

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

**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**

**Gyermekegyógyászati Klinika**



**Pécs, 2021.**

## Rövidítések jegyzéke

ALL	akut limfoblasztos leukémia
B-ALL	B-sejtvonal eredetű ALL
BFM	Berlin-Frankfurt-Münster német munkacsoport
CEP	centromér specifikus próba (centromer enumeration probe)
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DI	DNS-index
DNS	dezoxi-ribonukleinsav
EFS	eseménymentes túlélés (event free survival)
FISH	fluoreszcens in situ hibridizáció
HeH	magasan hiperdiploid (high hyperdiploid)
HR	magas rizikócsoport (high risk)
I-BFM	nemzetközi BFM (international BFM)
iFISH	interfázis fluoreszcens in situ hibridizáció
iMN <sub>8</sub>	modális kromoszómaszám a 8-paraméteres iFISH vizsgálat alapján
IR	közepes rizikócsoport (intermedier risk)
LSI	lókusz specifikus próba (locus specific identifier)
MN	modális szám (modal number)
MRD	minimális reziduális betegség (minimal residual disease)
OS	teljes túlélés (overall survival)
pEFS	az eseménymentes túlélés valószínűsége (probability of event free survival)
pOS	a teljes túlélés valószínűsége (probability of overall survival)
PTE-KK	Pécsi Tudományegyetem Klinikai Központ
SNP	egy-nukleotid polimorfizmus (single nucleotide polymorphism)
SR	standard rizikócsoport (standard risk)
WHO	Egészségügyi Világszervezet (World Health Organization)

## 1. Bevezetés

A leggyakoribb gyermekkori rosszindulatú megbetegedés az akut limfoblasztos leukémia (ALL). Magyarországon évente 60-70 új beteg kerül felismerésre. 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. Gyógyító munkánkban ma már nem csak a túlélés további javítása a cél, hanem a terápia rövid és hosszútávú toxikus következményeinek csökkentése is. Értekezésemben a gyermekkori ALL egyik legnagyobb, a betegek 20-25%-át magába foglaló citogenetikai alcsoportjának, a magasan hiperdiploid akut limfoblasztos leukémiának (HeH ALL) klinikai és citogenetikai prognosztikai tényezőit vizsgáltam.

A HeH ALL-t a limfoblasztok magas kromoszómaszáma jellemzi, a WHO 2016-os klasszifikációja 51-65 közötti értéket határoz meg, a leggyakoribb modális szám az 55. Az aneuploiditás a 4-, 6-, 10-, 14-, 17-, 18-, 21-es X, ritkábban az 5-ös és 8-as kromoszómák jellegzetes, non-random mintázat szerinti kópiaszám-növekedésének a következménye. Az aneuszómiák döntően triszómiák, fiúknál X kromoszóma diszómia, emellett tetraszómia is előfordul. Pentaszómia csak a 21-es kromoszómára jellemző.

A magasan hiperdiploid ALL betegek diagnóziskor fiatal életkorúak (átlag: 2-4 év), kezdeti fehérvérsejtszámuk jellegzetesen alacsony, a leukémia prekursor- B fenotípusú. Ezen tényezők kedvező kimenetelű betegségekre utalnak, a betegek nagyobb hányada ennek megfelelően standard intenzitású kemoterápiában részesül. Az indukció végi remisszió 95% feletti, és a teljes túlélés (OS) meghaladja a 90%-ot, az elmúlt években egyes munkacsoportok 95% feletti értékekről számoltak be. Mindezen kiváló eredmények ellenére nem ritka a relapszus, akár évekkal a terápia befejezését követően sem: így az eseménymentes túlélés (EFS) ennél alacsonyabb: korábban 70-75%, az elmúlt évtizedben 80-89% volt. Mivel a magasan hiperdiploid a legnagyobb citogenetikai alcsoport gyermekkori ALL esetén, így a relapszusok jelentős része is ezen alcsoport betegeit érinti.

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

tri-, tetraszómiák jelenléte általában kedvező prognózissal asszociált, azonban az egyes munkacsoportok vizsgálatainak eredményei nem teljesen egybehangzóak.

