МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА ПО ПЕДИАТРИЯ

Д-р Надежда Николова Юрукова – Цакова

ЗНАЧЕНИЕ НА НАЙ-ЧЕСТИТЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИ АНОМАЛИИ ПРИ ОСТРАТА ЛИМФОБЛАСТНА ЛЕВКЕМИЯ В ДЕТСКА ВЪЗРАСТ

ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД ЗА ПРИСЪЖДАНЕ НА ОБРАЗОВАТЕЛНА И НАУЧНА СТЕПЕН „ДОКТОР“

Област на висше образование: „Здравеопазване и спорт“
Научна област: „Медицина“
Научна специалност „Педиатрия“ 03.01.50

Научни ръководители:

Проф. д-р Георги Николаевич Балаценко, дм

Доц. Мая Николова Йорданова, дм

София, 2021

С Ъ К Р А Щ Е Н И Я

Съкращения на кирилица:

ДНК – Дезоксирибонуклеинова киселина

ИФ – Имунофонотипизация

КДКХО – Клиника по детска клинична хематология и онкология

КТ – Компютърна томография

ЛДХ – Лактатдехидрогеназа

МРБ – Минимална резидуална болест

НХЛ – Неходжкинов лимфом

ОЛЛ – Остра лимфобластна левкемия

ОМЛ – Остра миелоидна левкемия

РНК – Рибонуклеинова киселина

ХМЛ – Хронична миелоидна левкемия

ЦНС – Централна нервна система

ЯМР – Ядрено-магнитен резонанс

Съкращения на латиница:

ALL – Acute lymphoblastic leukemia

AML – Acute myeloid leukemia

BCP – ALL – B–cell precursor acute lymphoblastic leukemia

BFM – Berlin-Frankfurt-Münster

CGH – Comparative Genomic Hybridization

CML – Chronic myeloid leukemia

CNAs – Copy Number Aberrations

CNS – Central nervous system

DNA – Deoxyribonucleic acid

EFS – Event free survival

FC-MRD – Flow-cytometry based minimal residual disease

GPR – Good prednisolone response

GWAS – Genome-Wide Association Study

HR – High Risk

LDH – Lactate dehydrogenase

MR – Medium Risk

NCI – National Cancer Institute

OS – Overall survival

PPR – Poor prednisolone response

RNA – Ribonucleic acid

RT-PCR – Reverse transcriptase – polymerase chain reaction

SR – Standard risk

WBC – White blood cells

С Ъ Д Ъ Р Ж А Н И Е

Въведение 6
Литературен обзор 7
Епидемиология на Острата лимфобластна левкемия (ОЛЛ) .. 7
Етиопатогенеза на ОЛЛ 7
Класификация на ОЛЛ 11
Генетични субтипове на ОЛЛ 12
Генетичните маркери като показател за измерване на Минимална резидуална болест (МРБ) 33
Методи за изследване 35
Значение на генетичните фактори 38
Нерешени и спорни проблеми 39
Цели и задачи 40
Клинична група, материали и методи 41
Клинична група 41
Материали и методи – описание и дефиниция 49
Класически диагностични методи – физикално изследване, лабораторни и образни изследвания 49
Класически диагностични методи при хематологично заболяване 50
Специализирани диагностични методи 51
Статистически методи 58

Резултати 61

Честота и демографска характеристика 62

Корелации на основни клинико-лабораторни и имунофенотипни характеристики 71

Значение на установените с RT-PCR генетични аномалии за отговора към лечение и прогнозата 82

Проследяване на нивото на МРБ чрез RT-PCR 100

Обсъждане 110

Резултати, отнасящи се до честотата и демографската характеристика 110

Резултати, отнасящи се до корелациите на основните клинико-лабораторни и имунофенотипни характеристики 115

Резултати, отнасящи се до значението на установените с RT-PCR генетични аномалии за отговора към лечение и прогнозата 118

Резултати при проследяване на МРБ чрез нивото на експресия на фузионни гени 125

Заключение и изводи..... 132

Приноси 133

Библиография 136

ВЪВЕДЕНИЕ

Съвременният подход при лечението на най-честото онкологично заболяване при деца - Острата лимфобластна левкемия - налага прецизно изграждане на диагнозата, чийто задължителен компонент са генетичните изследвания. Последното десетилетие е период на изключителен напредък в разбирането на левкемогенезата. Разкрива се ролята на наследствените генетични варианти за отключването и развитието на заболяването, както и значението на индивидуалните генетични фактори за ефекта от лечението.

Острата лимфобластна левкемия (ОЛЛ) е малигнено хематологично заболяване, характеризиращо се с клонална пролиферация на лимфоидни клетки, блокирани на ранен етап от диференциацията си. Успехът, постигнат при лечението на деца, превръщайки заболяването от фатално протичащо до лечимо в над 80% от случаите, се дължи на комбинираните интензивни химиотерапевтични режими, съчетани с подобрени поддържащи грижи за пациентите. Най-съвременните иновативни терапевтични подходи са свързани с идентифицирането на клинични и биологични фактори с дефинирана прогностична стойност (1–3).

Въпреки значимите успехи на съвременното лечение, ОЛЛ остава водеща причина за смърт от злокачествени заболявания в детската възраст. Перспективите се свързват с дешифриране на процеса на левкемогенеза и произтичащите от това възможности за индивидуализиране на терапевтични подходи. Въвеждат се още по-надеждни прогностични критерии при диагнозата, специфична насочена (таргетна) терапия и динамично мониториране на отговора към лечението.

ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

Епидемиология на ОЛЛ

ОЛЛ е хетерогенно заболяване на демографско, клинично и генетично ниво. Заболяването засяга всички възрастови групи, но най-често се диагностицира в детската възраст (около 60% от новодиагностицираните са под 20 години), с най-висок пик във възрастта между 2 и 5 години (4). Това е най-честото малигнено заболяване в детската възраст, представляващо 25% от всички онкологични заболявания до 18-годишна възраст. Годишната заболеваемост е 3 до 4 случая/ 100 000 детско население на възраст до 15 години, като рискът от ОЛЛ се изчислява на 1:2000. Мъжкият пол е засегнат по-често в съотношение приблизително 1,4:1. (5).

Етиопатогенеза на ОЛЛ

Процесът на левкемогенеза (както и онкогенезата въобще) е многоетапен, с натрупване на структурни и функционални нарушения във времето от неговата инициация (често *in utero*), през период на скрита, до етап на явна болест (6). Промените настъпват в гени, контролиращи основните процеси в клетката и са резултат от взаимодействието на екзогенни (експозиционни) фактори, генетично предразположение (предиспозиция) и т.нар. случаен “риск”. Хетерогенността на заболяването се определя от:

- ✓ взаимодействието и доминацията на различни експозиционни и предиспозиционни фактори;
- ✓ нивото на малигнената трансформация в естествената клетъчна йерархия;
- ✓ спектъра и сложността на настъпилите генетични нарушения.

1.Експозиционни фактори

Географските различия в честотата на онкологичните заболявания в детска възраст, са основен аргумент за значението на факторите на околната среда при възникването им.

1.1.Инфекции

Ролята на инфекциите в патогенезата на детските левкемии се обосновава най-общо в две хипотези, базирани на епидемиологични данни. Според първата хипотеза (на Greaves или на „закъснялата инфекция"), рискът от левкемия при деца се увеличава при късна експозиция към най-честите инфекции, което поради липса на модулация на имунитета в ранното детство предполага абнормен имунен отговор (7). Втората хипотеза (на Kinlen или на „популационното смесване") се основава на предположението, че специфичен антиген, несрещан дотогава в популацията, съответно в организма, предизвиква абнормен имунен отговор (8). Двете хипотези не са взаимно изключващи се – първата акцентира върху времето за среща с антигена, а втората върху специфичността на новия антиген. Няма данни за единствен или уникален вирус, водещ до трансформация и ОЛЛ (7), независимо, че някои редки форми на Т-клетъчна левкемия/лимфом при възрастни се асоциират с HTLV-1 вируса (9). В обобщение – деца с по-висок риск за ОЛЛ са тези, с минимално излагане на инфекции по време на кърмаческата и ранна детска възраст, с *in utero* - генериран прелевкемичен клон и наследствена генетична предиспозиция.

1.2.Радиация

Йонизиращата радиация е един от експозиционните фактори с доказана роля в етиологията на острите левкемии. Специфично за детската възраст е значението на получената доза облъчване преконцепционно, по време на утеринното развитие, и в постналталния период. Многобройни проучвания изследват асоциацията между т.нар. преконцепционна родителска доза ирадиация, получена на работното място, при инциденти, при рентгенова пелвиметрия на бременни и риска от възникване на левкемия в поколението. Постналталната експозиция на йонизиращо лъчение основно е в резултат на същите източници, като основно доказателство остава асоциацията за повишен риск от левкемии в следствие радиацията от атомните бомби в Япония (10-13).

Данните за връзката между нейонизираща радиация (радиация от електро-магнитини полета) и детската левкемия са противоречиви. Съществуват доказателства, че нива над 0,2 μT увеличават риска от заболяване (10).

1.3. Химични вещества

Химичните вещества, които най-често се асоциират с повишен риск от детска левкемия са от групата на пестицидите и групата на въглеводородите (11,12). Многобройни проучвания доказват, че ефектът зависи от дозата и времето на експозиция в хода на онтогенезата, т.е. рискът е относително по-висок при експозиция по време на интраутеринното развитие, кърмаческата и ранната детска възраст.

Към тази група се причисляват и някои цитостатици, по-специално тези от групата на алкилиращите агенти и инхибиторите на топоизомераза II медикаменти (13,14). Алкилиращите агенти увреждат ДНК, причинявайки точкови мутации, транслокации и загуба на хромозомен материал, най-често засягащи хромозоми 5 и 7. Резултат от въздействието на топоизомераза II инхибиторите са делеции и транслокации, локализирани най-често в 11q23 регион – предпоставка за MLL (mixed lineage leukemia) (означаван също като KTM2A) – генни фузии. Прием на храни и медикаменти, съдържащи вещества с химическа структура, сходна с тази на топоизомераза II инхибиторите, от бременни жени, може да бъде причина за левкемия в кърмаческа възраст (16,17).

2. Вродена генетична предиспозиция

Началото на заболяването в детска възраст предполага сравнително кратък период на експозиция на мутагени и следователно по-значим ефект на генетичната предиспозиция. Въпреки че, при болшинството от случаите на левкемия няма разпознаваем предиспозиращ фактор, съществуват генетични синдроми, които при останалата малка част (<5% от случаите), са асоциирани с повишен риск от развитие на заболяването (15–17). В зависимост от механизма, обуславящ възникването на отделните генетични синдроми, те могат да бъдат класифицирани като такива в следствие на: 1) дефекти в ДНК – репарационните процеси – Анемия на Fanconi, Атаксия-телеангиектазия, Синдром на Nijmegen, Синдром на Bloom; 2) дефекти в протичането на клетъчния цикъл и процесите на

диференциация при нарушена функция на тумор-супресорни гени – синдром на Li-Fraumeni, Невфобироматоза тип 1, Синдром на Noonan и т.нар. Noonan-like синдром; 3) асоциирана с ануплоидия предиспозиция към левкемия – Синдром на Down (с 10 – 20 пъти повишен риск от развитие на левкемия); 4) Синдроми на костно-мозъчна недостатъчност – Анемия на Blackfan-Diamond, синдром на Shwachman-Diamond, Тромбоцитопения с липса на радиус синдром, Дискератозис конгенита, Синдром на Kostmann; 5) Имунодефицитни състояния – Синдром на Wiskott-Aldrich, Агамаглобулинемия на Bruton (18 – 20).

Освен повишеният риск при описаните по-горе генетични синдроми, широкомащабни проучвания установяват асоциация с повишена склонност към развитие на левкемия при генни варианти в определени рискови локуси на пациенти с ОЛЛ (от спорадичен тип), сравнени със здрави контроли (18). През 2009 г. са публикувани първите данни за идентифицирани герминативни (germline-) рискови генни локуси при деца от европейски произход – *ARID5B*, *IKZF1* и *CEBPE*. Последвалите проучвания (GWAS – genome-wide association studies) на големи, разнородни по характеристика популации установяват повишена склонност към ОЛЛ и при варианти на *CDKN2A, BM11-PIP4K2A* и *GATA3*. Интересен е фактът, че описаните генни локуси често са обект и на соматични аберации в левкемичната популация при ОЛЛ. Например, при *IKZF1*, кодиращ транскрипционен фактор с голямо значение за лимфоидната линия, често се установява делеция, особено при високо-рискови левкемии и предполага лоша прогноза. Липсват данни за ефект на косегрегация, касаещ герминативни ОЛЛ рискови варианти и соматичните мутации, засягащи същите гени. Смята се, че възникват и фунционират независимо едни от други. От друга страна, честота на ОЛЛ - рисковите алели показва расово/етническо различие. Например, от шестте сигнификантни локуса *ARID5B*, *IKZF1, ARID5B* и *IKZF1* са повсеместно разпространени, без оглед на етническа принадлежност, докато ефектът на *CDKN2A* и *CEBPE* касае само европеидната раса (19).

Данните от GWAS са собено полезни за разчитане на етиопатогенезата на острата левкемия, следователно за прогреса на етиопатогенетичната таргетна терпия. Това има значение не само в относително редките случаи с доказана генетична предиспозиция, но и за широк спектър други заболявания. От друга

страна, все още не е доказана прогностичната стойност на масовия скрининг за ОЛЛ в детската популация и няма установени стандарти за това (19).

Класификация на ОЛЛ

В исторически план, първата класификационна система на ОЛЛ е предложена от French-American-British (FAB) Cooperative Working Group през 1976 година (20). Базирана е на цитологични критерии, според които се дефинират три морфологични типа лимфобласти (L1, L2, L3). Основният проблем при прилагането ѝ е ниската прогностична значимост на отделните подтипове. С развитието на моноклоналните антитела, насочени към специфични клетъчни повърхностни и цитоплазмени антигени, биологичната класификация на ОЛЛ претърпява значителна промяна като имунологичните критерии изместват морфологичните. За поставяне на диагнозата и дефиниране на отделните подтипове ОЛЛ, кореспондиращи съответно на различни стадии на лимфоцитна диференциация, се изисква специфичен панел от антитела. Това е основата на възприетата от WHO (World Health Organization) през 2001 класификация на ОЛЛ, разделяща случаите на прекурсорна В-клетъчна, прекурсорна Т-клетъчна и зряла В-клетъчна ОЛЛ (21). През 2008 година се въвежда и възприема широко новата WHO класификация, основаваща се на мултидисциплинарен подход и обединяваща данните от морфологичното, имунофенотипното и генетично изследване. От 2016 година е последната ревизия на класификацията, при която към съществуващите се добавят нови два генетични подтипа (22) (табл. 1).

Таблица 1. СЗО класификация на миелоидните неоплазми и остра левкемия (Arber DA et al., B*lood 2016)*

WHO myeloid neoplasm and acute leukemia classification
Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm
Acute leukemias of ambiguous lineage
Acute undifferentiated leukemia
Mixed phenotype acute leukemia (MPAL) with t(9;22)(q34.1;q11.2); *BCR-ABL1*
MPAL with t(v;11q23.3); *KMT2A* rearranged
MPAL, B/myeloid, NOS
MPAL, T/myeloid, NOS
B-lymphoblastic leukemia/lymphoma
B-lymphoblastic leukemia/lymphoma, NOS
B-lymphoblastic leukemia/lymphoma with recurrent genetic abnormalities
B-lymphoblastic leukemia/lymphoma with t(9;22)(q34.1;q11.2);*BCR-ABL1*
B-lymphoblastic leukemia/lymphoma with t(v;11q23.3);*KMT2A* rearranged
B-lymphoblastic leukemia/lymphoma with t(12;21)(p13.2;q22.1); *ETV6-RUNX1*
B-lymphoblastic leukemia/lymphoma with hyperdiploidy
B-lymphoblastic leukemia/lymphoma with hypodiploidy
B-lymphoblastic leukemia/lymphoma with t(5;14)(q31.1;q32.3) *IL3-IGH*
B-lymphoblastic leukemia/lymphoma with t(1;19)(q23;p13.3);*TCF3-PBX1*
Provisional entity: B-lymphoblastic leukemia/lymphoma, BCR-ABL1–like
Provisional entity: B-lymphoblastic leukemia/lymphoma with iAMP21
T-lymphoblastic leukemia/lymphoma
Provisional entity: Early T-cell precursor lymphoblastic leukemia
Provisional entity: Natural killer (NK) cell lymphoblastic leukemia/lymphoma

Генетични субтипове на ОЛЛ

Началото на проучванията върху генетичните промени при злокачествените заболявания се поставя с откриването през 1960 година на Филаделфийска хромозома, образувана при t(9;22) и установена първоначално при ХМЛ, а в последствие – и при част от пациентите с ОЛЛ. В резултат на последвалите проучвания с използването на хромозомен лентов анализ на големи кохорти от пациенти с ОЛЛ става ясно, че левкемичните клетки в значителна част от случаите носят хромозомни аберации, някои от които представляват фактор с

независимо прогностично значение (23–25). Тези открития съвпадат хронологично с периода на въвеждане на риск-адаптираните полихимиотерапевтични режими, които сами по себе си водят до значимо подобрени резултати от лечението на ОЛЛ при деца. Много скоро след това, информацията от цитогенетичните изследвания е интегрирана успешно в рисковата стратификация на педиатричната ОЛЛ (26). Последвалите цитогенетични и молекулярно-генетични изследвания на B-Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia (BCP-ALL) очертават добре оформени подгрупи на заболяването с характерна клинико-биологична характеристика, ясно асоциирани с чести, повтарящи се, несвързани помежду си генетични аномалии. Установените субтипове се базират на специфична констелация от структурни и бройни хромозомни аномалии и промени в нуклеотидната последователност в някои гени с ключово значение за клетъчната биология. Спектърът на генетичните аномалии при ОЛЛ, наблюдавани при рутинния хромозомен лентов анализ включва разнообразни нарушения в броя и структурата на хромозомите, от които най-добре проучени са хромозомните транслокации. Резултат на генните реаранжиранията са химерични фузионни гени или генни активирания, иницииращи левкемогенезата чрез повлияване на процесите на нормално лимфоидно развитие, регулацията на клетъчния цикъл, функцията на туморсупресорни гени и онкогени, експресията на цитокинови рецептори, регулацията и функционирането на сигнални пътища, процесите на хроматинова модификация (27).

Консенсусът относно значението на генетичните подтипове при BCP–ALL рефлектира във включването им в предложената през 2008 година от Световната здравна организация класификация (WHO –*World Health Organization* classification *of myeloid neoplasms and acute leukemia),* ревизирана през 2016 година с добавяне на два нови подтипа (22).

Установените подтипове се базират на:

- Наличие на хипердиплоиден хромозомен набор (50-67 хромозоми);
- Наличие на хиподиплоиден хромозомен набор (по-малко от 44 хромозоми);
- Наличие на t(9;22)(q34;q11.2)[*BCR-ABL1*]
- Наличие на t(v;11q23)[*MLL* rearranged]

- Наличие на t(12;21)(p13;q22)[*ETV6-RUNX1*]
- Наличие на t(1;19)(q23;p13.3)[*TCF3-PBX1*]
- Наличие на t(5;14)(q31;q32)[*IL3-IGH*]
- Интрахромозомна амплификация на хромозома 21 (iAMP21);
- Наличие на транслокации, включващи тирозин-кинази или цитокинови рецептори („*BCR-ABL1-like ALL*“);

<u>B – лимфобластна левкемия/лимфом</u>

1. Структурни хромозомни аномалии

1.1. <u>t(12;21)(p13;q22)[*ETV6-RUNX1](TEL – AML1)*</u>

Най-честата структурна хромозомна аномалия в детската възраст е t(12;21)(p13;q32). На молекулярно ниво, при размяната на генетичен материал между *ETV6* и *RUNX1* гените се формира нов фузионнен ген *ETV6-RUNX1.* При физиологични условия, кодираните от *ETV6* и *RUNX1* транскрипционни фактори са есенциални за нормална хематопоеза. *ETV6* е член на фамилията транскрипционни фактори *ETS*, които са чест таргет на реаранжирания и мутации при левкемии и други малигнени заболявания. От своя страна, *RUNX1* заедно с *CBFB* формира *core binding factor*-транскрипционен комплекс – също обект на различни мутации при миелоидни и лимфоидни неоплазии. Фузионният протеин *ETV6-RUNX1* трансформира *RUNX1* в транскрипционен репресор, което води до промяна в експресията на регулираните от *RUNX1* гени.

До средата на 90-те години, честотата с която се съобщава аномалията възлиза на по-малко от 0,05% от диагностицираните пациенти с ОЛЛ (28), тъй като транслокацията не може да бъде доказана чрез методите на конвенционалната цитогенетика и остава криптична (скрита). След секвениране и молекулярна идентификация на участващите във фузията гени (29), става възможно въвеждане на диагностични техники като FISH, RT-PCR, Southern blot, чрез които се установява много по-висока честотата, достигаща 20 – 25% от педиатричните BCP-ALL (30-33).

В последните години е постигнат значителен прогрес относно уточняване на ролята на получения генен фузионен продукт *ETV6-RUNX1* в левкемогезата. Смята се, че формирането на фузионния ген е резултат на инициращо ранно, пренатално събитие. Доказателство са установените *ETV6-RUNX1* фузионни транскрипти в идентични близнаци, а също и в кръвни проби от карти на Guthrie, взети за неонатален скрининг на деца, диагностицирани в по-късен етап с ОЛЛ (30–35). Това е периодът на т.нар. пре-левкемична фаза, когато фузионният ген генерира персистиращ пре-левкемичен клон чрез повлияване на диференциацията и пролиферацията на хемопоетични стволови клетки, в частност на тези с В-клетъчна принадлежност (36).

Въпреки че, формирането на фузионен ген представлява първата стъпка в процеса на малигнена трансформация, за появата на клинично изявена левкемия е необходимо да настъпят серия допълнителни вторични генетични събития. В полза на тази теза са редица отчетени резултати от клинични и лабораторни изпитания, към които се отнасят установената ниска конкордантност за ОЛЛ (само 5%) при близнаци, много вариабилен по продължителност латентен период до клиничната изява на заболяването, данните от множество изследвания върху трансгенни животински модели (37–40).

Благодарение на методите на конвенционалната и молекулярната цитогенетика е разшифриран широк спектър от въвлечени генетични промени, участващи в генетичната еволюция на *ETV6-RUNX1* – положителни ОЛЛ. Сред тях са рекурентни делеции в гени, контролиращи В–клетъчната диференциация, клетъчния цикъл, хормонални ядрени рецептори. Големите хромозомни аберации с най-висока честота включват делеции на 12p, 6q, 9p, 11q, 13q, загуба на X, 8 и 13, допълнителна 21, 4, 10, и 16 хромозома. Най-честата аномалия, със значима патогенетична роля е загубата на втория, неаранжиран *ETV6*-алел (смята се, че *ETV6* функционира като тумор-супресорен ген чрез димеризация с фузионния *ETV6-RUNX1*) (41, 42).

