonatkozásában 0,8% és 4,4% között mozgott, a legalacsonyabb férfiakban az X kromoszóma esetében volt (0,05%). Fals triszómia 0,1% - 1,0% között fordult elő. Két szignál vesztesét vagy nyeresét olyan alacsony arányban találtunk, hogy emiatt sejtet kizárni nem kellett a betegmintákban. Miután 2x4 próbás iFISH tesztünkhöz 100%-os triszómiás kontroll nem állt rendelkezésre, különböző addicionális kísérleteket végeztünk az aneuszómia meghatározásunk pontosságának jobb megítélésére. Arteficiális triszómia (egy szomatikus és az X kromoszóma egyforma színben történő jelölése) három férfi kontroll sejtjein 5,3% fals diszómiát és 0,6% fals tetraszómiát adott. Betegmintákban 5x ismételt iFISH reakció, egyenként 3 vizsgáló által kiértékelve, mind a CEP illetve az LSI próbákra 4,7% (2,6 – 6,0%) és 4,0% (2,3 – 6,5%) átlagos standard deviációt mutatott. Sejtvonalon (69, XXY triploid sejtvonal /30-805717; Vysis ProbeCheck Prenatal Control Slides for FISH; Abbott Molecular Inc., IL, USA/) 18-as és 21-es triszómiát valamint X diszómiát két komplett iFISH teszt során, két vizsgáló által kiértékelve 95,5% +/- 2,2%, 95,7% +/- 1,3% és 97,2% +/- 1,0% pontossággal tudtunk azonosítani.

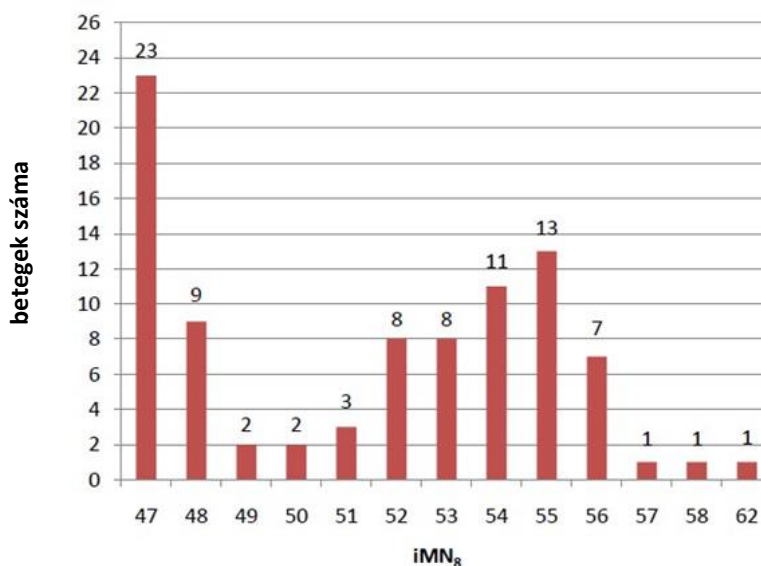
Univariáns (egyszempontos) analízist alkalmaztunk az egyes klinikai (pl. életkor, kezdeti fehérvérsejtszám, nem) és citogenetikai (pl. modális kromoszómaszám, kromoszóma-többlet kombinációk) paraméterek közötti összefüggések vizsgálata során. Az eseménymentes és teljes túlélés valószínűségét (pEFS és pOS) Kaplan-Meier módszerrel számítottuk ki és az alcsoportok összehasonlító analízisét log rank teszttel végeztük el. Az eseménymentes túlélés időtartama a diagnózistól az első kedvezőtlen „eseményig” (progresszív betegség, relapszus, második malignitás kialakulása, halál) eltelt időszaknak felelt meg. A teljes túlélés időtartamának meghatározásakor a diagnózis és az utolsó kontroll vizsgálat, illetve a diagnózis és a halál bekövetkezte közötti időtartamot vettük alapul. Cox regressziós modell szerinti multivariancia (többszempontos) analízist alkalmaztunk a túlélést egyéb tényezőktől független

módon befolyásoló faktorok azonosítása során. A p értékeket <0.05 esetén tekintettük statisztikailag szignifikánsnak. Az adatok elemzésére az IBM SPSS programot használtuk (Statistics Version 20.0, IBM Corp., Armonk, NY, USA). A klonális evolúció matematikai modellezésére csoport (cluster) és hálózat (network) analízist végeztek a munkacsoport biostatistikus munkatársai MEGA 5 és NETWORK 4.6.1. szoftverek (FluxusTechnology Ltd., Clare, England) segítségével (164,165).

4. Eredmények

4.1. A magasan hiperdiploid leukémiák azonosítása iFISH vizsgálattal

Multitarget interfázis fluoreszcens in situ hibridizációt alkalmazva a leggyakrabban érintett nyolc kromoszóma (4, 6, 10, 14, 17, 18, 21, X) többletét, kópiaszám-növekedési mintázatát rögzítettük, egysejtszintű korrelált adatbázist létrehozva. Az egyes betegmintákon belül rendkívül heterogén szubklonális mintázatot tapasztaltunk. Betegenként meghatároztuk a kromoszómaszám szerinti szubklónokat: ezek sejtjei ugyanannyi többlet kromoszómát (tri /tetraszómiát) tartalmaztak, a többlet kromoszómák összetételétől függetlenül. Így minden leukémia mintában megkaptuk a kromoszómaszám szerinti szubklónok gyakoriságának eloszlását. Ezt követően minden minta esetén megállapítottuk a modális kromoszómaszámot, melyet a legnagyobb szubklón kromoszómaszáma alapján határoztunk meg. Mivel ebben a tanulmányban nyolc kromoszómát vizsgáltunk, az iMN_8 jelölést alkalmaztuk, hogy ezt a paramétert elkülönítsük a metafázis vizsgálatokkal meghatározott modális számtól (MN). A vizsgált 214 mintából 89 beteg esett a hiperdiploid (HD) kategóriába ($iMN_8 \geq 47$). Az iMN_8 alapján bimodális eloszlást kaptunk, az egyik csúcserték az $iMN_8:47$, a másik az $iMN_8:55$ modális számnál volt (3. ábra).



3. ábra. Az iMN_8 értékek gyakoriság megoszlása a 89 hiperdiploid ($iMN_8 > 46$) leukémiában.

X-tengely: az iFISH vizsgálattal meghatározott modális szám (iMN_8), Y-tengely: a betegek száma

36 betegnél 47–50 közötti modális kromoszómaszámot kaptunk, őket az alacsonyan hiperdiploid (HeL) csoportba soroltuk. 53 betegnél ≥ 51 kromoszómaszámot igazoltunk. A recidíva kapcsán vizsgált (n=4), illetve a közel-tetraploid mintákat (n=3) kizártuk a további analízisből. Végül 48 magasan hiperdiploid (iMN₈ 51-56) beteg releváns klinikai és prognosztikai adatait gyűjtöttük össze, rögzítettük adatbázisunkban. Az eredeti, de novo prekursor-B-sejtes ALL betegeink 22,8 %-át képezte ez a kohorsz (48/210). Mindegyiküknél legalább 5 éves követési adatokkal rendelkezünk.

4.2. A kópiaszám-növekedés mintázata a magasan hiperdiploid csoportban

A magasan hiperdiploid csoportban (n=48) észlelt többlet kromoszómák gyakoriságát a 3. táblázat mutatja. Leggyakrabban a 21-es kromoszóma tri/tetraszómiát detektáltuk, ugyanakkor a 17-es kromoszóma triszómiát csak az esetek felében észleltük. Betegeinket további két alcsoportra osztva azt tapasztaltuk, hogy a magasabb modális számú alcsoportba (iMN₈ 55-56) tartozó mintáknál (n=20) átlagosan 13%-al volt gyakoribb az extra kromoszóma, mint az iMN₈ 51-54 alcsoportban (n=28). A modális szám növekedésével a 6, 17 és 21-es kromoszómák esetében már nem mutatkozott további kópiaszám-növekedés (3. táblázat).

kromoszóma	iMN ₈ ≥ 51	iMN ₈ 51-54	iMN ₈ 55-56
4	0,79	0,71	0,90
6	0,94	0,93	0,95
10	0,77	0,61	1,00
14	0,94	0,89	1,00
17	0,54	0,54	0,55
18	0,92	0,86	1,00
21	0,98	0,96	1,00
X	0,94	0,89	1,00

3. táblázat. A specifikus kromoszómák kópiaszám-növekedési gyakorisága iFISH analízis során, 48 magasan hiperdiploid ALL beteg esetén. A második oszlop (iMN₈ ≥ 51) mind a 48 beteg adatát tartalmazza, a harmadik és negyedik oszlop a modális számnak megfelelően két csoportra osztott betegek adatait.

4.3. A magasan hiperdiploid betegek klinikai adatai és prognosztikai jellemzői

A két egymást követő BFM protokollnál (ALL BFM 95 és ALL IC BFM 2002) a rizikócsoportba sorolás kritériumai (2. táblázat), a kemoterápia fázisai és az alkalmazott

citosztatikumok dózisa nagyfokú hasonlóságot mutat. A 214 betegből 168 betegre vonatkozó előtanulmányunk alapján nem volt szignifikáns különbség az ALL-BFM 95 (n=94) és az ALL IC-BFM 2002 (n=74) protokollal kezelt betegek eseménymentes és teljes túlélését illetően (pEFS: p=0,616 és pOS: p=0,550), ezért a két protokollal kezelt betegek adatait összevontuk az analízis során, más protokoll-családoknál alkalmazott gyakorlathoz hasonlóan (74).

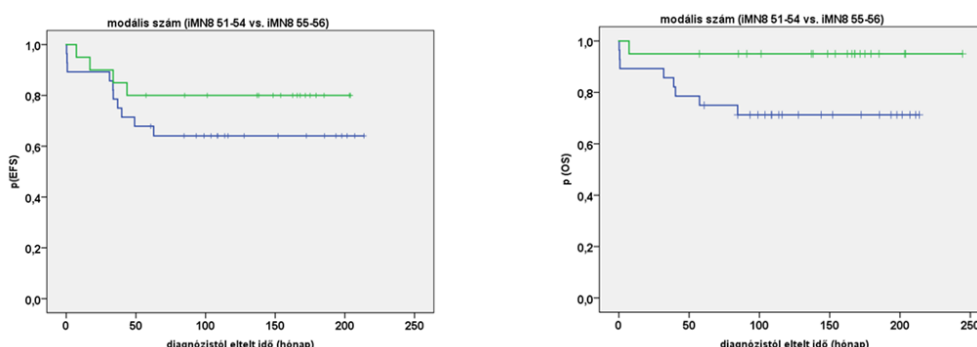
A 48 magasan hiperdiploid gyermek több, mint kétharmada az 1-6 éves korosztályba tartozott, 14 beteg volt 6 évesnél idősebb, és mindössze 4/48 beteg 10 évnél idősebb. A medián életkor 5,48 év volt. A nemek aránya a lányok javára tolódott el (28 vs. 20). A betegek több, mint fele (25/48) tartozott a standard rizikócsoporthoz. Kedvezőtlen prognosztikai tényezőnek számító magas fehérvérsejtszámot (>20 G/l) a betegek közel egyharmadánál (13/48) észleltünk. Tekintettel arra, hogy az angolszász protokolloknál hagyományosan az 50 G/l határértéket tekintik a kimenetel szempontjából meghatározónak, ez alapján is megvizsgáltuk a kezdeti fehérvérsejtszámot: így mindössze 5/48 gyermek tartozott a kedvezőtlen prognózisú csoportba. Az ALL BFM 95 és 2002 protokollok a terápiára adott választ a kezelés 8. és 33. napján értékelték. Két beteg kivételével mindenkinél kedvező volt a 8. napi prednizolon-válasz (azaz 1 G/l alatti blasztszám igazolódott a perifériás vérben), ennél a két betegnél azonban később semmilyen kedvezőtlen esemény nem lépett fel. A 33. terápiás napon pedig minden betegnél – azok kivételével, akiket a kezelés első heteiben fulmináns fertőzés következtében elvesztettünk – komplett remisszió igazolódott, azaz 5% alatt volt a csontvelői blasztarány és extramedulláris érintettség sem állt fenn. Magasan hiperdiploid betegeink döntő hányada tehát a szakirodalomban leírt kedvező klinikai prognosztikai jegyekkel volt jellemezhető.

Vizsgálatunk egyik fontos kérdése az volt, hogy a HeH csoporton belül sikerül-e azonosítani olyan paramétereket, melyekkel már a diagnózis idején elkülöníthetők a legkedvezőbb kórjóslatú gyermekek azoktól, akiknél a magas hiperdiploiditás ellenére kevésbé kedvező kimenetel várható. Megvizsgáltuk, hogy van-e összefüggés a túlélés és bizonyos klinikai és citogenetikai mutatók között (életkor, nem, kezdeti fehérvérsejtszám, terápiára adott válasz, modális kromoszómaszám, kromoszóma-többlet mintázat). Univariáns analízissel (4. táblázat) a kezdeti magas fehérvérsejtszám (>50 G/L) kedvezőtlen prognosztikai tényezőnek bizonyult (pEFS, p=0,019), ugyanakkor a betegek neme és életkora nem befolyásolta szignifikánsan a túlélést. Az iMN₈ paraméter alapján azonban a magasan hiperdiploid csoporton belül egy kimagaslóan kedvező túléléssel jellemezhető alcsoportot sikerült stratifikálnunk. A legmagasabb modális kromoszómaszámmal (iMN₈ 55–56) jellemezhető alcsoportnál (n=20)

95,2%-os teljes túlélést tapasztaltunk, mely szignifikánsan ($p=0,046$) kedvezőbb volt az alacsonyabb kromoszómaszámú (iMN₈ 51-54) betegek túlélésénél (4. ábra).

	betegek száma	pEFS (K-M)	p (log rank)	pOS (K-M)	p (log rank)
nem					
Fiú	20 / 48	140,5	0,429	164,6	0,319
Lány	28 / 48	167,9		214,1	
életkor					
1-6 év	34 / 48	169,9	0,176	206,5	0,742
>6 év	14 / 48	123,1		157,7	
FVS					
< 20 G/l	35 / 48	158,1	0,431	169,4	0,762
>20 G/l	13 / 48	143,4		209,8	
< 50 G/l	42 / 48	169,3	0,019	183,3	0,255
>50 G/l	6 / 48	77,5		169,5	
iMN₈					
51-54	28 / 48	147,4	0,256	161,5	0,046
55-56	20 / 48	168,3		232,5	

4. táblázat. A klinikai paraméterek és a modális kromoszómaszám prognosztikai jelentősége. K-M: Kaplan-Meier; pEFS: eseménymentes túlélés valószínűsége hónapokban; pOS: teljes túlélés valószínűsége hónapokban; iMN₈: 8 kromoszóma iFISH vizsgálata alapján meghatározott modális szám



4. ábra. A túlélés valószínűségét (pEFS, pOS) ábrázoló Kaplan-Meier görbe a modális szám függvényében. A magasabb modális kromoszómaszámú csoport (20/48 beteg) túlélése kedvezőbb (pOS, $p=0,046$). iMN₈ 55-56 csoport: zöld szín, iMN₈ 51-54 csoport: kék szín

A különösen kedvező kimenetellel jellemezhető iMN₈ 55-56 csoportba tartozó gyermekek közel fele (9/20) a standard rizikócsoportba került besorolásra. Kezdeti fehérvérsejtszámuk jellegzetesen alacsony volt (13/20 betegnél a normál tartományon belüli, 10 G/l alatti), extramedulláris érintettség egyik betegnél sem volt kimutatható. Ugyanakkor kedvezőtlen klinikai paraméterű betegek is tartoztak ebbe az alcsoportba, [rossz prednizolon-válasz miatt magas rizikójú betegség (2/20 beteg), magas kezdeti fehérvérsejtszám (>20 G/l: 5/20 beteg, >50 G/L: 4/20 beteg), idősebb életkor (>6 év: 8/20 beteg, >10 év: 3/20 beteg), relapszus (3/20 beteg)] a túlélés azonban ennek ellenére kimagaslóan kedvező volt. Az egyetlen haláleset egy fulmináns fertőzés következményeként lépett fel, egy komplett hematológiai remisszióban lévő betegnél, az intenzív kezelés utolsó fázisában. Három betegnél relapszus jelentkezett (izolált csontvelői), de mindhárom jól reagált a másodvonalbeli kemoterápiára, mely allogén transzplantációt is magába foglalt. Jelenleg második komplett remisszióban vannak. Kettőjüknél a recidíva késői típusú volt (34, ill. 44 hónappal a diagnózis után jelentkezett), a harmadik betegnél nagyon korai típusú (<18 hónap a diagnózistól számítva), mely általában a legkedvezőtlenebb kimenetellel asszociált, a beteg azonban már 7 éve komplett remisszióban van.

Az iMN₈ 55-56 alcsoporttal összehasonlítva, az iMN₈ 51-54 csoportba tartozó betegeknél kedvezőtlenebb kimenetelt ($p=0,046$, OS) tapasztaltunk. Bár diagnóziskor jó prognózissal asszociált paraméterek voltak a jellemzők: fiatal életkor (medián: 3,75 év), alacsony kezdeti FVS szám (medián: 8,05 G/l), többségében alacsony rizikócsoportú betegség (15/28) és megfelelő terápiás válasz: hematológiai remisszió a 33. napon. Három beteg azonban meghalt az indukciós fázisban uralhatatlan fertőzés következtében. Hét betegnél késői recidíva jelentkezett. Közülük kettőnél történt allogén csontvelőtranszplantáció, ők azok, akik jelenleg is élnek, második komplett remisszióban. A recidívált betegek közül négy esetben szubmikroszkópikus aberrációk irányában munkacsoportunk multiplex ligáció-függő próba amplifikációt végzett (166). Egyikőjüknél diagnóziskor a *CDKN2A* gén monoallélikus deléció, recidívakor a *CDKN2A* biállélikus deléció, illetve *PAX5* és *IKZF1* deléció volt észlelhető. Egy másik betegnél *IKZF1* deléció volt kimutatható diagnóziskor. Ezen aberrációk befolyásolhatták a kimenetelt. Ugyanakkor a másik két betegnél a B-sejt fejlődés, differenciálódás, funkcionális aktivitás, sejtosztás és sejtciklus-szabályozást befolyásoló 14 gén vizsgálata során nem igazolódtak hasonló eltérések. A recidívák függetlenek voltak az alkalmazott protokolltól (ALL BFM 95: négy beteg, ALL IC BFM 2002: három beteg).

4.4. A kópiaszám-növekedés prognosztikai jelentősége

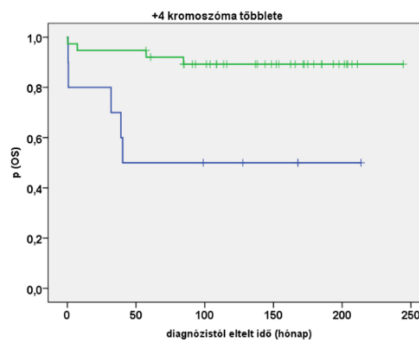
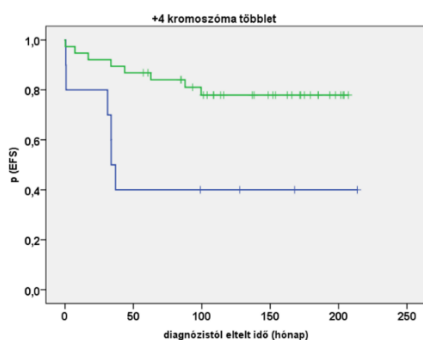
Vizsgálatunk tárgya volt, hogy vajon az egyes specifikus kromoszóma-többletek jelenléte társul-e kedvezőbb klinikai kimenetellel, magyarázza-e a magasan hiperdiploid betegek heterogén prognózisát? Az egyes kromoszóma-többletek mellett a dupla és a tripla triszómiák különféle kombinációinak jelentőségét is vizsgáltuk. Univariáns analízissel mind az eseménymentes, mind a teljes túlélést illetően szignifikánsan kedvezőbb kimenetelt tapasztaltunk azon betegeknél, akiknél a 4-es kromoszóma többlete volt kimutatható (pEFS: $p=0,06$ és pOS: $p=0,002$) (5. táblázat, 5. ábra). A 4-es kromoszóma többletét minden leukémiában a 6-os kromoszóma kópiaszám növekedése kísérte. A kombinált triszómiák esetén a 4-6, 4-10, 4-17, 4-18, 4-10-17 és 4-10-18 szimultán jelenléte bizonyult prognosztikailag relevánsnak az eseménymentes túlélés, a teljes túlélés, vagy mindkettő vonatkozásában (5. táblázat, 6-10. ábra).

Ha multivariancia analízisben a négy klinikai illetve citogenetikai paramétert (életkor, fehérvérsejtszám, nem és iMN_8) kombináltuk az egyedi és kombinált kromoszóma-többletekkel, az utóbbiak egyike sem javította az eseménymentes túlélést (nem voltak független EFS paraméterek). Ugyanakkor, ugyanilyen többszemponatos analízisben a teljes túlélés vonatkozásában egyedül a 4-es kromoszóma kópiaszám-növekedése bizonyult magasan szignifikáns ($p=0,009$) és független változónak.

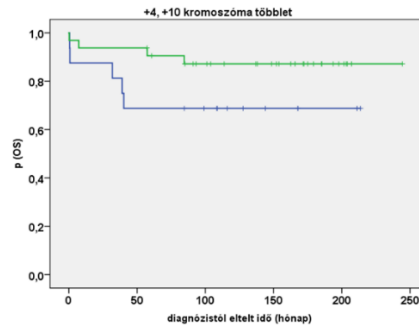
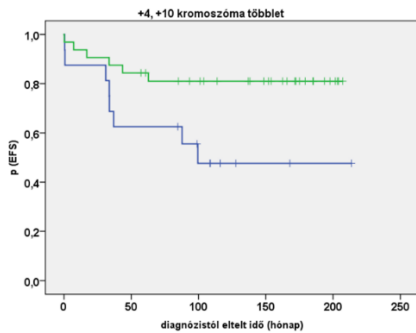
Összességében megállapítható, hogy a magas hiperdiploiditású csoportban multivariancia analízis alapján az alacsonyabb (<50 G/L) fehérvérsejtszám ($p=0,002$), az 1–6 év közötti életkor ($p=0,005$) és a magas iMN_8 -érték ($p=0,008$) egyaránt szignifikánsan hozzájárult a jobb pEFS-értékhez, de a kromoszóma nyéréseknek ezekre nem volt további hatása. Továbbá, mind a négy paraméter (női nem, alacsony fehérvérsejtszám, 1-6 év közötti életkor, magas iMN_8 érték) szignifikáns ($p=0,003$ - $p=0,021$) összefüggést mutatott a pOS értékkel. Ezt a kromoszóma-többlet kombinációk közül egyedül az izolált +4 javította szignifikánsan, azaz bizonyult az egyetlen független változónak. Ezen eredmények függetlenek voltak az adott időszakban alkalmazott protokolloktól (ALL BFM 95 vagy ALL IC BFM 2002).

kromoszóma-többlet		betegek száma	pEFS (K-M)	p (log rank)	pOS (K-M)	p (log rank)
kr. 4	Igen	38 / 48	169,9	0,006	222,2	0,002
	Nem	10 / 48	99,2			
kr. 4-6	Igen	38 / 48	169,9	0,006	222,2	0,002
	Nem	10 / 48	99,2			
kr. 4-10	Igen	22 / 48	173,1	0,024	218,0	0,109
	Nem	26 / 48	121,0			
kr. 4-17	Igen	38 / 48	182,2	0,033	198,0	0,024
	Nem	10 / 48	135,1			
kr. 4-18	Igen	34 / 48	170,4	0,031	219,5	0,046
	Nem	14 / 48	119,5			
kr. 4-10-17	Igen	18 / 48	185,4	0,047	196,0	0,081
	Nem	30 / 48	140,1			
kr. 4-10-18	Igen	31 / 48	171,9	0,045	217,1	0,154
	Nem	17 / 48	126,4			

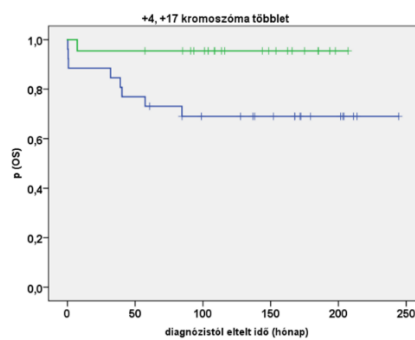
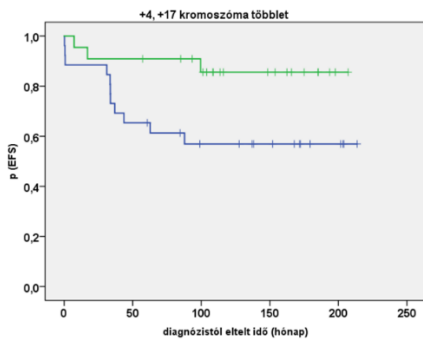
5. táblázat. A specifikus kromoszómák és kromoszóma-kombinációk kópiaszám növekedésének prognosztikai jelentősége a HeH leukémiákban. K-M: Kaplan-Meier; pEFS: eseménymentes túlélés valószínűsége hónapokban; pOS: teljes túlélés valószínűsége hónapokban