## 2. Célkitűzések

A HeH ALL betegek klinikai és citogenetikai prognosztikai jellemzőinek vizsgálata során a hagyományos vizsgálómódszerekkel ellentétben interfázis fluorescens in situ hibridizációt (iFISH) 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 sejttenyésztés 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 Pathologiai Intézetében 1996-2009 között diagnosztizált és archivált prekursor-B-sejtes ALL betegek diagnosztikus csontvelőjének interfázis FISH vizsgálatát. Betegmintánként 2x4 fluorescens próbát alkalmazva, két hibridizációs körben detektáltuk a HeH 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 háttérben 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**

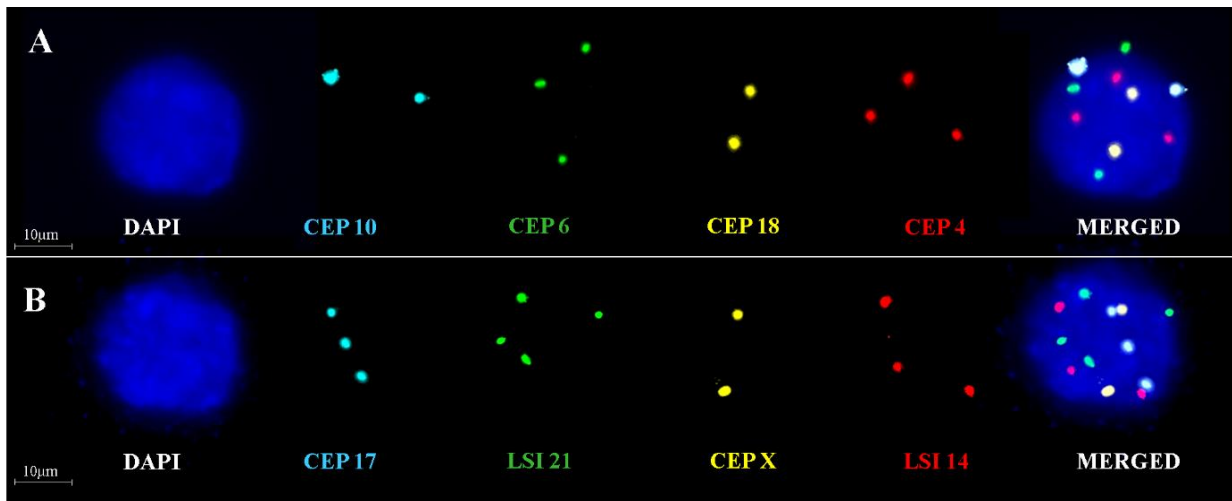
214 prekursor-B-sejtes ALL gyermek (1-18 év) kezelés előtti, 70%-os etanolban, -20 °C-on archivált csontvelőmintáit vizsgáltuk. A vizsgált kohorsz tagjai negatívak voltak a következő, önálló prognosztikai kategóriát képviselő mutációkra: t(9;22)(q34;q11.2) (*BCR-ABL1* fúzió), t(v;11q23) (*KMT2A* génátrendeződés), 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. Klinikai követési, prognosztikai vizsgálat csak azon betegeknél történt meg, akiknél a 8-paraméteres iFISH analízis során magasan hiperdiploid státusz került megállapításra. A létrehozott adatbázisunk az alábbi klinikai paramétereket foglalta magába: a beteget diagnosztizáló központ azonosítója, a 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), rizikócsoporthozás, a betegség kimenetele, relapszus esetén annak dátuma és lokalizációja, a relapszust követő terápiás 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.