Прилагането на технологията на array-comperative геномна хибридизация с висока резолюция [Comparative Genomic Hybridization (CGH)] за изследване на нарушенията в броя на копията [CNAs (Copy number alterations)]

демонстрира наличието на средно 3,5 допълнителни CNAs при пациенти с *ETV6-RUNX1* – положителна ОЛЛ. Нещо повече, множеството случаи имат уникален модел на CNAs, което доказва съществуването на изключителна хетерогенност сред тази група левкемии (43–45).

Нарастващ е броят на описаните субмикроскопски генни промени, като засегнатите гени принадлежат към различни класове и съответно повлияват различни патогенетични механизми, например загубата на *PAX5, TCF3, EBF1* води до нарушена В–клетъчна матурация, делеция на *CD200* се свързва променен имуномодулаторен ефект, налице е блок на апоптозата при промени в регулаторния ген *BTG1*. Към списъка се причисляват гените: *PAX5, CD200, BTLA, TBL1XR1, GLRX2, NR3C2, NR3C1, TCF3, EBF1, LEF1, IKZF1, CCNC, ARMC2, BTG1, SPANXB, TP63, PTPRJ, ATF7IP* (44, 46, 47).

Анализът CNA и вида на клоналните Ig/TCR реаранжирания на проби, взети при диагнозата и при рецидив на *ETV6-RUNX1* – положителна ОЛЛ, показва интраклонален произход на рецидивите, на базата на разнообразието от субклонове при диагнозата. При повечето случаи част от CNAs са идентични, което предполага общ клонален произход, но са налице и други допълнителни аномалии с отношение към възникването на рецидив и лекарствена резистентност (48–51).

Клинично значение на аномалията

Очертават се следните общи характеристики на *ETV6-RUNX1* – положителната ОЛЛ:

1. Това е най-честата рекурентна генетична аномалия сред ОЛЛ в детска възраст. В голямата част от проучванията се съобщава за честота около 20 - 25% от случаите.
2. По-голямата част от пациентите попадат във възрастовия диапазон между 1 и 10 години при поставяне на диагнозата, с пик между 2 и 5 години. Честотата на аномалията при възрастни пациенти е 0 – 3,4%.
3. Асоциира се с начален левкоцитен брой под $50x10^9$/l.
4. Характеризира се с имунофенотип на BCP–ALL, често се установява коекспресия на миелоидни маркери.

5. Като най-честа допълнителна аномалия се описва загубата на неаранжирания *ETV6* – алел.
6. Фузионният ген определя специфичен профил на лекарствена резистентност.
7. Приема се, че *ETV6-RUNX1* – положителната ОЛЛ се свързва с добра прогноза на заболяването, но независимата прогностичната стойност на маркера остава дискусионна.
8. Отчита се сравнително висока честота на късни рецидиви.

След клониране на *ETV6-RUNX1* – фузионния ген и въвеждане на молекулярно-генетичните методики за идентифициране на аномалията, става ясно, че честота на аномалията е най – висока сред рекурентните аномалии при ОЛЛ в детска възраст. Съществуват, обаче, различия в честота на популационно ниво, вероятно свързани с расова и етническа принадлежност (52). Това има значение не само като важен елемент в епидемиологичната характеристика на заболяването въобще, но и заради вероятна етиопатогенетична връзка (29, 53–56).

В групата на *ETV6-RUNX1* – положителните ОЛЛ се очертава типична констелация от биологични характеристики на заболяването. Всички описани случаи имат прекурсорен В-клетъчен имунофенотип, много рядко про-В-имунофенотип, но не и наличие на Т-клетъчен имунофенотип (с изключение на един описан в литературата случай) (57), както и такъв на ОМЛ или НХЛ. Характерна е сигнификантна асоциация с експресия на миелоидни антигени – CD13 и/или CD33 в над 10% от лимфоидната популация (58). Наличието на транслокацията рядко се съчетава с хипердиплоидия, и почти напълно изключва вероятността за другите аномалии с най-голяма значимост при ОЛЛ - t(9;22), t(1;19) и 11q23 (59).

Прогностичното значение на *ETV6-RUNX1* – маркера при ОЛЛ е обект на изследвания и дебат между отделните терапевтични групи, произтичащ от противоречивите заключения, по отношение на изхода на заболяването, честотата на рецидивите и оптималните терапетични режими (60–63). Според възприетите като общовалидни стратификационни рискови критерии - NCI (National Cancer Institute)/Rome risk criteria, пациентите с *ETV6-RUNX1* –

положителна ОЛЛ се категоризират в голямата си част като пациенти с нисък или стандартен риск, поради асоциацията с други фактори, предполагащи добър отговор към лечение и съответно добра прогноза, а именно – възраст между 1 и 10 години, начален левкоцитен брой под 50 000/мм3, нон-Т имунофенотип, ниска честота на екстрамедуларно ангажиране (64). В този контекст, добрата прогноза за тези пациенти изглежда закономерна, като резултатите от многобройни ретроспективни и проспективни студии подкрепят това. Нещо повече, според някои проучвания наличието на *ETV6-RUNX1* е добър прогностичен фактор със самостоятелна стойност. Появилите се по-късно съобщения, че честота на положителните *ETV6 -RUNX1* рецидиви също е около 20%, поставят на дебат действителното благоприятно значение на аномалията за прогнозата (61). Все пак, рецидивите при тази група пациенти са късни, след спиране на лечението, а противорецидивното лечение по-често постига нова дълготрайна ремисия на заболяването.

Има различни причини, обясняващи до голяма степен споменатите по-горе противоречия, касаещи изхода от заболяването и риска от късен рецидив. Те произтичат преди всичко от факта, че между отделните описани пациентски групи трудно може да се направи сравнение, поради значителни различия в големината им, в продължителността на наблюдение, и най-вече в типа на прилаганите терапевтични режими. В подкрепа на последното са доказателствата за особено висока чувствителност *in vitro* на *ETV6-RUNX1* – положителните бласти към *L-asparaginase, антрациклини, етопозид* (65, 66) и сравнително по-ниска към *vincristine, cytarabine.* Разнопосочни са данните относно интензивността и продължителността на терапевтичните режими въобще, както и на отделните компоненти и фази, изграждащи лечебната схема. За неоспоримо се приема, че OS (overall survival) и EFS (event free survival) са силно зависими от вида на терапевтичния подход, интензивността на лечението и продължителността на антиметаболитната поддържаща терапия (34, 36). В обобщение, при тази група пациенти благоприятната прогноза не предполага механично редуциране на интензитета на терапията, а по-скоро дефиниране на допълнителни рискови критерии, които да позволят по-прецизно адаптиране на схемата.

1.2. t(1;19)(q23;p13)*[TCF3-PBX1] (E2A-PBX1)*

Втората по честота рекурентна транслокация, срещаща се в 2 – 6% от детските ОЛЛ е t(1;19)(q23;p13)(52,67,72,77). За разлика от повечето детски лимфобластни левкемии, левкемичната трансформация при t(1;19)+ ALL протича постнатално, в матурационно по-зрели клетки (пре-В стадий) (68).

За първи път аномалията е описана при BCP–ALL през 1983 г. (25). Цитогенетично се идентифицира под две форми – балансирана: t(1;19) (q23;p13) и небалансирана: -19, +der(19)t(1;19)(q23;p13), като при някои пациенти се откриват и двете (69). Резултат на транслокацията е фузията между *TCF3* (синоним *E2A*) върху 19p13 и *PBX1* върху 1q23 и генерирането на фузионен ген *TCF3-PBX1* върху дериватната хромозома 19. При нормални условия *TCF3* кодира два протеина - *E12* и *E47*, които са основни транскрипционни фактори с критична роля в В–клетъчната матурация. *PBX1* е *homeobox gene*, експресиращ се във всички тъкани, но не и в В– и Т–лимфоцитите. Полученият фузионен ген *TCF3-PBX1* е причина за нефизиологична активация на *PBX1* и съответно трансактивация на група от гени с краен резултат малигнена лимфобластна трансформация (70).

TCF3-PBX1 се среща по-често при афро-американци, корелира с висок начален левкоцитен брой и липса на хипердиплоидия (71), асоциира се с пре-В имунофенотип, липса на CD34 експресия (CD34-) (72) и по-често ЦНС – ангажиране.

Първите проучвания относно прогностичното значение на t(1;19) сочат по-лоша прогноза, в сравнение с останалите (73, 74). Това дава основание t(1;19)+ ОЛЛ да бъдат считани за високо-рискови и дори показани за костно-мозъчна трансплантация. Резултатите се свързват с прилаганите конвенционални антиметаболитно-базирани терапевтични режими. С въвеждането на интензифицирани лечебни протоколи, и особено на интензивна индукционна фаза, прогнозата в детска възраст е значително подобрена. Честотата на началното ЦНС – ангажиране (ЦНС статус 2 и ЦНС статус 3) е по-висока при случаите с *TCF3-PBX1(+),* в сравнение с *TCF3-PBX1(-*) , като това е валидно в по-висока степен за ЦНС – рецидивите (75). Остава дискусионен въпросът за

вида и обема на ЦНС – насочената терапия. Освен това, важно е да се отбележи, че бластите при този тип левкемия проявяват специфичен тропизъм и повишена склонност и към друга екстрамедуларна миграция, което е важно за определяне на специфичен диагностичен подход и интензифициране на локалната терапия (76).

В развитите страни, 5-годишната EFS достига приблизително 85% - стойности за преживяемост, подобни на тези при считаните за най-благоприятни BCP-ОЛЛ (*ETV6-RUNX1*+ ОЛЛ и хипердиплоидните ОЛЛ) (75, 76). Подобрените резултати при съвременните терапевтични схеми води до изключване на този генотип от рутинното рисково стратифициране. При рецидив на заболяването прогнозата е крайно неблагоприятна. Рецидивите се проявяват в ранните етапи на лечението, при пациенти без първоначални високорискови критерии. Класическите прогностични фактори (възраст при дебюта, начален левкоцитен брой, NCI–рискова група, тип на хромозомната аномалия (балансирана или небалансирана) нямат прогностична стойност, според проведени напоследък проучвания (56, 75–78). Ето защо, през последното десетилетие, усилията са насочени към идентифициране на достоверни прогностични маркери при групата пациенти с незадоволителни терапевтични резултати и в частност за тези с ЦНС – рецидиви (75).

1.3. t(9;22)(q34;q11)[*BCR-ABL1*]

В резултат на t(9;22)(q34;q11) се формира Филаделфия хромозома (Ph) – генетична аномалия, срещаща се в около 3-4% от децата с ОЛЛ (79). В недалечното минало, установяването на тази транслокация се свързва с изключително сериозна прогноза. 5-годишната свободна от събития преживяемост (EFS) в детска възраст достига едва 30-40% (79, 80), въпреки интензивната химиотерапия с последваща алогенна костно – мозъчна трансплантация. При детската ОЛЛ наличието на *BCR-ABL1* се асоциира с по-голяма възраст, по-висок левкоцитен брой и по-често ЦНС-ангажиране в дебюта. (81). Независимо от тези особености, клиничната изява на Ph+ALL не е

дискриминативна и ключови за разпознаването й са цитогенетичното и молекулярно изследване. Изследванията са с особена важност, тъй като доказването на аномалията определя специфичен терапевтичен подход. С въвеждане на таргетната терапия изходът от лечение е подобрен значително, оставайки по-неблагоприятен от резултатите за други цитогенетични подгрупи. С увеличаване на възрастта, нараства и честотата на Ph+ALL, достигайки до около 25% при възрастни пациенти (82). Възрастовите различия в разпределението на генетичните подгрупи при ОЛЛ са едно от основанията възрастта да е основен фактор в рисковата стратификация на пациентите.

Ph–хромозома, съотв. Ph+ ОЛЛ, носят наименованието на града, в който аномалията е описана за първи път през 1960 г., от Nowell и Hungerford, при случаи с Хронична миелоидна левкемия. През 1973 г., Janet Rowley описва в своя публикация (83) същността на Филаделфия–хромозомата, като der(22) – продукт от реципрочна t(9;22)(q34;q11.2) транслокация. Фузионният ген *BCR–ABL1* е резултат от фузията на кодиращия регион от *ABL1* тирозин киназен ген (Abelson murine leukemia virus homolog, екзони 2–11, хромозома 9) към *BCR* (breakpoint cluster region) върху хромозома 22 (84). В зависимост от локализацията на конкретния “breakpoint” в BCR гена се формират различни фузионни гени и транскрипти, кодиращи синтез на хибридни онкопротеини с различна молекулярна маса. При локализация в M-BCR (major breakpoint cluster region, или “CML”- breakpoint region) се обхващат интронните последователности след екзони 13 и 14 в централната част на гена и се образува фузионен транскрипт e13a2 и/или e14a2 (M-BCR-ABL). При счупване в m-BCR (minor-BCR или “ALL”- breakpoint region) се ангажира първи интрон, в самото начало на гена и се формира фузионен транскрипт e1a2 (m-BCR-ABL). Молекулярната маса на различните транскрипти определя и наименованието им – p210 (молекулно тегло 210 кDa) и p190 (молекулно тегло 190 кDa), много по–рядко p230 (когато счупването е в интрон 19) (85). И двата пептида имат трансформационен потенциал, като в около 90% от случаите при ALL се доказва класическия тип p190 – транслокация.

При физиологични условия *ABL1* киназата функционира като нерецепторна тирозин-киназа, имаща отношение към хематопоезата чрез участие в сигнални пътища и модулация на цитоскелета, и регулация на

клетъчния цикъл. От своя страна, фузионният партньор на *ABL1, BCR* е комплексен локус, който се транскрибира в протеини с фундаментално значение за редица биологични процеси – сигнални пътища, организация на цитоскелет, растеж и развитие. В резултат на транслокацията, се стига до преместване на ABL от ядрото в цитоплазмата и загуба на важен регулаторен участък на автоинхибиция. Това е причина за високата киназна активност на фузионния продукт *BCR–ABL1, способност за* катализиране на аберантна фосфорилация на различни таргети, вкл. такива, които не са негов обичаен субстрат при физиологични условия. Стига се до директна и индиректна активация на многобройни сигнални пътища, между които *PI3K, AKT, MTOR, RAS, EGFR, MAP*-киназа, *JNK/SAPK, JAK1–3, SRC*-кинази, *HCK, FGR, TPN11* и последваща малигнена трансформация (86).

Описват се редица съпътстващи генетични аномалии при Ph+ ALL, имащи кооперативна роля в процеса на левкемогенеза. Най-честите са делеции, засягащи *IKAROS (IKZF1), PAX5* (pairedbox5), *CDKN2A/B* и *EBF1* (earlyB-cellfactor1) – генни локуси, кодиращи лимфоидно-специфични транскрипционни регулатори (87–89).

С разкриване на ролята в онкогенезата на активираната *BCR–ABL1* - кодирана тирозин-киназа, тя се превръща в атрактивен таргет за фармакологична инхибиция (90,91). След официалното одобрение на *Imatinib* (1-ва генерация ТКИ – тирозин-киназни инхибитори) за лечение на ХМЛ, настъпва нова ера в лечението на Ph+-хемопатии. Първите опити за монотерапия с ТКИ при Ph+ОЛЛ не се увенчават с обещаващи резултати. Последващото интегриране на таргетната терапия към интензивна химиотерапия води до фундаментално променен подход при лечението на високорисковата левкемия (92–94). Общата преживяемост е увеличена двукратно, в сравнение с тази, единствено с химиотерапия, а приложението на алогенна костно-мозъчна трансплантация (КМТ) вече не е ултимативно в цялостния лечебен процес (95).

Въпреки постигнатата значителна ефективност, резултатите при пациентите с Ph+ ОЛЛ не достигат нивата при останалите цитогенетични групи. След първоначалния успех на първата генерация ТКИ (*Imatinib*) (96), се разработват следващи поколения ТКИ – второ (*Dasatinib, Nilotinib, Bosutinib)* (97–

99) и трето *(Ponatinib)* (100), в опит за превъзмогване на резистентността, в следствие на различни механизми, сред които най-чести са появата на допълнителни мутации в *ABL1*-частта на *BCR–ABL1*, повишената интрацелуларна концентрация на транскрипти, придобиване на допълнителни генетични аномалии, активиране на паралелни трансформиращи механизми и др. (101–104).

По-пълното дешифриране на механизмите и факторите за малигнена трансформация предоставя възможности за разширяване на таргетната терапия. В допълнение към избора на ТКИ при лечението на педиатричните Ph+ ОЛЛ, остават дискутабилни въпросите, касаещи: 1) вида на оптималната съпътстваща химиотерапия, с оглед непосредствените и късни усложнения от комбинираната терапия; 2) продължителността на лечението с ТКИ 3) мястото на КМТ; 4) ролята на пост- КМТ приложение на ТКИ (79, 80).

Ph+ ОЛЛ е модел за успешна интеграция на таргетна терапия към стандартна химиотерапия със значимо подобрение в изхода от заболяването. Усилията са насочени към оптимизиране на химиотерапевтичните режими и избора на ТКИ, както и прецизиране на критериите за КМТ.

1.4. 11q23 аномалии [*MLL – rearranged*][*KMT2A]*

Хромозомните реаранжирания в 11q23 се асоциират с агресивно протичащи левкемии в кърмаческа и детска възраст, и при възрастни, както и левкемии като вторична неоплазма след предхождаща химиотерапия. Срещат се с различна честота в отделните възрастови диапазони, като най-висока е честотата за кърмаческата (под 1 година при диагнозата) ОЛЛ - около 2/3 от случаите, ОЛЛ в детска възраст (без кърмаческа) – 1-2%, общо около 5%, и 12–20% при възрастни (107). Аномалията се описва в около 85% от случаите на вторични левкемии след лечение с топоизомераза II инхибитори (14,108–111). 11q23 аномалии се откриват и при ОМЛ, отново относително по-често във възрастта <1 година (35-50% от случаите), заедно с по-големите деца в общо 15-20% (112), както и при

остри левкемии с неизяснен клетъчен произход (известни в миналото като бифенотипни и биклонални остри левкемии).

Епидемиологични и молекулярно–генетични изследвания доказват, че случаите на кърмаческа левкемия възникват *in utero*. Много ранното начало на заболяването, дори непосредствено след раждането, е доказателство за интраутеринно настъпило левкемогенно събитие (113). Установено е, че при едноядчни близнаци с *MLL*+ левкемии реаранжираните гени са идентични, което доказва възникване на неконституционално реаранжиране, генериращо левкемичен клон в единия близнак *in utero*, метастазирал през плацентарни анастомози или майчиното кръвообръщение до другия близнак (114). Освен това, в съхранени проби от неонален скрининг на деца, заболели от *MLL*+ ОЛЛ, е откриван фузионния продукт на реаранжирането (108,115).

От епидемиологична гледна точка е важна аналогията между кърмаческата левкемия и индуцираната от терапия вторична левкемия. По подобие на връзката между приложението на топоизомераза II инхибиторите и индуцирането на MLL+ левкемия, възниква хипотезата, че диетичния режим на майките по време на бременността може да бъде етиологичен фактор за кърмаческата левкемия. Има доказателства, че храни съдържащи катехини (чай, какао, вино), кверцетин (плодове и зеленчуци), генистеин (соя) имат роля в етиологията на MLL+ AML (13). За възникването на левкемия, обаче, вероятно е необходимо участието и на други фактори.

Честотата на реаранжиранията в 11q23, резултат на балансирани и небалансирани транслокации, инверсии, инсерции, парциални тандем дупликации са повод да се опише и характеризира локализирания на това място *MLL*–ген *(mixed leukemia gene)*. При физиологични условия, *MLL*–генът кодира хистон-метилтрансфераза (транскрипционен фактор, участващ в нормалната хемопоеза), която се свързва директно и регулира позитивно генната транскрипция, играейки роля на епигенетичен модификатор. Епигенетичната модификация на хроматина е форма на клетъчна памет, запазваща интактна програмираната генна експресия по време на клетъчното делене. Промяната в транскрипционните фактори довежда до дисрегулация в епигенетичната сигнатура, нарушено клетъчно развитие и възможна малигнена трансформация.

В частност, фузионният продукт на *MLL*-реаранжирането с партниращ ген води до индуциране на несъответна експресия на *HOX* – гена (ключов регулаторен ген на ембриогенезата и тъканното развитие, в т.ч. на хемопоезата) и блокирана клетъчна диференциация (116).

Реаранжираният *MLL*–ген е резултат от фузията на N-края на *MLL*-гена и С-края на някой от многобройните възможни партниращи гени. В зависимост от мястото на геномно пречупване по дължината на *MLL*-гена и вида на партниращия ген описаните доскоро различни *MLL*-реаранжирания са 135, като на молекулярно ниво са идентифицирани 94 транслоцирани партньорски гена (117). Палитрата от така получени *MLL*-рекомбиноми имат отношение към биологията на неоплазмата и съответно клиничното протичане. Установени са сигнификантни тенденции за корелация на фузионен ген с пол, възраст при диагнозата, различни хематологични неоплазми, отговор към терапия (117,118). Въпреки голямото разнообразие на генни реаранжирания, съществува известна асоциация на вида на фузионния ген с линейната принадлежност на острата левкемия (ОМЛ vs ОЛЛ), като най-често се установяват следните четири: *MLL-AF4*, в резултат на t(4;11)(q21;q23), *MLL-AF9* в резултат на t(9;11)(p21;q23), MLL-ENL в резултат на t(11;19)(q23;p13.3), *MLL-AF10* в резултат на t(10;11)(p12;q23), срещащи се при 76% от пациентите с остра левкемия и *MLL* - реаранжирания въобще, а при *MLL*+ ОЛЛ – в 91% от случаите(119).

За разлика от останалите остри левкемии, с други генетични маркери, при левкемиите с *MLL*–реаранжиране рядко се установяват съпътстващи допълнителни субмикроскопски генетични аномалии, кодиращи транскрипционни фактори с участие в лимфоидното развитие. Липсата на кооперирващи мутации е особено характерно за кърмаческата *MLL*+ ОЛЛ, където освен мутации в RAS и FLT3, ген-експресионният анализ установява „тих“ мутационен статус. Това дава основание да се предполага, че аномалията е достатъчна за тригериране на левкемогенеза, което е в противовес с догмата за необходимост от многобройни последователни генетични промени за индуциране на левкемична трансформация (120,121).

На фона на широкия спектър от малигнени хематологични заболявания, свързани с *MLL*-реаранжиране, се очертават *MLL*+ подтипове ОЛЛ, които биха могли да се дефинират с характерна клинико – лабораторна констелация:

- ✓ *MLL*+ ОЛЛ в кърмаческа възраст има подчертано лоша прогноза, засяга възрастта под 1 година с честота 1/1 000 000 новородени; асоциира се с висок левкоцитен брой, обемна хепатоспленомегалия и често засягане на ЦНС. Имунофенотипната характеристика е на CD34+, CD19+ pro-B ОЛЛ, с липса на експресия на CD10, често с коекспресия на аберантни миелоидни маркери като CD15 и CD65, както и на NG2. При децата под 6 месеца, в над 50% от случаите, се касае са t(4;11)(q21;q23)/*MLL-AF4*, при тези над 6 месеца и под 1 година същата транслокация се открива в около 20% от случаите. Наличието на реаранжиран *MLL* се счита за сигнификантен лош прогностичен белег като при съвременната интензивна полихимиотерапия по протоколи за кърмаческа възраст, се постига ремисия в около 90% от случаите, но 5-годишният EFS остава едва под 40%, дори след приложение на КМТ (122–127).