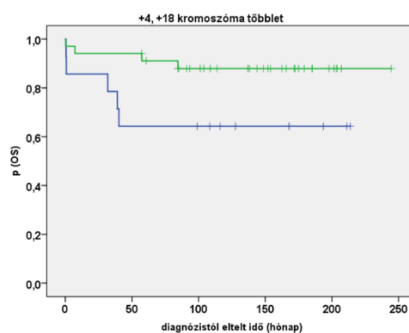
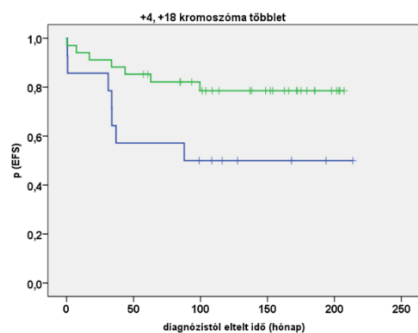
5. ábra A túlélés valószínűségét (pEFS, pOS) ábrázoló Kaplan-Meier görbe a 4-es kromoszóma kópiaszám-növekedésének függvényében. A 4-es kromoszóma kópiaszám-növekedése esetén (zöld szín) kedvezőbb a prognózis (pEFS: p=0,006, pOS: p=0,002). pEFS: eseménymentes túlélés valószínűsége hónapokban; pOS: teljes túlélés valószínűsége hónapokban



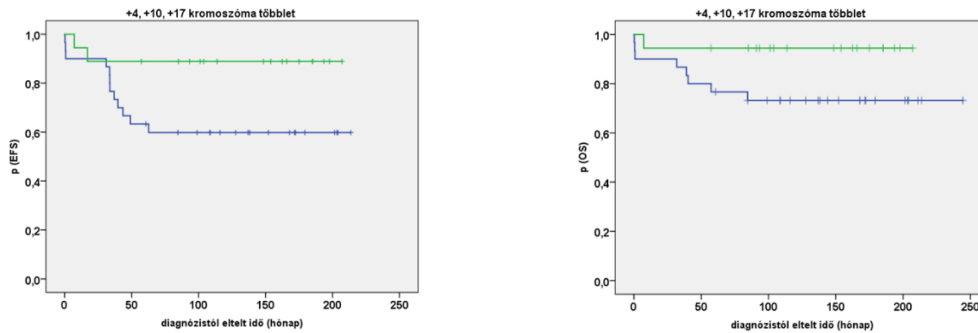
6. ábra. A túlélés valószínűségét (pEFS, pOS) ábrázoló Kaplan-Meier görbe a 4-es és 10-es kromoszómák együttes kópiaszám-növekedésének függvényében. A 4-10 kromoszóma-kombináció együttes kópiaszám- növekedése esetén (zöld szín) kedvezőbb az eseménymentes túlélés (pEFS: $p=0,024$). pEFS: eseménymentes túlélés valószínűsége hónapokban; pOS: teljes túlélés valószínűsége hónapokban



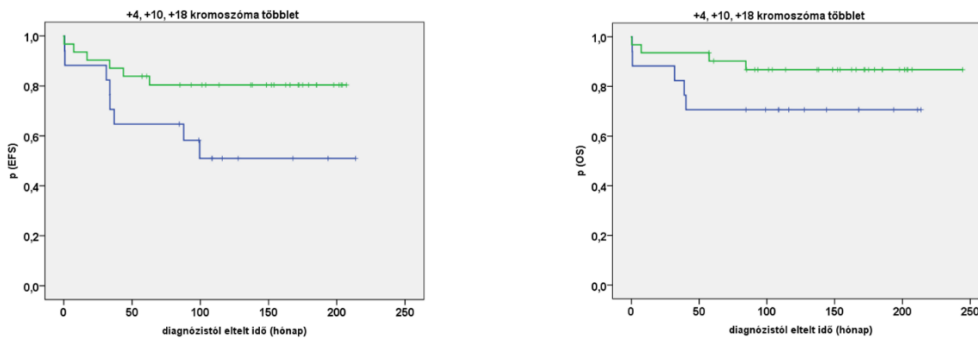
7. ábra. A túlélés valószínűségét (pEFS, pOS) ábrázoló Kaplan-Meier görbe a 4-es és 17-es kromoszómák együttes kópiaszám-növekedésének függvényében. A 4-17 kromoszóma-kombináció együttes kópiaszám-növekedése esetén (zöld szín) kedvezőbb a prognózis (pEFS: $p=0,033$ pOS: $p=0,024$). pEFS: eseménymentes túlélés valószínűsége hónapokban; pOS: teljes túlélés valószínűsége hónapokban



8. ábra. A túlélés valószínűségét (pEFS, pOS) ábrázoló Kaplan-Meier görbe a 4-es és 18-as kromoszómák együttes kópiaszám-növekedésének függvényében. A 4-18 kromoszóma-kombináció együttes kópiaszám-növekedése esetén (zöld szín) kedvezőbb a prognózis (pEFS: $p=0,031$ pOS: $p=0,046$). pEFS: eseménymentes túlélés valószínűsége hónapokban; pOS: teljes túlélés valószínűsége hónapokban



9. ábra. A túlélés valószínűségét (pEFS, pOS) ábrázoló Kaplan-Meier görbe a 4-10-17 kromoszómák együttes kópiaszám-növekedésének függvényében. A 4-10-17 kromoszómák együttes kópiaszám-növekedése esetén (zöld szín) kedvezőbb az eseménymentes túlélés (pEFS: $p=0,047$). pEFS: eseménymentes túlélés valószínűsége hónapokban; pOS: teljes túlélés valószínűsége hónapokban



10. ábra. A túlélés valószínűségét (pEFS, pOS) ábrázoló Kaplan-Meier görbe a 4-10-18 kromoszómák együttes kópiaszám-növekedésének függvényében. A 4-10-18 kromoszómák együttes kópiaszám-növekedése esetén (zöld szín) kedvezőbb az eseménymentes túlélés (pEFS: $p=0,045$). pEFS: eseménymentes túlélés valószínűsége hónapokban; pOS: teljes túlélés valószínűsége hónapokban

4.5. Kromoszómaszám és kariotípus szintű genetikai heterogenitás

A multiplex, 2x4 kromoszómát érintő iFISH vizsgálat eredményeképpen minden leukémia mintában kétfajta szubklónt azonosítottunk. Egyfelől az *egyedi kariotípus szubklónokat*, melyek mind a nyolc kromoszóma szerint ugyanazon numerikus konstellációt képviselték (7. táblázat). Másfelől a *kromoszómaszám szerinti szubklónokat*, melyek sejtjei ugyanannyi totál kromoszóma-többletet tartalmaztak, a többlet kromoszómák összetételétől függetlenül (11. ábra).

Először a szubklónok számát a totál kromoszómaszám alapján, betegenként vizsgáltuk. Masszív klonális heterogenitás volt azonosítható a magasan hiperdiploid csoportban. Azt

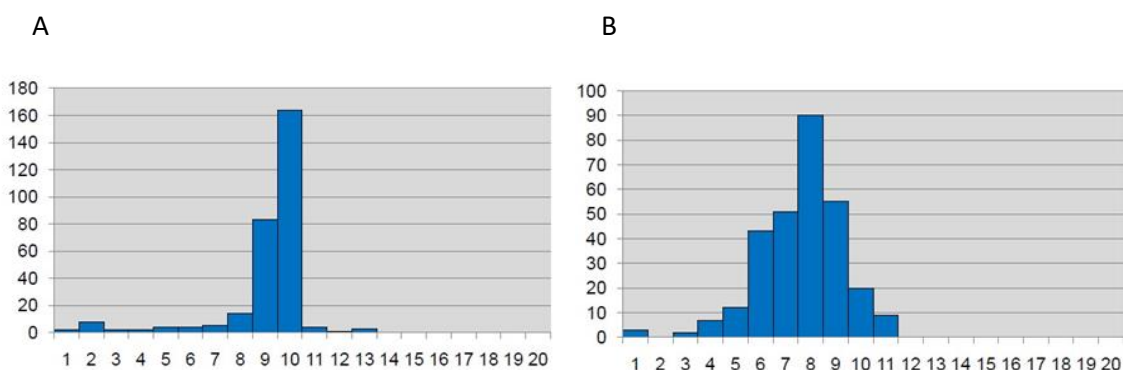
tapasztaltuk, hogy a domináns szubklónok a tumorsejtek mindössze egyharmadát, átlagosan 34%-át alkották (terjedelem: 13-71%). A domináns szubklónok mellett átlagosan 9,9 szubklónt (terjedelem: 6-13) azonosítottunk a betegmintákban (6. táblázat).

iMN ₈	ID	domináns sejtarány	többi sejt aránya	szubklónok száma
51	24	0,28	0,72	9
51	67	0,37	0,63	7
51	200	0,19	0,81	10
51	29	0,15	0,85	12
51	51	0,18	0,82	10
52	4	0,25	0,75	10
52	20	0,38	0,62	7
52	33	0,35	0,65	7
52	35	0,51	0,49	7
52	36	0,19	0,81	8
52	71	0,71	0,29	6
52	193	0,71	0,29	6
53	5	0,31	0,69	10
53	15	0,60	0,40	13
53	31	0,40	0,60	8
53	56	0,16	0,84	10
53	57	0,23	0,77	12
53	60	0,16	0,84	12
53	66	0,20	0,80	10
54	7	0,24	0,76	13
54	16	0,13	0,87	12
54	17	0,30	0,70	10
54	22	0,36	0,64	10
54	40	0,35	0,65	10
54	43	0,17	0,83	13
54	49	0,36	0,65	9
54	54	0,25	0,75	12
54	55	0,67	0,33	7
55	9	0,27	0,73	13
55	12	0,29	0,71	9
55	23	0,38	0,62	9
55	38	0,30	0,70	10
55	39	0,22	0,78	13
55	45	0,50	0,50	11
55	46	0,36	0,64	10
55	47	0,68	0,32	8
55	48	0,49	0,51	8
55	50	0,42	0,58	9
55	52	0,56	0,44	9
55	53	0,20	0,80	13
55	63	0,17	0,83	12
56	1	0,41	0,59	9
56	18	0,56	0,44	13
56	26	0,39	0,61	7
56	42	0,31	0,69	11

56	44	0,26	0,74	11
56	64	0,31	0,69	10
56	135	0,19	0,81	12
	átlag:	0,34	0,66	9,9

6. táblázat. A kromoszómaszám szerinti szubklónok száma, illetve a domináns szubklónok sejtaránya az egyes HeH leukémiákban az iMN_8 értékek szerint. ID: a betegek azonosító kódja

Az egyes leukémia mintákban a kromoszómaszám szerinti szubklónok eloszlása többféle mintázatot követett, a leggyakoribb a haranggörbe alak volt. A haranggörbe-mintázat jellegzetesen alakult a két alcsoportnál: az iMN_8 55–56 csoportnál kisebb heterogenitásra utaló keskenyebb alappal rendelkezett, mint az iMN_8 51-54 csoportnál (11. ábra).



11. ábra. A kromoszóma-többletek száma szerinti szubklónok gyakorisági eloszlása két beteg esetében bemutatva. A: keskenyebb alapú haranggörbe-mintázat egy iMN_8 56 modális számú leukémia esetén (ID-18). B: szélesebb alapú haranggörbe-mintázat egy iMN_8 54 modális számú leukémia esetén (ID-17). ID: a betegek azonosító kódja. Függőleges tengely: a vizsgált sejtek száma. Vízszintes tengely: a kromoszóma-többletek száma szerinti szubklónok.

A 8-paraméteres korrelált vizsgálat lehetővé tette, hogy a kromoszómaszám alapján meghatározott szubklónok mellett az *egyedi kariotípus mintázatot* is vizsgáljuk. Minden beteg minden egyes vizsgált sejtjében a nyolc kromoszóma kópiaszámát rögzítve, sejtenként egy nyolc karakterből álló számsort, *egyedi kariotípust* kaptunk. Az azonos egyedi kariotípusok alkották az egyedi kariotípus szubklónokat. Egy adott - kromoszómaszám szerint meghatározott - szubklónt több, mint egyfajta egyedi szubklón építhet így fel. A 7. táblázatban is látható, hogy a betegek egy részénél a domináns szubklónt sok egyedi kariotípus szubklón alkotja (pl. ID-17 beteg esetében 13 egyedi kariotípus szubklón), más betegeknél kevés (pl. ID-18 betegnél egyetlen egyedi kariotípus szubklón).

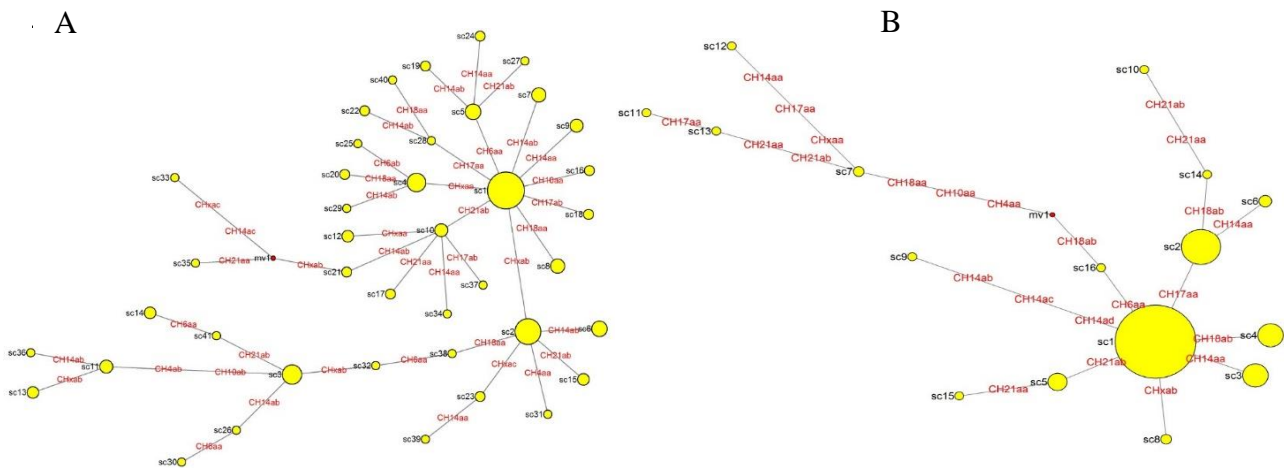
ID	iMN ₈	kr. többlet	az egyedi kariotípus szubklónokat reprezentáló sejtek száma	kr. 4	kr. 6	kr. 10	kr. 14	kr. 17	kr. 18	kr. 21	kr. X
17	54	8	39	2	3	2	4	2	3	4	4
			5	3	2	3	4	2	2	4	4
			4	2	3	2	4	2	3	3	5
			3	2	3	1	4	2	3	4	4
			3	2	2	2	5	2	3	4	4
			3	2	3	2	5	2	3	3	4
			2	2	4	2	4	2	3	4	3
			2	2	3	2	5	2	3	4	3
			2	2	3	2	5	2	2	4	4
			2	1	3	2	4	2	3	4	5
			2	2	3	2	5	2	3	2	5
			2	2	3	2	4	3	3	3	4
			2	2	3	2	4	2	2	4	5
			Az ID-17 betegnél (iMN ₈ 54) kromoszómaszám szerint 10 szubklón volt azonosítható (6.táblázat). A legnagyobb szubklón kromoszómaszáma 54 (46+8). Ezen szubklónt 13 egyedi kariotípus szubklón alkotta, mely összesen 71 sejtben manifesztálódott. A legnagyobb egyedi kariotípus szubklónba tartozott a 8 kromoszóma-többlettel rendelkező sejtek 55%-a (39/71).								
ID	iMN ₈	kr. többlet	az egyedi kariotípus szubklónokat reprezentáló sejtek száma	kr. 4	kr. 6	kr. 10	kr. 14	kr. 17	kr. 18	kr. 21	kr. X
18	56	10	163	3	3	3	3	3	4	4	2
			Az ID-18 betegnél (iMN ₈ 56) kromoszómaszám szerint 13 szubklón volt azonosítható (6.táblázat). A legnagyobb szubklón kromoszómaszáma 56 (46+10). Ezen szubklónt egyetlen egyedi kariotípus alkotta, mely összesen 163 sejtben manifesztálódott. Így a legnagyobb egyedi kariotípus szubklónba tartozott a 10 kromoszóma-többlettel rendelkező sejtek 100%-a.								

7. táblázat. A domináns szubklónt alkotó egyedi kariotípus szubklónok kromoszóma-többlet mintázata két beteg esetében bemutatva. ID: a betegek azonosító kódja 2: diszómia 3: triszómia 4: tetraszómia 5: pentaszómia

Az értékelés során csak a legalább két sejtben egyforma kariotípussal rendelkező sejtcsoportokat vettük figyelembe, tekintettük kariotípus klónoknak (nyolc paraméter hibás értékelésből eredő, két egyforma kariotípus [fals duplikátum] valószínűsége közelít a 10^{-5} -hez).

Az egyedi kariotípus klónok száma és mintázata jelentős heterogenitást mutatott egy-egy betegmintán belül, ezt a hálózat (network) analízis, a Steiner-fa ábrázolás tette szemléletessé (12. ábra). A Steiner-fa a lehető legrövidebb utat, hálózatot reprezentálja, amelyben egy leukémia minta szubklónjai egy fa-mintázattá állnak össze. Minden kromoszóma kópiaszám változását egy lépés távolság jelöli. Ha pl. egy kromoszóma triszómiássá vált, az egy genetikai

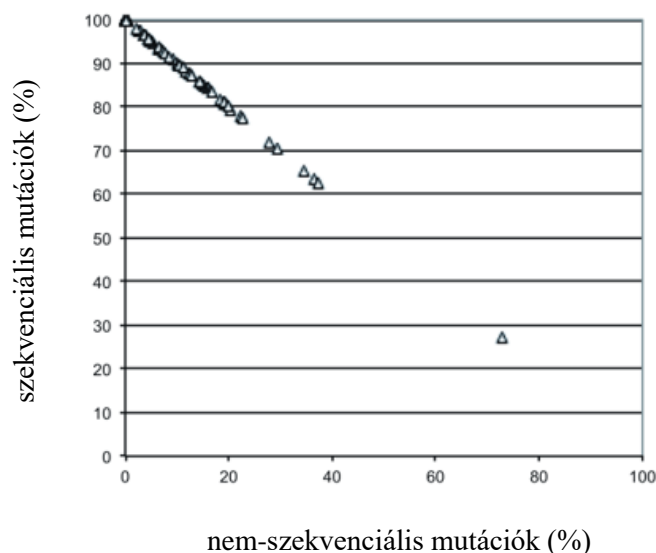
lépés, ha egy másik kromoszóma vált triszómiássá, az egy másik lépés, és ha egy triszómiás kromoszóma tetraszómiássá vált, az egy harmadik genetikai lépés, stb. Az egymástól egységnyi genetikai eltérést mutató szubklónok közötti távolság egy egységnyi, míg a pl. 5x egységnyi genetikai eltérést mutató, összekötött szubklónok között 5x egységnyi a távolság (a közöttük levő egységnyi eltérést mutató szubklónok vagy nem léteznek - 5 mutáció egyszerre fordul elő x- vagy nem kerültek azonosításra, az alacsony arányuk miatt). A sárga körök az egyedi kariotípus szubklónokat reprezentálják, méretük arányos a szubklón méretével, azaz a szubklónt alkotó sejtek számával. A szubklónokat összekötő vonalakon látható a változást mutató kromoszóma száma. A piros pöttyök median vektorokat jelölnek, melyek vagy nem megtaláltak vagy nem létező klónokat képviselnek.



12. ábra. Az egyedi kariotípus szubklónok alapján nyert Steiner-fa mintázat két beteg esetében bemutatva. A: komplex mintázat (iMN₈ 54 modális számú leukémia esetén, ID-17 beteg) B: egyszerűbb, kevésbé összetett mintázat (iMN₈ 56 modális számú leukémia esetén, ID-18 beteg)

A Steiner-fa-mintázatban jelentős heterogenitást tapasztaltunk az egyes betegminták között, jellemzően azonban a magasabb modális számú, iMN₈ 55–56 csoportban egyszerűbb, kevésbé komplex volt a mintázat (12. ábra/ B). Az egyedi kariotípus klónok átlagos száma szignifikánsan alacsonyabb volt ($p=0,028$) az iMN₈ 55–56 csoportban ($23,0 \pm 9,2$), mint az iMN₈ 51–54 csoportban ($29,9 \pm 11,8$). Munkacsoportunk biostatistikusai további Steiner-fa asszociált paramétereket számoltak. A fa egyes távolságainak összege adja a Steiner-fa hosszát. Az utóbbi matematikai korrelációja az azonosított szubklónok valamint a feltételezett szimultán mutációk számával arra utal, hogy egy daganatsejt populációban a genetikai változások szekvenciálisan

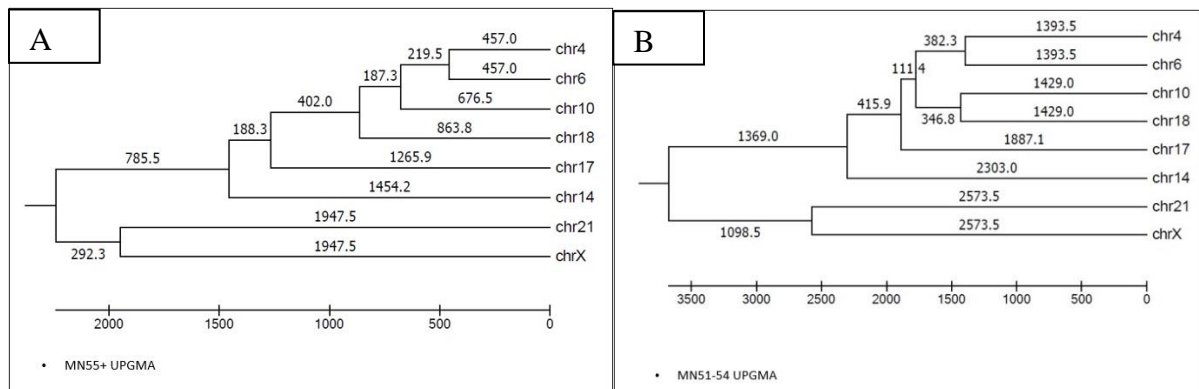
(sorozatosan), vagy szimultán (egyidőben) történnek. Az egyedi szubklónok száma lineárisan korrelált a Steiner-fa hosszával, azaz a mutációk számával. Amennyiben a Steiner-fa hossza valamint a feltételezett szimultán mutációkat is tartalmazó egyedi kariotípus szubklónok száma között lineáris és nem logaritmikus összefüggés áll fenn, az arra utal, hogy a kromoszómaszám változások többségben szekvenciálisan, egyesével mentek végbe. A szubklónok száma és a Steiner-fa hosszának arányából származtatott matematikai paraméter 1,00 ha minden mutáció szekvenciális, és közelíti a 0,00 értéket, ha minden mutáció szimultán. Ezen paraméter értéke ebben a tanulmányban (0,907) azt mutatta, hogy a numerikus aberrációk kb. 90%-a szekvenciálisan, egyesével alakult ki (13. ábra).



13. ábra. A szekvenciális illetve szimultán kialakuló kromoszóma-többletek százalékos megoszlása az összes hiperdiploid leukémiában vizsgálva.

Magasan hiperdiploid ALL kialakulásának a háttérében kromoszóma elválási zavar (szegregációs zavar) áll fenn, mely valamilyen valószínűségi sorrendben érinti az adott kromoszómákat. Vizsgáltuk, hogy az egyes leukémiák esetén a kromoszóma-többletek kialakulása mutat-e specifikus sorrendet, ezért csoport (cluster) analízist végeztünk az egyedi kariotípus szubklónok alapján. Csoportanalízis során az egyes csoportokon belüli adatok valamely szempont alapján hasonlítanak egymáshoz és e szempont alapján különböznek a többi csoport elemeitől. A hierarchikus csoport-alakítást gyakran ábrázolják egy fa jellegű diagram, a dendrogram segítségével. A kromoszóma-többletek csoportjai változatosan alakultak az

egyes leukémiákban, de a dendogram-fa alapját mindig a 21-es vagy/és az X kromoszóma alkotta. A dendogram-fa felső zónái később kialakuló eseményeket reprezentálnak. Az iMN₈ 51-54 leukémiák mintáit összesítve a dendogram-fa alapját a 21-X-14 kromoszómacsoport alkotta, a 10-es és 18-as kromoszómák, majd a 4-es és 6-os kromoszómák egy-egy rákövetkező csoportot képeztek, míg a 17-es kromoszóma nem tartozott konzisztensen az utóbbi két csoport egyikéhez sem. Az iMN₈ 55-56 csoportban a 10-es és 18-as kromoszómacsoport nem volt kimutatható, de egyébként a dendogram topológiája megegyezett az iMN₈ 51-54 csoportban észleltekkkel (14. ábra). A bonyolult számításokat munkacsoportunk statisztikusai többféle szoftver algoritmussal (MEGA 5 - NJ, UPGMA és ME) is elvégezve konzisztens eredményt kaptak.