#### **3.2. Módszerek**

##### **3.2.1. iFISH próbák**

A számbeli kromoszómaeltérések vizsgálatokor centromér próbákat (CEP) alkalmazunk, melyekkel a rövid szakaszok ismétlődéséből álló, nem kódoló, szatellita DNS mutatható ki. A szatellita DNS kromoszóma specifikus, így megfelelő próba alkalmazásakor egy adott kromoszóma azonosítható. A szatellita és kromoszóma specifikus DNS próbákkal fény vagy fluorescens 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 aberrációit kimutató centromer próbák a PTE-KK Pathológiai Intézetben rendelkezésre álltak. Mivel a 14-es és a 21-es kromoszómák esetében a CEP próbák két másik kromoszómával is átfedést mutatnak (14/22, illetve 13/21), ezért két lókuszos specifikus próbát (LSI) terveztünk. A CEP és LSI próbák szenzitivitását, specificitását és a szignálok

minőségét nemzetközileg elfogadott előírások szerint határoztuk meg. Két kör próbaszettet alkalmaztunk: az első kör (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 második kör próbaszettel (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) (1. ábra).



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

### 3.2.2. Hibridizáció

A 70%-os etanolban fixált leukémia sejtminták előkészítését követően a jelöléshez az első körben 3 µl CEP próba-elegyet (4, 6, 10, 18-as kromoszómák próbái) tettünk minden mintára, majd a minta és próba DNS-t együtt denaturáltuk. A hibridizációt követően poszthibridizációs mosásokat végeztünk a nem kötődött próbák eltávolítása céljából. A sejtmagok jelzésére DAPI oldatot használtunk, amelyet a fluorescens szignál kioltódásának lassítására Vectashield lefedő oldatban oldottunk. A mintát végül fedőlemezrel fedtük és sötétben tartottuk az analízisig. A kiértékelést követően, a második hibridizációs kör előtt a fedőlemezeket leáztattuk, a preparátumokat refixáltuk, dehidráltuk majd 3 µl LSI+CEP elegyet (a 14, 17, 21, X kromoszómák próbái) adagoltunk mintánként. A denaturációs és hibridizációs lépések megegyeztek az első körben alkalmazottakkal.

### **3.2.3. A multiplex iFISH jelek kiértékelése**

Mindegyik próbaszettel történő jelölés után a lemezeket komputer kontrollált, motorizált, pásztázó tárgyasztallal, kvarc optikai szálal megvilágítással, motorizált fluoreszcens szűrőtartóval felszerelt multifunkciós mikroszkóp rendszerrel analizáltuk. 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. A hibridizáció eredményeként a kromoszómák centromer régiójának megfelelő számú kerek, pontszerű jelet kaptunk (1. ábra). A szignál mintázatot manuálisan értékeltük ki (3 szignál: triszómia, 4 szignál: tetraszómai 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. A mikroszkóp 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. Ily módon 8-próbás, korrelált iFISH analízisre volt lehetőségünk, melyben egysejt szinten vizsgálhattuk a kromoszóma-többletek mintázatát és a szubklonális heterogenitást.

### **3.3. Statisztikai feldolgozás**

Univariáns 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 al csoportok összehasonlító analízisét log rank teszttel végeztük el. Cox regressziós modell szerinti multivariáns analízist (többszemponos 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.

## 4. Eredmények

### 4.1. A magasan hiperdiploid leukémiák azonosítása iFISH vizsgálattal

A leggyakrabban érintett nyolc kromoszóma többletének, kópiaszám-növekedési mintázatának rögzítés után az egyes betegmintákon belül rendkívül heterogén szubklonális mintázatot tapasztaltunk. Minden vizsgált leukémiában 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 valamint megállapítottuk a modális számot (iMN<sub>8</sub>), a legnagyobb szubklón kromoszómaszáma alapján. A vizsgált 214 mintából 89 betegnél találtunk hiperdiploiditást (iMN<sub>8</sub> ≥ 47), közülük 48 beteg leukémiája bizonyult magasan hiperdiploidnak (iMN<sub>8</sub> ≥ 51). A vizsgált HeH leukémiák esetén a leggyakoribb modális szám 55 volt.

### 4.2. A magasan hiperdiploid betegek klinikai adatai és prognosztikai jellemzői

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), illetve >50 G/l értéket mindössze 5 betegnél észleltünk. Két beteg kivételével mindenkinél kedvező volt a 8. napi prednizolon-válasz, a 33. terápiás napon pedig minden betegnél - azok kivételével, akiket a kezelés első heteiben fulmináns fertőzés következtében elvesztettünk - komplett remisszió igazolódott. Magasan hiperdiploid betegeink döntő hányada tehát a szakirodalomban leírt kedvező klinikai prognosztikai jegyekkel volt jellemezhető.