- ✓ *MLL*+ ОЛЛ в детска възраст – аномалиите в 11q23 регион се срещат при 1-2% от случаите на ОЛЛ. Заболяването се характеризира с подчертано по-голям туморен обем (начален левкоцитен брой и органомегалия), ангажиране на ЦНС при дебюта и в хода на болестта; бластната популация има про-/пре-В клетъчен имунофенотип и аберантна коекспресия на миелоидни маркери; наличието на аномалията е лош прогностичен маркер, широко застъпен в критериите за стартифициране по рискови групи в терапевтичните протоколи; характерна е относително по-добра прогноза за възрастта между 2 и 9 години, с 3–годишен EFS достигащ 73%, за разлика от останалите възрастови групи с 30-40% (128).

ОЛЛ с аномалии в 11q23 остава встрани от постигнатите съвременни високи терапевтични резултати, с относително най-лоша прогноза. Въвеждането на отделни адаптирани химиотерапевтични режими за тази възраст е важна стъпка към постигане на по-добри резултати. Инкорпорирането на нови прогностични фактори и иновативни терапевтични модели (*FLT3* – инхибитори, епигенетични агенти, имунотерапия, таргетна терапия) са предизвикателства за съвременната и бъдеща медицинска наука и практика (129,130).

2. Бройни хромозомни аномалии (анеуплоидия)

2.1. Хипердиплоидия

Една от най-честите цитогенетични аномалии, наблюдавани при детската В - клетъчна ОЛЛ, е т.нар. high–хипердиплоидията (хромозомен набор от 51-65 хромозоми), срещаща се в 20-25% от случаите. Клинично, high–хипердиплоидната ОЛЛ се асоциира с възраст 3 - 5 години, относително нисък начален левкоцитен брой и пре-В имунофенотип. High–хипердиплоидията се характеризира със значителна анеуплоидия, за сметка на допълнителните хромозоми, които в 75% от случаите са: +X, +4, +6, +10, +14, +17, +18, +21. Наличието на хипердиплоидия предполага добра прогноза с EFS над 80%. Чрез молекулярно-генетични техники (SNP) се установявят допълнителни генетични аномалии при около 80% от случаите, в асоциация с хипердиплоидната гарнитура. Въпреки че това е доказателство за хетерогенността генетичната група, етиопатогенетична им роля и значението за прогнозата още не е дефинирано (131–133).

2.2. Хиподиплоидия

С хиподиплоидия се означава наличие на хромозомен набор от по-малко от 45 хромозоми, в резултат на загуба на цели хромозоми. Този подтип ОЛЛ се среща в по-малко от 2% от случаите и се свързва с лоша прогноза (134). По степен на анеуплоидия могат да бъдат разграничени: near–хаплоидия с 24-31 хромозоми, low–хиподиплоидия с 32-39 хромозоми, high–хиподиплоидия с 40-44 хромозоми. Когато хиподиплоидията е подложена на редупликация се получава псевдо-хипердиплоидия, която по същество е „маскирана“ хиподиплоидия. Съществено е разграничаването на подтиповете хиподиплоидна ОЛЛ, тъй като ген-експресионният им профил ги характеризира като различни състояния, възникнали по пътя на различни патогенетични механизми и съответно, носещи различен прогностичен индекс. При над 70% от случаите на near–хаплоидна ОЛЛ се установяват генетични аберации, активиращи *RAS* и *RTK* – сигнални пътища,

докато голямата част от low – хиподиплоидните ОЛЛ носят мутации в *TP53* (91%), *RB1* (41%), *IKZF2* (53%) (135). Прогнозата при тези два подтипа е екстремно лоша, въпреки съвременното лечение (136).

3. Нови генетични подгрупи

✓ (iAMP21)

Интрахромозомната амплификация на 21 хромозома (iAMP21) се установява при около 2% от децата с ОЛЛ (137,138). Наличието й се смята за първично генетично събитие (139) и определя отделна цитогенетична подгрупа в последната ревизия на WHO - класификацията на хематологичните неоплазми (22). Касае се за амплификация на голям и вариабилен регион на хромозома 21. Методът на избор за изследване е FISH с *RUNX1* - проба, чрез който се установяват 5 или повече копия на *RUNX1* в интерфазно ядро. Пациентите с (iAMP21) се презентират с уникален спектър от вторични генетични аномалии (допълнителни хромозома X, 10, 14, монозомия 7/del7q, del11q), което би могло да се използва за подобряване на диагнозата (140,141).

Аномалията се среща при сравнително по–големи деца (средна възраст 9 години), изключително рядко при възрастни, асоциира се с нисък левкоцитен брой при диагнозата и BCP–ОЛЛ имунофенотип. Нозологията е обособена наскоро и наблюденията са оскъдни, но все пак, наличието на (iAMP21) се счита за лош прогностичен белег. При лечение за стандартен риск се регистрира висока честота на рецидиви, следователно пациентите следва да се класифицират като високо-рискови и да се лекуват с по-интензивна химиотерапия, което подобрява значително клиничния изход (142,143).

Бързият прогрес на техниките за генетичен анализ внася допълнителна светлина върху генетичната база на заболяванията въобще, в частност и на BCP –ОЛЛ. Благодарение на изследванията върху целия геном (GWAS), използвайки aCGH (Comperative Genomic Hybridization), SNP (single nucleotide polymorphism arrays), MPS (massive parallel sequencing), се разкриват нови рекурентни генетични аномалии. Някой от тях имат сигнификантна прогностична значимост, определят наличието на специфичен ген-експресионен профил и дават

основания за обособяване на нови гентични подрупи и и усъвършенстване на рисковата стратификация (144).

✓ „BCR-ABL1 – like ОЛЛ“

През 2016 година *BCR-ABL1–like* или *Ph-like* ОЛЛ се включва в ревизираната версия на WHO класификацията, като отделно състояние с клинична значимост, поради асоциацията между неблагоприятна прогноза и възможно повлияване от TKI (22). Дефинира се чрез ген–експресионен профил, подобен на този при *BCR-ABL1+*, но с липса на *BCR-ABL1* фузия (145,146). Честотата на *BCR-ABL1–like* ОЛЛ нараства с възрастта и от почти 10% при децата, на възраст между 1 и 10 години, достига до 20% при възрастни с ОЛЛ (147). Специфичната ген–експресионна сигнатура е резултат от генетични аберации, засягащи гени, кодиращи кинази (напр. *JAK1, JAK2, JAK3, ABL1, ABL2*), транскрипционни фактори (*IKZF1*), цитокини и рецептори за растежни фактори (напр. *CRLF2, PDGFRB, EPOR, IL7R, FLT3*), сигнални медиатори и регулатори (напр. *KRAS, NRAS, BRAF, PTPN11, NF1)* (148,149).

Заболяването протича като високорискова левкемия, с лош отговор към индукционно лечение, високи нива на минимална резидуална болест (МРБ) и неблагоприятен изход. Последните студии подчертават необходимостта от МРБ – базирана рискова стратификация и интензификация на лечението, чрез което се постига обща преживяемост, близка до останалите (150). Важно е да се подчертае, че прогнозата зависи от типа на „киназната аберация“ и наличието на делеция на ген за *IKZF1* (151). Лечението на тази левкемия остава предизвикателство, особено в контекста на многобройните опции за инкорпориране на таргетна терапия.

✓ Други

ETV6-RUNX1–like ОЛЛ - Касае се за BCP –ОЛЛ с ген - експресионен профил, подобен на този при *ETV6-RUNX1+* ОЛЛ, но без наличие на *ETV6-RUNX1* – фузия, потвърдено чрез PCR (152). Среща се при 1 до 3% от случаите на BCP – ОЛЛ. Всички случаи, принадлежащи към този ОЛЛ субтип имат общ генетичен

маркер – аберация на *ETV6* – гена, най-често делеции (152). Понастоящем не се свързва с лоша прогноза (152,153).

DUX4-rearranged ОЛЛ - Към този нов подтип BCP–ОЛЛ принадлежат около 4-8% от случаите. Характеризира се с наличие на уникална генетична аномалия – реаранжиране на гена, кодиращ транскрипционен фактор DUX4 като ранно, левкемия–инициращо събитие. В около 50-63% от случаите се установява и делеция на *ERG* – гена (вторична аберация). Последни проучвания сочат, че *DUX4*-rearranged ОЛЛ се свързват с добра прогноза (152,154,155).

ZNF384-rearranged ОЛЛ - ОЛЛ с ZNF384 – ген, реаранжиран с най-малко 9 други партньорски гена, е друг нов субтип, срещащ се в 1 до 5% от случаите на BCP- ОЛЛ. Ген-експресионната сигнатура се свързва с дисрегулация на *JAK-STAT* - сигнален път, експресия на CD13 и/или CD33. Не принадлежи към високо-рисковите детски ОЛЛ (156–158).

MEF2D – rearranged - Последният дефиниран като подтип на ОЛЛ *е MEF2D-rearranged* ALL с 1 до 3% от случаите. Идентифицирани са реаранжирания с поне 6 партньорски гена. Ген-експресионният профил отговаря на относително по-зряла BCP – ALL, по-често засяга пациенти в юношеска възраст и се свързва с относително по-лош изход от лечението (159).

Освен описаните по-горе, са установени още голям брой други генетични аномалии, част от които вероятно са първични лезии и биха могли да се считат също като подтип-определящи. Други са вторични събития или се срещат като кооперирващи с вече установени първични, или в комбинация с различни други в отделните подгрупи. Такива са аномалиите, свързани с *IGH–MYC*, *TCF3–HLF*, *CRLF2*, *NUTM1, IKZF1, PAX5, CDKN2A, CDKN2B*, част от които категорично имат отношение към прогнозата. Допълнително се описва голяма група генетични аберации, с потенциал за възможно терапевтично таргетиране. Между тях най-чести са *JAK/STAT* – клас аберациите, в резултат на засягане на *CRLF2, JAK1, JAK2, JAK3, EPOR, IL7R, SH2B3* и *ABL* – клас, съответно със засягане на *ABL1, ABL2, PDGFRB, PDGFRA.* Натрупаният огромен информационен пул следва да

се интерпретира както в контекста на взаимовръзката между биологичен/генетичен аспект и клинична изява, така и по отношение на бъдещи терапевтични опции и подобряване на резултатите (160–162).

Т – лимфобластна левкемия/лимфом

✓ del1p32*(SIL-TAL1);*

За разлика от В-клетъчната прекурсорна ОЛЛ, при която прогностичното значение на фенотип-генотип асоциацията е добре дефинирано, откритите при Т-клетъчните ОЛЛ генетични аномалии нямат еднозначно и самостоятелно значение за прогнозата (163). Напредъкът и големите успехи в лечението на ОЛЛ в детска възраст се отнасят в по-малка степен за Т-ОЛЛ. Шансът за постигане на дълготрайна ремисия при новодигностицирана Т-ОЛЛ достига 60-70%, а при рецидив на заболяването едва 25% (79,164). Понастоящем, отговорът към лечение на определени етапи, в хода на терапията (отчетен чрез измерване на МРБ), се счита за най-важният фактор при рисковата стратификация. Големи надежди се възлагат на откриването на нови генетични маркери с прогностична значимост, както и такива, предоставящи възможности за таргетна терапия.

Благодарение на различни генетични изследвания са описани над 100 гена, засегнати от мутации, които са в основата на биологичната хетерогенност на Т-клетъчната ОЛЛ. Различни генни аномалии могат да съществуват едновременно или да бъдат взаимно изключващи се. Доказано е наличие на средно 10-20 генни мутации в левкемичната Т-клетка, като акумулацията на мутациите не е случайна, а често се касае за специфични, кооперираща се мутации (165). Въпреки хетерогенността, повечето аномалии могат да се класифицират в две категории: хромозомни транслокации, асоциирани с променена ген-експресионна сигнатура (свръхекспресия на протоонкогени) и мутации и делеции, повлияващи сигнални пътища и клетъчния цикъл (ектопична експресия на транскрипционни фактори) (166).

Мутацията на *TAL-1*(1p32) е сравнително често събитие (около 30%) при педиатричните T-ALL (167). При 1%-3% от случаите промените в *TAL-1* се дължат

на t(1;14)(p33;q11). В други 9% - 26% от случаите (168,169) се получава фузионния продукт *SIL-TAL1,* в резултат от субмикроскопска интерстициална делеция между локус, наречен *SIL* и 5' региона на *TAL-1.* Това води до несъответна експресия на TAL-транскрипционен фактор, участващ в различни регулаторни механизми и задвижващ Т-клетъчната левкемогенеза (166). Възникването на *SIL-TAL1* е постнатално събитие, тъй като фузионният трнскрипт не се открива в проби кръв за неонатален скрининг.

Данните в литературата за значението на *SIL-TAL1* фузията не са еднопосочни, особено по отношение на ефекта върху прогнозата на заболяването (167,169–171). Анализи на различни терапевтични групи (1,169,171) очертават следните характеристики при пациенти със *SIL-TAL1*+ ОЛЛ:

- ✓ адолесцентна възраст;
- ✓ висок левкоцитен брой при дебюта на заболяването;
- ✓ лош преднизолонов отговор (PPR – poor prednisolone response);
- ✓ сравнително по-чести екстрамедуларни прояви;
- ✓ асоциация със сранително по-зрял имунофенотип;

Поради трудно сравняемите източници, разнородност и често малобройност на групите, и особено различни терапетични подходи и отчитане на ефекта от лечение, прогностичната стойност на маркера не е добре дефинирана. Резултатите демонстрират широк спектър от отчетени взаимодействия – от негативен ефект върху преживяемостта (обща и свободна от събитие), през липса на корелация, до фактор с благоприятна прогностична стойност.

Въпреки подобрените терапевтични успехи при Т-клетъчната ОЛЛ в детска възраст, възможностите за терапевтичен успех в случай на рецидив остават значително по-ограничени, в сравнение с В-клетъчните. Остава приоритет установяването и дефинирането на достоверни прогностични фактори, които биха могли да станат и обект за развитие и на таргетна терапия (166).

Генетичните маркери като показател за измерване на Минимална резидуална болест (МРБ)

Според съвременната концепция за диагноза и отчитане на отговора към лечение при ОЛЛ, състоянието на пълна ремисия, дефинирано чрез морфологично (микроскопско) изследване, допуска наличие на левкемични клетки в костния мозък (172). Субмикроскопско количествено отчитане на много нисък процент остатъчна бластна популация се дефинира като минимална резидуална болест (МРБ или MRD). Тя би могла да бъде разпозната единствено чрез високотехнологични методи, базирани на възможността за идентифициране на специфични левкемия-асоциирани имунофенотипни или молекулярно-генетични маркери. Като МРБ - негативиране се приема липсата на измерима МРБ, с високо ниво на сигурност чрез високо-сензитивни методи за детекция на нива на МРБ от $\leq 10^{-4}$ (173,174).

За измерване на МРБ, в течение на повече от две десетилетия, се развиват и усъвършенстват няколко PCR – базирани и флоуцитометрични технологии, като интерпретирането на резултатите се подчинява на международно приети консенсуси. В рутинната практика се използват три основни МРБ - техники:

- ✓ количествена PCR за детекция на реаранжирания в имуноглобулинови/Т-клетъчни рецепторни гени – ДНК-базиран метод с висока чувствителност, стандартизация и приложимост при около 95% от случаите, но много скъп и времеконсумиращ;
- ✓ конвенционална многоцветна (6-8 цвята) флоуцитометрия – метод с широка приложимост, бързо изпълним, информативен за цялостния клетъчен състав, но с променлива чувствителност, поради сходства в характеристиките на нормалната (регенерираща) и малигнена хемопоеза (123);
- ✓ PCR за фузионни транскрипти и други аберации – РНК-базиран метод, високо специфичен, относително лесно изпълним, но приложим само при отделните подгрупи ОЛЛ с установени фузионни гени, с ограничена стандартизация (175).

Многобройни клинични проучвания доказват високата прогностична стойност на МРБ за изхода от лечението при детската ОЛЛ (152,176). Мониторирането на МРБ, в комбинация с класически клинични фактори и заедно с генетичните маркери на малигнената популация, формират критериите за рискова стратификация на пациентите и интензивността на терапевтичния режим. Проследяването на МРБ при пациенти, подлежащи на КМТ, се оказва най-важният предиктор за изхода от трансплантацията, както и прогнозиране на след-трансплантационен рецидив (177). В допълнение, МРБ-диагностиката се използва в клинични изпитания за отчитане на ефективността на нови терапевтични средства като имуно- и таргетна терапия.

От особено голямо значение е фактът, че MRD – отговорът е различен при отделните генетични подгрупи. Така например, най-бързо се негативира МРБ при пациентите от генетичните подгрупи с добра прогноза - ETV6-RUNX1(+) и хипердиплоидия. От друга страна, отново в зависимост от подтипа, едни и същи нива на МРБ носят по-нисък риск от рецидив при пациенти с благоприятна генетика и по-висок при по-рисковите генетични подгрупи (163).

Въпреки, че MRD-мониторирането е широко застъпено в съвременните терапевтични протоколи, терминологията е унифицирана и процедурите в голямата си част са стандартизирани, няма еднозначно тълкуване на резултатите и пълно единомислие, по отношение на бъдещите терапевтични решения. Това се дължи на трудно сравняемите резултати от различните терапевтични протоколи, различията в избора на времеви интервал и график за измерване на МРБ, след приложен обем лечение. Възлагат се големи очаквания към двете нови технологии за MRD-мониториране – HTS (high-throughput sequencing) - MRD на IG/TCR и NGF (next-generation flow) - MRD, предполагащи индивидуализиран подход към всеки конкретен пациент, но и покриващи изискванията за широка достъпност, лесно внедряване, приложимост в над 90-95% от случаите, висока чувствителност (≤ 10^{-4} - 10^{-5}) и стандартизация (173).

Методи за изследване

Съвременният подход за изграждане на диагнозата ОЛЛ, класификация и стратифициране на случаите, както и проследяване на ефекта от терапията, включва като задължителен компонент генетичните изследвания (109). От своя страна, наборът от методи за генетичен анализ се обогатява изключително бързо, а предоставяните факти позволяват все по-прецизно дефиниране на клинично значимата информация.

Методите за откриване на генетични аномалии в рутинната практика при злокачествени хематологични заболявания включват:

1. Конвенционална цитогенетика (G-banding);
2. Молекулярна цитогенетика (FISH, multicolor FISH);
3. Молекулярни техники, анализиращи ДНК и РНК (PCR, RT-PCR, qRT-PCR);

Напоследък навлизат и редица високо-технологични подходи за глобална оценка на промените в генома и генната експресия - microarray-базирани анализи и секвениране от следващо поколение [Next Generation Sequensing (NGS)], които обаче са скъпи и трудоемки с все още ограничено приложение в рутинната практика.

Конвенционалната цитогенетика се използва при диагнозата на левкемията от 70-те години на миналия век (178). Методът се базира на оценка на броя и морфологията на метафазни хромозоми в зависимост от модела на оцветяването им чрез т. нар. banding-техники. Този метод все още е метод на избор в рутинната диагностика, тъй като за разлика от останалите техники за генетичен анализ дава информация за цялостния геном, идентифицира абнормен клон и позволява оценка на комплексни цитогенетични промени в неопластичните клетки с единствен тест (179). Установените хромозомни аномалии се дефинират като бройни (придобивка или загуба на генетичен материал) и структурни (транслокации, делеции, инверсии, дупликации и др.). Като слабости на изследването се отчитат: 1) липса на метафази за анализ, поради слабата пролиферация на левкемичните клетки в клетъчни култури; 2) могат да се анализират около 20 клетки на пациент, така че чувствителността на

метода за детекция на абнормана клетка е 5%; 3) недостатъчно количество на клетки за анализ, което затруднява детайлния анализ и комплексността на промените; 4) ниска резолюция на хромозомния анализ – поради ширината на бандовете, всеки може да включва по няколко гена; 5) методът е трудоемък. Поради изброените особености, стандартният цитогенетичен анализ не може да бъде използван за проследяване на МРБ.

В комбинация със стандартния хромозомен анализ ***флуоресцентната in situ хибридизация (FISH)*** дава допълнителна информация за специфични генни локуси(179). *FISH* – анализът използва флуоресцентно маркирана ДНК–сонда със специфична секвенция и едноверижна ДНК–таргетна секвенция (най-често интерфазно ядро). Съществува голямо разнообразие от FISH – проби и стратегии за установяване на хромозомни аномалии, както и специфични методологии за анализ на резултатите. Откриват се допълнителни хромозоми или загуба на цели хромозоми, специфични генни фузии, генни делеции и генни амплификации. FISH методът има най-голяма приложимост и информативност в случаите, когато е известно с каква таргетна аномалия се асоциира специфичната нозологична единица. Веднъж установена, проследяването на аномалията може послужи за оценка на отговора към терапията, по-рядко за проследяване на минималната резидуална болест (FISH не се използва рутинно за МРБ, поради ниската чувствителонст, която е сходна с тази на морфологията), в някои случаи за диагноза на ранен рецидив на заболяването. Предимството от използване на интерфазно ядро е възможността за анализиране на относително голям брой клетки (средно 200). Освен това, възможно е морфологичното и имунофенотипно изследване на препаратите чрез имунохистохимично оцветяване, което да прецизира матурационния стадий на клетките с аберация. Не на последно място, FISH може да бъде реализиран върху съхранен материал във вид на натривки. Недостатък на изследването е, че не може да бъде използвано като скрининг тест, информативната стойност на метода се ограничава основно от вида на наличните за употреба проби, чувствителността е по-ниска в сравнение с PCR.

Полимеразно – верижната реакция (PCR) е базова техника за голяма група тестове, използвани в молекулярната диагностика. Основава се на мултиплициране на таргетен сегмент ДНК или РНК (след превръщането й в

комплементарна ДНК) в присъствие на два специфични праймера, термостабилна полимераза, деоксинуклеотиди. При повечето транслокации вариациите в местата на счупване на ДНК са толокова големи, че става практически невъзможно да се реализира PCR. Ето защо, като източник за PCR за установяване на генни реаранжирания се използва РНК и първият етап е трансформирането на РНК в по-стабилната комплементарна ДНК (complementary DNA) чрез ензима обратна транскриптаза (reverse-transcriptase – RT и оттук RT-PCR). При наличие на генна фузия в резултат на транслокация се получава PCR-продукт, който подлежи на амплифициране и разпознаване при гел-електрофореза.

Методът се използва в допълнение към конвенционалния цитогенетичен анализ(108,163). Изискването за специфични праймери ограничава приложението до рутинното използване само за най-честите левкемия - специфични транслокации като t(12;21), t(9;22), t(1;19) и t(4;11).