14. ábra. A kromoszóma-többletek kialakulásának specifikus sorrendjét bemutató dendogramok. A: az összes iMN₈ 51-54 modális számú leukémia, B: az összes iMN₈ ≥55 modális számú leukémia

5. Megbeszélés

A magasan hiperdiploid leukémia a gyermekkori akut limfoblasztos leukémia legnagyobb genetikai alcsoportja. Általában kedvező klinikai kimenetel jellemzi, a betegek 20%-nál azonban később recidíva jelentkezik.

A gyermekkori leukémia kezelésére alkalmazott jelenlegi nemzetközi protokollok számos klinikai és genetikai paramétert alkalmaznak a különböző rizikócsoporthú betegek azonosítására. Az alacsony rizikójú betegek kevésbé intenzív, kevesebb mellékhatással járó kezeléssel gyógyíthatóak. A kezdeti fehérvérsejtszámon, az életkoron és a tumorvolumen csökkenésén kívül a különböző többlet kromoszómák, tri/tetraszómiák jelenléte is meghatározó tényező egyes munkacsoportoknál az alacsony rizikócsoporthú betegeknél. A COG AALL0331 protokollnál a 4-10-17 tripla triszómia, a POG 9904 tanulmányban a 4-10 dupla triszómia jelenléte alacsony rizikójú betegséget jelez, redukált intenzitású kezelést eredményez (47,167). Ugyanakkor más tanulmányok nem erősítették meg a 4-10 illetve a 4-10-17 triszómia-kombinációk prognosztikai szerepét, sőt, a magas modális számot határozták meg a legjelentősebb citogenetikai és prognosztikai tényezőként (74,93). Dastugue és mtsai 58951 CLG-EORTC protokoll szerint kezelt, 440 magasan hiperdiploid leukémiás gyermeknél a legjelentősebb prognosztikai tényezőnek a magas, 58-66 közötti modális számot találta, mely jelentősége meghaladta a specifikus triszómiák/triszómia-kombinációk jelentőségét (93). A skandináv munkacsoport NOPHO ALL 92/00 protokollal kezelt, 344 magasan hiperdiploid gyermek konvencionális citogenetikai adatainak elemzésekor a tripla triszómiákat tartalmazó leukémiák prognosztikai szempontból korreláltak a magas modális számú (>53, vagy >55) leukémiákkal. Szignifikánsan kedvezőbb eseménymentes túlélés jellemezte ezen betegeket, ugyanakkor multivariancia analízisben sem a tripla triszómiák, sem a magas modális szám nem volt független változó a túlélés (EFS /OS) szempontjából (74). A legnagyobb, gyermekkori hiperdiploid leukémiát vizsgáló Japán tanulmányban az összes dupla triszómia kombináció prognosztikai szerepét vizsgálva 15-öt találtak a betegség kimenetele szempontjából jelentősnek. A kedvező kimenetellel a legerősebb asszociációt a 11-es és 17-es kromoszómák dupla triszómiája jelentette, ugyanakkor a 4-10-17-es tripla triszómia, illetve a 4-10 dupla triszómia jelenléte nem befolyásolta szignifikánsan a kimenetelt (94). Zaliouva és mtsai a magasan hiperdiploid leukémiákon belül két alcsoportot különített el a DNS index alapján: $DI=1,1-1,16$ illetve $DI>1,16$. Beteganyagukban az alacsonyabb DI az 51-54, a magasabb a >55 kromoszómaszámnak felelt meg. A két alcsoport mind a terápiára adott kedvező válasz, mind

génexpressziós mintázat alapján jól elkülöníthetőnek bizonyult. A $DI > 1,16$ csoportban észlelt kedvezőbb terápiás válasz összefüggésben volt a 10-es kromoszóma, illetve a 4, 10, 17-es többlet kromoszómák, illetve kombinációik jelenlétével (58). A BFM munkacsoport SNP alapú molekuláris allélkariotipizálása során a 17-es vagy a 18-as többlet kromoszómák hiánya esetén észlelt kedvezőtlen kimenetelt. A 17-es és 18-as kromoszómák együttes diszómiaja pedig kifejezetten rossz prognózissal társult (5 éves EFS: 53% vs. 90%). Vizsgálati anyagukban a 4-es és 10-es kromoszómák kópiaszám-növekedésének nem volt prognosztikai jelentősége (70).

Ezek az eredmények nem teljesen egybehangzóak. A legtöbb tanulmányban univariáns analízissel vizsgálva prognosztikai szempontól relevánsnak bizonyult a 4-es, 10-es, 17-es, 18-as kromoszómák tri/tetraszómiaja, illetve a magasabb modális szám, ugyanakkor a többszemponos analízis eredményei különböztek egymástól. Az újabb vizsgálatok eredményei sem mutatnak egy irányba.

Az ellentmondásos eredmények hátterében a munkacsoportok eltérő terápiás protokolljai mellett módszertani okok is valószínűsíthetők. A fent említett legtöbb tanulmányban a kromoszóma-többletek vizsgálata *konvencionális citogenetikai vizsgálattal*, illetve *áramlási citometriával* történt. A hiperdiploiditás detektálásának standard módszere a konvencionális citogenetikai analízis, azonban a hiperdiploid blasztok nehezen tenyésztethetők és a tenyésztés során klonális szelekció jöhet létre: a mitotikus alakok esetenként nem reprezentálják a genetikai eltérést hordozó sejtpopulációt. Egyes vizsgálatokban iFISH segítségével a minták 30%-ban magasan hiperdiploid kromoszómakészletet detektáltak olyan esetekben, ahol a konvencionális citogenetikai vizsgálatok normál kariotípust igazoltak, illetve sikertelennek minősített kariotipizálás esetén ez az arány még magasabbnak (60%) bizonyult (56,168). Paulsson és mtsai az egyik legnagyobb esetszámú gyermekkori HeH leukémiát vizsgáló, konvencionális citogenetikai analízisre támaszkodó tanulmányában a modális számot az esetek 97%-ban meghatározták ugyan, azonban a tripla triszómiákat csak 51%-ban tudták vizsgálni. Az összes kromoszómára vonatkozó numerikus aberrációkat mindössze a beteganyag 43%-ban tudták meghatározni (74). A konvencionális kariotípus analízis tehát - ami elméletileg genomszintű adatokat jelenít meg - a magasan hiperdiploid ALL esetén korlátozottan informatív. A nem-osztódó sejtekből nyert teljes DNS tartalom analízise - a DNS index meghatározása áramlási citometriával - valamennyire kiküszöböli ezt a problémát, ugyanakkor arról nem ad információt, hogy a kromoszóma-többletek mely kromoszómákat érintik. A leukémia kialakulása sejtszintű szelekció következménye, így az egyedi sejtek vizsgálata tűnik a legmegfelelőbb módszernek a specifikus kromoszóma változások feltérképezésében. A molekuláris allélkariotipizálás szintén nem egysejt alapú diagnosztikai módszer. Az egyedi sejt

specifikus, 8-paraméteres interfázis FISH vizsgálat során nagyszámú - a citogenetikai vizsgálathoz képest 15x több - sejtet lehet analizálni, sejttenyésztés és az ebből fakadó információvesztés kiküszöbölésével. A sejt specifikus genetikai információ pedig új ismereteket jelenthet a kromoszóma-többletek kialakulását, illetve prognosztikai jelentőségét illetően.

Jelen tanulmány azt tűzte ki célul, hogy gyermekkori HeH prekursor-B sejtés ALL-ben a kromoszóma-többletek mintázatát, mechanizmusát és evolúcióját jobban megvilágítsa. iFISH vizsgálattal 214 betegnél, mintánként legalább háromszáz, tenyésztés nélküli sejtben vizsgáltuk a magasan hiperdiploid leukémia esetén leggyakoribb nyolc kromoszóma kópiaszám növekedési mintázatát. Tudomásunk szerint korábban nem végeztek hasonló vizsgálatot gyermekkori HeH ALL esetén. Az extra kromoszómák számának hierarchikus növekedése a modális szám növekedésével korrelál (69), így elegendőnek bizonyult ezen nyolc kromoszóma analízise ahhoz, hogy megbízhatóan azonosítsuk a magasan hiperdiploid alcsoportot, melyet korábbi tanulmányok a teljes kromoszóma készlet vizsgálatával diagnosztizáltak.

iFISH vizsgálatunkkal a magasan hiperdiploid leukémiákban masszívan heterogén szubklonális architektúrát észleltünk. Kétfajta szubklónt azonosítottunk minden mintában: a kromoszómaszám szerinti szubklónokat (melyek sejtjei ugyanannyi totál kromoszóma-többletet mutattak, a nyert kromoszómák összetételétől függetlenül), illetve az egyedi kariotípusokat (melyek a nyolc kromoszóma szerint ugyanazon numerikus konstellációt képviselték). A kromoszómaszám szerinti domináns szubklónok csak mintegy harmadát képezték a tumorsejteknek, és további szubklónokat is azonosítottunk, betegmintánként átlagosan 9,9-et. Ezen adatok korreláltak Talamo genetikailag nem szubtipizált, kis esetszámú, négy kromoszómára folytatott iFISH vizsgálatának eredményével (169). Ugyanakkor éles ellentétben állnak a legnagyobb konvencionális citogenetikai adatbázissal, mely szerint az akut limfoblasztos leukémia eseteinek 84%-ban csak egy klón volt kimutatható (73). A konvencionális citogenetikai és az iFISH adatok közötti diszkrépancia szintén magyarázható az eltérő módszertannal: a hagyományos citogenetikai analízis során klonális szelekció léphet fel a szubklónok eltérő növekedési sajátosságai miatt. Továbbá, mivel kariotípus analízissel csak limitált számú sejtet vizsgálunk (20-30 metafázis), így a kisebb szubklónokat érintő eltérések figyelmen kívül maradhatnak. A hiperdiploid leukémia klonális heterogenitásának lehetőségét új, szekvenáláson alapuló technológiák alkalmazásával Paulsson és mtsai is felvetették (170).

A különböző malignus betegségekből jelenlévő szubklonális heterogenitás (ugyanazon tumormintán belüli szubpopulációk jelenléte), illetve celluláris heterogenitás (ugyanazon szubpopuláció sejtjei közötti heterogenitás) kiemelten vizsgált jelenségek napjainkban, melyek

az ALL-t vizsgáló tanulmányokban is egyre több figyelmet kapnak (171,172). A genetikai heterogenitás háttérben valószínűsíthetően fontos szerepet játszik a tumor-összejt modell és a klonális evolúciós modell, illetve a két jelenség kombinációja. A tumor összejt modell a malignus sejtszoptok hierarchikus szerveződését jelenti, melyben a legéretlenebb, összejt-szerű tumorsejtek állnak a malignus differenciáció hierarchikus rendszerének a csúcsán. A klonális evolúciós modell szerint a különböző sejtek mutáció-halmazása határozza meg az egyes szubklónok növekedésének sikerét. A heterogenitásnak fontos klinikai következményei lehetnek: az eltérő mutációkkal rendelkező szubpopulációk elősegíthetik a változó környezethez (pl. kemoterápia) való tumor-adaptációt és szerepet játszhatnak a terápia-rezisztencia, illetve a relapszus kialakulásában. Aneuploid malignitások esetén az aneuploiditás egyfelől lehet stabil (a tumor-fejlődés valamely pontján kromoszóma szegregációs zavar következtében egy stabilan propagáló kóros kariotípus jön létre). Másfelől az aneuploiditás kromoszóma-instabilitás következtében is kialakulhat, amit a mitózisok során létrejövő, fokozott mértékű kromoszómaszám változás (többség vagy hiány) jellemez, mely instabil kariotípust, sejt-sejt variabilitást és komplex szubklonális architektúrát eredményez. Ez utóbbi jelenséget HeH ALL esetén korábban Blandin és Betts munkacsoportja is tanulmányozta, mi magunk is észleltük, de további vizsgálatok szükségesek a prognosztikai jelentőség pontos karakterizálása céljából (173-175).

iFISH vizsgálatunkkal egy igen kedvező prognosztikai alcsoportot azonosítottunk: az iMN₈ 55-56 betegcsoportban kedvezőtlen klinikai rizikófaktorok jelenléte ellenére is 95,2%-os volt az öt éves teljes túlélés. Az iMN₈ 51-54 és az iMN₈ 55-56 csoport között a jelentős túlélésbeni különbség mellett a kariotípus szerinti szubklonális heterogenitást illetően is szignifikáns különbséget észleltünk. Ugyanakkor az iMN₈ által meghatározott modális szám nem bizonyult független prognosztikai paraméternek: többszemponos analízis során a legpozitívabb prediktív értéke a 4-es kromoszóma kópiaszám-növekedésének volt (5 éves pEFS 86,8%, p=0,006 és 5 éves pOS: 92,1%, p=0,002). Mi állhat ennek a jelenségnek a háttérben?

Minél „agresszívabb” tulajdonságú egy daganat, annál nagyobb veszélyt jelent a betegre nézve, ugyanakkor nagyobb a tumorsejt nekrozis, tumorsejt pusztulás esélye is. Az iMN₈ 55-56 alcsoport kedvező prognózisa valószínűsíthetően a két esemény közötti egyensúlyt reprezentálja, melyet az is erősen alátámaszt, hogy a HeH leukémiákon belül az 55-ös modális szám a leggyakoribb, mind a saját iFISH vizsgálatunkban és a több évtized alatt végzett számos konvencionális citogenetikai vizsgálatban is (3. ábra, 57,66,72). Feltehetőleg ezen leukémiákban valósul meg legoptimálisabban a „gazdaszervezet” és a malignus sejtpopuláció együttélése. Valószínűsíthető, hogy a specifikus kromoszóma-többletek (azaz géntöbbletek,

„gene dosage”) miatt kialakuló genetikai instabilitás következtében a leukémiás sejtek propagációjának kedvezőbbek a feltételei, sikeres növekedési kapacitással rendelkeznek. Ugyanakkor terápiára jól reagálnak, melynek egy lehetséges magyarázata a szubklonális mintázatukban kereshető. A szubklonális analízis során azt tapasztaltuk, hogy a HeH leukémia kialakulása során a leukemogenezis lehet komplex, elágazó jellegű, illetve egyszerűbb, célirányosabb mintázatú is. Az iMN₈ 55-56 alcsoportban az egyedi szubklónok átlagos száma szignifikánsan alacsonyabb volt és mintázatuk egyszerűbb, célirányosabb, kevésbé komplex az iMN₈ 51-54 alcsoportéhoz képest (12. ábra). Mindez kedvezőbb klinikai kimenetelt eredményezhet azon teoretikus gondolatmenet alapján, mely szerint egy komplexebb, „többarcú” ellenféllel való küzdelem a sejtszintű harcban is kevésbé sikeres.

Bár a magas modális szám kedvezőbb kimenetellel társult, nem ez volt a döntő faktor a teljes túlélést illetően. Nagyobb jelentőségű a 4-es kromoszóma kópiaszám-növekedése: beteganyagunkban ez bizonyult az egyetlen független prognosztikai tényezőnek az összes vizsgált klinikai és citogenetikai prognosztikai tényező közül. Eredményeink háttérben felmerül annak a lehetősége, hogy az extra 4-es kromoszómának specifikus, proliferációt serkentő és proliferációt gátló gének működése tulajdonítható, mely összességében csökkenti a sejt túlélési kapacitását.

Mi lehet a magyarázata annak, hogy az iMN₈ alapú startifikáció nem független a 4-es kromoszóma triszómiától? Csoportanalízis azt igazolta, hogy a többlet kromoszómák lépcsőzetesen kialakuló hierarchikus rendjében a 4-es kromoszóma többlete képezi a legkisebb független csoportot és mindig a dendrogram-fa tetejét, a nyolcadik „ágát” alkotja (14. ábra). Statisztikai alapon tehát az a legvalószínűbb, hogy hét kromoszóma többletének a kialakulása előzi meg a 4-es kromoszóma triszómia létrejöttét. A modális szám növekedésével a 21-es kromoszóma gyakran tetraszómiássá válik, így végül összesen tehát nyolc kromoszómának kilenc kópiaszám-növekedése észlelhető, ami az 55-ös modális számnak felel meg és valóban, ez a leggyakoribb modális szám a HeH leukémiákban (57,66,72,152). Tehát a 4-es kromoszóma többletének kialakulásával valósul meg az a genetikai konstelláció, ami a leggyakrabban észlelt modális számot eredményezi a HeH csoportban, ezért feltehetően ez a legkedvezőbb a limfoblasztok számára, illetve ez jelenti a legkedvezőbb gazda-tumorsejt interakciót.

Eredményeink alátámaszják az egyes, specifikus többlet kromoszómák prognosztikai jelentőségét magasan hiperdiploid akut limfoblasztos leukémiában. A modális szám jelentősége másodlagosnak tűnik, tekintettel arra, hogy a többlet kromoszómák kialakulása konzekvens, hierarchikus rendet mutat.

Vizsgálatunk több tekintetben is hagy maga után kívánalmakat. Az ALL BFM 1995 és 2002 protokollok a terápiára adott válasz megítélése során a remisszió kritériumának - az extramedulláris érintettség hiányán túl - az 5% alatti csontvelői blasztarányt tekintették. Napjaink korszerű kezelési protokolljaiban a minimális reziduális betegség 10^{-3} - 10^{-5} nagyságrendben történő meghatározása minden citogenetikai alcsoportban nagy jelentőségű, ezért a jövőben HeH betegek prognosztikai tényezőinek elemzése során ezt is figyelembe kell vennünk.

Bár több, mint tíz év beteganyagát vizsgáltuk, a statisztikai értékelés szempontjából a minta nagysága viszonylag kicsi volt, ennek megfelelően eredményeinket óvatosan kell, hogy értékeljük. Fontos célunk a jövőben, hogy a feltárt komplex szubklonális heretogenitás jelenségét és jelentőségét további, nagyobb esetszámú vizsgálatban is analizáljuk. Reményeink szerint ez hozzájárul majd ezen gyakori citogenetikai alcsoport kialakulásának, kórlefolyásának és prognosztikai jellegzetességeinek mélyebb megismeréséhez, mely legfontosabb célként a betegek optimálisabb kezelését eredményezheti.

6. Az új eredmények összefoglalása

1. Munkacsoportunk első alkalommal végzett és publikált valódi korrelált, nyolc kromoszómára kiterjedő, egysejtszintű vizsgálatot gyermekkori prekursor-B-sejtes akut limfoblasztos leukémia diagnosztikus csontvelőmintáin. Interfázis FISH vizsgálattal 214 beteg esetében mintánként legalább 300 sejtet vizsgáltunk, az érintett kromoszómák (4, 6, 10, 14, 17, 18, 21, X) kópiaszámát rögzítettük, egysejtszintű korrelált adatbázist hoztunk létre.

2. A nyolc kromoszóma többletének iFISH vizsgálatával meghatározott modális szám (iMN_8) alapján 48 beteget azonosítottunk a magasan hiperdiploid alcsoportban (HeH ALL, $iMN_8 \geq 51$). Ezen betegek releváns klinikai és prognosztikai jellemzőit adatbázisba foglaltuk.

3. Igazoltuk, hogy a HeH csoporton belül prognosztikai jelentősége van a modális kromoszómaszámnak: a legmagasabb modális számmal (iMN_8 55–56) jellemezhető alcsoportnál szignifikánsan kedvezőbb volt a túlélés (OS: 95,2%). Azt tapasztaltuk, hogy a triszómiák / kombinált triszómiák közül a 4-es, illetve a 4-6, 4-10, 4-17, 4-18, 4-10-17 és 4-10-18 kombinációk jelenléte volt prognosztikai szempontból releváns a kedvezőbb eseménymentes-, teljes túlélés, vagy mindkettő vonatkozásában. Multivariancia analízis során az életkor, fehérvérsejtszám, a nem, az iMN_8 érték valamint az izolált vagy kombinált numerikus aberrációk közül egyedül az izolált 4-es kromoszóma-többlet bizonyult pozitív, magasan szignifikáns és független változónak a teljes túlélés vonatkozásában.

4. Az egyes HeH leukémia mintákon belül masszívan heterogén szubklonális architektúrát igazoltunk. Mintánként átlagosan 9,9 szubklónt azonosítottunk, a domináns klónok a tumorsejteknek mindössze átlagosan 34%-át alkották. Mindez ellentétben áll a nemzetközi szakmai körökben domináló állásponttal, mely konvencionális citogenetikai vizsgálatra alapozva lényegében monoklonális entitásnak tekinti a HeH ALL-t.

A kromoszómaszám szerinti szubklónok eloszlását illetően változatos mintázatot tapasztaltunk a magasan hiperdiploid csoporton belül. A leggyakoribb a haranggörbe alakzat volt, mely a magasabb modális számú, iMN_8 55–56 csoportnál kisebb heterogenitásra utaló keskenyebb alappal rendelkezett, mint az iMN_8 51-54 csoportnál.

Az egyes betegmintákon belül az egyedi kariotípus szubklónok mintázatát illetően is jelentős heterogenitást tártunk fel. Hálózat-analízis során kevésbé komplex képet és szignifikánsan kevesebb egyedi kariotípust reprezentáló szubklónt mutattunk ki az iMN₈ 55–56 csoportban, az iMN₈ 51-55 csoporthoz képest. Az egyszerűbb, célirányosabb, kevésbé komplex szubklonális architektúra kedvezőbb klinikai kimenetellel volt összefüggésbe hozható.

Csoportanalízissel a kromoszómák kópiaszám-növekedésének hierarchikus rendjét igazoltuk: a legkorábbi események a csoportfa alját képező 21, X és 14-es kromoszómákat érintik, a 4-es kromoszóma többlete pedig a legkisebb független csoportot képezte és mindig a dendogram-fa tetejét, a 8. „ágát” alkotta. A hálózat- és csoportanalízis azt támasztotta alá, hogy a HeH leukémiákon belül a kromoszóma-többletek kialakulása döntően (90%-ban) egymás után követoző, szekvenciális mutációs lépések következménye.

7. Irodalomjegyzék

1. Jakab Zs, Garami M. Magyar Gyermekonkológiai Hálózat: Országos Gyermektumor Regiszter. Gyermekgyógyászati Továbbképző szemle. 2018;1:19-23.
2. Farber S, Diamond LK, Mercer RD, Sylvester RF, Wolf JA. Temporary remissions in acute leukemia in children produced by folic acid antagonist, 4-aminopteroyl-glutamic acid (aminopteryn). *N Engl J Med.* 1948;238:787-93.
3. Frei E, Karon M, Levin RH, Freireich EJ, Taylor RJ et al. The effectiveness of combinations of antileukemic agents in inducing and maintaining remission in children with acute leukemia. *Blood.* 1965;5:642-56.
4. Aur RJ, Simone J, Hustu HO, Walters T, Borella L et al. Central nervous system therapy and combination chemotherapy of childhood lymphocytic leukemia. *Blood.* 1971;37:272-81.
5. Simone J, Aur RJ, Hustu HO, Pinkel D. "Total therapy" studies of acute lymphocytic leukemia in children. Current results and prospects for cure. *Cancer.* 1972;6:1488-94.
6. Pui CH, Yang JJ, Bhakta N, Rodriguez-Galindo C. Global efforts toward the cure of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Lancet Child Adolesc Health.* 2018;2:440-54.
7. Hunger SP, Mullighan CG. Acute lymphoblastic leukemia in children. *N Engl J Med.* 2015;373:1541-52.
8. Schuler D. Systemizing childhood cancer care in Hungary: twenty-five years of progress. *Med Pediatr Oncol.* 1999;32:68-70.
9. Jakab Zs, Juhasz A, Nagy Cs, Schuler D, Garami M and the Hungarian Paediatric Haemato-Oncology Network. Trends and territorial inequalities of incidence and survival of childhood leukaemia and their relations to socioeconomic status in Hungary, 1971–2015. *Eur J Cancer Prev.* 2017;26:S183-90.
10. Grabow D, Kaiser M, Hjorth L, Byrne J, Alessi D et al. A PanCareSurFup Consortium. The PanCareSurFup cohort of 83,333 five-year survivors of childhood cancer: a cohort from 12 European countries. *Eur J Epidemiol.* 2018;33:335-49.
11. Kızılocak H, Ocku F. Late Effects of Therapy in Childhood Acute Lymphoblastic Leukaemia Survivals. *Turk J Haematol.* 2019;36:1-11.
12. Ribeiro RC, Pui CH. Prognostic factors in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Hematol Pathol.* 1993;7:121-42.
13. Moricke A, Zimmermann M, Reiter A, Henze G, Schrauder A et al. Longterm results of five consecutive trials in childhood acute lymphoblastic leukemia performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 2000. *Leukemia.* 2010;24:265-84.