A túlélés és bizonyos klinikai és citogenetikai mutatók közötti összefüggést is vizsgáltuk. Univariáns analízissel a kezdeti magas fehérvérsejtszám (>50 G/L) kedvezőtlen prognosztikai tényezőnek bizonyult (pEFS, p=0,019), ugyanakkor a betegek neme, kora, valamint az iMN<sub>8</sub> paramétere nem befolyásolta szignifikánsan az eseménymentes túlélést. Az iMN<sub>8</sub> paraméter alapján azonban a magasan hiperdiploid csoporton belül egy kimagaslóan kedvező túléléssel jellemezhető alcsoportot sikerült stratifikálnunk. A legmagasabb modális kromoszómaszámmal (iMN<sub>8</sub> 55–56) jellemezhető alcsoportnál (n=20) 95,2%-os teljes túlélést tapasztaltunk, mely szignifikánsan (p=0,046) kedvezőbb az iMN<sub>8</sub> 51-54 betegek túlélésénél.



### 4.3. A kópiaszám-növekedés prognosztikai jelentősége

Vizsgáltuk, hogy az egyes specifikus kromoszóma-többletek jelenléte társul-e kedvezőbb klinikai kimenetellel, magyarázza-e a magasan hiperdiploid betegek heterogén prognózisát. 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:  $p=0,002$ ). 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 ( $p=0,006$  -  $p=0,047$ ).

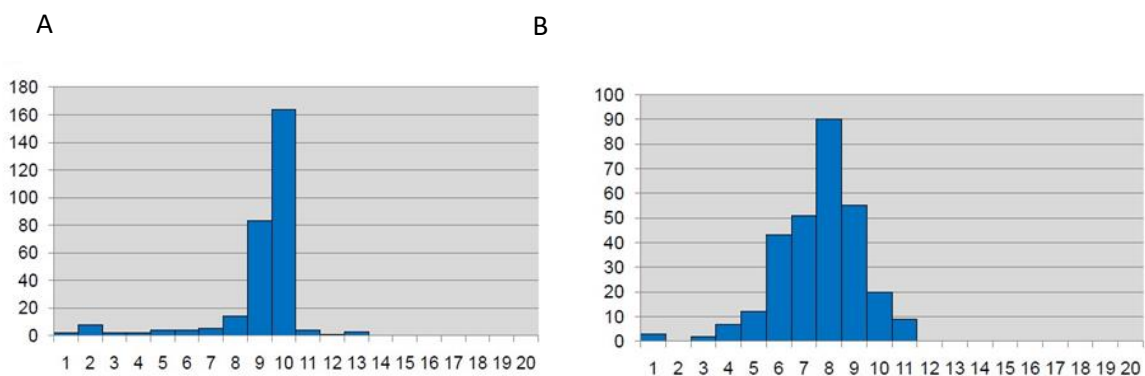
Ha multivariáns analízisben a négy klinikai illetve citogenetikai paramétert (életkor, fehérvérsejtszám, nem és  $iMN_8$ ) kombináltuk az egyedi és kombinált kromoszóma-többletekkel, az utóbbiak egyike sem javította az eseménymentes túlélést (nem voltak független EFS paraméterek). Ugyanakkor, ugyanilyen 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 multivariáns 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-többszám kombinációk közül egyedül az izolált +4 javította szignifikánsan, azaz bizonyult az egyetlen független változónak. Ezen eredmények függetlenek voltak az adott időszakban alkalmazott protokolloktól.