RT-PCR се прилага широко и за мониториране на МРБ (127,180,181). Методът е високо сензитивен и позволява откриване на една левкемична клетка сред 10 000-100 000 нормални клетки. За тази цел, освен посочените по-горе фузионни гени, по-често се използват реаранжировките на имуноглобулиновите или Т-клетъчните рецепторни гени - уникални за всяка клетка, съотв. и за моноклонална клетъчна популация. Чрез PCR могат да се идентифицират специфични таргети в над 95% от пациентите. Недостатък на метода е високата трудоемкост, а понякога и трудности при интерпретацията на резултатите.

Големият интерес към откритията, свързани с клетъчния геном и високите очаквания за клиничната им приложимост, доведе до бързото развитие на технологиите за неговото изследване. Голяма част от изследванията са базирани на т.нар. microarray platforms (микрочипове). Най-общо, microarray – базираните технологии могат да се разделят на два типа - за идентифициране на ДНК–аберации и за измерване на ген-експресионния профил. Тук спадат Comparative Genomic Hybridization (CGH) arrays, Oligonucleotide SNP (single nucleotide polymorphism) arrays, MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification), Methylation array, cDNA array, Oligonucleotide array, Real Time quantitative PCR array(182).

Значение на генетичните маркери

Според съвременните схващания, ОЛЛ представлява спектър от заболявания на генетична основа, като прави насочените генетичните изследвания задължителен компонент при изграждане на диагнозата, избор на терапевтичен план и проследяване на отговора към терапия (183). Наследствената генетична предиспозиция е фактор, който в голяма степен предопределя отключването на левкемогенезата. Генетични са факторите и механизмите, определящи характеристиките на малигнената пролиферация, клиничните прояви на заболяването и повлияването от лечение, както и клоналната еволюция в случай на рецидив.

Генетичните маркери представляват основен класификационен критерий за обособяване на нозологични категории. Генетичните изследвания подкрепят диагнозата и са доказателство за клонален характер на пролиферацията, но не са основание за диагноза. Имат основно значение като прогностични индикатори, определящи стратификацията на пациентите и съответно избора на терапевтичен режим. Установените генетични реаранжирания могат да се използват като маркер за проследяване на МРБ и адаптиране на терапевтичната стратегия. Не на последно място, развитието на таргетната терапия, считано за особено перспективно направление, се основава на непосредствените резултати от насочени генетични изследвания (2,144,184,185).

Представените литературни данни като част от огромния информационен пул, натрупан в резултат на изключително бързо развиващите се и широкозастъпени генетични методи за изследване на острите левкемии, подчертават необходимостта от интегрирането на молекулярно-генетичните изследвания в актуалния диагностичен алгоритъм на Острата лимфобластна левкемия при пациентите в детска възраст в наши условия. Все пак, съществуват

Нерешени и спорни проблеми:

1. Описани са географски и етнически различия в разпределението на най-честите генетични аномалии при детската ОЛЛ. Счита се, че разкриването на интимните механизми, отключващи процеса на левкемогенеза, като резултат от взаимодействието на ендогенни предиспозиционни (генетични) фактори и фактори на околната среда, изисква анализ от всеобхватни епидемиологични проучвания с данни за разпространението и демографската характеристика на различните генетични подтипове ОЛЛ.
2. Възприетите като характерни клинико-лабораторни констелации при поставяне на диагноза ОЛЛ имат свой специфичен облик, отнесени към отделните генетични подтипове.
3. Данните за значението на генетичните фактори за отговора към лечение и прогнозата не са еднопосочни в литературата, показвайки различни зависимости при отделните цитогентични подтипове в контекста на съответните терапевтични групи и лечебни протоколи. Доближаването до достоверни тенденции би бил сериозен аргумент в търсене на адекватен, с възможности за индивидуализиране, терапевтичен режим с оглед подобряване на резултатите и избягване на краткосрочните и дългосрочни странични ефекти от терапията.
4. Мониторирането на МРБ чрез надежден метод има основно значение за адаптиране и индивидуализиране на терапевтичния подход. Въпреки, че съществуват стандарти и консенсуси относно техниката, времето на изследване и показателното ниво на МРБ, съществуват вариации в интерпретацията на резултатите.

Цели и задачи:

Цел на научния труд:

Да се оцени честотата и значението на генетичните аномалии, изследвани чрез RT-PCR, по отношение на диагнозата, рисковата принадлежност, избора на терапия и ефекта от лечението, при деца с Остра лимфобластна левкемия, диагностицирани и лекувани за 13-годишен период в Клиниката по детска клинична хематология и онкология в София.

Задачи:

1. Да се определи честотата и демографската характеристика на групите с най-честите молекулярно-генетични аномалии при ОЛЛ в детска възраст.

2. Да се оценят зависимостите между основните клинико-лабораторни и имунофенотипни характеристики, и наличието на най-честите молекулярно-генетични аномалии при деца с ОЛЛ.

3. Да се проследи влиянието на изследваните генетични маркери върху отговора към лечение и преживяемостта при деца с ОЛЛ при унифициран терапевтичен подход.

4. Да се оцени прогностичната стойност на нивото на минимална резидуална болест (МРБ), измерено чрез полуколичествена RT-PCR на установените при диагнозата фузионни гени.

Клинична група, материали и методи

1. Клинична група

Изследвани са биологични материали (костен мозък) от пациенти с Остра лимфобластна левкемия (ОЛЛ), диагностицирани и лекувани в Клиниката по детска клинична хематология и онкология, УМБАЛ „Царица Йоанна – ИСУЛ“, София за периода 1 януари 2005 г. до 31 декември 2017 г. Дата на последно проследяване – 31.12.2019 г.

Критерии за включване в анализа:

- Диагноза Остра лимфобластна левкемия, поставена в съответствие със съвременните стандарти, интегриращи данните от морфологичното, имунофенотипното и генетичните изследвания. Съобразени са изискванията на Класификация на лимфоидните неоплазми на СЗО, 2008 г. и ревизираното издание от 2016 г. (30)
- Възраст при поставяне на диагнозата 0–18 г.;
- Подписано информирано съгласие за провеждане на изследвания и лечение от родител/настойник;

Изключващи критерии:

- Отказ от лечение в КДКХО;
- Летален изход преди началото на диагностичните и терапевтични процедури (22);
- Заболяване, категоризирано като вторична неоплазма;

- Заболяване, категоризирано като рецидив на друго неуточнено предхождащо лимфопролиферивно заболяване;

1.1. Характеристики на пациентите

В настоящето проучване са включени общо **271 пациента**, при всеки от които са осъществени молекулярно-генетични изследвания по метода полимеразно-верижна реакция с обратна транскриптаза (RT-PCR).

Всички пациенти са диагностицирани и лекувани в Клиника по детска клинична хематлогия и онкология, УМБАЛ „Царица Йоанна – ИСУЛ“ (по-рано Специализирана болница за активно лечение на деца с онкохематологични заболявания – СБАЛДОХЗ) през периода януари 2005 г. – декември 2017 г. Периодът на наблюдение обхваща времето до края на м.декември 2019 г. Пациентите са на възраст от 0 до 18 години, медиана 5 години. Разпределението по пол е с превес на мъжкият – 166 момчета и 105 момичета. При всички пациенти е поставена диагноза Остра лимфобластна левкемия (ОЛЛ) на базата на общовъзприети критерии (30). Във всички случаи са осъществявани морфологични и флоуцитометрични изследвания за характеризиране на заболяването. Съпътстващ цитогенетичен анализ е наличен за голяма част от пациентите в групата.

При всички пациенти е осъществен RT-PCR, като броят на проведените изследвания надхвърля 1700:

- ✓ ***BCP-ALL (N=239) – при дебюта по 5 (пет) RT-PCR (вж по-долу), при положителните (N=85) за маркер – средно по още 6 (шест) в хода на проследяване;***
- ✓ ***T-ALL (N=32) – при дебюта по 3 (три) RT-PCR, при положителни за маркер (N=6) – средно по още 5 (пет) в хода на проследяване;***

Прилагано е лечение в съответствие с международно-възприети терапевтични протоколи: ALL IC 2002, ALL IC 2009, Interfant-06, EsPhALL 09.

Събраната информация е архивирана при спазване на приниципите за защита на личните данни.

1.2. Възприети дефиниции на отчитани, проследявани и анализирани фактори.

Оценката и интерпретацията на резултатите са базирани на следните дефиниции:

- ***Ремисия –*** под 5% бласти в костния мозък при цитомрфологично изследване в края на индукционното лечение, липса на бласти в ликвор, липса на локализирани левкемични инфилтрати или редукция с най-малко от 1/3 на първоначално наличен туморен обем.
- ***Категоризиране на състоянието на костния мозък в зависимост от морфологично определения процент патологични бласти -*** M1 костен мозък – бласти <5%; M2 костен мозък – бласти 5 – 25%; M3 костен мозък – бласти > 25% при морфологично изследване.
- ***Непостигната ремисия –*** неизпълнени критерии по горната дефиниция - над 5% бласти в костен мозък при цитоморфологично изследване, бласти в ликвор, персистиращ левкемичен (туморен) обем в края на индукционното лечение и консолидационната фаза.
- ***Рецидив (релапс):***
  - изолиран костно-мозъчен – над 25% бласти в костния мозък при цитоморфологично изследване без екстрамедуларно засягане;
  - комбиниран – над 5% бласти в костния мозък и ≥1 екстрамедуларна локализация;
  - изолиран ЦНС - >5 бластни клетки/μl ликвор и/или интракраниални левкемични огнища;
  - тестикуларен - едно- или двустранно неболезнено уплътнение (инфилтрация) на тестиси, доказано чрез биопсия;

- други биопсично доказани локализации;

1.3. Клинични данни и лабораторни показатели

Изследвани и проследявани са следните <u>показатели</u> за характеризиране на пациентите:

➢ ***Демографски*** – възраст, пол;

➢ ***Клинични данни*** – лимфопролиферативен синдром - медиастинално ангажиране, ЦНС-ангажиране, бъбречна инфилтрация; остеоартралгии при поставяне на диагнозата.

Като начално медиастинално ангажиране се определя наличие на тумор в преден медиастинум или увеличен тимус, с наличие или без плеврален излив. За начално ЦНС ангажиране се приема визуализиран чрез КТ/ЯМР пространство-заемащ процес в главния и/или гръбначния мозък, или мозъчните обвивки; ретинално ангажиране; пареза на черепно-мозъчни нерви при липса на друга етиология; наличие на над 5 клетки/μL в гръбначно-мозъчна течност с морфология на парабласти при изследвне на цитоспин. Наличие на бъбречна инфилтрация се установява по ехографски критерии.

➢ ***Начални лабораторни данни*** – левкоцитен брой, хемоглобиново ниво, тромбоцитен брой, ЛДХ; биохимични показатели за бъбречна и чернодробна фунция, коагулационен статус.

➢ ***Имунофенотип на бластната популация*** – всички случаи с ОЛЛ първоначално са характеризирани флоуцитометрично по имунологични маркери за потвърждаване на диагнозата и за определяне на субкласификацията, в зависимост от засегнатата клетъчна линия. В динамика, чрез флоуцитометрия е проследяван и отговорът на терапията.

➢ ***Цитогенетични аномалии*** – конвенционално кариотипизиране при диагнозата на голяма част от пациентите. По специфични показания – допълнително изследване с флуоресцентна *in situ* хибридизация (FISH).

➢ ***Молекулярно-генетични маркери.***

В зависимост от определената имунофенотипна принадлежност, наборът от изследвани аномалии включва:

➢ При В-клетъчен фенотип:

- ✓ t(12;21)(p13;q22)[*ETV6-RUNX1*];
- ✓ t(1;19)(q23;p13.3)[*TCF3-PBX1*];
- ✓ t(9;22)(q34;q11.2)[M-*BCR-ABL1*];
- ✓ t(9;22)(q34;q11.2)[m-*BCR-ABL1*];
- ✓ t(v;11q23)[*MLL* rearranged];

➢ При Т-клетъчен фенотип:

- ✓ del1p32*(SIL-TAL1);*
- ✓ t(9;22)(q34;q11.2)[M-*BCR-ABL1];*
- ✓ t(9;22)(q34;q11.2*)[m-BCR-ABL1];*

При установяване на молекулярно-генетичен маркер, нивото на експресията му е проследявана периодично за оценка на терапевтичния отговор със следната динамика от началото на лечението: ден 33-ти, 3-ти, 6-ти, 12-ти, 18-ти и 24-ти месец.

➢ ***Рискови групи по критериите на прилагания терапевтичен протокол (BFM).***

Всички пациенти са стратифицирани универсално, съобразно съответствието с общоприети критерии.

- **За пациенти, лекувани по Протокол ALL IC 2002 и ALL IC 2009:**

Стандартна рискова група (SR):

- ✓ добър отговор към преднизолон (GPR – good prednisolone response) на ден 8 от началото на лечението (бласти <1000/мм³);
- ✓ възраст >/=1 и <6 години;
- ✓ начален WBC < 20 000/мм³;

- ✓ наличие на < 0,1% бласти на 15-тия ден (Flow-cytometry based minimal residual disease (флоуцитометрично измерена минимална остатъчна болест)(FC MRD) < 0,1%);
- ✓ бласти под 5% в костния мозък на 33-ия ден (липса на M 2/3).

Високо-рискова група (HR). (За принадлежност е д*остатъчен само един критерий)*:

- ✓ пациенти със SR или интермедиерен риск (IR) при диагнозата, но с инсуфициентен терапевтичен отговор в динамика - FC MRD >10% на ден 15; лош преднизолонов отговор (PPR-poor prednisolone response) - бласти > 1000/мм³ на ден 8 от началото на лечението; M2 или M3 костен мозък на ден 33.
- ✓ Установени от материала към диагнозата генетични отклонения: транслокации t(9;22) [BCR/ABL]; t(4;11) [MLL/AF4]; хиподиплоидия ≤ 45.

Интермедиерен/среден риск (IR) - Пациентите, които не са стратифицирани в SR и HR.

- **За пациенти, лекувани по Протокол EsPhALL 2009**

Високо-рискови група:

- ✓ лош преднизолонов отговор (PPR) **И/ИЛИ**
- ✓ M3 костен мозък на ден 15 **или** M2/M3 костен мозък на ден 21 **И/ИЛИ**
- ✓ пациенти с непостигната хематологична ремисия в края на индукционната фаза;

Стандартна рискова група:

- ✓ добър преднизолонов отговор (GPR) **И**
- ✓ пациенти с постигната хематологична ремисия в края на индукционната фаза **И/ИЛИ**
- ✓ M1/M2 костен мозък на ден 15 **или** M1 костен мозък на ден 21;

- **За пациенти, лекувани по Протокол Interfan 06:**

Нисък риск (LR): *MLL* germline (*MLL* без реаранжиране)

Висок риск (HR):

- ✓ *MLL* реаранжиран **И**
- ✓ Възраст при диагноза < 6 месеца (или < 183 дни) **И**
- ✓ WBC >300 000/ мм³ И/или лош преднизолонов отговор (PPR)

Среден риск (MR): Всички останали случаи, заедно с:

- ✓ *MLL* статус неизвестен **ИЛИ**
- ✓ *MLL* реаранжиран **И** възраст > 6 месеца **ИЛИ**
- ✓ *MLL* реаранжиран **И** възраст < 6 месеца **И** WBC < 300 000/ мм³ **И** добър преднизилонов отговор (GPR);

➢ ***Рискови групи по*** критериите на National Cancer Institute (NCI), т.нар. Rome criteria.

- ✓ Критерии за стандартна рискова група (SR) пациенти:
  1) с начален WBC под 50 000/mm³ и
  2) възраст при дебюта на заболяването 1-9 години
- ✓ Критерии за високорискова група (HR) пациенти:
  1) WBC над 50 000/mm³ и
  2) възраст под 1 и над 10 години.

➢ ***Методи за оценка на терапевтичен отговор. Динамика.***

- ✓ 8-ми ден – цитоморфологично и/или флоуцитометрично изброяване на бласти в периферна кръв;
- ✓ 15-ти ден – цитоморфологично и/или флоуцитометрично изброяване на бласти в проба от костен мозък;
- ✓ 33-ти ден (завършена индукционна фаза) - цитоморфологично изследване на натривка от костен мозък и/или флоуцитометрия на проба от костен мозък и/или молекулярно-генетично изследване на проба от костен мозък.

Обобощена информация за пациентите, заедно с основни характеристики и разпределение по основни критерии е представена в Таблица 2

Таблица 2. Основните характеристики на пациентите с ОЛЛ. Критерии за разпределение по групи

Фактор	№ пациенти	% от всички
Всички пациенти	271	100
Пол		
мъжки	166	61,3
женски	105	38,7
Възраст (год.)		
< 1	7	2,6
1-9	185	68,3
>10	79	29,2
Левкоцити (x10³/mm³)		
< 10	120	44,3
10-49	88	32,5
50-99	23	8,5
> 100	40	14,8
Клетъчна линия		
В-клетъчна	239	88,2
Т-клетъчна	32	11,8
CNS		
статус 1	264	97,4
статус 2	0	0
статус 3	7	2,6
t(12;21)/*ETV6-RUNX1*		
положителни	56	20,7
отрицателни	215	79,3
t(1;19)/*TCF3-PBX1*		
положителни	14	5,2
отрицателни	257	94,8
t(9;22)/*BCR-ABL1*		
положителни	8	3
отрицателни	263	9
MLL – реаранж.		
отрицателни	7	2,6
положителни	264	97,4
del1p32/*SIL-TAL1*)		
положителни	6	2,2
отрицателни	265	97,8
Молекулярен маркер (всички)		
положителни	91	33,6
отрицателни	180	66,4
NCI: Всички пациенти	271	100
SR	152	56,1
HR	119	43,9
NCI: В-клетъчни		
SR	148	54,6
HR	91	33,6
NCI: Т-клетъчни		
SR	4	1,5
HR	28	10,3
BFM рискови гр.		
SR	44	16,2
IR	157	58
HR	70	25,8
MRD Ден 8		
GPR	220	81,2
PPR	51	18,8
MRD Ден 15		
<0,1	12	12,2
0,1-10	65	66,3
>10	21	21,4
Ремисия на ден 33. MRD		
Да	264	97,4
Не	7	2,6

Обяснения на важните абревиатури:NCI – National Cancer Institute; BFM – Berlin-Francfurt-Munster; SR-standard risk, IR – intermediate risk, HR – kigh risk; MRD – minimal residual disease; CNS статус 1 – липсва ЦНС засягане,CNS статус 2 – артефициално-предизвикано ликворно засягане, CNS статус 3 – ЦНС ангажиране; GPR – good prednisone response, PPR – poor prednisone response;

2. Материали и методи – описание и дефиниция

2.1. Класически диагностични методи – физикално изследване, лабораторни и образни изследвания

2.1.1. Анамнеза и клиничен преглед

При всички пациенти се снеха данни от придружителите и пациента за дебютните признаци на заболяването, предшестващи изследвания и хоспитализации, подлежащи състояния, в т.ч. вродени синдроми, медикаментозно лечение, данни от представена медицинска документация.

Направи се оценка на общо състояние, извърши се подробен физикален преглед по системи, оценка на обема на лимфопролиферативния синдром, на симптомите при ангажиране на таргетни локализации.

2.1.2. Рутинни лабораторни изследвания.

Всички рутинни лабораторни изследвания се извършиха в клиничната лаборатория към КДКХО с: хематологични анализатори (модел DHL600 и модел BC-5800), биохимичен анализатор (модел Spin 200E), за препарати от ликвор - апарат модел Cytospin 4 Cytocentrifuge, за коагулационен статус - модел Acl 7000, като за референтни граници на изследваните показатели се използваха тези, дефинирани за цитираните апарати.

2.1.3. Образни изследвания

Извършени са в Отделение по образна диагностика, УМБАЛ „Царица Йоанна – ИСУЛ“, ехографското изследване – в КДКХО.

При всички пациенти се проведе рентгенографско изследване на гръден кош и медиастинум и ехографско изследване за оценка на степента на разпространение и обема на лимфолимфадено-, хепато- и спленомегалията, наличие на инфилтративни промени на бъбреци и тестиси. При случаите с медиастинално ангажиране – оценка на максимален диаметър. При изразени клинично осалгии, нарушена подвижност, деформитети - рентгенография на гръбначен стълб, лумбален отдел.

Визуализации с КТ/ЯМР – за уточняване и проследяване на туморни формации (екстрамедуларно засягане), вкл. при данни за пространство-заемащ процес в ЦНС.

2.2. Класически диагностичен метод при хематологично заболяване:

Микроскопско цитологично изследване

- ✓ на периферна кръв – изследането се провеждаше при всички пациенти със съмнение за онкохематологична диагноза, както и при проследяване на ефекта от лечение. Натривките се изготвяха по стандратна процедура, с оцветяване по метода на Romanowsky-Giemsa, в клиничната лаборатория към клиниката. Морфологична оценка и процентно съотношение на ядрените клетки се правеше при преброени 100-200 клетки, според установените стандарти.
- ✓ на проба от костен мозък – изследваха се всички пациенти при поставяне на диагнозата (ден 0) и в хода на лечението за оценка на ефекта от лечението ден 15, ден 33 от началната (индукционна) фаза на терапията, преди началото на консолидационната и реиндукционната фаза, в края на лечението, както и при съмнение за рецидив. Костно-мозъчният материал се добиваше чрез аспирационна биопсия, в спринцовка без антикоагулант, от пункционни локализации на *crista iliaca anterior superior, crista iliaca posterior superior, tibia, sternum.* Допълнителен материал се съхраняваше/транспортираше за 24-48 часа, при стайна температура, в епруветки с антикоагулант EDTA или среда за клетъчни култри (в зависимост от необходимите допълнителни

изследвания). Приготвяха се натривки, оцветявани по стандартен протокол, по метода на Romanowsky-Giemsa, в условията на клиничната лаборатория към клиниката. Натривките се оценяваха на микроскоп (модел Olympus CH-2), първоначално с увеличение 40х за целуларитет, наличие на мегакариоцити, съотношение на трите хемопоетични редици, наличие и обем на патологична популация. Допълнителни морфологични особености се описваха при преценка с микроскопско увеличение 100х. Прилагаха се морфологичните критерии на общоприетата FAB класификационна система (20) за класифициране на бластите като тип L1, L2 и L3.

- ✓ на ликвор – морфологична оценка на наличен клетъчния субстрат се правеше на препарати от гръбначно-мозъчна течност, изготвени на цитоспин, при поставяне на диагнозата и в хода на лечение, при наличие на плеоцитоза от апаратно измерване.