14. Crist W, Pullen J, Boyett J, Falletta J, van Eys J et al. Clinical and biologic features predict a poor prognosis in acute lymphoid leukemias in infants: a Pediatric Oncology Group Study. *Blood*. 1986;67:135-40.
15. Mann G, Attarbaschi A, Schrappe M, De Lorenzo P, Peters C et al. Interfant-99 Study Group. Improved outcome with hematopoietic stem cell transplantation in a poor prognostic subgroup of infants with mixed-lineage-leukemia (MLL)-rearranged acute lymphoblastic leukemia: results from the Interfant-99 Study. *Blood*. 2010;116:2644-50.
16. Schrappe M, Reiter A, Zimmermann M, Harbott J, Ludwig WD et al. Long-term results of four consecutive trials in childhood ALL performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 1995. Berlin-Frankfurt-Munster. *Leukemia*. 2000;14:2205-22.
17. Schultz KR, Pullen DJ, Sather HN, Shuster JJ, Devidas M et al. Risk- and response-based classification of childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia: a combined analysis of prognostic markers from the Pediatric Oncology Group (POG) and Children's Cancer Group (CCG). *Blood*. 2007;109:926-35.
18. Pui CH, Yang JJ, Hunger SP, Pieters R, Schrappe M et al. Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: Progress Through Collaboration. *J Clin Oncol*. 2015;33:2938-48.
19. Schwab C, Harrison C. Advances in B-cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia Genomics. *Haemasphere*. 2018;52:5-7.
20. Pui CH, Nichols KE, Yang JJ. Somatic and germline genomics in paediatric acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Rev Clin Oncol*. 2019;16:227-40.
21. Stary J, Zuna J, Zaliova M. New biological and genetic classification and therapeutically relevant categories in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *F1000 Research*. 2018;7:1569.
22. Wiemels JL, Cazzaniga G, Daniotti M, Eden OB, Addison GM et al. Prenatal origin of acute lymphoblastic leukaemia in children. *Lancet*. 1999;354:1499-1503.
23. Forestier E, Heyman M, Andersen MK, Autio K, Blennow E et al. Outcome of ETV6/RUNX1-positive childhood acute lymphoblastic leukaemia in the NOPHO-ALL-1992 protocol: frequent late relapses but good overall survival. *Br J Haematol*. 2008;140:665-72.
24. Pieters R, De Lorenzo P, Ancliffe P, Aversa LA, Brethon B et al. Outcome of Infants Younger Than 1 Year With Acute Lymphoblastic Leukemia Treated With the Interfant-06 Protocol: Results From an International Phase III Randomized Study. *J Clin Oncol*. 2019;37:2246-6.
25. Minson KA, Prasad P, Vear S, Borinstein S, Ho R et al. t(17;19) in Children with Acute Lymphocytic Leukemia: A Report of 3 Cases and a Review of the Literature. *Case Rep Hematol*. 2013; 563291.

26. Biondi A, Schrappe M, De Lorenzo P, Castor A, Lucchini G et al. Imatinib after induction for treatment of children and adolescents with Philadelphia-chromosome-positive acute lymphoblastic leukaemia (EsPhALL): a randomised, open-label, intergroup study. *Lancet Oncol.* 2012;13:936-45.
27. Jain SP, Abraham A. BCR-ABL1-like B-Acute Lymphoblastic Leukemia/Lymphoma: A Comprehensive Review. *Arch Pathol Lab Med.* 2020;144:150-5.
28. Zaliova M, Kotrova M, Bresolin S, Stuchly J, Stary J et al. ETV6/RUNX1-like acute lymphoblastic leukemia: A novel B-cell precursor leukemia subtype associated with the CD27/CD44 immunophenotype. *Genes Chromosomes Cancer.* 2017;56:608-16.
29. Zhang J, McCastlain K, Yoshihara H, Xu B, Chang Y et al, St. Jude Children's Research Hospital–Washington University Pediatric Cancer Genome Project. Deregulation of DUX4 and ERG in acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet.* 2016;48:1481-9.
30. Hirabayashi S, Ohki K, Nakabayashi K, Ichikawa H, Momozawa Y et al. Tokyo Children's Cancer Study Group (TCCSG). ZNF384-related fusion genes define a subgroup of childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia with a characteristic immunotype. *Haematologica.* 2017;102:118-29.
31. Gu Z, Churchman M, Roberts K, Li Y, Liu Y et al. Genomic analyses identify recurrent MEF2D fusions in acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Commun.* 2016;7:13331.
32. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood.* 2016;127:2391-405.
33. Harrison CJ, Moorman AV, Schwab C, Carroll AJ, Raetz EA et al. An international study of intrachromosomal amplification of chromosome 21 (iAMP21): cytogenetic characterization and outcome. *Leukemia.* 2014;28:1015-21.
34. Fournier B, Balducci E, Duployez N, Clappier E, Cuccuini W et al. B-ALL With t(5;14)(q31;q32); IGH-IL3 Rearrangement and Eosinophilia: A Comprehensive Analysis of a Peculiar IGH-Rearranged B-ALL. *Front Oncol.* 2019;9:1374.
35. Patrick K, Wade R, Goulden N, Mitchell C, Moorman AV et al. Outcome for children and young people with Early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia treated on a contemporary protocol, UKALL 2003. *Br J Haematol.* 2014;166:421-4.
36. Egyed B, Kovács G, Kutszegi N, Rzepiel A, Csányiné Sági J és mtsai. Új és hagyományos irányok a gyermekkori acut lymphoblastos leukaemia biológiájában és ellátásában. *Orvosi hetilap.* 2018;159:786-97.
37. Swerdlow S, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissue. Lyon:IARC. 2017.

38. Raimondi SC, Zhou Y, Shurtleff SA, Rubnitz JE, Pui CH et al. Near-triploidy and near-tetraploidy in childhood acute lymphoblastic leukemia: association with B-lineage blast cells carrying the ETV6-RUNX1 fusion, T-lineage immunophenotype, and favorable outcome. *Cancer Genet Cytogenet.* 2006;169:50-7.
39. Lemez P, Attarbaschi A, Béné MC, Bertrand Y, Castoldi G et al. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). Childhood near-tetraploid acute lymphoblastic leukemia: an EGIL study on 36 cases. *Eur J Haematol.* 2010;85:300-8.
40. Harrison CJ, Moorman AV, Broadfield ZJ, Cheung KL, Harris RL et al, Childhood and Adult Leukaemia Working Parties. Childhood and Adult Leukaemia Working Parties. Three distinct subgroups of hypodiploidy in acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol.* 2004;125:552-9.
41. Pui CH, Rebora P, Schrappe M, Attarbaschi A, Baruchel A et al, Ponte di Legno Childhood ALL Working Group. Outcome of Children With Hypodiploid Acute Lymphoblastic Leukemia: A Retrospective Multinational Study. *J Clin Oncol.* 2019;37:770-9.
42. Holmfeldt L, Wei L, Diaz-Flores E, Walsh M, Zhang J et al. The genomic landscape of hypodiploid acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet.* 2013;45:242-52.
43. Mühlbacher V, Zenger M, Schnittger S, Weissmann S, Kunze F et al. Acute lymphoblastic leukemia with low hypodiploid/near triploid karyotype is a specific clinical entity and exhibits a very high TP53 mutation frequency of 93%. *Genes Chromosomes Cancer.* 2014;53:524-36.
44. Powell BC, Jiang L, Muzny DM, Treviño LR, Dreyer ZE et al. Identification of TP53 as an Acute Lymphocytic Leukemia Susceptibility Gene Through Exome Sequencing. *Pediatr Blood Cancer.* 2013;60:E1–E3.
45. Safavi S, Paulsson P. Near-haploid and low-hypodiploid acute lymphoblastic leukemia: two distinct subtypes with consistently poor prognosis. *Blood.* 2017;129:420-3.
46. Carroll AJ, Shago M, Mikhail FM, Raimondi SC, Hirsch BA et al. Masked hypodiploidy: Hypodiploid acute lymphoblastic leukemia (ALL) mimicking hyperdiploid ALL in children: A report from the Children's Oncology Group. *Cancer Genet.* 2019;238:62-8.
47. Mitchell HR, Lu X, Myers RM, Sung L, Balsamo LM et al. Prospective, longitudinal assessment of quality of life in children from diagnosis to 3 months off treatment for standard risk acute lymphoblastic leukemia: results of Children's Oncology Group study AALL0331. *Int J Cancer.* 2016;138:332-9.
48. Starza ID, Chiaretti S, De Propriis MS, Elia L, Cavalli M et al. Minimal Residual Disease in Acute Lymphoblastic Leukemia: Technical and Clinical Advances. *Front. Oncol.* 2019;9:726.

49. van Dongen JJ, van der Velden VH, Brüggemann M, Orfao A. Minimal residual disease diagnostics in acute lymphoblastic leukemia: need for sensitive, fast, and standardized technologies. *Blood*. 2015;125:3996-4009.
50. Campana D, Pui CH. Minimal residual disease-guided therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2017;129:1913-8.
51. Conter V, Bartram CR, Valsecchi MG, Schrauder A, Panzer-Grümayer R et al. Molecular response to treatment redefines all prognostic factors in children and adolescents with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: results in 3184 patients of the AIEOP-BFM ALL 2000 study. *Blood*. 2010;115:3206-14.
52. Basso G, Veltroni M, Valsecchi MG, Dworzak MN, Ratei R et al. Risk of relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia is predicted by flow cytometric measurement of residual disease on day 15 bone marrow. *J Clin Oncol*. 2009;27:5168-74.
53. Health Quality Ontario. Minimal residual disease evaluation in childhood acute lymphoblastic leukemia: a clinical evidence review. *Ont Health Technol Assess Ser* 2016;16:1-52.
54. Pieters R, de Groot-Kruseman H, Van der Velden V, Fiocco M, Van Den Berg HM et al. Successful therapy reduction and intensification for childhood acute lymphoblastic leukemia based on minimal residual disease monitoring: Study ALL10 From the Dutch Childhood Oncology Group. *J Clin Oncol*. 2016;34:2591-601.
55. Vora A, Goulden N, Mitchell C, Hancock J, Hough R et al. Augmented post-remission therapy for a minimal residual disease-defined high-risk subgroup of children and young people with clinical standard-risk and intermediate-risk acute lymphoblastic leukaemia (UKALL 2003): a randomised controlled trial. *Lancet Oncol*. 2014;15:809-18.
56. Paulsson K, Johansson B. High hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*. 2009;48:637-60.
57. Moorman AV, Richards SM, Martineau M, Cheung KL, Robinson HM et al. United Kingdom Medical Research Council's Childhood Leukemia Working Party. Outcome heterogeneity in childhood high-hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2003;102:2756-62.
58. Zaliouva M, Hovorkova L, Vaskova M, Hrusak O, Stary J et al. Slower early response to treatment and distinct expression profile of childhood high hyperdiploid acute lymphoblastic leukaemia with DNA index < 1.16. *Genes Chromosomes Cancer*. 2016;55:727-37.

59. Lamper F. Cellulärer DNS-Gehalt un Chromosomenzahl bei der akuten Leukämie im Kindesalter und ihre Bedeutung für Chemotherapie und Prognose. *Klin. Wochenschr.* 1967; 45:763-8.
60. Kaneko Y, Hayashi Y, Sakurai M. Chromosomal findings and their correlation to prognosis in acute lymphocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet.* 1981;4:227-35.
61. Kaneko Y, Rowley JD, Variakojis D, Chilcote RR, Check I et al. Correlation of karyotype with clinical features in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res.* 1982;42:2918-29.
62. Look AT, Melvin SL, Williams DL, Brodeur GM, Dahl GV et al. Aneuploidy and percentage of S-phase cells determined by flow cytometry correlate with cell phenotype in childhood acute leukemia. *Blood.* 1982;60:959-67.
63. Kowalczyka JR, Grossib M, Sandberg AA. Cytogenetic findings in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet.* 1985;15:47-64.
64. Smets LA, Slater RM, Behrendt H, Van't Veer MB, Homan-Blok J. Phenotypic and karyotypic properties of hyperdiploid acute lymphoblastic leukaemia of childhood. *Br J Haematol.* 1985;61:113-23.
65. Heerema NA, Palmer CG, Baehner RL. Karyotypic and clinical findings in a consecutive series of children with acute lymphocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet.* 1985;17:165-79.
66. Williams DL, Tsiatis A, Brodeur GM, Look AT, Melvin SL et al. Prognostic importance of chromosome number in 136 untreated children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 1982;60:864-71.
67. Studd JB, Vijaykrishnan J, Yang M, Migliorini G, Paulsson K et al. Genetic and regulatory mechanism of susceptibility to high-hyperdiploid acute lymphoblastic leukaemia at 10p21.2. *Nat Commun.* 2017;8:14616.
68. Paulsson K, Forestier E, Lilljebjörn H, Heldrup J, Behrendtz M et al. Genetic landscape of high hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010;107:21719-24.
69. Heerema NA, Raimondi SC, Anderson JR, Biegel J, Camitta BM et al. Specific extra chromosomes occur in a modal number dependent pattern in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer.* 2007;46:684-93.

70. Kawamata N, Ogawa S, Zimmermann M, Kato M, Sanada M et al. Molecular allelokaryotyping of pediatric acute lymphoblastic leukemias by high-resolution single nucleotide polymorphism oligonucleotide genomic microarray. *Blood*. 2008;111:776-84.
71. Mullighan CG, Goorha S, Radtke I, Miller CB, Coustan-Smith E et al. Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature*. 2007;446:758-64.
72. Raimondi SC, Pui CH, Hancock ML, Behm FG, Filatov L et al. Heterogeneity of hyperdiploid (51 - 67) childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 1996;10:213-24.
73. Mitelman F, Johansson B, Mertens F. Mitelman database of chromosome aberrations and gene fusions in cancer. Available at: <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman> 2012.
74. Paulsson K, Forestier E, Andersen MK, Autio K, Barbany G et al. Nordic Society of Pediatric Hematology and Oncology (NOPHO); Swedish Cytogenetic Leukemia Study Group (SCLSG); NOPHO Leukemia Cytogenetic Study Group (NLCESG). High modal number and triple trisomies are highly correlated favorable factors in childhood B-cell precursor high hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia treated according to the NOPHO ALL 1992/2000 protocol. *Haematologica*. 2013;98:424-32.
75. Davidsson J, Andersson A, Paulsson K, Heidenblad M, Isaksson M et al. Tiling resolution array comparative genomic hybridization, expression and methylation analyses of dup(1q) in Burkitt lymphomas and pediatric high hyperdiploid acute lymphoblastic leukemias reveal clustered near-centromeric breakpoints and overexpression of genes in 1q22-32.3. *Hum Mol Genet*. 2007;16:2215-25.
76. Armstrong SA, Mabon ME, Silverman LB, Li A, Gribben JG et al. FLT3 mutations in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2004;103:3544-6.
77. Taketani T, Taki T, Sugita K, Furuichi Y, Ishii E et al. FLT3 mutations in the activation loop of tyrosine kinase domain are frequently found in infant ALL with MLL rearrangements and pediatric ALL with hyperdiploidy. *Blood*. 2004;103:1085-8.
78. Tartaglia M, Martinelli S, Cazzaniga G, Cordeddu V, Iavarone I et al. Genetic evidence for lineage-related and differentiation stage-related contribution of somatic PTPN11 mutations to leukemogenesis in childhood acute leukemia. *Blood*. 2004;104:307-13.
79. Wiemels JL1, Zhang Y, Chang J, Zheng S, Metayer C et al. RAS mutation is associated with hyperdiploidy and parental characteristics in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2005;19:415-9.
80. Paulsson K, Jonson T, Ora I, Olofsson T, Panagopoulos I et al. Characterisation of genomic translocation breakpoints and identification of an alternative TCF3/PBX1 fusion transcript in t(1;19)(q23;p13)-positive acute lymphoblastic leukaemias. *Br J Haematol*. 2007;138:196-201.

81. Malinowska-Ozdowy K, Frech C, Schönegger A, Eckert C, Cazzaniga G et al. KRAS and CREBBP mutations: a relapse-linked malicious liaison in childhood high hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2015;29:1656-67.
82. de Smith AJ, Ojha J, Francis SS, Sanders E, Endicott AA et al. Clonal and microclonal mutational heterogeneity in high hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia. *Oncotarget*. 2016;7:72733-45.
83. Molteni CG, Te Kronnie G, Bicciato S, Villa T, Tartaglia M et al. PTPN11 mutations in childhood acute lymphoblastic leukemia occur as a secondary event associated with high hyperdiploidy. *Leukemia*. 2010;24:232-5.
84. Inthal A, Zeitlhofer P, Zeginigg M, Morak M, Grausenburger R et al. CREBBP HAT domain mutations prevail in relapse cases of high hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2012;26:1797-803.
85. Davidsson J, Paulsson K, Lindgren D, Lilljebjörn H, Chaplin T et al. Relapsed childhood high hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia: presence of preleukemic ancestral clones and the secondary nature of microdeletions and RTK-RAS mutations. *Leukemia*. 2010;24:924-31.
86. Kiss R, Gángó A, Benard-Slagter A, Egyed B, Haltrich I et al. Comprehensive profiling of disease-relevant copy number aberrations for advanced clinical diagnostics of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Mod Pathol*. 2020;33:812-24.
87. Forestier E, Schmiegelow K; Nordic Society of Paediatric Haematology and Oncology NOPHO. The incidence peaks of the childhood acute leukemias reflect specific cytogenetic aberrations. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2006;28:486-95.
88. Chilton L, Buck G, Harrison CJ, Ketterling RP, Rowe JM et al. High hyperdiploidy among adolescents and adults with acute lymphoblastic leukaemia (ALL): cytogenetic features, clinical characteristics and outcome. *Leukemia*. 2014;28:1511-8.
89. Pui CH, Raimondi SC, Dodge RK, Rivera GK, Fuchs LA et al. Prognostic importance of structural chromosomal abnormalities in children with hyperdiploid (greater than 50 chromosomes) acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1989;73:1963-7.
90. Heerema NA, Sather HN, Sensel MG, Zhang T, Hutchinson RJ et al. Prognostic impact of trisomies of chromosomes 10, 17, and 5 among children with acute lymphoblastic leukemia and high hyperdiploidy (> 50 chromosomes). *J Clin Oncol*. 2000;18:1876-87.
91. Forestier E, Johansson B, Borgström G, Kerndrup G, Johannsson J et al. The NOPHO Leukemia Cytogenetic Study Group. Cytogenetic findings in a population-based series of 787 childhood acute lymphoblastic leukemias from the Nordic countries. *European Journal of Haematology*. 2008;64:194-200.
92. Sharathkumar A, DeCamillo D, Bhambhani K, Cushing B, Thomas R et al. Children with hyperdiploid but not triple trisomy (+4,+10,+17) acute lymphoblastic leukemia have an

increased incidence of extramedullary relapse on current therapies: a single institution experience. *Am J Hematol.* 2008;83:34-40.

93. Dastugue N, Suciú S, Plat G, Speleman F, Cavé H et al. Hyperdiploidy with 58-66 chromosomes in childhood B-acute lymphoblastic leukemia is highly curable: 58951 CLG-EORTC results. *Blood.* 2013;121:2415-23.

94. Kato M, Imamura T, Manabe A, Hashii Y, Koh K et al. Prognostic impact of gained chromosomes in high-hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukaemia: a collaborative retrospective study of the Tokyo Children's Cancer Study Group and Japan Association of Childhood Leukaemia Study. *Br J Haematol.* 2014;166:295-8.

95. Djokic M, Björklund E, Blennow E, Mazur J, Söderhäll S et al. Overexpression of CD123 correlates with the hyperdiploid genotype in acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica.* 2009;94:1016-19.

96. Enshaei A, Schwab C, Chilton L, Wade R, Hancock J et al. Risk factor analysis in pediatric acute lymphoblastic leukemia with high hyperdiploidy. 57th International Meeting of the American Society of Hematology, San Francisco, CA. 2015.

97. Reismüller B, Steiner M, Pichler H, Dworzak M, Urban C et al. On behalf of the Austrian ALL-BFM (Berlin-Frankfurt-Münster) Study Group. High hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia (ALL) - A 25-year population-based survey of the Austrian ALL-BFM (Berlin-Frankfurt-Münster) Study Group. *Pediatr Blood Cancer.* 2016;00:1-8.

98. Norén-Nyström U, Roos G, Bergh A, Botling J, Lönnerholm G et al. Bone marrow fibrosis in childhood acute lymphoblastic leukemia correlates to biological factors, treatment response and outcome. *Leukemia.* 2008;22:504-10.

99. Jackson JF, Boyett J, Pullen J, Brock B, Patterson R et al. Favorable prognosis associated with hyperdiploidy in children with acute lymphocytic leukemia correlates with extra chromosome 6. A Pediatric Oncology Group study. *Cancer.* 1990;66:1183-9.

100. Harris MB, Shuster JJ, Carroll A, Look AT, Borowitz MJ et al. Trisomy of leukemic cell chromosomes 4 and 10 identifies children with B-progenitor cell acute lymphoblastic leukemia with a very low risk of treatment failure: a Pediatric Oncology Group study. *Blood.* 1992;79:3316-24.

101. Sutcliffe MJ, Shuster JJ, Sather HN, Camitta BM, Pullen J et al. High concordance from independent studies by the Children's Cancer Group (CCG) and Pediatric Oncology Group (POG) associating favorable prognosis with combined trisomies 4, 10, and 17 in children with NCI Standard-Risk B-precursor Acute Lymphoblastic Leukemia: a Children's Oncology Group (COG) initiative. *Leukemia.* 2005;19:734-40.

102. Moorman AV, Ensor HM, Richard SM, Chilton L, Schwab C et al. Prognostic effect of chromosomal abnormalities in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia: Results from the UK Medical Research Council ALL97/99 randomised trial. *Lancet Oncol.* 2010;11:429-43.
103. Paulsson K, Forestier E, Lilljebjörn H, Heldrup J, Behrendtz M et al. Genetic landscape of high hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107:21719-24.
104. Paulsson K, Lilljebjörn H, Biloglav A, Olsson L, Rissler M et al. The genomic landscape of high hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet.* 2015;47:672-6.
105. Chen C, Bartenhagen C, Gombert M, Okpanyi V, Binder V et al. Next-generation-sequencing of recurrent childhood high hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia reveals mutations typically associated with high risk patients. *Leuk Res.* 2015;39:990-1001.
106. Clappier E, Grardel N, Bakkus M, Rapon J, Moerloose BD et al. IKZF1 deletion is an independent prognostic marker in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia, and distinguishes patients benefiting from pulses during maintenance therapy: results of the EORTC Children's Leukemia Group study 58951. *Leukemia.* 2015;29:2154-61.
107. Hamadeh L, Enhssaei A, Schwab C, Alonso CN, Attarbaschi A et al. Validation of the United Kingdom copy-number alteration classifier in 3239 children with B-cell precursor ALL. *Blood Adv.* 2019;3:148-57.
108. Greaves M. In utero origins of childhood leukaemia. *Early Hum Develop.* 2005;81:123-9.
109. Bateman CM, Alpar D, Ford AM, Colman SM, Wren D et al. Evolutionary trajectories of hyperdiploid ALL in monozygotic twins. *Leukemia.* 2015;29:58-65.
110. Wiemels JL, Kang M, Chang JS, Zheng L, Kouyoumji C et al. Backtracking RAS mutations in High Hyperdiploid Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Blood Cells Mol Dis.* 2010;45:186-91.
111. Gale KB, Ford AM, Repp R, Borkhardt A, Keller C et al. Backtracking leukemia to birth: identification of clonotypic gene fusion sequences in neonatal blood spots. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997;94:13950-4.
112. Wiemels JL, Greaves M. Structure and possible mechanisms of TEL-AML1 gene fusions in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res.* 1999; 59:4075-82.

113. Maia AT, Tussiwand R, Cazzaniga G, Rebulli P, Colman S et al. Identification of preleukemic precursors of hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia in cord blood. *Genes Chromosomes Cancer.* 2004;40:38-43.

