

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

VOJCEK ÁGNES<sup>1</sup>, PAJOR LÁSZLÓ<sup>2</sup>

PTE Klinikai Központ, <sup>1</sup>Gyermekgyógyászati Klinika, <sup>2</sup>Patológiai 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 citosztatikumok 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 csúcsa 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 nyerése 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 faktora (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 változónak 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)
<b>Kr. 4</b>					
igen	38/48	169,9	0,006	222,2	0,002
nem	10/48	99,2		118,1	
<b>Kr. 4-6</b>					
igen	38/48	169,9	0,006	222,2	0,002
nem	10/48	99,2		118,1	
<b>Kr. 4-10</b>					
igen	32/48	173,1	0,024	218,0	0,109
nem	16/48	121,0		154,0	
<b>Kr. 4-17</b>					
igen	22/48	182,2	0,033	198,0	0,024
nem	26/48	135,1		178,7	
<b>Kr. 4-18</b>					
igen	34/48	170,4	0,031	219,5	0,046
nem	14/48	119,5		145,4	
<b>Kr. 4-10-17</b>					
igen	18/48	185,4	0,047	196,0	0,081
nem	30/48	140,1		187,5	
<b>Kr. 4-10-18</b>					
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