2.3. Специализирани диагностични методи:

2.3.1. Имунофенотипизация

Изследването е провеждано при всички пациенти към момента на диагнозата и динамично, при всички регулярни костно-мозъчни контроли, за проследяване на терапевтичния отговор, както и при съмнения за рецидив. Материалите бяха от периферна кръв и/или костно-мозъчен аспират (съхранени в епруветка с антикоагулант EDTA, BD Vacutainer). Имунофенотипизацията е осъществена в лабораторията на Клиниката, по рутинна методика с първоначално инкубиране на несепариран материал с моноклонални антитела (МАТ) срещу повърхностно експресирани антигени и последващо лизиране. При определяне на вътреклетъчни маркери е прилагана инкубация след предварително лизиране и пермеабилизиране с PermLyse (Beckman Coulter). Мултипараметърно измерване и анализ бяха извършвани с цитометри FACS Calibur и FACS Canto (Becton, Dickinson and Company BD Biosciences - BD Company, CA, USA) и съотв. прилежащите им софтуерни програми (CellQuest и Diva). Използваните комбинации МАТ, означени по международна номенклатура за *cluster of differentiation (CD),* бяха съставени от: насочени към универсално

експресирани маркери (пан-левкоцитни, прогениторни - CD45, HLA-DR, CD34), към специфични за B- и T- клетъчните линии антигени и от допълнителни, аберантни (нетипични за основната клетъчна линия) антигени (CD33, CD13, CD15). Бяха използвани МАТ към следните интрацитоплазмено (cyt) и повърхностно експресирани антигени: CD22, CD79a, TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase), CD34, MPO (myeloperoxidase), CD33, CD13, HLA-DR, CD15, CD14, CD19, CD20, CD10, CD3, CD7, CD1a, CD2, CD5, CD4, CD8, CD56 от BD Biosciences и Beckman Coulter Life Sciences, USA.

Изборът на популацията за анализ и диагноза (гейтираща стратегия) беше основана на универсално експресирания от бластите линейно-специфичен маркер, критерий за положителна реакция беше ниво ≥10%, определяне на линейната специфичност на левкемията – по наличие на дефинирана комбинация в експресионния профил (в съответствие с насоки на EGIL *(European Group for the Immunological characterization of leukaemias)* (186).

2.3.2. Цитогенетично изследване

При поставянето на диагнозата и в хода на лечението е осъществявана конвенционална цитогенетика върху свеж, нефиксиран материал – костно-мозъчен аспират с витални клетки, взет при стериални условия (съхранен в епруветка с антикоагулант Heparin Na). Препаратите са приготвяни с или без клетъчно култивиране. След фиксация са оцветявани по Giemsa banding method (G-banding). Хромозомните аномалии са описвани, в съответствие с International System for Human cytogenetic Nomenclature (187). За клоналност е приемано установяването на аналогична аномалия в поне две клетки.

2.3.3. FISH (fluorescence *in situ* hybridization)

Осъществявана е при вероятност за реаранжиране на *MLL*-ген или хромозомни реаранжирания, характерни за Burkitt-лимфома. Методологията за FISH включва етапи на: денатурация на пробата и таргетната ДНК чрез инкубация при висока температура, хибридизация на пробата към хромозомния таргет, измиване за отстраняване на несвързаната проба и анализ чрез флуоресцентна микроскопия.

При настоящото проучване не се цитират резултати от FISH изследване, тъй като методът не се прилага скринингово при пациенти в детска възраст с ОЛЛ, а само по строго специфични показания, а. На практика, чрез FISH са доказани случаи на Burkitt лимфом със специфичната генетична аномалия t(8;14), инфилтриращ костния мозък (стадий IV), което е изключващ критерий за лечение по протокол за ОЛЛ.

Цитогенетичните и FISH изследвания бяха осъществени в Лаборатория по цитогенетика и молекулярна генетика към Национална специализирана болница за активно лечение на хематологични заболявания – София.

2.3.4. Молекулярно-генетично изследване - RT-PCR

За изследването на най-честите фузионни транскрипти при остра лимфобластна левкемия беше използвана полимеразно верижна реакция след обратна транскрибция на РНК [Reverse Transcription (RT) Polymerase Chain Reaction (PCR)] със следните технологични етапи:

Изолиране на ядроносни клетки

Изследвани бяха ядроносни клетки, изолирани от клетки от 1 мл костно-мозъчен аспират, съхранен в епруветка с антикоагулант EDTA (BD Vacutainer), след селективно отстраняване на еритроцитите с лизиращ разтвор, съдържащ 155 mM NH4Cl, 10 mM KHCO3, 0.1 mM EDTA(188), в продължение на 20 мин. на стайна температура и 2-кратно промиване с phosphate-buffered saline (PBS) с центрофугиране за 10 мин при 400 *g*. (центрофуга KENRO (Heraeus) Labofuge 400 с ротор).

Екстракция на РНК

От така получените ядроносни клетки беше екстрахирана тотална РНК чрез Trizol Reagent (Invitrogen, Karlsruhe, Germany), спазвайки препоръките на производителя. Накратко, в 1,5 ml епруветки тип Eppendorf, около 5-10x10^6 ядроносни клетки бяха суспендирани с 1 ml TRIZOL, след което бяха оставени за 5 мин на стайна темпераратура. Към всяка епруветка бяха добавени 200 μl хлороформ и след ресуспендиране на съдържимото бяха оставени на стайна температура за 2-3 минути. След тази инкубация епруветките бяха центрофугирани на 12 000 *g,* в продължение на 15 минути при 2-8°C (хладилна

центрофуга KENRO (Heraeus), Biofuge Primo R). От видимите три фази във всяка една епруветка, най-горната бистра фаза, съдържаща РНК, беше прехвърлена в нова 1,5 ml епруветка, като се внимаваше да не се замърси разтвора с материал от останалите 2 фази. Към епруветката бяха добавени 500 μl изопропанол (за 1 ml TRIZOL) и след няколкократно разклащане бяха инкубирани, при стайна температура, в продължение на 10 минути и наново центрофугирани на 12 000 *g*, в продължение на 10 минути при 2-8°C. Утаената РНК се визуализираше като бяло петънце на дъното на епруветката. След отливане на надстоящата, утаената РНК беше промита със 75% етанол и центрофугирана на 7 500 *g* за 5 минути при температура 2-8°C. Течността беше отлята, останалият етанол беше оставен да се изпари и получената РНК беше оставена на стайна температура да се изсуши за около 10-15 мин, след което разтворена в 22 μl свободна от РНази вода. Спектрофотометрично беше определена чистотата й и нейната концентрация (спектрофотометър EPOCH BIOTEK).

Обратна транскрибция

За синтез на комплементарна ДНК (кДНК) беше използване протокол, препоръчан от Европейската програма BIOMED 1(174). Накратко, 1 μg РНК в 9.5 μl вода беше инкубиран при 70°C за 10 мин и веднага охладен на лед, след което бяха добавени останалите компоненти на реакционната среда до общ обем 20 μl: RT буфер (20 mM Tris HCl, 50 mM KCl, pH 8.3) (New England Biolabs Beverly, MA, USA), MgCl2 (Invitrogen, Karlsruhe, Germany): 5 mM, DTT: 10 mM, дезоксинуклеотидтрифосфати (дНТФ): 1 mM (Promega, Madison, WI, USA), случайни хексамери: 5 mM [Jena Bioscience GBH, Germany], Рназен инхибитор: 20 E, [Invitrogen, Karlsruhe, Germany] и MMLV обратна транскриптаза: 200 E [New England Biolabs Beverly, MA, USA] и сместа беше последователно инкубирана при 37°C за 45 мин, при 99°C за 3 мин и съхранявана при 4°C до започване на PCR [Термосайклър Techne TC3000].

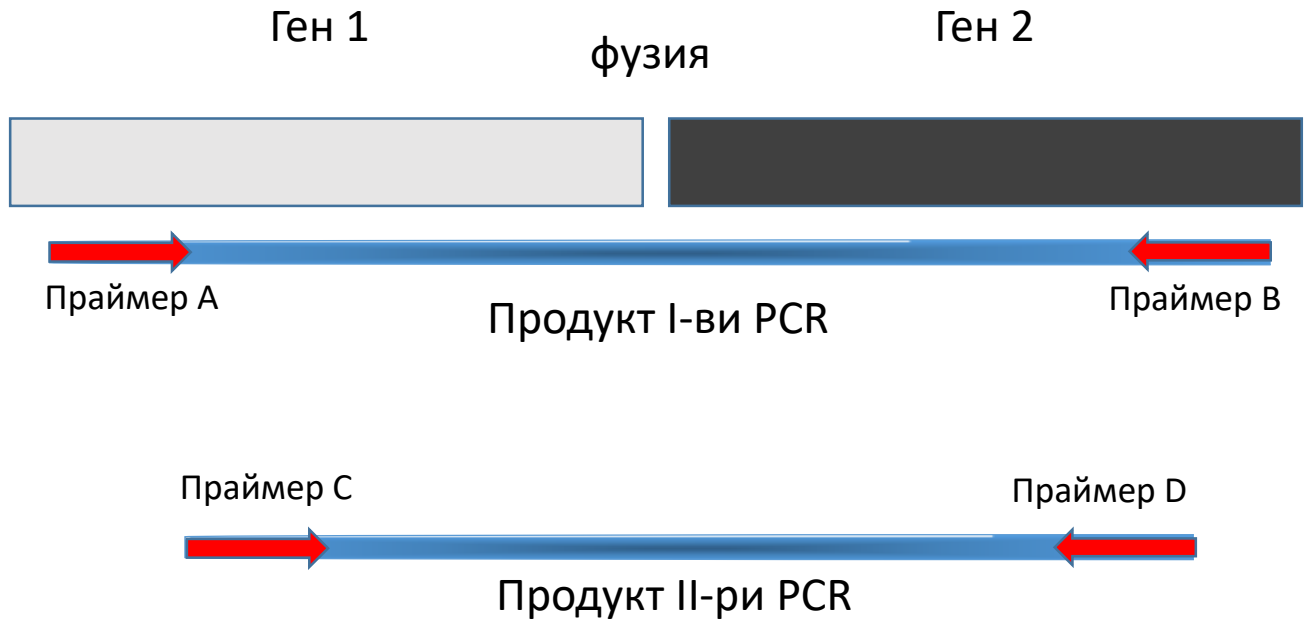
Оценка на наличието на годна за анализ РНК и ефективността на обратната транскрибция – амплификация на β-Actin

Наличието на годна за анализ РНК и ефективността на обратната транскрибция беше оценено чрез амплификация на β-Actin гена. За целта, 2 μl кДНК беше амплифицирана в 25 μl среда, съдържаща 1x PCR буфер, 1.5 mM MgCl2, 0.5 U Taq polymerase [Invitrogen, Karlsruhe, Germany], 200 μM от всеки един от дНТФ

[Promega, Madison, WI, USA] и по 0.4 pM от праймерите b-actin (S) 5'-ggcatcgtgatggactccg-3' and b-actin (AS) 5'-gctggaaggtggacagcga-3' (Alpha DNA, Montreal, Quebec, Canada). Амплификацията беше осъществена на Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems,Foster City,CA,USA) при следните температурни режими: начална денатурация на 95°C за 5 мин, последвана от 35 цикъла, включващи: денатурация на 95°C за 30 сек, аннилинг при 58°C за 1 мин, и екстензия на 72°C за 1 мин, и накрая финална екстенция за 10 мин при 72°C. PCR продуктите бяха анализирани чрез електрофореза в 2% агарозен гел , оцветен с SYBR Safe DNA gel stain [Invitrogen, Karlsruhe, Germany] и визуализация след УВ облъчване (големина на PCR продукта 615 bp) (Фотодокументационна система с трансилуминатор Vilber Lourmat BLX-254).

Изследване на фузионни гени, спецефично асоциирани с остра лимфобластна левкемия, съгласно протокола, препоръчан от европейската програма BIOMED-1 (174) При изследването на фузионните транскрипти беше използван унифициран подход при стандартизирани условия, основаващ се на двуетапна PCR (Nested Primers PCR), при която при първата амплификация се използват праймери A и B, специфични за съответните гени, а при втората реакция така получения продукт се реамплифицира със съответните праймери C и D.

Процесите са представени във фиг. 1, а видът и характеристиката на изследваните праймери в табл. 3 и 4.



Фигура 1. Двуетапна PCR

Таблица 3. Праймери, използвани при изследване на фузионните транскрипти

	Външни праймери [първа PCR] 5'→ 3'		Вътрешни праймери [втора PCR] реамплификация 5'→ 3'	
t(9;22)(q34;q11) ***BCR-ABL1 (p210)***	BCR-B1A: gaagtgtttcagaagcttctcc	ABL-A3B:gtttgggcttcacaccattcc	BCR-B2C:cagatgctgaccaactcgtgt	ABL-A3D: ttccccattgtgattatagccta
t(9;22)(q34;q11) ***BCR-ABL1 (p190)***	BCR-E1A: actgcagctccaatgagaac	ABL-A3B:gtttgggcttcacaccattcc	BCR-E1C: cagaactcgcaacagtccttc	ABL-A3D: ttccccattgtgattatagccta
t(4;11)(q21;q23) ***KMT2A-AFF1 (MLL-AF4)***	MLL-A: ccgcctcagccacctac	AF4-B: tgtcactgagctgaaggtcg	MLL-C: aggaccgccaagaaaaga	AF4-B: cgttccttgctgagaatttg
t(1;19)(q23;p13) ***TCF3-PBX1 (E2A-PBX1)***	E2A-A: caccagcctcatgcacaac	PBX1-B: tcgcaggagattcatcacg	E2A-C: caccctccctgacctgtct	PBX1-D: ggcctgctcgtatttctcc
t(12;21)(p13;q22); ***ETV6-RUNX1 (TEL-AML1)***	TEL-A: aagcccatcaacctctctcatc	AML1-B: aacgcctcgctcatcttgc	TEL-C: aagcccatcaacctctctcatc	AML1-D:tggaaggcggcgtgaagc

Таблица 4. Големина на различни варианти на фузионните транскрипти при амплификация с двете двойки праймери

Фузионни транскрипти	**Големина на различни варианти на фузионните транскрипти при амплификация с двете двойки праймери** продук [base pair (bp)	
	Праймери A-B	Праймери C-D
BCR-ABL1 (p210)	B3a2 вариант 417 B2a2 вариант 342 B3a3 вариант 243 B2a3 вариант 168	B3a2 вариант 360 B2a2 вариант 285 B3a3 вариант 186 B2a3 вариант 111
BCR-ABL1 (p190)	E1a2 вариант 521 E1a3 вариант 347	E1a2 вариант 381 E1a3 вариант 207
KMT2A-AFF1 (MLL-AF4)	E8-e7 вариант 184 E8-e4 вариант 353 E9-e5 вариант 382 E9-e4 вариант 427 E10-e6 вариант 427 E10-e5 вариант 514 E10-e4 вариант 559 E11-e6 вариант 541	E8-e7 вариант 127 E8-e4 вариант 296 E9-e5 вариант 325 E9-e4 вариант 370 E10-e6 вариант 370 E10-e5 вариант 457 E10-e4 вариант 502 E11-e6 вариант 484

	E11-a5 вариант 628 E11-e4 вариант 673	E11-a5 вариант 571 E11-e4 вариант 616
TCF3-PBX1 (E2A-PBX1)	Стандартни транскрипти 373 Вариантни транскрипти 400	Стандартни транскрипти 289 Вариантни транскрипти 316
ETV6-RUNX1 (TEL-AML1)	Стандартни транскрипти 298 Вариантни транскрипти 259	Стандартни транскрипти 181 Вариантни 4 транскрипти 142

За целта 2 μl кДНК бяха амплифицирани в 25 μl реакционна среда, съдържаща 1x PCR буфер, 2.5 mM MgCl2, 1 E Taq polymerase [Invitrogen, Karlsruhe, Germany], 400 nM от първата двойка праймери (A и B) [Alpha DNA, Montreal, Quebec, Canada], 200 μM от всеки един от дНТФ [Promega, Madison, WI, USA] и 0.5 U Taq polymerase. Амплификацията беше осъществена на Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA,USA) при следните температурни режими: начална денатурация на 95°C за 30 сек., последвана от 35 цикъла, включващи: денатурация на 94°C за 30 сек, аннилинг при 65°C за 60 сек., и екстензия на 72°C за 60 сек. При втората амплификация, 1 μl от продукта на първата PCR беше реамплифициран в реакционна среда, идентична по своя състав на тази, използвана при първата реакция, но със съответните праймери C и D, при същите температурни условия. PCR продуктите бяха анализирани чрез електрофореза в 2% агарозен гел, оцветен със SYBR Safe DNA gel stain [Invitrogen, Karlsruhe, Germany] и визуализация след УВ облъчване (големина на PCR продукта 615 bp) (Фотодокументационна система с трансилуминатор Vilber Lourmat BLX-254).

При всяка една амплификация, бяха включвани съответните контроли:

(1) Отрицателна – реакционна среда с вода, без кДНК (no template control) и (2) кДНК от здрави лица.

(2) Положителна – плазмидни стандарти, получени от съответните клетъчни линии, носещи характерните аномалии, както следва: *BCR-ABL1 (p210)* – K562; *BCR-ABL1 (p190)* – TOM-1; *KMT2A-AFF1 (MLL-AF4)* – RS-4;11; MV-4;11*; TCF3-PBX1 (E2A-PBX1)* - ACC-42; *ETV6-RUNX1 (TEL-AML1)* – REH

Чувствителността на реакцията, определена чрез серийни разреждания на съответните положителни контроли, съответстваше на около: 10^{-3} (0.1%) фузионни транскрипти след първата и 10^{-4} (0.01%) - след втората амплификация.

RT-PCR беше осъществена в Лаборатория по цитогентика и молекулярна генетика към Национална специализирана болница за активно лечение на хематологични заболявания - София.

3. Статистически методи

Основни понятия : *survival time (*време на преживяемост – *overall survival или OS* и време до събитие – *event free survival или EFS)* - интервалът от поставяне на диагнозата (или началото на лечение) до поява на събитието от интерес (съответно смърт или рецидив, прогресия); *censoring (цензориране)* – цензорира се в случай на: липса на събитие от интерес за периода на наблюдение, отпадане на пациент от проследяването, невъзможно наблюдение, поради настъпване на други събития (189):

За решаване на поставените задачи и за оценка на получените резултати бяха направени:

3.1. Анализи на преживяемостта (survival analysis) (190), използвайки следните методи: *Kaplan-Meier* диаграма за визуализиране на кривите на преживяемост; *Log-rank test* за сраняване на кривите на преживяемост между две или повече групи. Методът на Каплан-Майер и *log-rank test* са примери за унивариатни анализи, които описват преживяемостта в зависимост само от един фактор, игнорирайки влиянието на останалите. Освен това, могат да се използват в случай само на категорийни вариабилни(189,190). В нашето проучване тези методи се приложиха за сравняване на преживяемостта между отделните групи пациенти, разделени по различни променливи от категориен тип.

3.2. ***Cox proportional - hazards model*** е регресионен модел, който се използва предимно в проучванията в областта на медицината. Чрез метода се изследва асоциацията между времето на преживяемост и една или повече прогностични вариабилни. За разлика от предходните два анализа, Cox – регресията използва освен категорийни и количествени вариабилни и оценява едновременното

въздействие на няколко фактора върху преживяемостта, заедно със степента им на въздействие. Методът изследва как специфични фактори влияят върху честотата на определено събитие в конкретен момент, честотата се означава като *hazard rate*, а прогностичните вариабилни като *ковариати*. *Cox*-моделът може да се изрази чрез линеарна мултиплена регресия, където коефициентът β отразява тежестта на въздействие на ковариатите, а чрез HR (*hazard ratio*) се съди за посоката на въздействие – HR>1 означава, че ковариатата се асоциира с вероятност от събитие, т.е. с негативно въздействие върху продължителността на преживяемост, и обратно. Накратко, в онкологията HR > 1 е лош прогностичен белег, HR < 1 е добър прогностичен белег(191,192).

В нашето проучване методът се приложи за установяване на зависимостите в най-голямата генетична подгрупа.

3.3. Дисперсионен анализ (**Analysis of variance** - ANOVA) - Чрез дисперсионния анализ може да се установи дали между изследваните явления (признаци) съществува зависимост, без да се измерва теснотата или силата на зависимостта, както и нейната посока. Ето защо дисперсионният анализ се отнася към методите за изследване на връзки и зависимости. При нас този метод е използван за установяване на зависимост между AGE (възраст), WBC (начален левкоцитен брой), Hb (хемоглобин), PLT (тромбоцити) и влияващият му фактор генетичен маркер. За целта се проверява статистическа нулева хипотеза за равенство на средните стойности (mean) за AGE, WBC, Hb, PLT от 6 броя независими извадки от данни на пациентите. Чрез тази проверка се оценява доколко влиянието на фактора “генетичен маркер” (“marker“) е статистически значимо за различието на средните стойности.

3.3. **Kruskal-Wallis test –** непараметричен анализ за разпределението между категорийни променливи. Сравняват се две или повече независими извадки, с еднакъв или различен размер. При нас този метод е използван за установяване на зависимост между рискови групи, ЦНС-ангажиране, отговор на терапия 8 ден, ремисия 33-ти ден и влияещия му фактор генетичен маркер.

3.4. Проверка на хипотези за равенство на две вероятности – ***Хи-квадрат анализ (χ^2)*** или *chi-squared test* е статистически анализ, който се използва за проверка на хипотези, касаещи очакваното спрямо наблюдаваното разпределение на честоти на една или повече категории. Резултатът има статистическа значимост (p<0,01), когато е много малко вероятно да се потвърди нулевата хипотеза (193,194). Посредством този анализ, в нашето проучване, беше определена еднаквостта на групите по категорийни променливи.

3.5. Проверка за статистически значима разлика между средните аритметични/медианните стойности на две групи – ***тестът на Стюдънт – Фишер*** е статистически анализ за проверка на статистически параметрични хипотези (194,195). Така сравнихме групите по разпределение на количестени променливи. Посредством този анализ в нашето проучване бяха сравнени групите по разпределение на количестени променливи.

За извършване на анализите са използвани статистически софтуерни пакети:

- ✓ SPSS, версия 19.1, SPSS Inc, Chicago USA;
- ✓ STATISTICA 13.0, StatSoft Inc, USA.

Статистическата обработка на данните е извършена със съдействието на:

Доц. Милена Стойчева-Янчева, Катедра по Социална медицина и Здравен мениджмънт на МУ – София, Сектор Биостатистика и Медицинска информатика.

Проф. Красимира Проданова, ръководител катедра „Математически анализ и диференциални уравнения“ на ТУ – София.

РЕЗУЛТАТИ

Получените резултати от проведените изследвания, в отговор на поставените цели и задачи, се обособиха в четири раздела:

1. Резултати, отнасящи се до честотата и демографската характеристика на установените чрез RT-PCR генетични подгрупи ОЛЛ при пациентите, лекувани в КДКХО – София.

2. Резултати, отнасящи се до корелациите на основни клинико-лабораторни и имунофенотипни характеристики и наличие на най-честите молекулярно-генетични аномалии при деца с ОЛЛ.

3. Резултати, отнасящи се до влиянието на изследваните генетични маркери върху отговора към лечение и преживяемостта при деца с ОЛЛ, в условията на унифициран лечебен протокол.