114. Gruhn B, Taub JW, Ge Y, Beck JF, Zell R et al. Prenatal origin of childhood acute lymphoblastic leukemia, association with birth weight and hyperdiploidy. *Leukemia*. 2008;22:1692-7.
-
115. Panzer-Grümayer ER, Fasching K, Panzer S, Hettinger K, Schmitt K et al. Nondisjunction of chromosomes leading to hyperdiploid childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia is an early event during leukemogenesis. *Blood*. 2002;100:347-9.
116. Taub JW, Konrad MA, Ge Y, Naber JM, Scott JS et al. High frequency of leukemic clones in newborn screening blood samples of children with B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2002;99:2992-6.
117. Paulsson K. High hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukaemia: Chromosomal gains as the main driver event. *Mol Cell Oncol*. 2016;3:e1064555.
118. Onodera N, McCabe NR, Rubin CM. Formation of a hyperdiploid karyotype in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1992;80:203-8.
119. Yang M, Vesterlund M, Siavelis I, Moura-Castro LH, Castor A et al. Proteogenomics and Hi-C reveal transcriptional dysregulation in high hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *Nat Commun*. 2019;10:1519.
120. Pui CH, Pei D, Raimondi SC, Coustan-Smith E, Jeha S et al. Clinical Impact of Minimal Residual Disease in Children with Different Subtypes of Acute Lymphoblastic Leukemia Treated with Response-Adapted Therapy. *Leukemia*. 2017;31:333-9.
121. Menendez P, Molina O. Chromosome Segregation Defects as Early Underlying Pathogenic Mechanism in Hyperdiploid Childhood B-Cell Acute Lymphoblastic Leukaemia. *Experimental Hematology*. 2018;64:S50.
122. Winther JF, Sankila R, Boice JD, Tulinius H, Bautz A et al. Cancer in siblings of children with cancer in the Nordic countries: a population-based cohort study. *Lancet*. 2001;358:711-7.
123. Schmiegelow K, Hjalgrim H. Is the risk of acute lymphoblastic leukemia reduced in siblings to children with the disease? A novel hypothesis explored by international collaboration. *Leukemia*. 2006;20:1206-8.
124. Forestier E, Izraeli S, Beverloo B, Haas O, Pession A et al. Cytogenetic features of acute lymphoblastic and myeloid leukemias in pediatric patients with Down syndrome: An iBFM-SG study. *Blood*. 2008;111:1575-83.
125. Papaemmanuil E, Hosking FJ, Vijayakrishnan J, Price A, Olver B et al. Loci on 7p12.2, 10q21.2 and 14q11.2 are associated with risk of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Nat. Genet*. 2009;41:1006-10.
126. Trevino R, Yang W, French D, Hunger SP, Carroll WL et al. Germline genomic variants associated with childhood acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet*. 2009;41:1001-5.

127. Studd JB, Vijayakrishnan J, Yang M, Migliorini G, Paulsson K et al. Genetic and regulatory mechanism of susceptibility to high-hyperdiploid acute lymphoblastic leukaemia at 10p21.2. *Nat Commun.* 2017;8:14616.
128. Walsh KM, de Smith AJ, Chokkalingam AP, Metayer C, Dahl GV et al. Novel childhood ALL susceptibility locus BMI1-PIP4K2A is specifically associated with the hyperdiploid subtype. *Blood.* 2013;121:4808-9.
129. Woodward EL, Olsson ML, Johansson B, Paulsson K. Allelic variants of PRDM9 associated with high hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol.* 2014;166:947-9.
130. Hussin J, Sinnott D, Casals F, Idaghdour Y, Bruat V et al. Rare allelic forms of PRDM9 associated with childhood leukemogenesis. *Genome Res.* 2013;23:419-30.
131. Moriyama T, Metzger ML, Wu G, Nishii R, Qian M et al. Germline genetic variation in ETV6 and risk of childhood acute lymphoblastic leukaemia: a systematic genetic study. *Lancet Oncol.* 2015;16:1659-66.
132. Rampersaud E, Ziegler DS, Iacobucci I, Payne-Turner D, Churchman ML et al. Germline deletion of ETV6 in familial acute lymphoblastic leukemia. *Blood Adv.* 2019;3:1039-46.
133. de Smith AJ, Lavoie G, Walsh KM, Aujla S, Evans E et al. Predisposing germline mutations in high hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia in children. *Genes Chromosomes Cancer.* 2019;58:723-30.
134. Inaba H, Greaves M, Mullighan CG. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet.* 2013;381:1943-55.
135. Greaves M. A causal mechanism for childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Rev Cancer.* 2018;18:471-84.
136. Ottoffy G, Szigeti E, Bartyik K, Nyari C, Parker L et al. Investigating the relationship between mortality from respiratory diseases and childhood acute lymphoblastic leukaemia in Hungary. *Pathol Oncol Res.* 2015;21:53-7.
137. Amitay EL, Keinan-Boker L. Breastfeeding and Childhood Leukemia Incidence: A Meta-analysis and Systematic Review. *JAMA Pediatr.* 2015;169:e151025.
138. Wiemels JL, Zhang Y, Chang J, Zheng S, Metayer C et al. RAS mutation is associated with hyperdiploidy and parental characteristics in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 2005;19:415-9.

139. Hjalgrim LL, Rostgaard K, Hjalgrim H, Westergaard T, Thomassen T et al. Birth Weight and Risk for Childhood Leukemia in Denmark, Sweden, Norway, and Iceland. *J Natl Cancer Inst.* 2004;96:1549-56.
140. Kaspers GJ, Smets LA, Pieters R, Zantwijk CH, Van Wering ER. Favorable prognosis of hyperdiploid common acute lymphoblastic leukemia may be explained by sensitivity to antimetabolites and other drugs: results of an in vitro study. *Blood.* 1995;85:751-6.
141. Steeghs EMP, Boer JM, Hoogkamer AQ, Boeree A, de Haas V et al. Copy number alterations in B-cell development genes, drug resistance, and clinical outcome in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Nature. Scientific Reports.* 2019;9:4634.
142. Iwamoto S, Mihara K, Downing JR, Pui CH, Campana D. Mesenchymal cells regulate the response of acute lymphoblastic leukemia cells to asparaginase. *J Clin Invest.* 2007;117:1049-57.
143. Andersson A, Olofsson T, Lindgren D, Nilsson B, Ritz C et al. Molecular signatures in childhood acute leukemia and their correlations to expression patterns in normal hematopoietic subpopulations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:19069-74.
144. Lajoie M, Drouin S, Caron M, St-Onge P, Ouimet N et al. Specific expression of novel long non-coding RNAs in high-hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *PLoS One.* 2017;12:e0174124.
145. Whitehead VM, Vuchich MJ, Lauer SJ, Mahoney D, Carroll AJ et al. Accumulation of high levels of methotrexate polyglutamates in lymphoblasts from children with hyperdiploid (greater than 50 chromosomes) B-lineage acute lymphoblastic leukemia: a Pediatric Oncology Group study. *Blood.* 1992;80:1316-23.
146. Zhang L, Taub JW, Williamson M, Wong SC, Hukku B et al. Reduced folate carrier gene expression in childhood acute lymphoblastic leukemia: relationship to immunophenotype and ploidy. *Clin Cancer Res.* 1998;4:2169-77.
147. Ito C1, Kumagai M, Manabe A, Coustan-Smith E, Raimondi SC et al. Hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia with 51 to 65 chromosomes: a distinct biological entity with a marked propensity to undergo apoptosis. *Blood.* 1999;93:315-20.
148. Zhang Y, Lu J, van den Berghe J, Lee SH. Increased incidence of spontaneous apoptosis in the bone marrow of hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *Exp Hematol.* 2002;30:333-9.
149. Holleman A, den Boer ML, de Menezes RX, Cheok MH, Cheng C et al. The expression of 70 apoptosis genes in relation to lineage, genetic subtype, cellular drug resistance, and outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2006;107:769-76.

150. Mörnicke A, Reiter A, Zimmermann M, Gadner H, Stanulla M et al. Risk-adjusted therapy of acute lymphoblastic leukemia can decrease treatment burden and improve survival: Treatment results of 2169 unselected pediatric and adolescent patients enrolled in the trial ALL-BFM 95. *Blood*. 2008;111:4477-89.
151. Stary J, Zimmermann M, Campbell M, Castillo L, Dibar E et al. Intensive chemotherapy for childhood acute lymphoblastic leukemia: results of the randomized intercontinental trial ALL IC-BFM 2002. *J Clin Oncol*. 2014;32:174-84.
152. Alpár D, Pajor G, Varga P, Kajtár B, Póto L et al. Sequential and hierarchical chromosomal changes and chromosome instability are distinct features of high hyperdiploid pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr. Blood Cancer*. 2014;2208-14.
153. Vojcek Á, Pajor G, Alpár D, Mátics R, Póto L et al. Conserved hierarchical gain of chromosome 4 is an independent prognostic factor in high hyperdiploid pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res*. 2017;52:28-33.
154. Alexandrov IA, Yurov YB, Mitkevits S, Gindilis VM. Chromosomal organization of human alphoid DNA. *Dokl Akad Nauk USSR*. 1986;228:242-5.
155. Vorsanova SG, Alexandrov IA, Yurov YB. A list of chromosome-specific centromeric DNA probes tested as a molecular marker for identification of the human chromosomes in molecular and clinical cytogenetic studies. *Cytogenet Cell Genet*. 1989;5:1111-4.
156. Devilee P, Kievits T, Wayne JS, Pearson PL, Willard HF. Chromosome-specific alpha satellite DNA: isolation and mapping of a polymorphic alphoid repeat from human chromosome 10. *Genomics*. 1988;3:1-7.
157. Wayne JS, Willard HF. Molecular analysis of a deletion polymorphism in alpha satellite of human chromosome 17: evidence for homologous unequal crossing-over and subsequent fixation. *Nucl Acids Res*. 1986;14:6915-27.
158. Devilee P, Cremer T, Slagboom P, Bakker E, Scholl HP et al. Two subset of human alphoid repetitive DNA show distinct preferential localization in the pericentric regions of chromosomes 13, 18, and 21. *Cytogenet Cell Genet*. 1986;41:193-201.
159. Cook HJ, Schmidtke J, Gosden JR: Characterisation of a human Y chromosome repeated sequence and related sequences in higher primates. *Chromosoma*. 1982;87:491-502.
160. Pajor L, Szuhai K, Méhes G, Kosztolányi G, Jáksó P et al. Combined metaphase, interphase cytogenetic, and flow cytometric analysis of DNA content of pediatric acute lymphoblastic leukaemia. *Cytometry*. 1998;34:87-94.
161. Wolff DJ, Bagg A, Cooley LD, Dewald GW, Hirsch BA et al. Association for Molecular Pathology Clinical Practice Committee and the American College of Medical Genetics Laboratory Quality Assurance Committee Guidance for Fluorescence in Situ Hybridization Testing in Hematologic Disorders. *J Mol. Diagn*. 2007;9:134-43.

162. Donát A, Kajtár B, Kneif M, Jáksó P, László R et al. 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;173:23-30.
163. Pajor G, Sule N, Alpar D, Kajtar B, Kneif M et al. Increased efficiency of detecting genetically aberrant cells by UroVysion test on voided urine specimens using automated immunophenotypical pre-selection of uroepithelial cells. *Cytometry Part A.* 2008; 73:259-65.
164. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M et al. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol Biol Evol.* 2011;28:2731-9.
165. Bandelt HJ, Forster P, Röhl A.: Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol.* 1999;16:37-48.
166. Alpar D, de Jong D, Savola S, Yigittop H, Kajtár B et al. MLPA is a powerful tool for detecting lymphoblastic transformation in chronic myeloid leukemia and revealing the clonal origin of relapse in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet.* 2012;205:465-9.
167. Gaynon PS, Camitta BC, Matloub Y, Martin PL, Winick N et al. Outcomes for B-Precursor Patients in Legacy Children's Cancer Group (CCG) and Pediatric Oncology Group (POG) Studies in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL): A Children's Oncology Group (COG) Report. *Blood.* 2007;110:847.
168. Heerema NA, Palmer CG, Baehner RL. Karyotypic and clinical findings in a consecutive series of children with acute lymphocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet.* 1985;17:165-79.
169. Talamo A, Chalandon Y, Marazzi A, Jotterand M. *Cancer Genet Cytogenet.* 2010;203:209-14.
170. Paulsson K. Genomic heterogeneity in acute leukemia. *Cytogenet Genome Res.* 2013;139:174-80.
171. Anderson K, Lutz C, van Delft FW, Bateman CM, Guo Y. Genetic variegation of clonal architecture and propagating cells in leukaemia. *Nature.* 2011;469:356-61.
172. Lang F, Wojcik B, Rieger MA. Stem Cell Hierarchy and Clonal Evolution in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Stem Cells Int.* 2015;2015:137164.
173. Blandin AT, Muhlematter D, Bougeon S, Gogniat C, Porter S et al. Automated four-color interphase fluorescence in situ hybridization approach for the simultaneous detection of specific aneuploidies of diagnostic and prognostic significance in high hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet.* 2008;186:69-77.

174. Betts DR, Riesch M, Grotzer MA, Niggli FK. The investigation of karyotypic instability in the high-hyperdiploidy subgroup of acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2001;42:187-93.

175. Vargas-Rondón N, Villegas VE, Rondón-Lagos M. The Role of Chromosomal Instability in Cancer and Therapeutic Responses. *Cancers*. 2018;10:4.

8. Közlemények jegyzéke

Közlemények az értekezés tárgyköréből:

Vojcek Á, Pajor L. A gyermekkori akut limfoblasztos leukémia kedvező prognosztikai alcsoportja: magasan hiperdiploid leukémia. *Magy Onkol.* 2018;62:214-21.

Vojcek Á, Pajor G, Alpár D, Mátics R, Pótó L, Szuhai K, Pajor L. Conserved hierarchical gain of chromosome 4 is an independent prognostic factor in high hyperdiploid pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res.* 2017;52:28-33. **(IF 2017: 2,319)**

Alpár D, Pajor G, Varga P, Kajtár B, Pótó L, Mátics R, Vojcek Á, Ottóffy G, Szuhai K, Pajor L. Sequential and hierarchical chromosomal changes and chromosome instability are distinct features of high hyperdiploid pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer.* 2014;61:2208-14. **(IF 2012: 2,353)**

Pajor G, Varga P, Horváth B, Vojcek Á, Ottóffy G, Pótó L, Mátics R, Szuhai K, Alpár D, Pajor L. Gyermekkori akut lymphoblastos leukaemia /lymphoblastoma molekuláris stratifikációja – Hiperdiploid B-ALL: Mi van a felszín alatt? *Hemat Transzf.* 2014;47:10-16.

Citálható absztraktok az értekezés tárgyköréből:

Alpar D, Szuhai K, Pajor G, Vojcek A, Ottóffy G, Kneif M, Poto L, Pajor L. Sub-clonal cytogenetic heterogeneity in high hyperdiploid acute lymphoblastic leukaemia. *Pediatr Blood Cancer.* 2012;(6) p.1034.1p. **(IF 2012: 2,353)**

Pajor G, Alpar D, Szuhai K, Knief M, Poto L, Vojcek A, Ottóffy G, Pajor L. Novel Eight-target FISH Approach for Profiling Clonality of High-hyperdiploid Paediatric Acute Lymphoblastic Leukemia (HHD-pALL) *European Journal Of Cancer.* 2012;(5) p.S212.1p. **(IF 2012: 5,061)**

Poszterek az értekezés tárgyköréből:

Vojcek A, Pajor G, Poto L, Pauler G, Matics R, Lacza A, Knief M, Szuhai K, Ottóffy G, Alpar D, Pajor L. Identification of distinct prognostic subgroups in high hyperdiploid

pediatric acute lymphoblastic leukemia by multi-target interphase FISH. European Haematology Association (EHA), Bécs, 2015.

Pajor L, Szuhai K, Pajor G, Knief M, Poto L, Vojcek A, Ottóffy G, Matics R, Alpar D. Cytogenetic complexity and sub-clonal architecture in pediatric high hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia. European Haematology Association (EHA), Amszterdam, 2012.

Pajor L, Szuhai K, Pajor G, Knief M, Poto L, Vojcek A, Ottóffy G, Matics R, Alpar D. Deep insight into the sub-clonal architecture of high hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia using multi-target interphase fluorescens in situ hybridization. International Society for Advancement of Cytometry (CYTO), Lipcse, 2012.

Egyéb publikációk:

Kiss R, Gángó A, Benard-Slagter A, Egyed B, Haltrich I, Hegyi L, de Groot K, Király PA, Krizsán S, Kajtár B, Pikó H, Pajor L, Vojcek Á, Matolcsy A, Kovács G, Szuhai K, Savola S, Bödör C, Alpár D. Comprehensive profiling of disease-relevant copy number aberrations for advanced clinical diagnostics of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Mod Pathol.* 2020;33:812-24. (IF 2019: 6,365)

Vojcek Á, Csernus K, Kajtár P, Ottóffy G. Szöveti plazminogén aktivátor (tPA) al-kalmazása gyermekeknél centrális vénás kanül okklúziója esetén. *Gyermekgyógyászat.* 2008;59:219-23.

Ottóffy G, Vojcek Á, Cholnoky E, Kálmán E, Szalai G, Kajtár P. First report about a toxic sialadenosis of the parotis during induction and re-intensification of acute lymphoblastic leukemia. *Blood Reviews.* 2007;21:S95. (IF 2007: 5,922)

Vojcek Á, Ottóffy G, Kajtár P. Ritka betegségek társulása: immundeficiencia, histiocytosis esetleg ALL? *Gyermekgyógyászat.* 2006;57:121-4.

Kellermayer R, Hsu AP, Stankovics J, Balogh P, Hadzsiev K, Vojcek Á, Maródi L, Kajtár P, Kosztolányi Gy, Puck JM. A novel IL2RG mutation associated with maternal T lymphocyte engraftment in a patient with severe combined immunodeficiency. *J Hum Genet.* 2006;51:495-7. (IF 2006: 2,205)

Tézishez kapcsolódó közlemények impakt faktora: 4,672

Tézishez kapcsolódó idézhető absztraktok impakt faktora: 7,414

Közlemények és idézhető absztraktok összesített impakt faktora: 26,578

9. Köszönetnyilvánítás

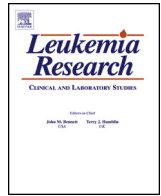
Ezúton szeretném megköszönni témavezetőmnek, dr. Pajor László professzor úrnak a munkám során nyújtott segítségét, a sok értékes tanácsát, szakmai támogatását. Köszönöm a végtelen türelmét, amelyet a klinikai munka mellett végzett kutatótevékenységem iránt viselt.

Ezen disszertáció egy kutatói munkacsoport közös munkájának eredménye. Az iFISH vizsgálatokban nyújtott segítséget a Pathologiai Intézet munkatársainak, dr. Alpár Donátnak, dr. Pajor Gábornak, dr. Kajtár Bélának, dr. Kereskai Lászlónak, dr. Jáksó Pálnak, Kneif Máriának, Lacza Ágnesnek és Csala Juditnak köszönhetem. Dr. Alpár Donátnak különösen hálás vagyok, amiért bevezetett a mindennapi klinikai munkámtól távol álló kutatói munka rejtelmeibe és segített eligazodni a tudományos közlemények útvesztőjében. A statisztikai elemzésben dr. Póto Lászlótól kaptam segítséget és beszélgetéseink során sok tanítást, szemléletet. A biostatistikai vizsgálatokért köszönettel tartozom dr. Szuhai Károlynak, dr. Mátics Róbertnek és dr. Pauler Gábornak. Azon beteg gyermekek klinikai adatait, akiket nem a PTE Gyermekklinikán kezeltünk, az Országos Gyermektumor Regiszterből gyűjtöttem ki, melyhez dr. Jakab Zsuzsannától kaptam segítséget.

Hálás köszönettel tartozom dr. Kajtár Pál professzor úrnak és dr. Ottóffy Gábornak, akik orvosi pályám kezdetén megismertették velem a gyermekonkológiában rejlő szépségeket, támogatták az elkötelezettségemet és emberségükkel, szakmai tudásukkal a mai napig példaképül szolgálnak a számomra.

Kiváltságnak érzem, és szeretném megköszönni közvetlen kollégáimnak, a PTE Gyermekklinika Onkohematológia Osztály valamennyi munkatársának, hogy nap mint nap velük dolgozhatok. A beteg gyermekek iránti segítő szándékuk, odaadó figyelmük, lelkesedésük, kedvességük és jó humoruk számomra is hatalmas erőforrás.

Mindenekelőtt pedig szeretnék köszönetet mondani családomnak. Szüleimnek, akik mindig hittek bennem, biztattak és bátorítottak, erős gyökereket és szárnyakat adtak. Férjemnek, aki példátlan türelemmel és megértéssel támogatja szakmai ambícióimat és aki segített a távolléteimet elviselni a számunkra legfontosabbaknak: gyermekeinknek, Máténak, Júliának és Andriskának.



Research paper

Conserved hierarchical gain of chromosome 4 is an independent prognostic factor in high hyperdiploid pediatric acute lymphoblastic leukemia



Á. Vojcek^{a,3}, G. Pajor^{b,3}, D. Alpár^b, R. Mátics^{c,1,2}, L. Pótó^d, K. Szuhai^e, L. Pajor^{b,*}

^a Pediatric Oncology Unit

^b Department of Pathology

^c Department of Translational Medicine

^d Department of Bioanalysis of the University of Pécs Medical Center, Pécs, Hungary

^e Department of Molecular Cell Biology, Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 August 2016

Received in revised form 9 November 2016

Accepted 10 November 2016

Available online 11 November 2016

Keywords:

Lymphoblastic leukemia

Hyperdiploidy

iFISH

Prognosis

ABSTRACT

Background: High hyperdiploid (HeH) pre-B pediatric acute lymphoblastic leukemia (B-pALL) is known to be heterogeneous by prognosis, but the stratification principals according to conventional cytogenetic analysis (CCA) are equivocal.

Procedure: Untreated bone marrow samples of 214 B-pALL patients were previously classified according to the modal numbers (iMN₈) based on the gains of the chromosomes 4, 6, 10, 14, 17, 18, 21, and X as revealed by consecutive and correlated 2 × 4 color interphase fluorescence *in situ* hybridization, and at least five years of follow up data were analyzed.

Results: Data from 48 of the 53 HeH (iMN₈ > 50) B-pALL patients indicated that among the age, gender, WBC, and iMN₈ parameters, only the last was significantly associated with overall survival (pOS), which allowed the cases to be classified as iMN₈ 51–54 (75%) and iMN₈ ≥ 55 (95%). Among the specific chromosomal gains of +4, +4/+6, +4/+17 and +4/+18, the first exhibited the most significance in terms of beneficial outcomes. The better prognostic group according to the iMN₈ was associated with a significantly reduced complexity of the subclonal landscape. However, iMN₈ did not prove to be an independent variable but was instead overridden by isolated trisomy of chromosome 4.

Conclusions: These data indicate that the better outcomes in the HeH B-pALL group arose from the gain of a specific chromosome that always ranks at the same position in the sequential acquisition of the affected chromosomes.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Abbreviations: B-pALL, pre-B pediatric acute lymphoblastic leukemia; CCA, conventional cytogenetic analysis; DI, DNA index; DT, double trisomies; HD, hyperdiploid; HeH, hyperdiploid high; HeL, hyperdiploid low; HHD, high hyperdiploid; iFISH, interphase fluorescence *in situ* hybridization; iMN₈, modal number by iFISH on eight chromosomes; MN, modal chromosome number; pEFS, probability of event free survival; pOS, probability of overall survival; SNP, single nucleotide polymorphism; TT, triple trisomies; WBC, white blood cell count.

* Corresponding author at: Department of Pathology, University of Pécs Medical Center, 12, Szigeti Str, Pécs, H-7624, Hungary.

E-mail addresses: lpajor54@yahoo.com, pajor.laszlo@pte.hu (L. Pajor).

¹ Department of Nature Conservation, Kaposvár University, Kaposvár, Hungary.

² Hungarian Nature Research Society, Ajka, Hungary.

³ Equal contribution.

1. Introduction

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most frequent malignancy in children and precursor B-cell pediatric ALL (B-pALL) is the most frequent type of it. The most common genetic and also clinicopathological entity of this condition is represented by the hyperdiploid subtypes with chromosome numbers of 51 to 67, which account for approximately 25% of all B-pALL and approximately 40% of cases with recurrent genetic abnormalities [1]. Research on this subtype of leukemia has a long, nearly half-century history. In the 1960s, the hyperdiploid (HD) B-pALL category was identified, and by the mid-1980s, the high-hyperdiploid (HeH) category was defined using DNA cytometry and conventional cytogenetic analysis (CCA) [2–8]. Therapeutic responses clearly distinguished the low hyperdiploid (HeL) type based on the modal chromosome numbers (MNs) of 47 to 50 in addition to the prog-

nistically superior HeH subgroup of B-pALL with MNs of 51 to 67 [9–11]. Several studies have noted the heterogeneity of the HeH status itself based on DNA indices (DIs), MN values and individual trisomies [7,12–18]. However, these results are conflicting, partially with each other, or with results obtained by other techniques (e.g., molecular karyotyping) and those of the most recent studies and comprehensive investigations in different geographic areas [19–22]. The reasons for these controversial data are unknown, but the known drawbacks of the gold standard, CCA, cannot be excluded.