### 4.4. Kromoszómaszám és kariotípus szintű genetikai heterogenitás

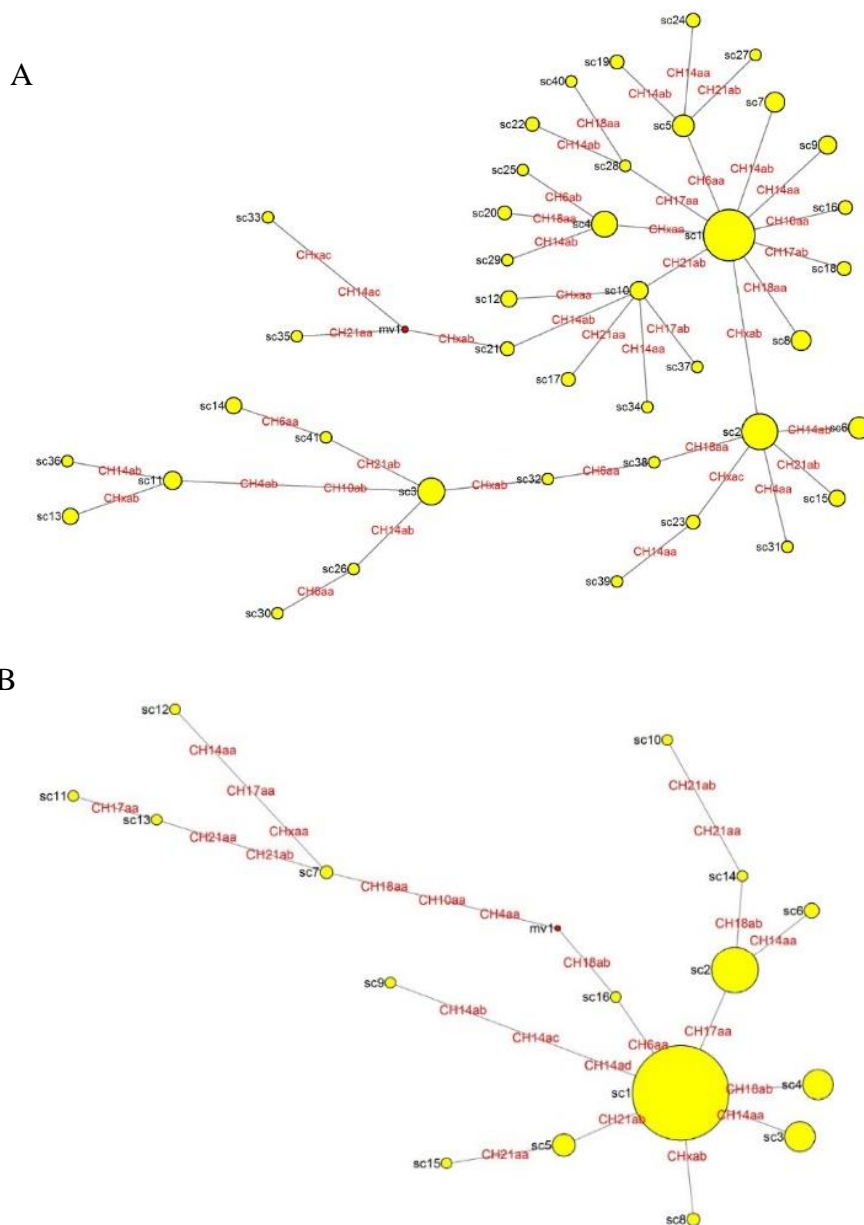
A multiplex, 2x4 kromoszómát érintő iFISH vizsgálat eredményeképpen minden leukémia mintában kétfajta szubklónt azonosítottunk. Egyfelől az *egyedi kariotípus szubklónokat*, melyek mind a nyolc kromoszóma szerint ugyanazon numerikus konstellációt képviselték. Másfelől a *kromoszómaszám szerinti szubklónokat*,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

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, és átlagosan további 9,9 szubklónt azonosítottunk a betegmintákban. Az egyes leukémiákban a kromoszómaszám szerinti szubklónok eloszlása többféle mintázatot követett, a leggyakoribb a haranggörbe alak volt. A haranggörbe-mintázat jellegzetesen alakult a két alcsoportnál: az iMN<sub>8</sub> 55–56 csoportnál kisebb heterogenitásra utaló keskenyebb alappal rendelkezett, mint az iMN<sub>8</sub> 51-54 csoportnál (2. ábra).