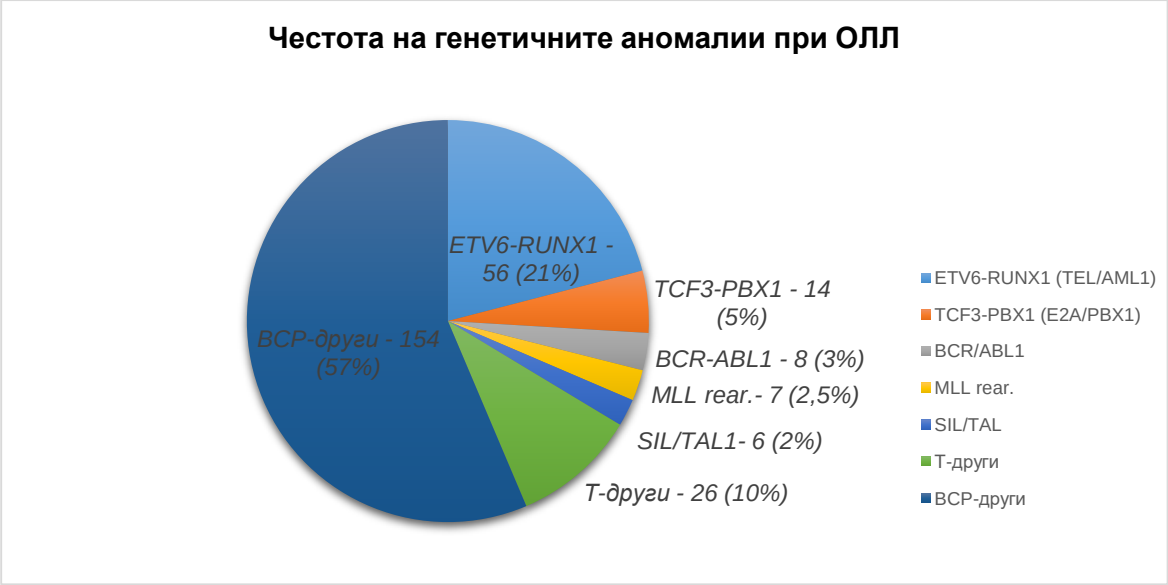
4. Резултати, отнасящи се до прогностичната стойност на нивото на минимална резидуална болест (МРБ), измерено чрез полуколичествена RT-PCR на установените при диагнозата фузионни гени.

1. Честота и демографска характеристика на установените чрез RT-PCR генетични подгрупи Остра лимфобластна левкемия (ОЛЛ) при деца, лекувани в КДКХО за 13-годишен период.

1. 1. При всички пациенти

Периодът на наблюдение на групата е средно 82 месеца (0 - 179,8 месеца).

От изследваните 271 деца с ОЛЛ, общият брой, положителни за изследваните с RT-PCR генетични аномалии, е 91 (34%) или 1/3 от всички случаи. Честотата на отделните генетични маркери, спрямо общия брой диагностицирани пациенти, е представена на фиг. 2. За краткост, групата пациенти с В-клетъчна прекурсорна левкемия (**B C**ell **P**recursor) без молекулярен маркер, е означена като **BCP-други**, а тези, с Т-клетъчен фенотип без маркер, съответно с **Т-други**.



Фигура 2. Генетични подтипове при ОЛЛ – разпределение по честота

Медианната възраст на изследваните 271 пациенти е 5 години (0 – 18). Диагностицирани са 166 момчета и 105 момичета, съотв. съотношението между половете е 1,6:1. Разпределението по възрастови групи е както следва: 7 деца

(3%) на възраст под 1 година, 141 деца (52%) на възраст от 1 до < 6 години, 44 деца (16%) на възраст от 6 до < 10 години, 43 деца (16%) от 10 до < 15 години и 36 деца (13%) на възраст от 15 години и по - големи (табл. 5).

В табл. 5 са представени демографски данни за пациентите, според наличието на генетичен маркер.

Таблица 5. Демографска характеристика на пациентити по подгрупи

Променлива	**Общо пациенти**	**BCP-други**	***ETV6-RUNX1* (+) пациенти**	***TCF3-PBX1* (+) пациенти**	***BCR-ABL1* (+) пациенти**	***MLL-rear*.(+) пациенти**	***SIL-TAL1(+)* Пациенти**	***SIL-TAL1(-)* Пациенти**
Брой пациенти	271	154	56	14	8	7	6	26
Пол, N Момчета Момичета	 166 105	 89 65	 31 25	 11 3	 7 1	 3 4	 6 0	 19 7
Възраст при диагнозата (години) медиана диапазон	 5 0 – 18	 5 0 – 18	 4 1 – 18	 7,5 1 – 17,5	 13 4 - 17	 0,7 0 – 15	 11,5 2 – 18	 10,5 2 – 18

При проверка на равномерността на разпределението по възраст, според стойността на медианата за възрастта, между отделните генетични подрупи, (мултипараметричен анализ Kruskal – Wallis) се установи статистически значима разлика между:

- ✓ *ETV6-RUNX1*(+) подгрупа и *BCR-ABL1*(+) подгрупа – пациентите с Ph+ ОЛЛ са с по-голяма възраст в сравнение с пациентите с *ETV6-RUNX1*(+) ОЛЛ;
- ✓ *ETV6-RUNX1*(+) подгрупа и *SIL-TAL1(-)* пациенти – пациентите с *ETV6-RUNX1*(+) са на по-малка възраст в сравнение с пациентите с Т-клетъчна ОЛЛ без генетичния малкер *SIL-TAL1;*
- ✓ *ETV6-RUNX1*(+) подрупа и групата с *MLL- rear*.;
- ✓ пациентите с *MLL- rear.* и *BCR-ABL1(+)* подгрупа;
- ✓ пациентите с *MLL- rear*. и *SIL-TAL1(+)* група*;*
- ✓ пациентите с *MLL- rear*. и *SIL-TAL1(-)* пациенти;

MLL-реаранжиране се установява най-често при пациенти в кърмаческа възраст, което определя установената статистически значима разлика в сранение с групите на *ETV6-RUNX1*(+), *BCR-ABL1(+)* и всички Т-клетъчни ОЛЛ.

- ✓ BCP-други и *SIL-TAL(-)* пациенти – пациентите BCP-ОЛЛ без маркер са на по-малка възраст в сравнение с Т-клетъчните без маркер;

Данните са представени в табл. 6.

Таблица 6. Мултипараметрично сравнение (по Kruskal – Wallis) за възраст

Multiple Comparisons p values (2-tailed); **AGE** (Spreadsheet1) Independent (grouping) variable: marker Kruskal-Wallis test: H (6, N= 271) =33,85135 p =,0000							
	0 - R:130,86	**1 - R:114,14**	**2 - R:147,50**	**3 - R:204,19**	**4 - R:66,643**	**5 - R:207,92**	**6 - R:188,42**
0		1,000000	1,000000	0,207430	0,713818	0,381006	0,011178
1	1,000000		1,000000	0,049734	1,000000	0,112293	0,001366
2	1,000000	1,000000		1,000000	0,542571	1,000000	1,000000
3	0,207430	0,049734	1,000000		0,014630	1,000000	1,000000
4	0,713818	1,000000	0,542571	0,014630		0,025107	0,005528
5	0,381006	0,112293	1,000000	1,000000	0,025107		1,000000
6	0,011178	0,001366	1,000000	1,000000	0,005528	1,000000	

0-BCP-други; 1- *ETV6-RUNX1*(+); 2- *TCF3-PBX1* (+); 3- *BCR-ABL1* (+); 4- *MLL- rear.*(+); 5- *SIL-TAL1(+); 6 - SIL-TAL1(-)*

Не беше установена статистически значима разлика при равномерността на разпределението по пол между отделните генетични подгрупи (табл. 7).

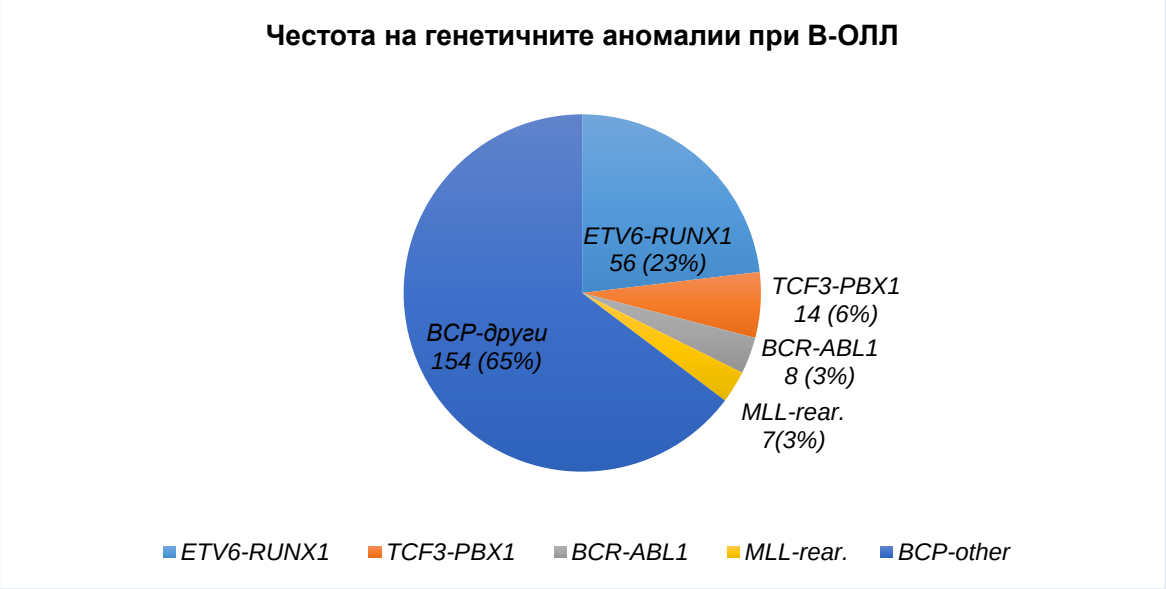
Таблица 7. Мултипараметричен анализ (по Kruskal – Wallis) за пол

Multiple Comparisons p values (2-tailed); **sex f=0;m=1** (Spreadsheet1) Independent (grouping) variable: marker Kruskal-Wallis test: H (6, N= 271) =12,78739 p =,0465							
	0 - R:133,07	**1 - R:123,17**	**2 - R:159,46**	**3 - R:171,56**	**4 - R:111,07**	**5 - R:188,50**	**6 - R:152,02**
0		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
1	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
2	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
3	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000
4	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000
5	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000
6	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	

0-BCP-други; 1- *ETV6-RUNX1*(+); 2- *TCF3-PBX1* (+); 3- *BCR-ABL1* (+); 4- *MLL- rear.*(+); 5- *SIL-TAL(+); 6 - SIL-TAL1(-)*

1. 2. В-клетъчна прекурсорна остра лимфобластна левкемия - BCP-ОЛЛ

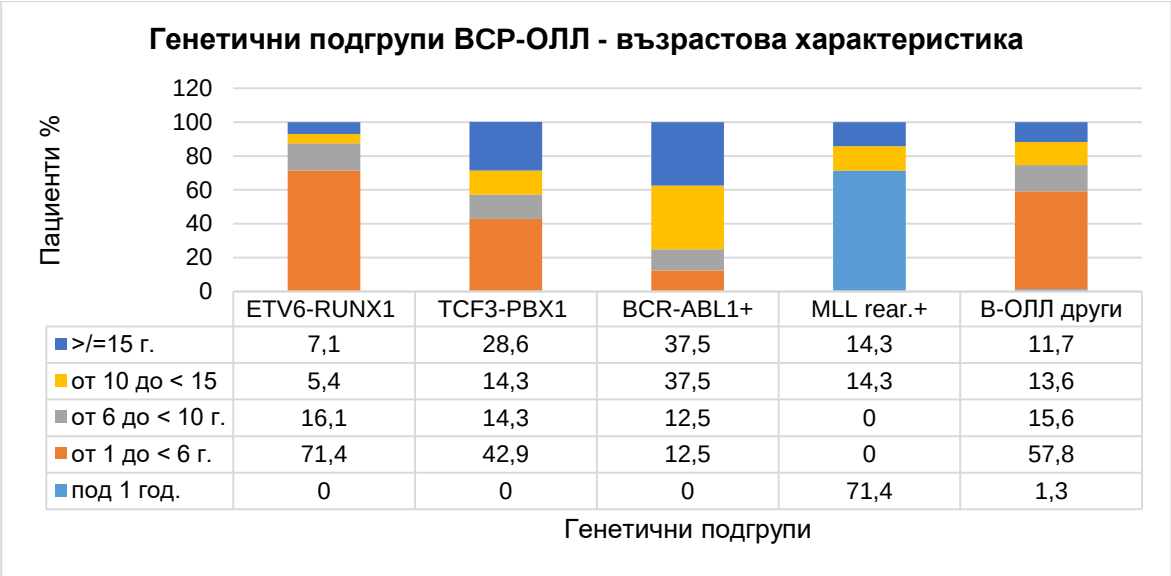
Пациентите с BCP-ОЛЛ са преобладаващата част 239 (88%) от всички 271 случаи, с медианна възраст 5 години (1 мес. - 18 год.) и разпределение по пол - 141 момчета/98 момичета, в съотношение 1,4:1. Честотата на установени молекулярни маркери е представена на фиг.3



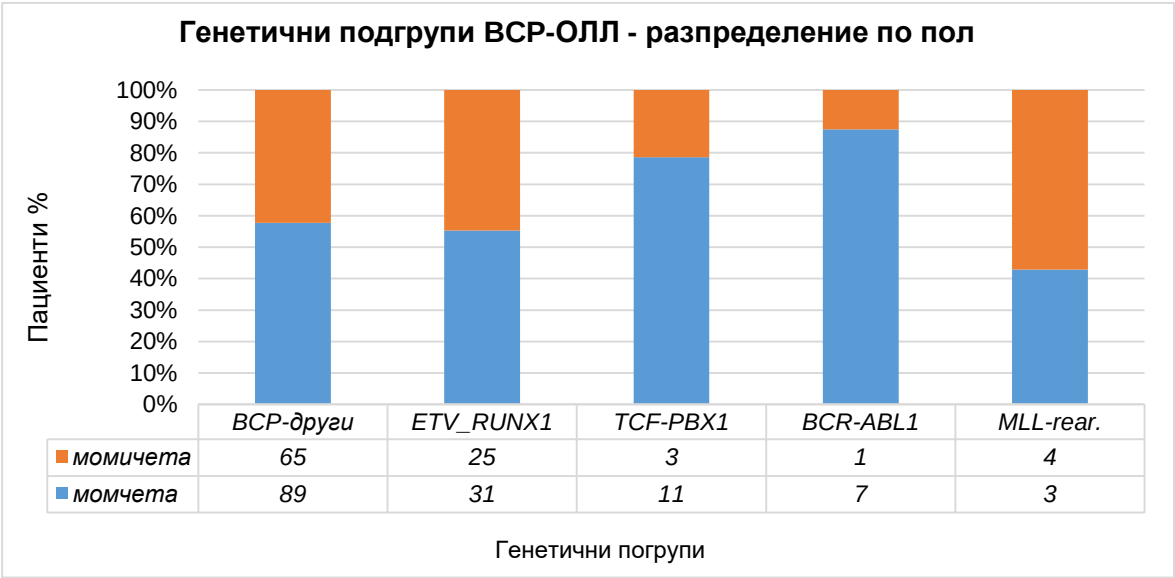
Фигура 3. Генетични подтипове при В - ОЛЛ – разпределение по честота

ETV6-RUNX1 (+) ОЛЛ

В най-голямата група с генетичен маркер, възрастовият диапазон е с по-ниска медианна възраст 4 год. (1 - 18) и приблизително същото полово съотношение (1,3:1, момчета 31/56, 55%, съотв. момичетата 25/56 или 45%). Няма нито един пациент в кърмаческа възраст и само 7 (12%) са над 10 годишна възраст. Повечето деца (49 (88%) са до 10 год. възраст, като 40 от тях (71%) са в диапазона 1 - 6 год. (фиг.4 и 5).



Фигура 4. Генетични подгрупи BCP-ОЛЛ – възрастова характеристика



Фигура 5. Генетични подгрупи BCP-ОЛЛ – разпределение по пол

TCF3-PBX1(+) ОЛЛ

Във втората по численост група е на пациенти с *TCF3-PBX1(+)*ОЛЛ, с възрастов диапазон 1 г. 4 мес.- 17 год. 6 мес., медиана 7,5 години. Преобладава мъжкият пол - момчета 11/14 или 79%, момичетата са 3/14 или 21%,

съотношение между полове – 3,7:1. В кърмаческа възраст няма диагностициран пациент, 8 деца (57%) са на възраст до 10 години, останалите 6 (43%) са на възраст ≥ 10 години (фиг.4 и 5).

BCR-ABL1(+) ОЛЛ

При пациентите с *BCR-ABL1(+)* ОЛЛ възрастта е в диапазон от 3 год. 10 мес. до 17 год. 2 мес., медиана – 13 год. Броят на момчетата е 7 (87,5%), има 1 (12,5%) момиче, съотношението между половете е 7:1. Шест от 8 деца (75%) са над 10 годишна възраст (фиг.4 и 5).

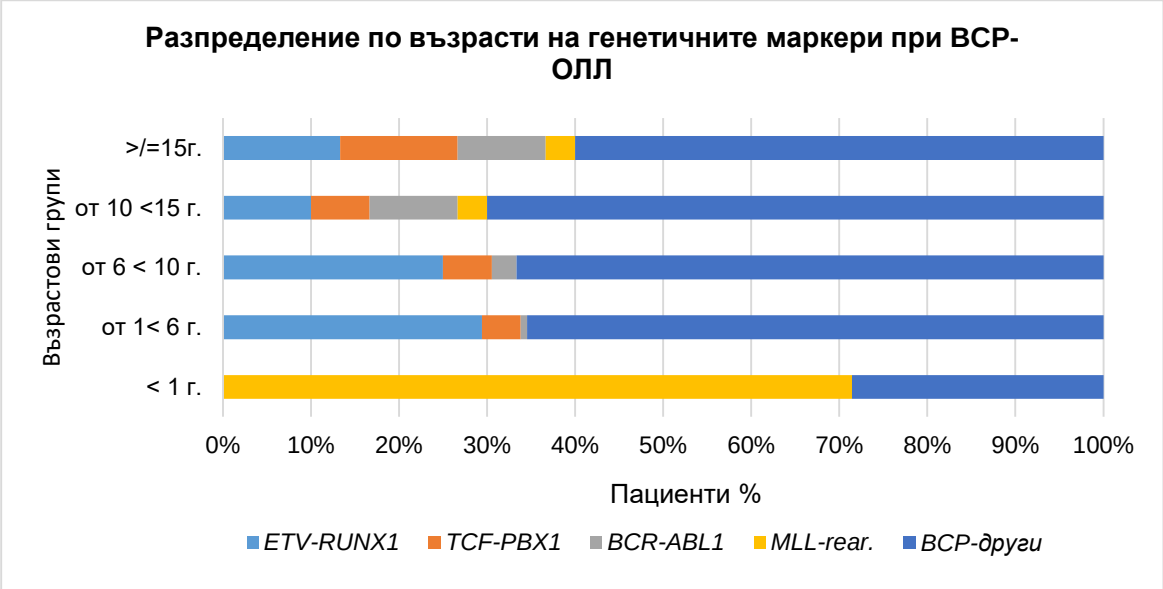
MLL-реаранжирани ОЛЛ

В последната по численост група на *MLL-реаранжираните* ОЛЛ, възрастовият диапазон е 1 мес. – 15 г. 3 мес., медиана - 0,7 год. В кърмаческа възраст са 5 от децата (71%), останалите 2 (29%) са с възраст над 10 години. Момчетата са 3, а момичетата 4, съотношението между половете е 0,75:1 (фиг.4 и 5).

При разглеждане на цялата група пациенти с BCP-ОЛЛ се очертават тенденции по отношение на възрастово и полово разпределение на отделните генетични маркери. Възрастовото разпределение на изследваните фузионни гени е както следва: 71% от децата с *MLL-реаранжиране* са в кърмаческа възраст, като това е единствената аномалия, която се установява във възрастта под 1 година.

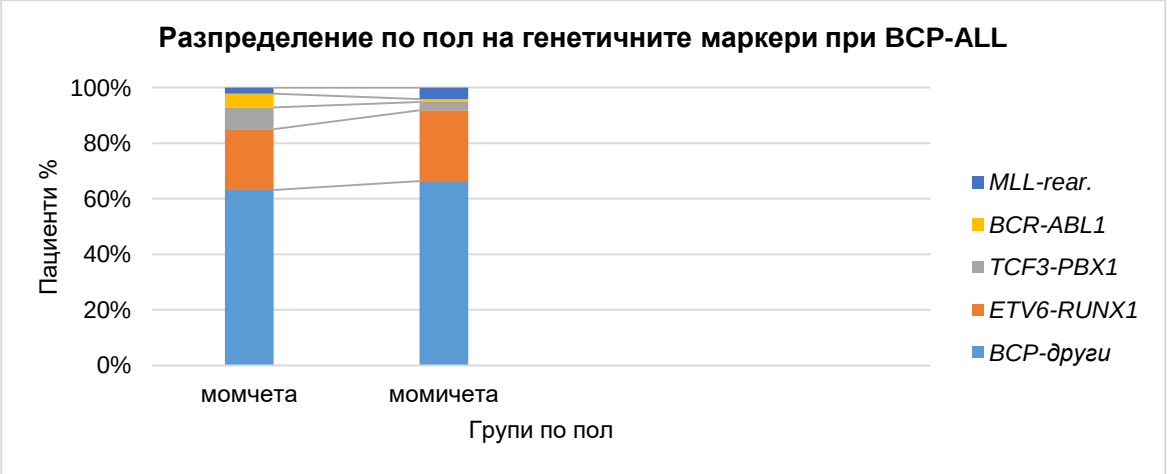
В най-многобройната възрастова група – между 1 и < 6 год. (136 деца, 57%) - при 1/3 от пациентите се установява генетична аномалия – в 29% това е *ETV6-RUNX1,* в 6 случая (4%) *TCF3-PBX1* и само при един случай (1%) *BCR-ABL(+).*

При следващата възрастова група (6 - 10 г.) разпределението на честотата на изследваните молукулярни маркери наподобява това при цялата група – 9 случая (25%) на *ETV6-RUNX1 (+)ОЛЛ*, 2 (5%) на *TCF3-PBX1 (+)ОЛЛ* и 1 (3%) на *BCR-ABL1(+) ОЛЛ,* не се установява само *MLL-реаранжиране.* При по-големите деца (възраст над 10 години) тенденциите са за значително намаляване честотата на *ETV6-RUNX1(+)ОЛЛ* и относително увеличаване на тази на останалите маркери (фиг.6 и табл.6).