To overcome these potential pitfalls, interphase fluorescent *in situ* hybridization (iFISH) analyses were performed in our previous study on 214 untreated bone marrow samples from B-pALL patients to reveal the numerical aberrations of chromosomes 4, 6, 10, 14, 17, 18, 21, and X, which are known to be responsible for the first-line for the hyperdiploidy in this disease [9]. The 2 × 4 color consecutive iFISH assay with the relocation feature allowed us to obtain an eight-parameter correlated database at the single cell level [23]. The patients were classified as high hyperdiploid (HeH) according to the MNs identified by interphase FISH on eight chromosomes (iMN₈). The follow up data of the 48 HeH patients out of this cohort were investigated by univariate and multivariate analyses to reveal the prognostic significance of the various clinical and cytogenetic features.

2. Materials and methods

2.1. Patients

In total, 48 out of the 53 HeH patients previously identified in our 214 B-pALL patients' cohort were analyzed in this study [23]. The patients were treated in Hungarian centers of pediatric hematology with a central review of all diagnostic bone marrow samples in the Department of Pathology of the University of Pecs Medical Center. The diagnoses were made based on the gold standard morphological, phenotypical and genotypical criteria [1,24]. All B-pALL patients were tested for t(9;22)(q34;q11.2) (*BCR-ABL1* gene fusion), t(v;11q23) (*MLL* gene disruption), t(12;21)(p13;q22) (*ETV6-RUNX1* gene fusion), t(1;19)(q23;p13.3) (*TCF3-PBX1* gene fusion) as well as Down syndrome. All patients were risk stratified and received treatment according to the BFM protocols (ALL BFM 1995 or ALL IC BFM 2002) including the induction, intensification, consolidation, late intensification and maintenance phases (completed with chemotherapeutic central nervous system prophylaxis +/- cranial irradiation). Both BFM protocols have a quite conserved backbone. Furthermore, among 168 patients out of our 214 cohort with pre-B-ALL, no significant differences in pEFS (p = 0.616) and in pOS (p = 0.550) were observed between patients treated according to the ALL BFM 95 (n = 94) or 2002 protocols (n = 74). Thus, data of all patients were combined in subsequent statistical analyses, similarly to data from other treatment regimen's family [21]. At least five years of follow up data were available for all patients, and the event-free survival (pEFS) was calculated from the diagnosis to the first adverse event. Induction failure, relapse, and death during complete remission and second malignancies were evaluated as events. Written informed consent was obtained from each of the children's parents or guardians, and the study was approved by the Hungarian National Ethics Committee and conducted according to the Declaration of Helsinki.

2.2. Multi-target interphase fish analysis

Cytospin preparations of uncultured and archived cells from pretreatment bone marrow samples were iFISH labeled and analyzed as described previously [23]. Briefly, consecutive 2 × 4-color

labeling was applied to fluorescently visualize the highly conserved loci of chromosomes 4 (red), 6 (green), 10 (aqua) and 18 (gold) followed by the chromosomes 14 (red), 17 (aqua), 21 (green) and X (gold). The chromosomal statuses of the mononuclear cells were determined by counting the iFISH dots in single nuclei after each round of multiprobe labeling. The positions (X/Y coordinates) of the cells analyzed in the first round were recorded and stored by a computer-assisted, motorized microscope system (Metasystems, Altusheim, Germany), which allowed for the relocation of the cell nuclei and the evaluation of their signal patterns after the second round of iFISH labeling. This 8-parameter correlated data acquisition allowed us to investigate the pattern of chromosomal gains at the single cell level and to assess the inter- and intra-patient heterogeneities of the chromosomal statuses in our cohort. A minimum of 300 nuclei was sought for full evaluation in each bone marrow sample. Subclones with unique karyotypes (unique subclones) were identified only when detected in at least in two copies. The modal number (MN), defined as the chromosome number of the largest subclone, was identified for each leukemia patient. An iMN₈ designation, i.e., the MN determined by interphase FISH on eight chromosomes, was introduced to distinguish the MN, which is traditionally determined by metaphase analysis. Three patients (ID34, 41 and 58) were excluded from this clinical study on HeH patients due to large fractions of tetrasomic chromosomes as well as the DIs (1.82, 2.02 and 1.94, respectively) indicative of (near) tetrasomic natures. Additionally, two other patients (ID29 and 51) with bimodal subclone distributions were reclassified according to the iMN₈ 53 values into the iMN₈ 51–54 subgroup of HeH patients based on the weighted distributions of subclones.

2.3. Statistical analysis

Univariate statistics were applied to reveal the possible differences between the subgroups according to various clinical (i.e., gender, age, and WBC at onset) and cytogenetic (i.e., iMN₈ and combinations of chromosomal gains) parameters. The pEFS and pOS were calculated using the Kaplan-Meier method and finally compared with a log rank test. Multivariate analysis using a Cox regression model was used to identify the factors with independent influences on the pEFS/pOS using IBM SPSS Statistics Version 20.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA). Cluster and network analyses were performed using the MEGA 5 and NETWORK 4.6.1 software (Fluxus Technology Ltd., Clare, England), and Steiner tree parameters were calculated [25,26].

3. Results

The B-pALL patients were classified using a modified modal number (MN) that was defined according to the chromosome number of the largest subclone, which was determined by iFISH on the 8 chromosomes (iMN₈) that are known to be the most frequently affected by gain in this disease (Fig. 1). According to this parameter, 53 (24.8%) of our 214 B-pALL leukemia cohort proved to be HeH (iMN₈ 51–67; the highest figure in our series was 62). Three patients with features of (near) tetrasomy were excluded from the clinical study; thus, the iMN₈ values ranged from 51 to 56 in the HeH group. Two HeL leukemias were reclassified as HeH samples and the four relapse HeH leukemias (ID 2, 6, 8, 10) were excluded. Thus, 48 HeH B-pALL diseases were available for prognostic evaluation. All the patients in the final group of HeH proved to be negative for *BCR-ABL1*, *ETV6-RUNX1*, *TCF3-PBX1* gene fusion or *MLL* gene disruption as well as Down syndrome.

The OS was considered the ultimate and most important feature of the disease. Based on pOS, using univariate analysis, the best separation of the subgroups by chromosomal gains could be

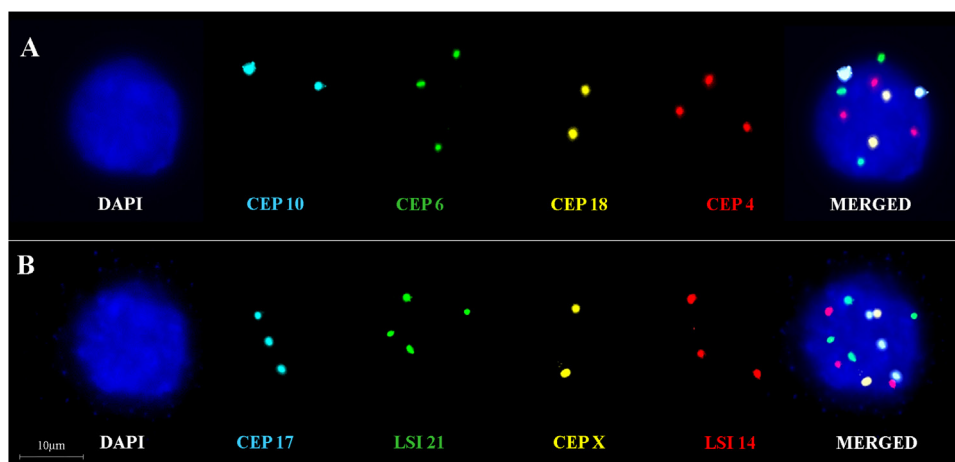


Fig. 1. Consecutive 2 × 4 iFISH labeling of a single cell with gain of 6 chromosomes (4 trisomies and 1 tetrasomy) of a HeH B-pALL patient. (A) 1st set of probes ('CEP' set): CEP4 (red), CEP6 (green), CEP10 (aqua), CEP18 (gold); (B) rehybridization of the same target using the 2nd set of probes ('LSI & CEP' set): LSI14 (red), LSI21 (green), CEP17 (aqua), CEPX (gold). DAPI counterstain, 63 × objective magnification.

Table 1
Relation of clinical and iFISH features to the outcome in patients with HeH pALL.

Variable	Number of patients	pEFS (K-M)	p (log rank)	pOS (K-M)	p (log rank)
Gender					
Male	20/48	140.5	0.429	164.6	0.319
Female	28/48	167.9		214.1	
Age (year)					
1–6	34/48	169.6	0.176	206.5	0.742
>6	14/48	123.1		157.7	
WBC count (G/L)					
<20	35/48	158.1	0.431	169.4	0.762
≥20	13/48	143.4		209.8	
iMN ₈					
<50	42/48	169.3	0.019	183.3	0.255
≥50	6/48	77.5		169.5	
iMN ₈					
51–54	28/48	147.4	0.256	161.5	0.046
55–56	20/48	168.3		232.5	
Chromosomal gains					
Chr 4					
Yes	38/48	169.9	0.006	222.2	0.002
No	10/48	99.2		118.1	
Chr 4–6					
Yes	38/48	169.9	0.006	222.2	0.002
No	10/48	99.2		118.1	
Chr 4–10					
Yes	32/48	173.1	0.024	218.0	0.109
No	16/48	121.0		154.0	
Chr 4–17					
Yes	22/48	182.2	0.033	198.0	0.024
No	26/48	135.1		178.7	
Chr 4–18					
Yes	34/48	170.4	0.031	219.5	0.046
No	14/48	119.5		145.4	
Chr 4–10–17					
Yes	18/48	185.4	0.047	196.0	0.081
No	30/48	140.1		187.5	
Chr 4–10–18					
Yes	31/48	171.9	0.045	217.1	0.154
No	17/48	126.4		157.5	

K-M: Kaplan-Meier; pEFS: probability of event-free survival in months; pOS: probability of overall survival in months; iMN₈: modal number determined by iFISH on eight chromosomes.

obtained according to the iMN₈ 51–54 and 55–56 classifications of the cases. Univariate analysis revealed that only the WBC proved to be significantly related to the pEFS ($p=0.019$), and gender, age

and iMN₈ were not related. In contrast, only the iMN₈ significantly separated the two groups ($p=0.046$) according to the pOS. With respect to the gain of the individual chromosomes, chromosome 4

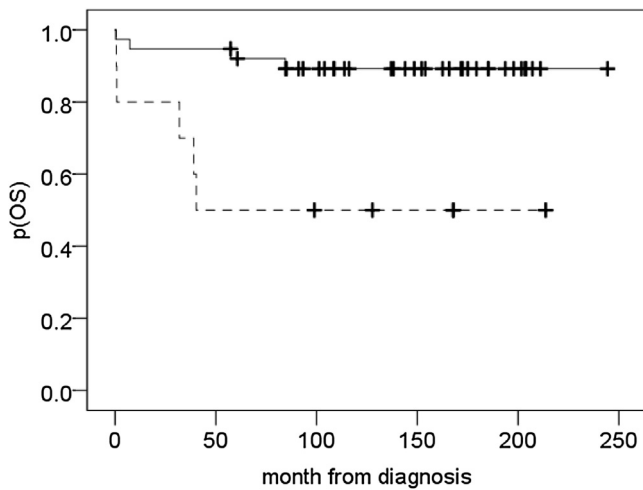


Fig. 2. Probability of the overall survival (pOS) of HeH B-pALL patients with (—) and without (---) gain of chromosome 4.

most significantly separated the subgroups ($p=0.006$ for pEFS and $p=0.002$ for pOS). The combined gains of the various chromosomes that also exhibited significant ($p < 0.05$) differences in pEFS, pOS or both are provided in Table 1 and Fig. 2. All of the leukemias with +4 also exhibited gains of chromosome 6, but the opposite relationship was not present.

Multivariate analysis with gender, WBC and iMN_8 as categorical variables and age as a continuous variable indicated that in addition to a lower WBC ($p=0.002$), younger age ($p=0.005$) and a high iMN_8 ($p=0.008$) also contributed significantly to superior pEFS values, but female gender did not ($p=0.068$). The same analysis of these four parameters revealed that in addition to the high iMN_8 ($p=0.004$), younger age ($p=0.003$), a lower WBC ($p=0.015$) and female gender ($p=0.021$) were also associated with superior pOS values. The combination of these four parameters with various chromosomal gains revealed that none of the chromosomal data exerted significant additional effects on the superior pEFS. In contrast, only individual gains of chromosome 4 were significantly associated ($p=0.009$) with a superior pOS.

The 8-parameter correlated acquisition of the chromosomal gains allowed us to identify subclones not only by chromosome number but also according to the unique karyotypes detected in at least two copies per patient. The subclones by chromosome number revealed that in both the iMN_8 51–54 and iMN_8 55–56 groups, bell-shaped distributions were present, but more narrow was present in the latter group of leukemias (Fig. 3a). The clones by unique karyotypes exhibited considerable intra-patient heterogeneity, but a less complex network of the Steiner tree was present in the iMN_8 55–56 group (Fig. 3b). The average number of unique subclones was significantly higher ($p=0.028$) in the iMN_8 51–54 group (29.9 ± 11.8) than in the patients in the iMN_8 55–56 group (23.0 ± 9.2). Cluster analysis indicated that in the iMN_8 51–54 group, chromosomes 21, X, and 14 formed the base of the tree, and chromosomes 10 and 18 clustered together. Additionally, chromosomes 4 and 6 formed another cluster, whereas chromosome 17 did not consistently belong to the latter two groups. In the iMN_8 55–56 group, the cluster formed by 10 and 18 was not present, but the topology was the same (Fig. 3c).

4. Discussion

HeH pALL with an MN of 51–67 is not homogeneous by prognosis, but suggested stratifying cut-off values of parameters obtained by traditional techniques with a special emphasis on CCA are also

heterogeneous. Several studies have noted this heterogeneity of HeH status according to the DIs, MN values and individual trisomies. B-pALL patients with $DI \geq 1.16$, which have been suggested to correspond to MNs of 53, double trisomies (DT; +4, +10) $DI \geq 1.16$, MNs of 56–67, DTs of +10, +17 MNs of 54–58, isolated +18, triple trisomies (TT; +4, +10, +17) MNs ≥ 53 , isolated TTs of +4, +10, +17, DTs of +4/+10 or +10/+17, TTs and $DI \geq 1.16$ have been found to have significantly better disease outcomes in the various studies [7,12,18]. In contrast, a BFM study using an SNP-platform based molecular allelokaryotyping on HD patients with > 50 chromosomes revealed that the lack of gain of either chromosome 17 or 18 has a worse prognosis, whereas disomy for both 17 and 18 has the worst prognosis compared with all other HD cases (53% vs 90% 5-year EFSs). This paper could not confirm that the lack of gain of chromosomes 4 and 10 has a negative influence on prognosis [19]. These results are conflicting. Most studies have detected specific effects of +4, +10, +17, +18 and range of MN values in univariate analyses, while the conclusions drawn from multivariate analyses have differed. The concordance of HeH with TTs and HeH with +18 is low, i.e., they do not identify the same patient populations [27]. The more recent studies are also controversial. MNs of 58–66 without specific profiles of chromosomal gains have been demonstrated to be the strongest favorable prognostic factors and to exceed the effects of any combination of specific trisomies [20]. In an other study, in HeH patients, TT was demonstrated to be biologically unrelated to but prognostically (pEFS) correlated with high MNs of either > 53 or > 55, but there was no significant effect of any of these on pOS. In this study, neither TT nor a high MN proved to be an independent variable that was predictive of either pEFS or pOS [21]. Furthermore, the largest Japanese study on HeH B-pALL patients investigated gains of all possible combinations of two chromosomes, and eventually found that 15 combinations had influences on outcome. DTs of +11 and +17 exhibited the strongest associations with superior outcomes, whereas no significant effects of +4, +10, +17 (TT) or +4, +10 (DT) were found [22].

The reason for these controversial data is unknown, but the role of the gold standard, i.e., the CCA, cannot be excluded. A high HD (HHD) B-pALL was demonstrated to have a lower plating efficiency and to often lack consistent abnormal clones, and interphase cytogenetics (iFISH) revealed HHD in 30% and 60% of cases with normal karyotypes by CCA and CCA failure, respectively [11,28,29]. In megastudies, informative CCAs were available in 38% and 53% of B-pALL cases, and MN was defined in 97% where TT was analyzable in 51%. Numerical aberrations for all chromosomes were determined only in 43% of cases in the same cohort [14,17,21]. Thus, CCA, which in principal provides genome-wide data, in specific practice, e.g., in HeH B-pALL, might suffer from a significant loss of single-cell based correlated genomic data. Sophisticated molecular allelokaryotyping is not a cell-based technique, either. On the contrary, the fact that single-cell specific correlated 8-parameter iFISH data acquisition is applied using a much larger number of cells (approximately fifteen-fold greater than the number of cells usually targeted during CCA) means that this technique might provide new information regarding specific questions, such as questions related to the interrelations of chromosomal gains and their clinical correlations in HeH pALL.

In this study, among the gender, age, iMN_8 and WBC variables, only the latter proved to be a significant, and in conjunction with the cytogenetic data, this was an independent parameter in association with beneficial pEFS. The follow up of the clinical data indicated that the best separation and the only significant feature according to the overall survival (pOS) analysis proved to be the iMN_8 grouping of 51–54 (75%) vs 55–56 (95%), according to the rule of higher being better. This massive difference was associated with a significant difference in subclonal heterogeneity in the two groups. However, the iMN_8 was not an independent parameter but was

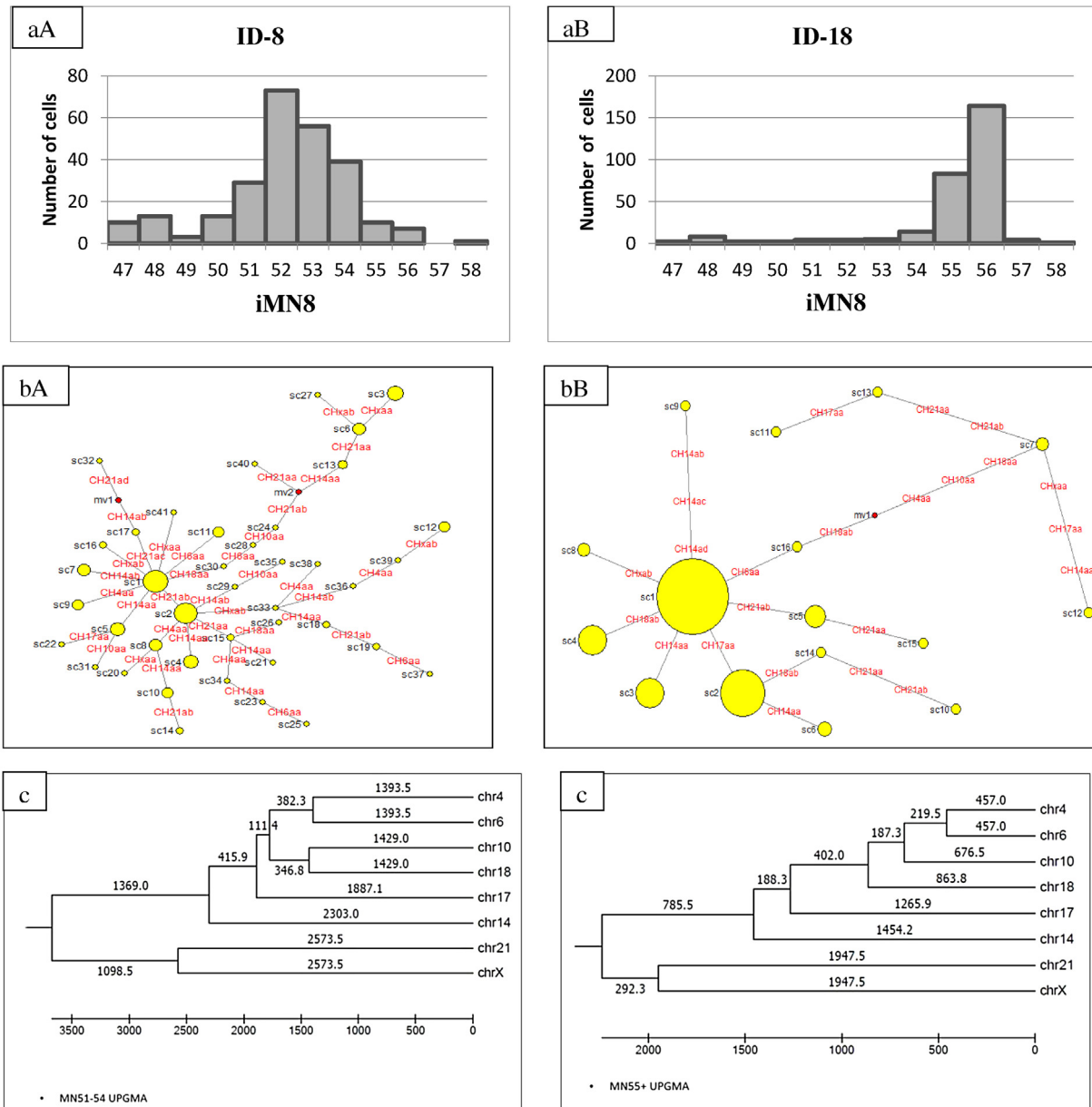


Fig. 3. Comparisons of the frequency distributions of subclones according to the total numbers of chromosomes (a). Steiner tree network of unique subclones (b) in a HeH pALL with iMN₈ 52 (A; ID-8) and iMN₈ 56 (B; ID-18) as well as the UPGMA cluster of the acquisition of chromosomes (c) in all iMN₈ 51–54 vs iMN₈ > 55 HeH pALL patients. In the panels (b), the yellow circles represent the unique subclones (sc1, sc2, etc.), and the diameters are proportional to the number of cells with a given chromosome constellation. The lines connect the related subclones with indications of the chromosomes affected and the type of copy number changes: *aa* represents the transition from disomy to trisomy, *ab* represents the transition from trisomy to tetrasomy, etc. The red dots are median vectors representing subclones that were not present or found.

overridden by the gain of chromosome 4 in the multivariate analysis. Tumor cell aggressiveness is a double-edged sword; higher levels increase the risk to the patient but also increase the probability of the suicide of tumor cells via necrosis. This cut-off value might represent a balance between the extremes, which is also strongly supported by the peak incidence of HeH B-pALL of MN and iMN₈ 55 according to CCA and our multiparameter correlated iFISH studies, respectively [6,7,13,15,23]. Leukemic cells may grow more favorably at this state of genomic imbalance due to a gain of specific chromosomes but without increased resistance upon therapy. As demonstrated by the network analysis in this paper, this was associated with more straightforward leukemogenesis and less heterogeneous chromosome segregation error, which resulted in a more homogenous subclonal landscape. The latter finding could be beneficial for the outcome according to the not fully objective but

self-explanatory rule that fighting against a multifaceted enemy is more difficult than fighting against a more simplified foe. Thus, although chromosomal gain is one defining parameter, it is not the ultimate parameter according to the pOS. This is because the iMN₈ is overridden by the gain of chromosome 4, which is the only independent factor among all of the factors including the cytogenetic parameters. This finding might imply that specific dosages of proliferation-promoting and proliferation-inhibiting genes with a net reduction of survival capacity are conferred by the extra chromosome 4. Why is iMN₈ stratification not independent from the +4? Our cluster analysis indicated findings, that were also demonstrated in our previous analysis of all HD B-pALL patients, that chromosome 4 forms the smallest independent cluster and always ranks at the eighth position in the course of the multistep acquisition of chromosomes [23]. Because chromosome 21 is already very

frequently tetrasomic with increasing iMN_8 , this implies that it is +4 that most frequently follows the acquisition of eight other chromosomes in the subclonal evolution, which results in a total of 9 extra chromosomes and an iMN_8 (MN) of 55, which is the most common genetic constellation among HeH B- pALL patients.

5. Conclusion

These data underline the significance of the gain of a specific chromosome in determining the outcome of HeH pALL and suggest that modal number is secondary due to the conserved acquisition of chromosomes in this disease. Because the genetically determined sequence of centromere separation of human chromosomes is known [30], the data might also suggest that chromosomes in hyperdiploid pALL exhibit a disease-specific sequential incidence of centromere segregation errors that result in a conserved probability of chromosomal non-disjunction and trisomies.

Conflict of interest statement

The authors declare that they have no conflict of interest with respect to the work described herein that is submitted for publication.

Acknowledgements

The work was supported by a Baross Gábor Project grant (OMFB-00342/2010) from the Hungarian National Development Agency. DA was supported as a scholar by the International Society for Advancement of Cytometry. The authors thank the Hungarian Nature Research Society for the support in the biostatistical analysis; László Kereskai MD, Béla Kajtár MD, PhD hematopathologist, Pál Jáksó PhD, Ágnes Lacza biologist as well as Maria Kneif and Judit Csala medical scientists for their support in diagnostic hematopathology, flow cytometric and molecular pathology as well as iFISH analyses, respectively.