**2. ábra.** A kromoszóma-többletek száma szerinti szubklónok gyakorisági eloszlása két beteg esetén bemutatva. A: keskenyebb alapú haranggörbe-mintázat egy iMN<sub>8</sub> 56 modális számú leukémia esetén B: szélesebb alapú haranggörbe-mintázat egy iMN<sub>8</sub> 54 modális számú leukémia esetén. Függőleges tengely: a vizsgálat sejtek száma. Vízszintes tengely: a kromoszóma-többletek száma szerinti szubklónok.

A kromoszómaszám alapján meghatározott szubklónok mellett az *egyedi kariotípus mintázatot* is vizsgáltuk. 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 kariotípus szubklón építhet így fel. Az egyedi kariotípus klónok mintázata jelentős heterogenitást mutatott egy-egy betegmintán belül. Azt tapasztaltuk, hogy a betegek egy részénél a domináns szubklónt sok egyedi kariotípus szubklón alkotta, míg más betegeknél kevés. Az egyes leukémiákban az egyedi kariotípus klónok átlagos száma szignifikánsan magasabb volt ( $p = 0.028$ ) az iMN<sub>8</sub> 51–54 csoportban ( $29.9 \pm 11.8$ ), mint az iMN<sub>8</sub> 55–56 csoportban ( $23.0 \pm 9.2$ ). Hálózat-analízis során kevésbé komplex képet kaptunk a magasabb modális számú, iMN<sub>8</sub> 55–56 csoportban (3. ábra).



**3. ábra.** Hálózat-analízis az egyedi kariotípus szubklónok mintázatát mutatja be két beteg esetén. A: komplex mintázat (egy iMN<sub>8</sub> 54 modális számú leukémia esetén) B: egyszerűbb, kevésbé összetett mintázat (egy iMN<sub>8</sub> 56 modális számú leukémia esetén). 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 megtalált vagy nem létező klónokat képviselnek.

Munkacsoportunk biostatistikusai matematikai módszerekkel a többlet-kromoszómák kialakulásának lehetséges mechanizmusát is vizsgálták. A feltételezhetően szimultán, egyidőben, illetve szekvenciálisan, sorozatosan kialakuló kromoszóma-többletek százalékos megoszlásából származtatott paraméter (0,907) azt mutatta, hogy a numerikus aberrációk kb. 90%-a szekvenciálisan, egyesével alakult ki.

Magasan hiperdiploid ALL kialakulásának a háttérben kromoszóma elválási zavar (szegregációs zavar) áll fenn, mely valamilyen valószínűségi sorrendben érinti az adott kromoszómákat. Csoport (cluster) analízissel az egyes kromoszómák többletének kialakulási sorrendjét vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy egy lépcsőzetesen kialakuló, konzekvens hierarchikus rend mutatkozik az iMN<sub>8</sub> 51-54 és az iMN<sub>8</sub> 55-56 csoportban is. A hierarchikus csoport-alakítást gyakran ábrázolják egy fa jellegű diagram, a dendrogram segítségével, ahol a dendogram-fa felső zónái később kialakuló eseményeket reprezentálnak. Az iMN<sub>8</sub> 51-54 leukémiáknál a csoportfa alapját 21-X-14 kromoszóma csoport 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 iMN<sub>8</sub> 55-56 csoportban a 10-es és 18-as kromoszóma csoport nem volt kimutatható, de egyébként a csoportfa topológiája megegyezett az iMN<sub>8</sub> 51-54 csoportban észleltekkkel.