Фигура 6. Разпределение по възрасти на генетичните маркери при BCP-ALL

При сравняване на честотата на изследваните фузионни гени между групите по пол, при момичета се установява сравнително по-висока честота на *ETV6-RUNX1(+) ОЛЛ* и отчетливо по-висока честота на *MLL*-реаранжирани ОЛЛ. Обратно, при мъжкия пол честотата на *TCF3-PBX1 (+) ОЛЛ* и особено на *BCR-ABL1(+) ОЛЛ* е значително по-висока (фиг. 7 и табл.8).



Фигура 7. Разпределение по пол на генетичните маркери при BCP-ALL

Обобщени данни са представени в табл. 8.

Таблица 8. Разпределение на пациентите с В-ОЛЛ по пол и възраст по групи

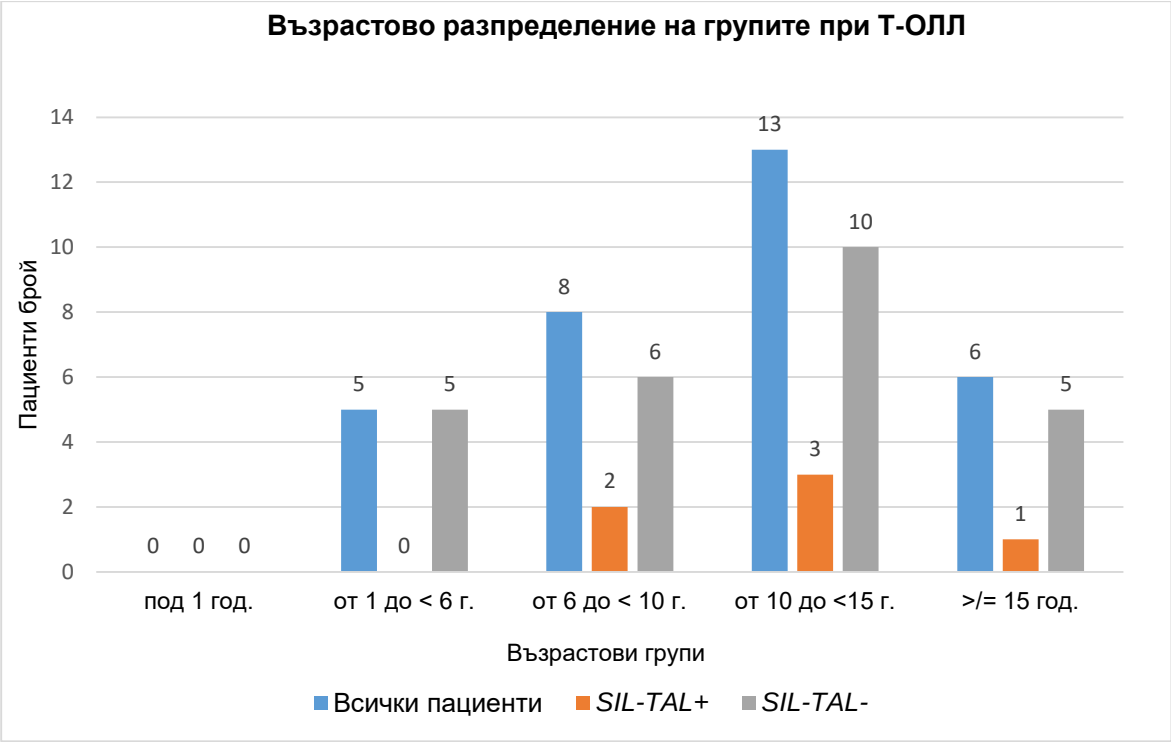
Променлива	Всички пациенти		*ETV6-RUNX1*(+) пациенти		*TCF3-PBX1* (+) пациенти		*BCR-ABL1* (+) пациенти		*MLL–rear*.(+) пациенти		BCP-други	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Брой пациенти	239	100	56	23	14	5,9	8	3,3	7	2,9	154	64,4
Пол **момчета** **момичета**	 141 98	 59 41	 31 25	 22 26	 11 3	 8 3	 7 1	 5 1	 3 4	 2 4	 89 65	 63 66
Пол (съотношение)	1,4:1	/	1,3:1	/	4:1	/	7:1	/	0,75:1	/	1,4:1	/
Възраст (години) **< 1** **1 до < 6 г.** **6 до < 10 г.** **10 до < 15 г.** **≥ 15 г.**	 7 136 36 30 30	 3 57 15 13 13	 0 40 9 3 4	 0 29 25 10 13	 0 6 2 2 4	 0 4 6 7 13	 0 1 1 3 3	 0 1 3 10 10	 5 0 0 1 1	 71 0 0 3 3	 2 89 24 21 18	 29 65 67 70 60
Възраст (медиана)	5	/	4	/	7,5	/	13	/	0,7	/	5	/

1. 3. Т – ОЛЛ

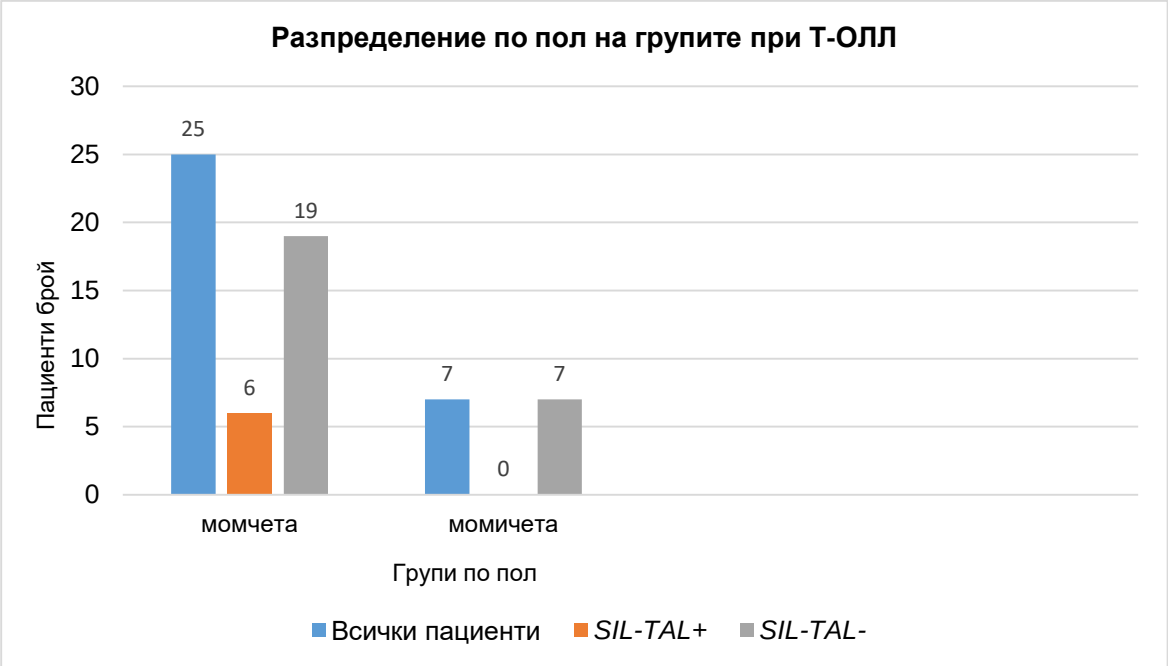
При диагностицираните 32 пациента с Т–ОЛЛ, възрастовият диапазон е 2 год. 1 мес. – 17 год. 11 мес. с медиана 10,5 години. Съотношението между половете е 3,6:1 (25 момчета и 7 момичета). Установени са 6 *SIL-TAL1*+ случая (19% честота в групата). При 60% от случаите възрастта е над 10 год. (медианна възраст 11,5) и всички диагностицирани *SIL-TAL1*+ случаи са деца над 6 год. и от мъжки пол. Данните са представени в табл.9 и фиг. 8 и 9.

Таблица 9. Разпределение на пациентите с Т-ОЛЛ по пол и възраст

Променлива	Всички пациенти		*SIL-TAL1*+ пациенти		*SIL-TAL1*- пациенти	
	N	%	*N*	*%*	*N*	*%*
Брой пациенти	32	100	6	19	26	81
Пол **момчета** **момичета**	 25 7	 78 22	 6 0	 24 0	 19 7	 76 100
Възраст (медиана)	10,5	/	11,5	/	10,5	/



Фигура 8. Възрастово разпределение на Т-ОЛЛ



Фигура 9. Разпределение на Т-ОЛЛ по пол

2. Корелации на основни клинико-лабораторни и имунофенотипни характеристики с наличието на най-честите молекулярно-генетични аномалии при деца с ОЛЛ.

2.1. Клинична картина

Клиничната картина при ОЛЛ включва широк спектър от клинични признаци и симптоми, повечето от които не са специфични. Чрез констелацията с данните, получени от насочените рутинни и специализирани лабораторни и образни изследвания, могат да се очертаят профили на отделните генетични подтипове на заболяването в иначе хетерогенната група на ОЛЛ.

В табл. 10 е представена честотата на отделни клинични прояви на основното заболяване при изследваните генетични подгрупи. Избрани са клинични белези, чието диагностициране, лечение и проследяване изисква специфично поведение в контекста на основното заболяване.

Таблица 10. Клинични прояви в дебюта на заболяването

Променлива	**Общо пациенти**	***ETV6-RUNX1* (+) пациенти**	***TCF3-PBX1* (+) пациенти**	***BCR/ABL1* (+) пациенти**	***MLL-реаранж* (+) пациенти**	**BCP-други**	***SIL-TAL1+* пациенти**	***SIL-TAL1-* пациенти**
	N (%)	**N (%)**	**N (%)**	**N (%)**	**N (%)**	**N (%)**	**N (%)**	**N (%)**
Брой пациенти	271 (100)	56 (100)	14 (100)	8 (100)	7 (2,5)	154 (100)	6 (100)	26 (100)
ЦНС-ангажиране	7 (2,5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (14)	2 (1)	0 (0)	4 (15)
Бъбречна инфилтрация	11 (4)	0 (0)	1 (7)	0 (0)	1 (14)	6 (4)	0 (0)	3 (12)
Остеоартралгии	80 (30)	19 (34)	7 (50)	3 (38)	0 (0)	48 (31)	1 (17)	2 (8)
Медиастинално ангажиране	23 (8)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (50)	20 (77)

При 7 (2,5%) деца чрез ликворна диагностика е установено ангажиране на ЦНС в дебюта на заболяването . В 4 от случаите диагнозата е Т-клетъчна ОЛЛ, отрицателна за *SIL-TAL1* маркера, един от пациентите е кърмаче с *MLL-реаранжиране,* останалите двама пациента са с BCP-ОЛЛ без установен генетичен маркер.

Освен ЦНС ангажиране, друга проява на екстрамедуларна инфилтрация е бъбречната инфилтрация. При началната диагноза такава е обективизирана чрез ехографско изследване при 11 пациента (4%). Отново по-висок брой пациенти са с Т-клетъчна *SIL-TAL1* негативна ОЛЛ, с *MLL-ангажиране* отново е един пациент, и още един пациент е с *TCF3-PBX1(+) ОЛЛ* .

Остеоартралгичният синдром е характерен и чест симптом при диагностициране на ОЛЛ. Регистриран е при 80 деца (30%) в разглежданата група, разпределени в отделните подгрупи, както е показано в табл.10.

Ангажиране на медиастинални лимфни възли се установява само при пациенти с Т-клетъчна ОЛЛ – 23 пациента (72% от случаите), като при *SIL-TAL1 (+)* е по-рядък, в сравнение със *SIL-TAL1(-)* група.

2.2. Лабораторни показатели

При поставяне на диагнозата, в пакета рутинни лабораторни изследвания, резултатите от пълната кръвна картина (ПКК) са първите и основни, насочващи към хематологично заболяване. Началният левкоцитен брой (WBC) остава един от класическите рискови фактори, определящи стратификацията на пациентите и съответно адаптирането на терапевтичния режим. Заедно с общото състояие на пациента, определят необходимостта от спешни терапевтични мероприятия.

В зависимост от левкоцитния брой при дебюта на заболяването, пациентите са разделени на 4 групи. Избрани са граници между отделните групи, в съответствие на NCI/Rome criteria, критериите на използваните за лечение BFM–базирани терапевтични протоколи, както и стойности, налагащи

непосредствени лечебни процедури. Данните са представени в табл.11 , като пациентите са разделени съответно:

- ✓ в група с начален левкоцитен брой под 20 x10³/mm³,
- ✓ втора група ≥ 20 до 50 x10³/mm³,
- ✓ трета група ≥ 50 до 100 x10³/mm³ и
- ✓ четвърта група с екстремна левкоцитоза над 100 x10³/mm³.

Голямата част от пациентите попадат в групите с левкоцити под 50 x10³/mm³, като изключение са групите с *MLL-реаранжиране* и позитивните за *SIL-TAL1,* в които над 50% от случаите са с хиперлевкоцитоза, както и Ph(+) ОЛЛ, при които 1/3 от пациентите също имат хиперлевкоцитоза при дебюта.

Нивото на хемоглобина и тромбоцитният брой при дебюта на ОЛЛ не са фактори за причисляване на пациентите към рискови групи, но имат значение при преценката на общия статус и риска от усложнения в резултат на костно-мозъчна недостатъчност. Според нивото на хемоглобина (Hb) пациентите са разпределени в 3 групи, като най-многобройна е групата с Hb-ниво 70 – 110 g/L. Според променливата тромбоцитен (Plt) брой пациентите отново са разделени на 3, като най-висок процент пациенти от отделните генетични подгрупи попадат в диапазона с Plt между 30 – 100 x 10³/mm³, с изключение на групата *TCF3-PBX1* (+) ОЛЛ. Данните са отразени в табл. 11.

Таблица 11. Левкоцитен брой, хемоглобин и тромбоцити при поставяне на диагнозата

Променлива	**Общо пациенти**	***ETV6-RUNX1* (+) пациенти**	***TCF3-PBX1* (+) пациенти**	***BCR/ABL1* (+) пациенти**	***MLL-реаранж* (+) пациенти**	**BCP-други**	***SIL-TAL1+* пациенти**	***SIL-TAL1-* пациенти**
	N (%)	**N (%)**	**N (%)**	**N (%)**	**N (%)**	**N (%)**	**N (%)**	**N (%)**
Брой пациенти	271 (100)	56 (100)	14 (100)	8 (100)	7 (2,5)	154 (100)	6 (100)	26 (100)
Левкоцити (x10³/mm³)								
<20	163 (60)	39 (70)	6 (43)	2 (25)	1 (14)	104 (68)	2 (33)	9 (35)
20 до <50	45 (17)	7 (13)	4 (29)	3 (38)	1 (14)	24 (16)	0 (0)	6 (23)
50 до <100	23 (8)	6 (11)	3 (21)	0 (0)	0 (0)	14 (10)	1 (17)	4 (15)
>100	40 (15)	4 (7)	1 (8)	3 (38)	5 (71)	17 (11)	3 (50)	7 (27)

Хемогло-бин (g/L)								
<70	72 (27)	14 (25)	5 (36)	1 (13)	1 (14)	49 (32)	1(17)	2 (8)
70 до <110	158 (58)	41 (73)	7 (50)	4 (50)	6 (86)	84 (55)	3 (50)	13 (50)
>/= 110	41 (15)	1 (2)	2 (14)	3 (38)	0 (0)	21 (14)	2 (33)	11 (42)
Тромбоци ти ($x10^3/mm^3$)								
<30	65 (24)	12 (21)	8 (57)	0 (0)	1 (14)	40 (26)	2 (33)	2 (8)
30 до <100	131 (48)	27 (48)	3 (21)	6 (75)	5 (71)	72 (47)	4 (67)	14 (54)
>/= 100	75 (28)	17 (30)	3 (21)	2 (25)	1 (14)	42 (27)	0 (0)	10 (38)

2.3. Имунофенотипизация

При всички пациенти чрез флоуцитометрия е определена клетъчната принадлежност на бластната популация – 239 пациента (88%) са с В-клетъчен имунофенотип, а останалите 32 (12%) – с Т-клетъчна левкемия. Всички случаи, при които са установени четирите най-чести молекулярно-генетични аномалии принадлежат към В-клетъчен имунофенотип.

С допълнителен флоуцитометричен анализ са търсени специфични особености в експресията на цитоплазмени и мембранни антигени, характеризиращи бластната популации в отделните генетични групи:

- ✓ *ETV6-RUNX1(+)* ОЛЛ – от положителните за генетичния маркер 56 пациента, за коекспресия на миелоидни маркери (CD13 и CD33) са изследвани 44 (79%) пациента. При 14 (22%) от пациентите се установява коекспресия и на двата миелоидни маркера, при 13 (30%) от пациентите се установява коекспресия на един от маркерите, или общо при 27 (61%) пациента е налична коекспресия на миелоидни маркери. За сравнение, в групата BCP – други от 154 пациента, за коекспресия на миелоидни маркери са изследвани 117 (75%) пациента, като при 8 (7%) от тях коекспресията е на два , при 31 (26%) имат на един маркер, а при останалите 78 (67%) не се намира коекспресия на миелоидни маркери (Табл. 12).

Таблица 12. Сравнителен анализи на коекспресия на миелоидни маркери при *ETV6-RUNX1(+)* и BCP-други

Генетична подгрупа	**CD13 + или CD33+**	**CD13 + и CD33+**	**CD13+ и/или CD33+**	**CD13- и CD33-**
ETV6-RUNX1(+) **Пациенти N(%)**	13 (30)	14 (32)	27 (61)	17 (28)
BCP – други Пациенти N(%)	31 (26)	8 (7)	39 (33)	78 (67)
p	*>0,05*	*<0,05*	*<0,05*	*<0,05*

✓ *TCF3-PBX1(+)* – отличителният за групата по-зрял имунофенотип със CD34- бласти, се установи при 12 (92%) от положителните за маркара 13 (за един от пациентите няма данни).

✓ *MLL-реаранжирани* ОЛЛ – характерен за групата по-незрял (про-В) имунофенотип със CD10- бласти се установи при всички 7 (100%) пациенти.

2.4. Клинико-лабораторни констелации по генетични подгрупи

Предположението, че отделните генетични подгрупи биха могли да се асоциират с характерна констелация от клинико-лабораторни показатели се провери чрез статистическо изследване за разпределението на честотите на избрани признаци:

- демографски - пол, възраст (медиана);

- клинични прояви - начално ЦНС-ангажиране, начална бъбречна инфилтрация, остеоартралгичен синдром, начално медиастинално ангажиране;

- лабораторни - левкоцитен брой, хемоглобин и тромбоцити при дебюта на заболяването.

За BCP-ОЛЛ се сравниха всяка от групите с генетичен маркер с групата на пациентите с В-клетъчен имунофенотип без установен молекулярен маркер

(BCP-други). Допълнително се анализираха особености в имунофенотипната характеристика по групи (табл. 13,14,15,16)

Таблица 13. Клинико-лабораторна констелация при *ETV6-RUNX1(+)* ОЛЛ

Променлива	***ETV6-RUNX1* (+) пациенти**	**BCP-други**	***P value***
	N (%)	**N (%)**	
Брой пациенти	56 (100)	154 (100)	
Пол момчета момичета	31 (55) 25 (45)	89 (58) 65 (42)	0,6976
Възраст (медиана)	4	5	1,0000
ЦНС-ангажиране	0 (0)	2 (1)	0,4526
Бъбречна инфилтрация	0 (0)	6 (4)	0,1287
Остеоарт-ралгии	19 (34)	48 (31)	0,6976
Медиасти-нално ангажира-не	0 (0)	0 (0)	1,0000
Левкоцити (x10³/mm³) <50 >50	46 (83) 10 (17)	128 (83) 26 (17)	1,0000
Хемогло-бин (g/L) <70 >70	14 (25) 42 (75)	49 (32) 105 (68)	0,3282
Тромбоци ти (x10³/mm³) <30 >30	12 (21) 44 (79)	40 (26) 114 (74)	0,4573
Миелоидни маркери	27(61)	39(33)	0,0045

Характеристиките на най-голямата група с генетичен маркер (*ETV6-RUNX1(+)* ОЛЛ се припокриват с тези на BCP-други. Сравнителният анализ доказа, че липсва статистически значима разлика в резпределението на честотите на изследваните клинични белези и лабораторни показатели между двете извадки. Статистически значимо по-висока е честотата на коекспресия на миелоидни маркери за групата.

Таблица 14. Клинико-лабораторна констелация при *TCF3-PBX1(+)* ОЛЛ

Променлива	*TCF3-PBX1* (+) пациенти	BCP-други	*p value*
	N (%)	N (%)	
Брой пациенти	14 (100)	154 (100)	
Пол момчета момичета	 11 (79) 3 (21)	 89 (58) 65 (42)	0,0052
Възраст (медиана)	7,5	5	1,0000
ЦНС-ангажиране	0 (0)	2 (1)	0,4526
Бъбречна инфилтрация	1 (7)	6 (4)	0,3685
Остеоарт-ралгии	7 (50)	48 (31)	0,012
Медиасти-нално ангажира-не	0 (0)	0 (0)	1,0000
Левкоцити ($x10^3/mm^3$) <50 >50	 10 (71) 4 (29)	 128 (83) 26 (17)	0,0554
Тромбоцити ($x10^3/mm^3$) <30 >30	 8 (57) 6 (43)	 40 (26) 114 (74)	0,0001

Сравнителният анализ доказа, че съществува статистически значима разлика между групата с *TCF3-PBX1(+)* ОЛЛ и BCP-други в разпределението по пол, с преобладаване на мъжкия в групата с генетичен маркер. При клиничната презентация, в сравнително по-голямата част от пациентите е налице остеоартралгичен синдром. Въпреки че е на границата със статистическата значимост, се очертава тенденция за по-високостепенна левкоцитоза. Отчита се сигнификантна разлика по показателя начален тромбоцитен брой, като при пациентите с генетичен маркер тромбоцитопенията е много по-често.

Таблица 15. Клинико-лабораторна констелация при *BCR-ABL1(+)* ОЛЛ

Променлива	*BCR-ABL1* (+) пациенти	BCP-други	*p value*
	N (%)	N (%)	
Брой пациенти	8 (100)	154 (100)	
Пол момчета момичета	 7 (87) 1 (13)	 89 (58) 65 (42)	0,0001
Възраст (медиана)	13	5	0,2074
ЦНС-ангажиране	0 (0)	2 (1)	0,4526
Бъбречна инфилтрация	0 (0)	6 (4)	0,1287
Остеоарт-ралгии	3 (38)	48 (31)	0,3396
Медиасти-нално ангажира-не	0 (0)	0 (0)	1,000
Левкоцити ($x10^3/mm^3$) <50 >50	 5 (63) 3 (37)	 128 (83) 26 (17)	0,0021
Хемогло-бин (g/L) <70 >70	 1 (13) 7 (87)	 49 (32) 105 (68)	0,0061
Тромбоцити ($x10^3/mm^3$) <30 >30	 0 (0) 8 (100)	 40 (26) 114 (74)	0,00001

Сравнителният анализ доказа, че съществува статистически значима разлика между групата с *BCR-ABL1(+)* ОЛЛ и BCP-други в разпределението по пол, с преобладаване на мъжкия в групата с генетичен маркер. В останалите клинични белези не се намира значимо различие. По отношение на лабораторната констелация се отчита значимо по-изразена левкоцитоза, успоредно със сравнително по-високи стойности на хемоглобин и тромбоцити.