References

- [1] M.J. Borowitz, J.K.C. Chan, WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, IARC, Lyon, 2008, 168 p.
- [2] F. Lamper, Cellulärer DNS-Gehalt und Chromosomenzahl bei der akuten Leukämie im Kindesalter und ihre Bedeutung für Chemotherapie und Prognose, *Klin. Wochenschr.* 45 (1967) 763–768.
- [3] L.M. Secker-Walker, S.D. Lawler, R.M. Hardisty, Prognostic implications of chromosomal findings in acute lymphoblastic leukaemia at diagnosis, *Brit. Med. J.* 2 (1978) 1529–1530.
- [4] G.J. Swansbury, L.M. Secker-Walker, S.D. Lawler, et al., Chromosomal findings in acute lymphoblastic leukaemia of childhood: an independent prognostic factor, *Lancet* 2 (1981) 249–250.
- [5] Y. Kaneko, J.D. Rowley, D. Variakojis, R.R. Chilcote, I. Check, M. Sakurai, Correlation of karyotype with clinical features in acute lymphoblastic leukemia, *Cancer Res.* 42 (1982) 2918–2929.
- [6] D.L. Williams, A. Tsiatis, G.M. Brodeur, et al., Prognostic importance of chromosome number in 136 untreated children with acute lymphoblastic leukemia, *Blood* 60 (1982) 864–871.
- [7] A.T. Look, P.K. Roberson, D.L. Williams, et al., Prognostic importance of blast cell DNA content in childhood acute lymphoblastic leukemia, *Blood* 65 (1985) 1079–1086.
- [8] N.A. Heerema, C.G. Palmer, R.L. Baehner, Karyotypic and clinical findings in a consecutive series of children with acute lymphocytic leukemia, *Cancer Genet. Cytogenet.* 17 (1985) 165–179.
- [9] N.A. Heerema, S.C. Raimondi, J.R. Anderson, et al., Specific extra chromosomes occur in a modal number dependent pattern in pediatric acute lymphoblastic leukemia, *Genes. Chromosomes Cancer* 46 (2007) 684–693.
- [10] Mitelman F., Johansson B., Martens F., Mitelman Database of Chromosome Aberrations and Gene Fusions in Cancer. 2016; <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>.
- [11] K. Paulsson, B. Johansson, High hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia, *Genes. Chromosomes Cancer* 48 (2009) 637–660.
- [12] M.B. Harris, J.J. Shuster, A. Carroll, et al., Trisomy of leukemic cell chromosomes 4 and 10 identifies children with B-progenitor cell acute lymphoblastic leukemia with a very low risk of treatment failure: a Pediatric Oncology Group study, *Blood* 79 (1992) 3316–3324.
- [13] S.C. Raimondi, C.H. Pui, M.L. Hancock, F.G. Behm, L. Filatov, G.K. Rivera, Heterogeneity of hyperdiploid (51–67) childhood acute lymphoblastic leukemia, *Leukemia* 10 (1996) 213–224.
- [14] N.A. Heerema, H.N. Sather, M.G. Sensel, et al., Prognostic impact of chromosomes 10, 17, and 5 among children with acute lymphoblastic leukemia and high hyperdiploidy (> 50 chromosomes), *J. Clin. Oncol.* 18 (2000) 1876–1887.
- [15] A.V. Moorman, S.M. Richards, M. Martineau, et al., for the United Kingdom Medical Research Council's Childhood Leukaemia Working Party, Outcome heterogeneity in childhood high-hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia, *Blood* 102 (2003) 2756–2762.
- [16] M.J. Sutcliffe, J.J. Shuster, H.N. Sather, et al., High concordance from independent studies by the children's cancer group (CCG) and pediatric oncology group (POG) associating favorable prognosis with combined trisomies 4, 10, and 17 in children with NCI standard-risk B-precursor acute lymphoblastic leukemia: a children's oncology group (COG) initiative, *Leukemia* 19 (2005) 734–740.
- [17] K.R. Schultz, D.J. Pullen, H.N. Sather, et al., Risk- and response-based classification of childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia: a combined analysis of prognostic markers from the Pediatric Oncology Group (POG) and Children' Cancer Group (CCG), *Blood* 109 (2007) 926–935.
- [18] M. Zaliava, L. Hovorkova, M. Vaskova, O. Hrusak, J. Stary, J. Zuna, Slower early response to treatment and distinct expression profile of childhood high hyperdiploid acute lymphoblastic leukaemia with DNA index <1.16, *Genes. Chromosomes Cancer* (2016), <http://dx.doi.org/10.1002/gcc.22374>.
- [19] N. Kawamata, S. Ogawa, M. Zimmermann, et al., Molecular allelokaryotyping of pediatric acute lymphoblastic leukemias by high-resolution single nucleotide polymorphism oligonucleotide genomic microarray, *Blood* 111 (2008) 776–784.
- [20] N. Dastugue, S. Suci, G. Plat, et al., Hyperdiploidy with 58–66 chromosomes in childhood B-acute lymphoblastic leukemia is highly curable: 58951 CLG-EORTC results, *Blood* 121 (2013) 2415–2423.
- [21] K. Paulsson, E. Forestier, M.K. Andersen, et al., High modal number and triple trisomies are highly correlated favorable factors in childhood B-cell precursor high hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia treated according to the NOPHO ALL 1992/2000 protocol, *Haematologica* 98 (2013) 1424–1432.
- [22] M. Kato, T. Imamura, A. Manaba, et al., Prognostic impact of gained chromosomes in high hyperdiploid acute lymphoblastic leukaemia: a collaborative retrospective study of the Tokyo Children's Cancer Study Group and Japan Association of Childhood Leukaemia Study, *Br. J. Haematol. Corresp.* 166 (2014) 295–308.
- [23] D. Alpar, G. Pajor, P. Varga, et al., Sequential and hierarchical chromosomal changes and chromosome instability are distinct features of high hyperdiploid pediatric acute lymphoblastic leukemia, *Pediatr. Blood Cancer* 61 (2014) 2208–2214.
- [24] R.D. Brunning, M.J. Borowitz, E. Matutes, et al., WHO Classification of Tumours Pathology and Genetics of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, IARC Press, Lyon, 2001, 111 p.
- [25] K. Tamura, D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, S. Kumar, MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods, *Mol. Biol. Evol.* 28 (2011) 2731–2739.
- [26] H.J. Bandelt, P. Forster, A. Röhl, Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies, *Mol. Biol. Evol.* 16 (1999) 37–48.
- [27] A.V. Moorman, H.M. Ensor, S.M. Richards, et al., Prognostic effect of chromosomal abnormalities in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia: results from the UK Medical Research Council ALL97/99 randomised trial, *Lancet Oncol.* 11 (2010) 429–438.
- [28] N.A. Heerema, C.G. Palmer, R.L. Baehner, Karyotypic and clinical findings in a consecutive series of children with acute lymphocytic leukemia, *Cancer Genet. Cytogenet.* 17 (1985) 165–179.
- [29] F.M. Uckun, J.H. Kersey, K.J. Gajl-Peczalska, et al., Heterogeneity of cultured leukemic lymphoid progenitor cells from B cell precursor acute lymphoblastic leukemia (ALL) patients, *J. Clin. Invest.* 80 (1987) 639–646.
- [30] G. Méhes, A. Tárnok, L. Pajor, K. Méhes, Objective analysis of centromere separation, *Hum. Genet.* 97 (1996) 365–366.

A gyermekkori akut limfoblasztos leukémia kedvező prognosztikai alcsoportja: a magasan hiperdiploid leukémia

VOJCEK ÁGNES¹, PAJOR LÁSZLÓ²

PTE Klinikai Központ, ¹Gyermekgyógyászati Klinika, ²Patológiai Intézet, Pécs

A kutatómunkát a MAG-NFÜ REG_DD_09-02-2009-0100; OMFb-00342/2010 sz. projekt támogatta.

Levelezési cím:

Dr. Vojcek Ágnes, PTE Gyermekgyógyászati Klinika,
7623 Pécs, József Attila u. 7., tel.: +36/70 5666 007,
e-mail: vojcek.agnes@pte.hu

Közlésre érkezett:

2018. augusztus 14.

Elfogadva:

2018. október 30.

Az akut limfoblasztos leukémia (ALL) a leggyakoribb gyermekkori rosszindulatú megbetegedés. Magyarországon évente 60-70 új betegség kerül felismerésre. A fejlett országokban jelenleg alkalmazott terápiás protokollokkal gyógyulása 85-90%. A legnagyobb, a betegek egynegyedét magába foglaló citogenetikai alcsoport a magasan hiperdiploid ALL: a limfoblasztok a normális diploid kromoszómakészlet helyett 51-67 kromoszómát tartalmaznak. Prognózisa nagyon jó, bár a betegek ~15%-ánál később relapszus lép fel, és vannak a csoport heterogenitása melletti adatok is. Közleményünkben összefoglaljuk ezen alcsoport citogenetikai, klinikai, epidemiológiai és prognosztikai jellemzőit. Bemutatjuk saját kutatási eredményeinket, melyben 168 prekursor B-sejtes leukémiával diagnosztizált gyermek csontvelőmintájának sejtszintű analízise során vizsgáltuk a nyolc leggyakrabban érintett teljes kromoszóma (4, 6, 10, 14, 17, 18, 21 és X) kópiaszám-növekedési mintázatát. A 48 magas hiperdiploiditású beteg adatait elemezve a magas modális kromoszómaszám (>55) és bizonyos triszómiák és kombinációik (+4, +4/+6, +4/+17, +4/+18) jelenléte kimagaslóan kedvező kimenetelű alcsoportot határoztak meg. *Magy Onkol* 62:214-221, 2018

Kulcsszavak: akut limfoblasztos leukémia, magasan hiperdiploid

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most frequent malignancy in children. In Hungary 60-70 new cases are diagnosed annually. The survival rate is 85-90% in developed countries with current treatment protocols. The most common genetic category of childhood ALL is the high hyperdiploid subtype (HHD) with chromosome numbers of 51 to 67. It accounts for approximately 25% of all cases. The prognosis is very good, though relapse occurs in ~15% of cases and there are data on the heterogeneity of this subgroup as well. In this paper we give an overview of the cytogenetic, clinical, epidemiological and prognostic features of this subgroup. We also demonstrate our interphase fluorescent in situ hybridization (iFISH) analysis performed retrospectively on 168 untreated bone marrow samples of precursor B pediatric ALL patients to reveal the numerical aberrations of chromosomes 4, 6, 10, 14, 17, 18, 21 and X, which are most frequently affected by gain in HHD ALL. Data from 48 high hyperdiploid patients indicated that high modal number (>55 chromosomes) and specific chromosomal gains (+4, +4/+6, +4/+17, +4/+18) exhibited significance in terms of beneficial overall survival.

*Vojcek Á, Pajor L. High hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia is a highly curable subtype of childhood leukemia. *Magy Onkol* 62:214-221, 2018*

Keywords: acute lymphoblastic leukemia, high hyperdiploid

BEVEZETÉS

Az akut limfoblasztos leukémia (ALL), mely a limfoid progenitorsejtek malignus transzformációjának következményként alakul ki, a leggyakoribb gyermekkori rosszindulatú megbetegedés. Magyarországon évente 60–70 új betegség kerül felismerésre. Az 50-es évek előtt gyógyíthatatlan betegségnek számított, azonban a fejlett országokban jelenleg alkalmazott terápiás protokollokkal gyógyulása napjainkban 85–90% [1, 2].

Hazánkban Prof. Dr. Schuler Dezső kezdeményezésére 1971-ben alakult meg a Magyar Gyermekonkológiai Munkacsoport. Minden rosszindulatú megbetegedésben szenvedő gyermeket egységes, nemzetközileg elfogadott diagnosztikus és terápiás elvek szerint kezelünk és követünk a hét hazai centrum egyikében. 1988 óta alkalmazzuk a német Berlin–Frankfurt–Münster (BFM) munkacsoport által folyamatosan fejlesztett protokollokat, melyeket világszerte több mint 30 országban átvettek. A kezelés gerincét a fél év intenzív és másfél év fenntartó kezelés során alkalmazott kombinált kemoterápia képezi. Központi idegrendszeri érintettség esetén kranió-spinalis sugárterápiával, kedvezőtlen citogenetikájú, agresszív betegség esetén első remisszióban elvégzett csontvelő-, illetve őssejt-transzplantációval, esetenként (BCR-ABL+, BCR-ABL-szerű) célzott terápia, tirozinkináz-inhibitorok alkalmazásával növelhető a tartós remisszió, a gyógyulás esélye. A hosszú kezelés, az elhúzódó mieloszuppresszió fő szövődményeként fertőzés, szepszis alakulhat ki, mely akár halálos kimenetelű is lehet („kezeléssel összefüggő mortalitás”). A gyógyult gyermekek felnőnek, a társadalom aktív tagjaiként munkát vállalnak, családot alapítanak. Nemzetközi felmérések (pl. az európai PanCare SurfUp) azt igazolják, hogy a túlélők között nem ritka a késői szövődmények aránya: csonttritkulás, kardiomiopátia, endokrinopátiák, pszichés problémák, második malignitás. Felmerül a kérdés: hogyan lehet tovább növelni a betegség gyógyulási esélyét úgy, hogy közben a kezelés korai és hosszú távú súlyos mellékhatásai mérsékelhetők legyenek?

AKUT LIMFOBLASZTOS LEUKÉMIA – PROGNOSZTIKAI TÉNYEZŐK

Számos törekvés irányult azon biológiai és klinikai prognosztikai faktorok feltárására, amelyek meghatározóak a betegség kimenetelében. A kockázati csoportba történő besorolás meghatározza a terápia intenzitását. Standard kockázati csoport (standard risk, SR) esetében a legnagyobb az esély a gyógyulásra, és a legalacsonyabb a recidíva kockázata. Már két héttel a kezelés megkezdését követően remisszióba kerülnek a gyermekek, így esetükben kevésbé intenzív konvencionális terápia alkalmazásával is tartós remisszió biztosítható, és csökkenthetőek a kezelés korai és hosszú távú mellékhatásai. Magas kockázati csoport (high risk, HR) esetében azonban erélyes kemoterápia, allogén transzplantáció esetén is magasabb a recidíva esélye. Jelenleg a legtöbb nemzetközi protokoll az alábbi tényezőket veszi figyelembe stádiumbesorolásnál: 1. életkor, 2. kezdeti fehérvérsejtszám, 3. a limfoblasztok spe-

cifikus genetikai eltérései, 4. a kezelésre adott korai terápiás válasz. A terápiát a nem, a központi idegrendszeri érintettség, a limfoblasztok immunfenotípusa is befolyásolja.

A LIMFOBLASZTOK SPECIFIKUS GENETIKAI ELTÉRÉSEI

A limfoid hemopoetikus progenitorsejtek csökkent differenciálódása és fokozott proliferációja mögött szerzett aberrációk, szomatikus mutációk állnak. Standard citogenetikai és molekuláris genetikai módszerekkel a betegek közel 80%-ánál, nagy felbontású microarray-vel, szekvenálással kiegészített analízis során azonban lényegében minden betegnél azonosíthatók mikroszkopikus/szubmikroszkopikus elváltozások, szekvenciamutációk [1–6].

A strukturális eltérések leggyakrabban kiegyensúlyozott transzlokációk, ritkábban inverziók, deléciók, duplikációk, pontmutációk. A gyakori és jól ismert strukturális eltérések a normális hemopoézist és a limfoid elemek fejlődését szabályozó géneket érinthetik (pl. RUNX1, ETV6), onkogéneket aktiválhatnak (pl. MYC), a tirozinkináz-rendszert indukálhatják (pl. ABL1).

A numerikus eltérések érinthetik az egész kromoszóma-állományt (triploid, tetraploid), vagy bizonyos kromoszómák többletét/hiányát okozzák (aneuploiditás). A leggyakoribb aberráns kariotípus a hiperdiploid: a limfoblasztok kromoszómakészlete a normális, diploidnál (46 kromoszóma) nagyobb. Két alcsoportja ismeretes: az alacsony (47–50 kromoszóma) és a magas hiperdiploiditású (51–67 kromoszóma). A közel triploid (68–79 kromoszóma) és közel tetraploid leukémiát (>80 kromoszóma) a gyakori társuló egyéb citogenetikai eltérések (pl. ETV6/RUNX1 fúzió) miatt külön entitásként kezeli a szakirodalom [7, 8]. Hipodiploid leukémia (≤45 kromoszóma) a betegek 5%-ánál mutatható ki, döntő többségüknél 45 a modális kromoszómaszám. Az ennél alacsonyabb kromoszómaszám igen ritka, és kedvezőtlen prognosztikai faktor. A limfoid leukémiák többségének patogeneziséhez további szubmikroszkopikus eltérések is hozzájárulnak [1–4].

Számos aberrációnak ismerjük a prognosztikai jelentőségét és a kockázatmeghatározásnál már besorolási tényezőként szerepelnek az egyes protokollokban, azonban döntő többségüknek a patogenetikai, klinikai jelentősége még nem teljesen egyértelmű. A hazánkban jelenleg alkalmazott ALL IC-BFM 2009 protokoll a magas rizikócsoportba sorolja a t(9;22) [BCR/ABL], vagy t(4;11) [MLL/AF4] transzlokációt hordozó, illetve a hipodiploid leukémiát. A gyermekkori ALL egynegyedét képező magasan hiperdiploid (HHD) leukémia a legkedvezőbb klinikai kimenetellel jellemezhető. Egyes munkacsoportok (pl. St. Jude Children’s Research Hospital, Children’s Oncology Group) standard rizikójú HHD leukémia esetén a kezelés intenzitásának csökkentését, dózisredukciót alkalmaznak.

A MAGASAN HIPERDIPLOID ALL JELLEMZŐI

Lampert és mtsai már 1967-ben felfigyeltek a magas kromoszómaszámú gyermekkori limfoblasztos leukémia kedvező prognózisára. Kaneko és mtsai írták le 1982-ben elő-

ször – a mai napig is érvényes – főbb jellemzőit: elsősorban gyermekkorban fordul elő, „non-B, non-T” fenotípusú (mai nomenklatúrával: prekursor B-sejtes), diagnóziskor fiatal életkor és alacsony kezdeti fehérvérsejtszám jellemzi, mediasztinális/központi idegrendszeri érintettség nélküli, a prognózisa pedig kimagaslóan jó [9].

A HHD ALL citogenetikai jellemzői

A limfoblasztok magas kromoszómaszáma [51–67] jellemzi, a leggyakoribb modális szám az 55. Az aneuploiditás az X-, 4-es, 6-os, 10-es, 14-es, 17-es, 18-as, és 21-es, ritkábban az 5-ös és 8-as kromoszómák jellegzetes, non-random mintázat szerinti kópiaszám-növekedésének a következménye. Extra 21-es kromoszóma közel 100%-ban kimutatható, jelenléte egyes szerzők szerint a magasan hiperdiploid ALL elengedhetetlen feltétele [10]. Egy nukleotidpolimorfizmus (SNP) vizsgálat alapján a többletkromoszómák közel 80%-áért a +4 (78–80%), +6 (85–90%), +10 (63–76%), +14 (84–90%), +17 (68–77%), +18 (76–86%), +21 (99–100%) és +X-kromoszóma [89–95%] felelős [11]. Az extra kromoszómák döntően triszómiák, fiúknál X-kromoszóma-diszómia alakul ki. Emellett tetraszómia 1,4–16%-ban (a 4-es, 8-as, 10-es, 14-es, 18-as, X-kromoszóma esetén), illetve 72%-ban (21-es kromoszóma) mutatható ki. Pentaszómia csak a 21-es kromoszómára jellemző [11].

Újszülöttkori szűrőkártyák (Guthrie-kártya) retrospektív citogenetikai vizsgálata arra utal, hogy a HHD leukémia prenatális eredetű. A leukemogenezis iniciáló lépése a méhen belül történik, és további másodlagos, posztnatális mutációk szükségesek a manifeszt betegség kialakulásához. A szűrőkártyákon/köldökzsinórvérben detektált preleukémiasejtek ugyanazon specifikus klonális markereket hordozzák, mint a csontvelői limfoblasztok a betegség diagnózisakor [12–14]. Monozigóta, HHD leukémiára konkordáns és diszkordáns ikrek vizsgálata is alátámasztja a prenatális eredet valószínűségét [15]. Hiperdiploid, RAS-mutációt hordozó leukémiás gyermekek esetén Wiemels és mtsai igazolták, hogy a születéskor azonosítható preleukémiás klón még nem hordozza a RAS-mutációt, így az valószínűsíthetően posztnatális eredetű, szekunder mutáció a leukemogenezis során [16].

A numerikus eltérések mellé másodlagos, strukturális, illetve szubmikroszkopikus aberrációk is társulnak: 1q-duplikáció, a 9-es és 11-es kromoszóma uniparentális diszómiája, mikrodeléciók (ETV6, CDKN2A, PAX5, és PAN3), pontmutációk (FLT3, NRAS, KRAS, PTPN11) [11, 17]. Rendkívül heterogén mintázatot mutatnak és – bár prognosztikai jelentőségük egyelőre nem egyértelmű – kétségtelenül szerepet játszanak a leukemogenezisben. E mutációk döntő része a triszómiák kialakulása után keletkezik, és teljesgenom- és exon-szekvenálással igazolták, hogy különösen gyakran érintik a RAS-jelpályarendszert, illetve a hisztonmódosító géneket [17]. A magasan hiperdiploid leukémia korai relapszusa esetén további mutációk jelennek meg, pl. a KRAS- és CREBBP-mutációk, melyek gyakori, szimultán jelenléte felveti a leuke-

mogenezisben kifejtett szinergista hatásuk lehetőségét [18]. Az elmúlt években magasan hiperdiploid ALL kialakulására hajlamosító konstitucionális DNS-eltérések lehetőségét is felvetették, pl. a PRDM9 allélvariánsét, mely a meiotikus rekombináció fő regulátorát kódolja [19].

Bár az extra kromoszómáknak fontos szerepük van a betegség kialakulásában, a kemoterápia megkezdése után a hiperdiploidia egyértelműen hátrányt jelent a tumorsejtek számára. A többletkromoszómák génjeinek megváltozott, többnyire fokozott expressziója fontos szerepet játszhat egyes citosztikumok transzportjában és metabolizmusában (gén-dózis hatás) [10, 20].

A HHD ALL epidemiológiai jellemzői

A magasan hiperdiploid a gyermekkori ALL leggyakoribb aberráns citogenetikai alcsoportja, a betegek mintegy 25%-ánál mutatható ki. Az incidencia csúcса 2–4 éves korban van, csecsemőkorban és 7 éves kor felett ritkábban fordul elő. Serdülő és felnőtt ALL-es betegek mintegy 10%-ánál igazolható. Ebben az életkorban is ugyanazon kromoszómák non-random nyérése jellemző, mint a gyermekeknél, és a kimenetel is hasonlóan kedvezőbb a nem hiperdiploid betegekhez képest [21]. Prevalenciája nem mutat jelentős különbséget a földrajzi eloszlás szempontjából [10], a betegség azonban ritkábban (11%) fordul elő az afroamerikai és bizonyos ázsiai populációkban [22, 23]. A két nem közel egyformán érintett, enyhe fiúpredominancia mellett [24, 25].

A HHD ALL klinikai és prognosztikai jellemzői

A magasan hiperdiploid leukémiás gyermekek fehérvérsejtszáma jellegzetesen alacsony a diagnózis idején, <10 G/L mediánértékkel [10, 25–32]. Az extramedulláris érintettség ritka [26]. A csontvelői blasztarány többnyire magas (95–100%), a limfoblasztok kisméretűek, morfológiájuk FAB L1, ritkán L2. Az immunfenotípus a prekursor B-sejtekre jellemző: CD10+, CD13-, CD19+, CD22+, CD24+, CD33-, CD34+, CD45-, CD65-, CD66c+, HLA-DR+, clg-, slg- és TdT+ [25].

A limfoid leukémia ismert kedvező prognosztikai faktorai (fiatal életkor, alacsony kezdeti fehérvérsejtszám, prekursor B fenotípus) mind jellemzőek általában a HHD leukémiára, a betegek nagyobb hányada ennek megfelelően standard intenzitású kemoterápiában részesül. A prognózis igen kedvező: az indukció végi remisszió 95% feletti, és a teljes túlélés (overall survival, OS) a napjainkban alkalmazott protokollokkal meghaladja a 90%-ot [26–29]. Mindezen kiváló eredmények ellenére nem ritka a recidíva, akár évekkal a kezelés befejezését követően sem, így az eseménymentes túlélés (event-free survival, EFS) 70–80% közötti. A hiperdiploid betegek tehát heterogén csoportot képeznek: döntő többségük alacsony intenzitású, standard protokollal kezelve is gyorsan remisszióba kerül és meggyógyul, a betegek 20–30%-ánál azonban később relapszus jelentkezik. Számos tanulmány célja volt azon citogenetikai tényezők feltárása, amelyek segítségével már diagnóziskor kiszűrhetők a fokozott relapszusri-

zikót mutató gyermekek, akiknél a tartós remisszió esélye a terápia intenzitásának fokozásával növelhető. A magas kromoszómaszám (modal number, MN), illetve bizonyos

specifikus tri-, tetraszómiák jelenléte kedvező prognózissal asszociált, azonban a vizsgálatok eredményei nem teljesen egybehangzóak, ahogyan az 1. táblázatban is látható [25–37].