## 5. Megbeszélés

A gyermekkori akut limfoblasztos leukémia kezelésére alkalmazott jelenlegi nemzetközi protokollok számos klinikai és genetikai paramétert alkalmaznak a különböző rizikócsoportú betegek azonosítására. A kezdeti fehérvérsejtszámon, az életkoron és a tumorvolumen csökkenésén kívül a különböző többlet kromoszómák, tri/tetraszómiák jelenléte is meghatározó tényező egyes munkacsoportoknál az alacsony rizikócsoport definiálásában. A legtöbb tanulmányban univariáns analízissel vizsgálva prognosztikai szempontól relevánsnak bizonyult a 4-es, 10-es, 17-es, 18-as kromoszómák tri/tetraszómiája, 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 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 tenyészthetők és a tenyésztés során klonális szelekció jöhet létre: a mitotikus alakok esetenként nem reprezentálják a genetikai eltérést hordozó sejtpopulációt. A nem-osztódó sejtekből nyert teljes DNS tartalom analízise ugyanakkor arról nem ad információt, hogy a kromoszóma-többletek mely kromoszómákat érintik. Az egyedi sejt specifikus, 8-paraméteres interfázis FISH vizsgálat során nagyszámú - a citogenetikai vizsgálathoz képest 15x több - sejtet lehet analizálni, sejtenyésztés és az ebből fakadó információvesztés kiküszöbölésével. A sejt specifikus genetikai információ pedig új ismereteket jelenthet a kromoszóma-többletek kialakulásáról, illetve prognosztikai jelentőségét illetően.

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 és mtsai genetikailag nem szubtipizált, kis esetszámú, négy kromoszómára folytatott iFISH vizsgálatainak eredményével. Ugyanakkor éles ellentétben állnak a legnagyobb konvencionális citogenetikai adatbázissal, mely szerint az

akut limfoblasztos leukémia eseteinek 84%-ban csak egy klón volt kimutatható (Mitelman és mtsai). Az adatok közötti diszkrepancia 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 újabb vizsgálatok szekvenáláson alapuló technológiák alkalmazásával is felvetették.

A különböző szolid tumorokban észlelt szubklonális illetve celluláris heterogenitás az ALL-t vizsgáló tanulmányokban is egyre több figyelmet kap. A genetikai heterogenitás fontos klinikai következménye, hogy 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 (kromoszóma szegregációs zavar következtében egy stabilan propagáló kóros kariotípus jön létre), másfelől kromoszóma-instabilitás következtében is kialakulhat, amit a mitózisok során létrejövő, fokozott mértékű kromoszómaszám változás 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.

iFISH vizsgálatunkkal egy igen kedvező prognosztikai alcsoportot azonosítottunk: az iMN<sub>8</sub> 55-56 betegcsoportban kedvezőtlen klinikai rizikófaktorok jelenléte ellenére is 95,2%-os volt az öt éves teljes túlélés. Az iMN<sub>8</sub> 51-54 és az iMN<sub>8</sub> 55-56 csoport között a jelentős túlélésbeni különbség mellett a kariotípus szerinti szubklonális heterogenitást illetően is szignifikáns különbséget észleltünk. Ugyanakkor az iMN<sub>8</sub> által meghatározott modális szám nem bizonyult független prognosztikai paraméternek: többszemponos analízis során a legpozitívabb prediktív értéke a 4-es kromoszóma kópiaszám-növekedésének volt.

Az iMN<sub>8</sub> 55-56 alcsoport igen legkedvező prognózissal jellemezhető. 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 iMN<sub>8</sub> 55-56 alcsoportban az egyedi szubklónok átlagos száma szignifikánsan alacsonyabb volt és

mintázatuk egyszerűbb, célirányosabb, kevésbé komplex az iMN<sub>8</sub> 51-54 alcsoportéhoz képest. 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 hátterében 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. Az iMN<sub>8</sub> alapú startifikáció nem volt 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 dendogram-fa tetejét, a nyolcadik „ágát” alkotja. 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, mind saját beteganyagunkban, mind a nemzetközi szakirodalom alapján. 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.

## 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. 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 iMN<sub>8</sub> 55–56 csoportban, az iMN<sub>8</sub> 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. 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 példaképpül 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, bíztattak és bátorítottak, erős gyökereket és szárnyakat adtak. Férjemnek, aki példátlan türelemmel és megértéssel támogatja szakmai ambícióimat és aki segített a távolléteket elviselni a számunkra legfontosabbaknak: gyermekeinknek, Máténak, Júliának és Andriskának.

## 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 lymphoblasztos 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) alkalmazása 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**