1. TÁBLÁZAT. A prognózist kedvezően befolyásoló citogenetikai tényezők HHD ALL esetén

Hivatkozás	Vizsgálómódszer	Esetszám*	MN	Kromoszómatöbblet
35	KT	239		+6 (p=0,02, EFS)
34	KT, FC	1021		+4, +10 (p<0,001, EFS)
25	KT	182	56–67 (p=0,04, EFS)	
32	KT	480	59–68 (p=0,0002)	+10 (p<0,0001)
				+17 (p=0,0002)
				+18 (p=0,004)
				+10, +17 (p<0,0001)
				+5 (kedvezőtlen prognózis, p=0,02)
31	KT	700	54–65 (p=0,0002, EFS, OS)	+4 (p=0,04, EFS, p=0,0002, OS)
				+10 (p=0,017, EFS, p=0,02, OS)
				+18 (p=0,0001, EFS, p=0,009, OS)
				+4, +18 és 1–9 év közötti (p<0,0001, OS)
33	KT	3827		+4, +10, +17 (p<0,001, EFS, SR esetén)
30	KT, FC	38		+4, +10, +17 (p<0,05, relapszus esélye)
36	FC, SNP	399		+17 (p=0,0076, EFS)
				+17, +18 (p=0,0003, EFS)
29	KT, FISH	562		+18 (p=0,002, relapszus esélye)
26	KT, FC, FISH	713	>53 (p=0,020, EFS)	+4 (p<0,0001, EFS)
			>55 (p=0,031, EFS)	+6 (p<0,003, EFS)
				+17 (p=0,01, EFS)
				+18 (p=0,049 EFS)
				+22 (p=0,040 EFS)
				+4, +10, +17 (p=0,003, EFS)
27	KT, FC, FISH	541	58–66 (p<0,0001, EFS)	+18 (p=0,012, EFS)
				+4 (p=0,025, EFS)
				+4, +18 (p=0,002, EFS)
				+4, +10, +17 (p=0,006, EFS)
				+4, +10, +18 (p=0,0003, EFS)
28	KT	260		+11, +17 (p=0,027, EFS)
				+11, +17 (p=0,045, EFS)
37	FC, SNP	75		+4, +10, +17 (p=0,009, gyors 15. napi terápiás válasz)

MN: modális kromoszómaszám, KT: kariotipizálás, FC: flow citometriával meghatározott DNS-index, SNP: egynukleotid-polimorfizmus analízis, FISH: fluoreszcens in situ hibridizáció, EFS: eseménymentes túlélés, OS: teljes túlélés, SR: standard rizikó. *Az esetszám megadása nem egységes: egyes publikációkban a magas hiperdiploiditását betegekre vonatkozik, másokban az összes leukémiás beteget magába foglalja

A különbségek csak részben magyarázhatók az eltérő terápiás protokollok alkalmazásával, a betegek etnikai különbségeivel: háttérükben módszertani okok is valószínűsíthetők. A kromoszómaeltérések detektálásának standard módszere a konvencionális citogenetikai analízis, mely során a sejtek teljes kromoszómakészletét vizsgáljuk, 20–25 metafázis során, tenyésztett sejteken. A hiperdiploid blasztok azonban nehezen tenyésztethetők és a tenyésztés során klonális szelekció jöhet létre: a mitotikus alakok esetenként nem reprezentálják a genetikai eltérést hordozó sejtpopulációt. Fluoreszcens *in situ* hibridizációval (iFISH) mintánként több száz interfázisú sejt vizsgálható, a fent említett nehézségek kiküszöbölésével [38]. Napjainkig kevés jelentős klinikai tanulmány született, melyben a gyermekkori HDD ALL prognosztikai citogenetikai tényezőit iFISH módszerrel vizsgálják.

SAJÁT VIZSGÁLATAINK

Betegek és módszerek

A Pécsi Tudományegyetem Patológiai Intézetében 1996 és 2009 között diagnosztizált, 168 prekursor B-sejtes ALL-es gyermek (1–18 év) kezelés előtti, diagnosztikus, archivált csontvelőmintáját retrospektíven vizsgáltuk. Minden gyermek magyarországi centrumban részesült kezelésben, a BFM-protokoll alapján (ALL-BFM 95 és ALL IC-BFM 2002). A Down-szindrómás, illetve a bizonyos mutációkat [t(9;22)(q34;q11.2) (BCR-ABL1 fúzió), t(v;11q23) (MLL génátrendező-dés), t(12;21)(p13;q22) (ETV6-RUNX1 fúzió), t(1;19)(q23;p13.3) (TCF3-PBX1 fúzió)] hordozó betegeket kizártuk a vizsgálatból, tekintettel arra, hogy ezen eltérések ismert prognosztikai jelentőségű ALL-alcsoportokat azonosítanak. Multitarget interfázis fluoreszcens *in situ* hibridizációt alkalmazva a leggyakrabban érintett 8 kromoszóma (4-es, 6-os, 10-es, 14-es, 17-es, 18-as, 21-es, X) többletét, kópiaszám-növekedési mintázatát rögzítettük, sejtszintű korrelált adatbázist létrehozva. Minden minta esetén a modális kromoszómaszámot a legnagyobb szubklón kromoszómaszáma alapján határoztuk meg (iMN8). A részletes módszertan korábbi publikációkban került bemutatásra [39]. A vizsgálat az ETT-TUKEB szakmai-etikai engedélyével zajlott.

Eredmények

A 168 beteg adatainak feldolgozása során nem volt szignifikáns különbség az ALL-BFM 95 (n=94) és az ALL IC-BFM 2002 (n=74) protokollal kezelt betegek eseménymentes és teljes túlélését illetően (pEFS: p=0,616 és pOS: p=0,550), ezért adataikat összevontuk az analízis során. A medián követési idő 84 hónap volt (0,3–222,4 hó) és minden gyógyult beteg esetén legalább 5 év eltelt a diagnózis és a klinikai adatok értékelése között. A fiú-lány arány közel 1:1 volt (82 vs. 86). A kezelés első hónapjában (indukciós fázis) nyolc gyermeknél fulmináns szövödmény jelentkezett, a többiek azonban mind komplett hematológiai remisszióba kerültek. A kromoszómák iFISH-vizsgálata a gyermekek 28,5%-ánál (48/168) igazolt magas hiperdiploid kromoszómakészletet

(iMN8 ≥51). A DNS-indexre vonatkozó adat 109/168 betegnél állt rendelkezésre, ezek retrospektív vizsgálatával is azonosítható volt az iFISH módszerrel elkülönített HDD csoport a szignifikánsan (p<0,001) magasabb átlagos DNS-index alapján (1,19 vs. 1,03).

Vizsgálatunk egyik fontos kérdése volt, hogy a magas hiperdiploiditású csoporton belül sikerül-e azonosítani olyan klinikai/citogenetikai paramétereket, melyekkel már a diagnózis idején elkülöníthetők a legkedvezőbb prognózisú gyermekek azoktól, akiknél a magas hiperdiploiditás ellenére kevésbé kedvező kimenetel várható. Univariáns analízissel a kezdeti magas fehérvérsejtszám (>50 G/L) kedvezőtlen prognosztikai tényezőnek bizonyult (pEFS, p=0,019), ugyanakkor a betegek neme, kora, valamint az iMN8 paramétere nem befolyásolta az eseménymentes túlélést. Ezzel szemben csak az iMN8 paraméter stratifikálta és különítette el, pOS vonatkozásában, szignifikánsan a HDD-n belül az 51–54 vs. ≥55 modális kromoszómaszámú betegeket. Kimagaslóan kedvező 5 éves túlélést (pOS=95,2%) tapasztaltunk a legmagasabb modális kromoszómaszámmal (iMN8 55–56) jellemezhető alcsoportnál (n=20). Ezen érték nem csupán a magas hiperdiploiditású leukémiás csoporton belül, de a teljes vizsgált betegpopuláción belül is szignifikáns (p=0,046, illetve p=0,019). Bár kedvezőtlen klinikai paraméterű betegek is tartoztak közéjük [rossz prednizolonválasz (2/20 betegnél), magas fehérvérsejtszám (>80 G/L, 3/20 betegnél), idősebb életkor (>15 év, 3/20 betegnél), relapszus (3/20 betegnél)], az egyetlen haláleset egy fulmináns infekció következménye volt egy komplett remisszióban lévő betegnél. A relapszust elszenvedett betegek mind második komplett remisszióban vannak. Összességében megállapítható, hogy a magas hiperdiploiditású csoportban multivariáns analízis alapján az alacsonyabb (<50 G/L) fehérvérsejtszám (p=0,002), az 1–6 év közötti életkor (p=0,005) és a magas iMN8-érték (p=0,008) egyaránt szignifikánsan hozzájárultak a jobb pEFS-értékhez. Továbbá, mind a négy paraméter (női nem, alacsony

2. TÁBLÁZAT. A specifikus kromoszómák kópiaszám-növekedési gyakorisága iFISH-analízis során, 48 hiperdiploid ALL-es beteg esetén

Kromoszóma	iMN8 >51	iMN8 51–54	iMN8 55–56
4-es	0,79	0,71	0,90
6-os	0,94	0,93	0,95
10-es	0,77	0,61	1,00
14-es	0,94	0,89	1,00
17-es	0,54	0,54	0,55
18-as	0,92	0,86	1,00
21-es	0,98	0,96	1,00
X	0,94	0,89	1,00

iFISH: interfázis fluoreszcens *in situ* hibridizáció, iMN8: 8 kromoszóma iFISH-vizsgálata alapján meghatározott modális szám

fehérvérsejtszám, 1–6 év közötti életkor, magas iMN8-érték) szignifikáns (0,003 és 0,021 közötti p-értékek) összefüggést mutatott a pOS-értékkel. Ezen eredmények függetlenek voltak az adott időszakban alkalmazott protokolloktól (ALL-BFM 95 vs. ALL IC-BFM 2002) [40].

A kópiaszám-növekedés mintázata és prognosztikai jelentősége

A többletkromoszómák gyakoriságát a 2. táblázat mutatja. Leggyakrabban a 21-es kromoszóma tri/tetraszómiáját detektáltuk, ugyanakkor a 17-es kromoszóma triszómiáját csak az esetek felében észleltük. Az iMN8 55–56 alcsoportban átlagosan 13%-kal volt gyakoribb az extra kromoszóma, mint az iMN8 51–54 csoportban. A modális szám növekedésével a 6-os, 17-es és 21-es kromoszómák esetében már nem mutatkozott további kópiaszám-növekedés. Univariáns analízissel szignifikánsan kedvezőbb kimenetelt tapasztaltunk +4-es kromoszóma jelenlétekor mind az eseménymentes, mind a teljes túlélést

illetően (pEFS: p=0,006 és pOS: p=0,002). A 4-es kromoszóma többletét minden leukémiában a 6-os kromoszóma többlete kísérte. A kombinált triszómiák esetén a 4-6, 4-10, 4-17, 4-18 és 4-10-18 szimultán jelenléte bizonyult prognosztikailag relevánsnak a pEFS, a pOS vagy mindkettő vonatkozásában (3. táblázat). Ha multivariáns analízisben a négy klinikai-citogenetikai paramétert (életkor, fehérvérsejtszám, nem és iMN8) kombináltuk az egyedi és kombinált kromoszómatöbbletekkel, az utóbbiak egyike sem javította a pEFS-értéket (nem voltak független EFS-paraméterek). Ugyanakkor, ugyanilyen multivariáns analízisben egyedül a 4-es kromoszóma kópiaszám-növekedése bizonyult erősen szignifikáns (p=0,009) és független változóknak pOS vonatkozásában [40].

Megbeszélés

Interfázis-citogenetikai vizsgálatainkkal mintánként legalább háromszáz, tenyésztés nélküli sejten vizsgáltuk a magasan hiperdiploid leukémia esetén leggyakrabban érintett nyolc

3. TÁBLÁZAT. A specifikus kromoszómák kópiaszám-növekedésének prognosztikai jelentősége

Kromoszómatöbblet	Betegek száma	pEFS (K-M)	p (log-rank)	pOS (K-M)	p (log-rank)
Kr. 4					
igen	38/48	169,9	0,006	222,2	0,002
nem	10/48	99,2		118,1	
Kr. 4-6					
igen	38/48	169,9	0,006	222,2	0,002
nem	10/48	99,2		118,1	
Kr. 4-10					
igen	32/48	173,1	0,024	218,0	0,109
nem	16/48	121,0		154,0	
Kr. 4-17					
igen	22/48	182,2	0,033	198,0	0,024
nem	26/48	135,1		178,7	
Kr. 4-18					
igen	34/48	170,4	0,031	219,5	0,046
nem	14/48	119,5		145,4	
Kr. 4-10-17					
igen	18/48	185,4	0,047	196,0	0,081
nem	30/48	140,1		187,5	
Kr. 4-10-18					
igen	31/48	171,9	0,045	217,1	0,154
nem	17/48	126,4		157,5	

K-M: Kaplan–Meier, pEFS: eseménymentes túlélés valószínűsége hónapokban, pOS: teljes túlélés valószínűsége hónapokban

kromoszóma kópiaszám-növekedési mintázatát. Az extra kromoszómák számának hierarchikus növekedése a modális szám növekedésével korrelál (41), így elegendőnek bizonyult a nyolc kromoszóma analízise ahhoz, hogy megbízhatóan azonosítsuk a magas hiperdiploiditású alcsoportot, melyet korábbi tanulmányok a teljes kromoszómakészlet vizsgálatával diagnosztizáltak. Mindezt megerősítette az aneuploiditás vizsgálatának egy másik standard módszere, a DNS-index meghatározása, mely adat 109/168 betegünk esetében állt rendelkezésünkre.

Az elmúlt években több neves kutatócsoport is hangsúlyozta a molekuláris citogenetikai módszerek (FISH, SNP, NGS) alkalmazásának lehetőségét, előnyeit HHD ALL esetén, azonban kevés ilyen tanulmányban vizsgálták a numerikus aberrációk klinikai, prognosztikai jelentőségét. Konvencionális citogenetikai vizsgálatok pozitív korrelációt igazoltak a magas modális kromoszómaszám és a betegség klinikai kimenetele között. Dastugue és mtsai az 58951 CLG-EORTC protokoll szerint kezelt, 440 hiperdiploid leukémiás gyermek esetén a legerősebb prognosztikai faktornak a modális számot találta: MN 58–66 esetén a hatéves EFS 99%-nak, az OS 100%-nak adódott (27). Paulsson és mtsai NOPHO protokollal kezelt 344 hiperdiploid gyermek adatainak elemzésekor szignifikánsan kedvezőbb kimenetelt észlelt az MN>55 betegcsoportban (26). Interfázis-citogenetikai módszerrel mi is hasonlóan kedvező prognosztikai alcsoportot azonosítottunk: az iMN8 55–56 betegcsoportban kedvezőtlen klinikai rizikófaktorok jelenléte ellenére is 95%-os az öt éves teljes túlélés. A specifikus tri/tetraszómiák, illetve kombinációik

relevanciáját vizsgálva a dupla triszómiák közül a +4+6, +4+10, +4+17, +4+18, a tripla triszómiák közül a +4+10+17 jelenléte társult szignifikánsan kedvezőbb eseménymentes kimenetellel. A legpozitívabb prediktív értéke a 4-es triszómiának volt (5 éves pEFS 86,8%, $p=0,006$ és 5 éves pOS: 92,1%, $p=0,002$). Interfázis-citogenetikai vizsgálatunk alkalmasnak bizonyult különösen kedvező prognosztikai alcsoportok azonosítására gyermekkori akut limfoblasztos leukémia esetén. További, nagyobb betegszámú vizsgálat szükséges az eredményeink megerősítésére és a módszer rutin diagnosztikai alkalmazhatóságának felderítésére.

A korrelált adatgyűjtés lehetővé tette a sejt-sejt szintű variabilitás, a szubklonális kromoszómális heterogenitás vizsgálatát is (39, 40, 42), ezen eredményeink ismertetése azonban meghaladja a jelen cikk terjedelmét.

Összefoglalás

A gyermekkori akut limfoblasztos leukémia legnagyobb, a betegek 25%-át magába foglaló citogenetikai alcsoportja a magas hiperdiploid ALL. Prognózisa nagyon jó, bár a betegek egy részénél később relapszus alakul ki. Vizsgálatunkban tenyésztés, szelekció nélküli diagnosztikus csontvelőminta sejtszintű analízise során vizsgáltuk a nyolc leggyakoribb teljes extra kromoszóma kópiaszám-növekedési mintázatát. A magas modális szám és bizonyos triszómiák jelenléte kimagaslóan kedvező prognosztikai alcsoport azonosítását tette lehetővé. Eredményeink megerősítéséhez további, nagyobb esetszámú vizsgálat szükséges.

IRODALOM

- Pui CH, Mullighan CG, Evans WE, et al. Pediatric acute lymphoblastic leukemia: where are we going and how do we get there? *Blood* 120:1165–1174, 2012
- Inaba H, Graves M, Mullighan CG, et al. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 381:1943–1955, 2013
- Woo JS, Alberti MO, Tirado CA. Childhood B-acute lymphoblastic leukemia: a genetic update. *Exp Hematol Oncol* 3:16, 2014
- Tasian SK, Loh ML, Hunger SP. Childhood acute lymphoblastic leukemia: Integrating genomics into therapy. *Cancer* 121:3577–3590, 2015
- Haltrich I, Csóka M, Kovács G, et al. A hagyományos citogenetika és a FISH egymást jól kiegészítő vizsgálatok gyermekkori akut limfoid leukémiában. *Magy Onkol* 52:283–291, 2008
- Oláh E, Balogh E, Pajor L, et al. Ten-year experiences on initial genetic examination in childhood acute lymphoblastic leukaemia in Hungary (1993–2002). Technical approaches and clinical implementations. *Pathol Oncol Res* 17:81–90, 2011
- Attarbaschi A, Mann G, König M, et al. Near-tetraploidy in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia is a highly specific feature of ETV6/RUNX1-positive leukemic cases. *Genes Chromosomes Cancer* 45:608–611, 2006
- Raimondi SC, Zhou Y, Shurtleff SA, et al. Near-triploidy and near-tetraploidy in childhood acute lymphoblastic leukemia: association with B-lineage blast cells carrying the ETV6–RUNX1 fusion, T-lineage immunophenotype, and favorable outcome. *Cancer Genet Cytogenet* 169:50–57, 2006
- Kaneko Y, Rowley JD, Variakojis D, et al. Correlation of karyotype with clinical features in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res* 42:2918–2929, 1982
- Paulsson K, Johansson B. High hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 48:637–660, 2009
- Paulsson K, Forestier E, Lilljebjörn H, et al. Genetic landscape of high hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:21719–21724, 2010
- Maia AT, van der Velden VH, Harrison CJ, et al. Prenatal origin of hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia in identical twins. *Leukemia* 17:2202–2206, 2003
- Panzer-Grümayer ER, Fasching K, Panzer S, et al. Nondisjunction of chromosomes leading to hyperdiploid childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia is an early event during leukemogenesis. *Blood* 100:347–349, 2002
- Taub JW, Ge Y. The prenatal origin of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma* 45:19–25, 2004
- Bateman CM, Alpar D, Ford AM, et al. Evolutionary trajectories of hyperdiploid ALL in monozygotic twins. *Leukemia* 29:58–65, 2015
- Wiemels JL, Kang M, Chang JS, et al. Backtracking RAS mutations in high hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood Cells Mol Dis* 45:186–191, 2010
- Paulsson K, Lilljebjörn H, Biloglav A, et al. The genomic landscape of high hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet* 47:672–676, 2015
- Malinowska-Ozdowy K, Frech C, Schönegger A, et al. KRAS and CREBBP mutations: a relapse-linked malicious liaison in childhood high hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 29:1656–1667, 2015
- Woodward EL, Olsson ML, Johansson B, et al. Allelic variants of PRDM9 associated with high hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 166:947–949, 2014

20. Gruszka-Westwood AM, Horsley SW, Martinez-Ramirez A, et al. Comparative expressed sequence hybridization studies of high-hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 41:191–202, 2004
21. Chilton L, Buck G, Harrison CJ, et al. High hyperdiploidy among adolescents and adults with acute lymphoblastic leukaemia (ALL): cytogenetic features, clinical characteristics and outcome. *Leukemia* 28:1511–1518, 2014
22. Pui CH, Yang JJ, Hunger SP, et al. Childhood acute lymphoblastic leukemia: Progress through collaboration. *J Clin Oncol* 33:2938–2948, 2015
23. Chen B, Wang YY, Shen Y, et al. Newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia in China (I): abnormal genetic patterns in 1346 childhood and adult cases and their comparison with the reports from Western countries. *Leukemia* 26:1608–1616, 2012
24. Mitelman F, Johansson B, Martens F. Mitelman Database of Chromosome Aberrations and Gene Fusions in Cancer. 2016. <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>
25. Raimondi SC, Pui CH, Hancock ML, et al. Heterogeneity of hyperdiploid (51–67) childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 10:213–224, 1996
26. Paulsson K, Forestier E, Andersen MK, et al. High modal number and triple trisomies are highly correlated favorable factors in childhood B-cell precursor high hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia treated according to the NOPHO ALL 1992/2000 protocol. *Haematologica* 98:1424–1432, 2013
27. Dastugue N, Suciu S, Plat G, et al. Hyperdiploidy with 58–66 chromosomes in childhood B-acute lymphoblastic leukemia is highly curable: 58951 CLG–EORTC results. *Blood* 121:2415–2423, 2013
28. Kato M, Imamura T, Manabe A, et al. Prognostic impact of gained chromosomes in high-hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukaemia: a collaborative retrospective study of the Tokyo Children's Cancer Study Group and Japan Association of Childhood Leukaemia Study. *Br J Haematol* 166:295–298, 2014
29. Moorman AV, Ensor HM, Richards SM, et al. Prognostic effect of chromosomal abnormalities in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia: results from the UK Medical Research Council ALL97/99 randomised trial. *Lancet Oncol* 11:429–438, 2010
30. Sharatkumar A, DeCamillo D, Bhambhani K, et al. Children with hyperdiploid but not triple trisomy (+4,+10,+17) acute lymphoblastic leukemia have an increased incidence of extramedullary relapse on current therapies: A single institution experience. *Am J Hematol* 83:34–40, 2008
31. Moorman AV, Richards SM, Martineau M, et al. Outcome heterogeneity in childhood high-hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 102:2756–2762, 2003
32. Heerema NA, Sather HN, Sensel MG, et al. Prognostic impact of chromosomes 10, 17, and 5 among children with acute lymphoblastic leukemia and high hyperdiploidy (>50 chromosomes). *J Clin Oncol* 18:1876–1887, 2000
33. Sutcliffe MJ, Shuster JJ, Sather HN, et al. High concordance from independent studies by the Children's Cancer Group (CCG) and Pediatric Oncology Group (POG) associating favorable prognosis with combined trisomies 4, 10, and 17 in children with NCI Standard-Risk B-precursor Acute Lymphoblastic Leukemia: a Children's Oncology Group (COG) initiative. *Leukemia* 19:734–740, 2005
34. Harris MB, Shuster JJ, Carroll A, et al. Trisomy of leukemic cell chromosomes 4 and 10 identifies children with B-progenitor cell acute lymphoblastic leukemia with a very low risk of treatment failure: a Pediatric Oncology Group study. *Blood* 79:3316–3324, 1992
35. Jackson JF, Boyett J, Pullen J, et al. Favorable prognosis associated with hyperdiploidy in children with acute lymphocytic leukemia correlates with extra chromosome 6. A Pediatric Oncology Group study. *Cancer* 66:1183–1189, 1990
36. Kawamata N, Ogawa S, Zimmermann M, et al. Molecular allelokaryotyping of pediatric acute lymphoblastic leukemias by high-resolution single nucleotide polymorphism oligonucleotide genomic microarray. *Blood* 111:776–784, 2008
37. Zaliouva M, Vaskova M, Hovorkova L, et al. Childhood hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 126:4990, 2015
38. Pajor L, Szuhai K, Mehes G, et al. Combined metaphase, interphase cytogenetic, and flow cytometric analysis of DNA content of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Cytometry* 34:87–94, 1998
39. Alpár D, Pajor G, Varga P, et al. Sequential and hierarchical chromosomal changes and chromosome instability are distinct features of high hyperdiploid pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer* 61:2208–2214, 2014
40. Vojcek A, Pajor G, Alpar D, et al. Conserved hierarchical gain of chromosome 4 is an independent prognostic factor in high hyperdiploid pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res* 52:28–33, 2017
41. Heerema NA, Raimondi SC, Anderson JR, et al. Specific extra chromosomes occur in a modal number dependent pattern in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 46:684–693, 2007
42. Pajor G, Varga P, Horváth B, et al. Gyermekkori akut lymphoblastos leukaemia, lymphoblastoma molekuláris stratifikációja. Hiperdiploid B-ALL: mi van a felszín alatt? *Hematológia-Transzfuziológia* 47:10–16, 2014