Таблица 16. Клинико-лабораторна констелация при *MLL-реар.* ОЛЛ

Променлива	*MLL-реаранж* (+) пациенти	BCP-други	*p value*
	N (%)	N (%)	
Брой пациенти	7 (100)	154 (100)	
Пол момчета момичета	 3 (43) 4 (57)	 89 (58) 65 (42)	0,0538
Възраст (медиана)	0,7	5	0,7138
ЦНС-ангажиране	1 (14)	2 (1)	0,0001
Бъбречна инфилтрация	1 (14)	6 (4)	0,0001
Остеоарт-ралгии	0 (0)	48 (31)	0,00001
Медиасти-нално ангажира-не	0 (0)	0 (0)	1,0000
Левкоцити ($x10^3/mm^3$) <50 >50	 2 (29) 5 (71)	 128 (83) 26 (17)	0,00001
Хемогло-бин (g/L) <70 >70	 1 (14) 6 (86)	 49 (32) 105 (68)	0,0095
Тромбоци-ти ($x10^3/mm^3$) <30 >30	 1 (14) 6 (86)	 40 (26) 114 (74)	0,0668

Сравнителният анализ доказа, че съществува статистически значима разлика между групата с *MLL-реар.* ОЛЛ и BCP-други в разпределението, по отношение на честотата на начално ЦНС-ангажиране, бъбречна инфилтрация, остеоартралгии. При лабораторните показатели се установява с по-голяма честота левкоцитоза и компенсирани нива на хемоглобин.

В групата на Т-клетъчните ОЛЛ се сравниха *SIL-TAL1(+)* със *SIL-TAL1(-)* пациенти (табл. 17).

Таблица 17. Клинико-лабораторна констелация при *SIL-TAL1(+)* ОЛЛ

Променлива	***SIL-TAL1+* пациенти**	***SIL-TAL1-* пациенти**	***p value***
	N (%)	**N (%)**	
Брой пациенти	6 (100)	26 (100)	
Пол **момчета** **момичета**	6 (100) 0 (0)	19 (73) 7 (27)	0,0017
Възраст (медиана)	11,5	10,5	1,0000
ЦНС-ангажиране	0 (0)	4 (15)	0,0021
Бъбречна инфилтрация	0 (0)	3 (12)	0,0066
Остеоарт-ралгии	1 (17)	2 (8)	0,0588
Медиасти-нално ангажира-не	3 (50)	20 (77)	0,0002
Левкоцити (x10³/mm³) **<50** **>50**	2 (33) 4 (67)	15 (58) 11 (42)	0,00001
Хемогло-бин (g/L) **<70** **>70**	1(17) 5 (83)	2 (8) 24 (92)	0,0588
Тромбоци ти (x10³/mm³) **<30** **>30**	2 (33) 4 (67)	2 (8) 24 (92)	0,00001

Сравнителният анализ доказа, че съществува статистически значима разлика между *SIL-TAL1(+)* и *SIL-TAL(-)* група по отношение на:

- ✓ разпределението по пол - *SIL-TAL1(+)* случаи са пациенти само от мъжки пол;
- ✓ по клинична картина - при пациенти без маркер няма установена начална ЦНС - и бъбречна инфилтрация, а медиастинално ангажиране е сравнително по-рядко;
- ✓ при пациенти с положителен маркер по-често се установява хиперлевкоцитоза и по-рядко тромбоцитопения.

2.5. Цитогенетика

Успешно цитогенетично изследване е проведено при 101 от случаите (37%). В групата с положителен генетичен маркер, цитогенетични резултати са отчетени при 34 (37%) пациенти, съответно:

- *ETV6-RUNX1*(+) подгрупа – 21 (38%), от които 14 (25%) са с нормален кариотип, а останалите 7 (13%) – с комплексен;
- *TCF3-PBX1(+)* подгрупа – в 5 (36%) от случаите аномалията е установена и цитогенетично, като при 2 от тях се касае за небалансирана транслокация;
- *BCR-ABL1(+)* подгрупа – при 4 (50%) от случаите транслокацията е доказана и цитогенетично;
- *MLL*-реаранжиране – при 3 от случаите наличието на *MLL* – реаранжиране е потвърдено и от цитогенетично изследване;
- *SIL-TAL1(+)* подгрупа - само при един от случаите аномалията е доказана и цитогенетично.

Допълнително, един от случаите с *MLL- реаранжиране* е доказан само с FISH – проба, без да може да се идентифицира партньорския ген.

3. Резултати, отнасящи се до влиянието на изследваните генетични маркери върху отговора към лечение и преживяемостта при деца с ОЛЛ, в условията на унифициран лечебен протокол.

3.1. Оценихме влиянието на генетичните аномалии върху отговора към лечение и прогнозата:

3.1.1. Направихме сравнителен анализ за отговора към лечение между всяка от групите с генетичен маркер, съпоставена с групата без установен маркер, съответно за В-клетъчните и Т-клетъчните ОЛЛ. Установено бе, че:

- ✓ групата с *ETV6-RUNX1*(+) ОЛЛ не се различава от BCP-други по отговор към терапията на ден 8, по разпределението на BFM рисковите групи, както и за постигане на ремисия на ден 33;
- ✓ за групите с *TCF3-PBX1*(+), *BCR-ABL1(+)*, *MLL-rear*. и *SIL-TAL1*(+) ОЛЛ разпределението по отговор на лечение на ден 8 и BFM рисковите групи е сигнификантно различно от групите, негативни за маркер;
- ✓ за групата с *MLL- rear.* и *SIL-TAL1*(+) ОЛЛ, въпреки че не е статистически значима, съществува разлика в честотата на постиганати ремисии в сравнение с останалите групи.

Данните са представени в табл. 18

Таблица 18. Сравнителен анализ за отговор към лечение

Промен Лива	**Общо пациенти**	***ETV6-RUNX1* (+) пациенти**	***TCF3-PBX1* (+) пациенти**	***BCR-ABL1* (+) пациенти**	***MLL-реаранж* (+) пациенти**	**BCP-други**	***SIL-TAL1(+)* пациенти**	***SIL-TAL1(-)* пациенти**
	N (%)	**N (%)**	**N (%)**	**N (%)**	**N (%)**	**N (%)**	**N (%)**	**N (%)**

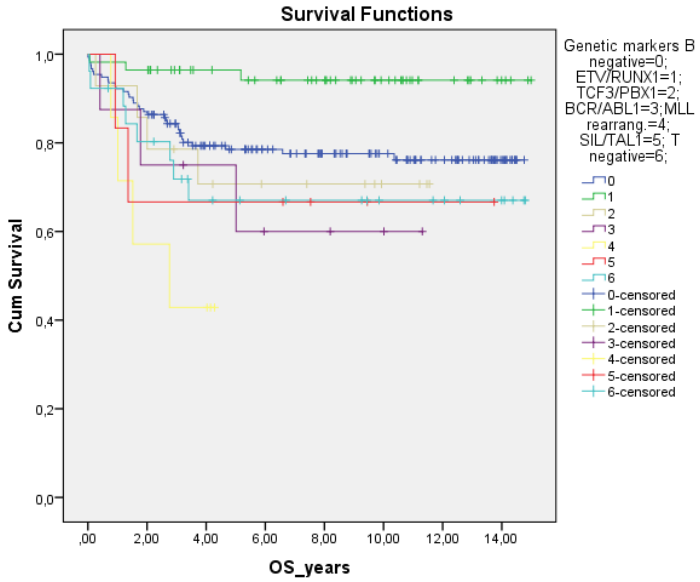
Брой пациенти	271 (100)	56 (100)	14 (100)	8 (100)	7 (2,5)	154 (100)	6 (100)	26 (100)
Отговор ден 8								
GPR	220(81)	52(93)	8 (57)	5 (63)	4 (57)	141(92)	3(50)	19(73)
PPR	51(19)	4 (7)	6 (43)	3 (37)	3 (43)	13(8)	3(50)	7(27)
***p*¹**		*>0,05*	*<0,05*	*<0,05*	*<0,05*		*<0,05*	
BFM рискови групи								
SR	44(16)	13(23)	2(14)	0	0	29(19)	0	0
MR	157(58)	36(64)	6(43)	0	0	93(60)	3(50)	19(73)
HR	70(26)	7(13)	6(43)	8(100)	7(100)	32(21)	3(50)	7(27)
***p*¹**		*>0,05*	*<0,05*	*<0,05*	*<0,05*		*<0,05*	
Ден 33 (ремисия)								
Да	264(96)	55(98)	13(93)	8(100)	6(86)	148(96)	5(83)	24 (92)
Не	12(4)²	1 (2)[3]	1(7)	0	1(14)	6(4)[4]	1(17)	2 (8)[5]
***p*¹**		*>0,05*	*>0,05*	*>0,05*	*>0,05*		*>0,05*	

¹- всяка генетична подгрупа е сранена с групата без молекулярен маркер от същия имунофенотип; ²- в т.ч. 7 случая на ранна смърт в хода на индукция; [3] - в т.ч.1 случай на ранна смърт; [4] - в т.ч. 4 случая на ранна смърт; [5]- в т.ч. 2 случая на ранна смърт

3.1.2. Посредством еднофакторен анализ в зависимост от факторите: наличие на генетичен фактор, пол, имунофенотип, възрастови групи по критериите на NCI, начални левкоцити в диапазони по критериите на NCI, рискови групи по критериите на NCI, възрастови групи по критериите на BFM, начални левкоцити в диапазони по критериите на BFM, рискови групи по критериите на BFM, отговор към лечение на ден 8, ден 15 и ден 33, идентифицирахме фактори, които имат отношение към прогнозата.

Поради сходство на кривите и еднозначно установена прогностична значимост за OS и EFS се показват само криви за OS.

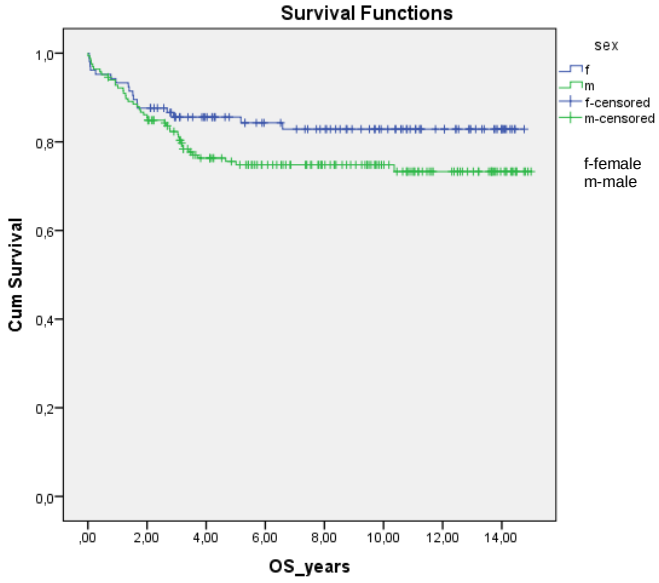
Установено бе, че съществува статистически значима разлика (*p < 0,004)* в преживяемостта на отделните генетични подгрупи в зависимост от наличието на молекулярни аномалии (*ETV6-RUNX1, TCF3-PBX1,BCR-ABL1, MLL-peap., SIL-TAL1*) (фиг.10).



OS (5-год.)
0 – 78,5 ± 0,034
1 – 96,4 ± 0,025
2 – 70,7 ± 0,124
3 – 60,0 ± 0,182
4 – 42,9 ± 0,187
5 – 66,7 ± 0,192
6 – 67,0 ± 0,096
p < 0,004

Фигура 10 . OS (5-год.) на отделните генетични подгрупи

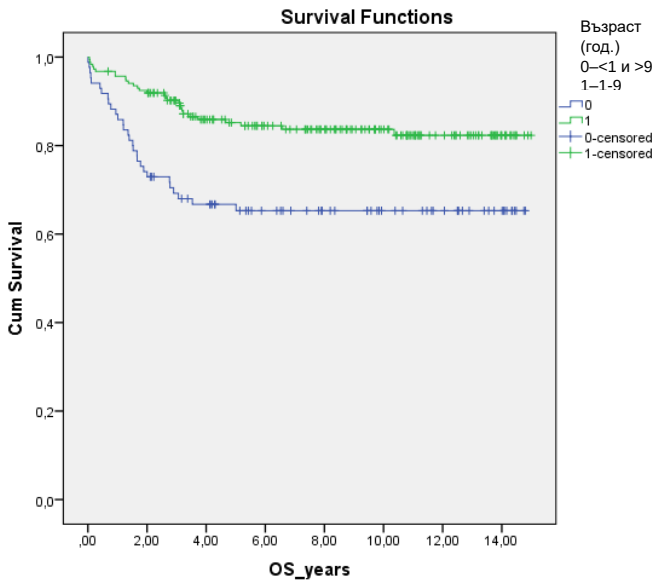
Не се намери статистически значима зависимост между OS и пола (*p<0,118)* (фиг. 11)



OS (5-год.)
f – 85,6 ± 0,034
m – 75,6 ± 0,034
p < 0,118

Фигура 11. OS (5-год.) по групи, разделени по пол

Статистически значима разлика (*p < 0,001)* се установи между OS и възрастта (фиг.12).



OS (5-год.)

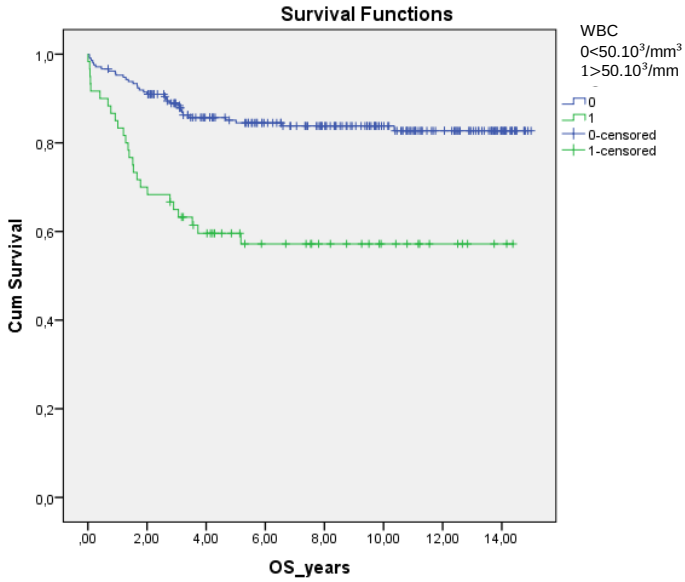
0 – 66,7 ± 0,052

1 – 85,2 ± 0,027

p < 0,001

Фигура 12 . OS (5-год.) по възрастови групи (NCI)

За нашата група пациенти, се потвърди, че класическият критерий начален левкоцитен брой (по NCI) има отношение към преживяемостта (*p < 0,001)*(фиг.13)



OS (5-год.)

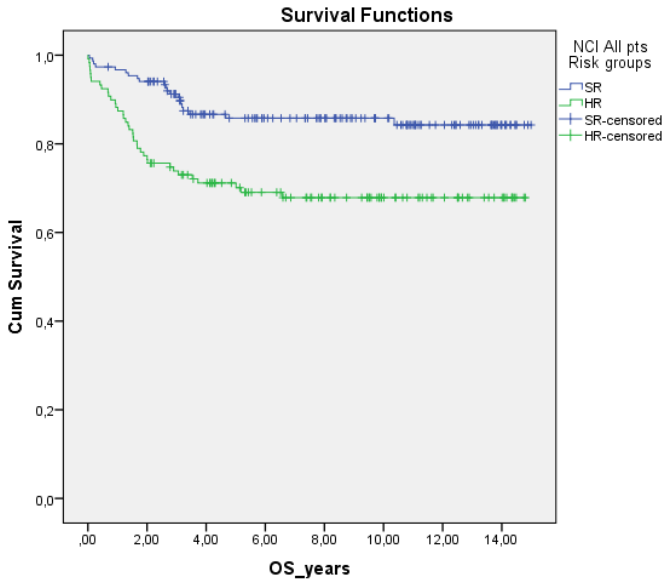
0 – 85,1 ± 0,025

1 – 59,6 ± 0,064

p < 0,001

Фигура 13. OS (5-год.) по групи според начален левкоцитен брой (NCI)

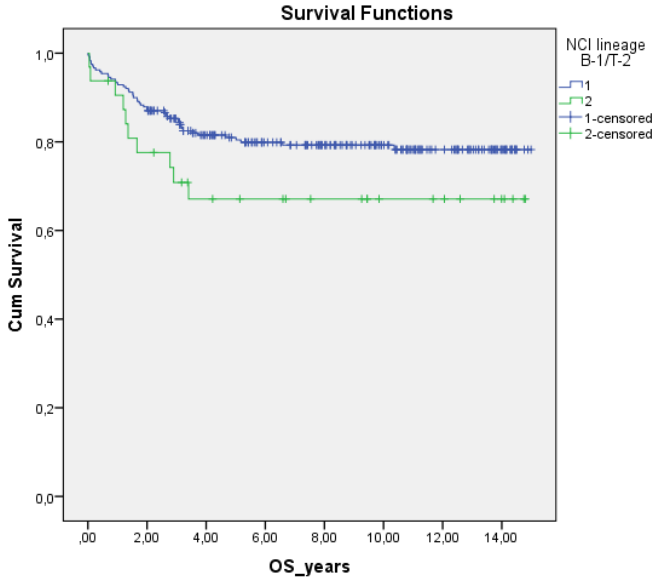
Установи се статистически значима разлика в преживяемостта (*p< 0,001)* в зависимост от рисковата група по NCI (фиг.14).



OS (5-год.)
SR – 85,8 ± 0,030
HR – 71,2 ± 0,042
p < 0,001

Фигура 14 . OS (5-год.) по рискови групи (NCI)

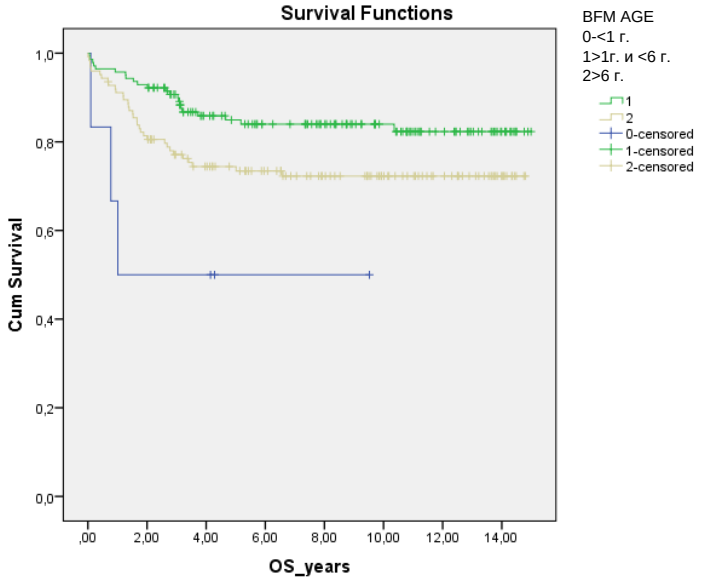
При сравняване на преживяемостта според имунофенотипа (B- или T-лимфобластен), не се намери статистически значима разлика *(p< 0,108)* (фиг.15). Въпреки това, трябва да се отбележи, че разликата не е пренебрежима.



OS (5-год.)
1 – 81,0 ± 0,026
2 – 67,1 ± 0,086
p < 0,108

Фигура 15. OS (5-год.) по групи според имунофенотип

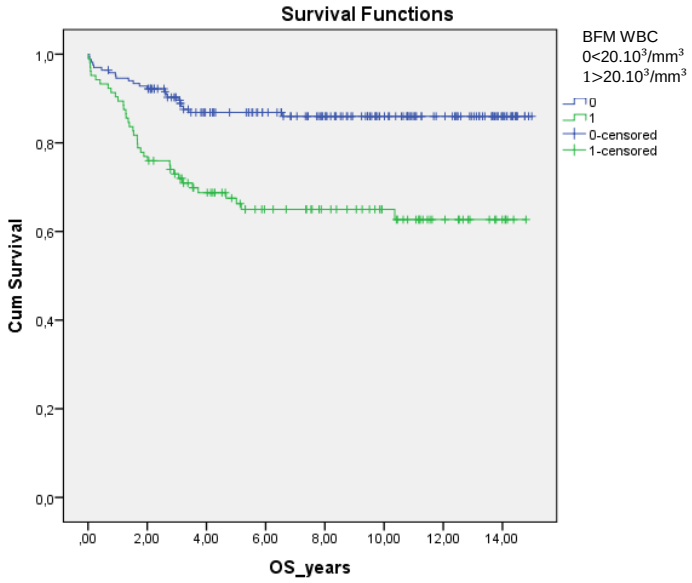
Възрастта, дефинирана и по критериите на BFM, отново е фактор, повлияващ значимо (*p < 0,006)* вероятността за преживяемост (фиг.16).



OS (5-год.)
0 – 50,0 ± 0,204
1 – 84,9 ± 0,031
2 – 74,4 ± 0,040
p < 0,006

Фигура 16 . OS (5-год.) по възрастови групи (по BFM)

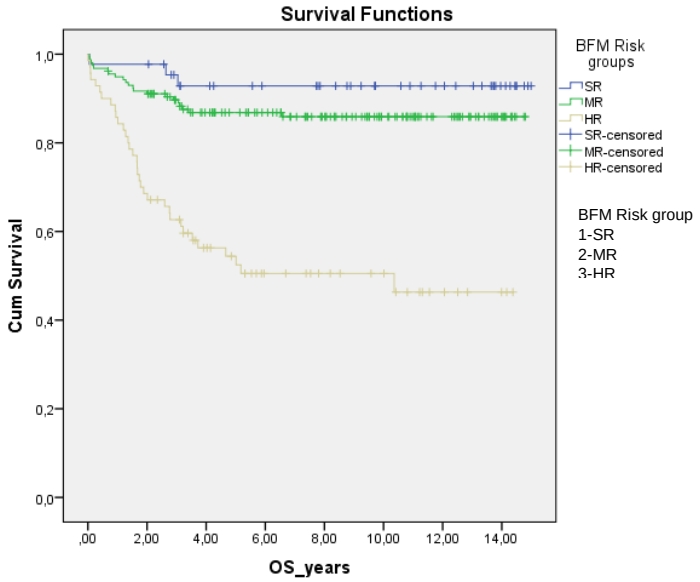
Отново се установи статистически значима разлика (*p< 0,001)* при изследване на зависимостта между преживяемостта и началния левкоцитния брой, но по BFM критерии (фиг.17).



OS (5-год.)
0 – 86,9 ± 0,027
1 – 67,5 ± 0,047
p < 0,001

Фигура 17. OS (5-год.) по групи според начален левкоцитен брой (по BFM)

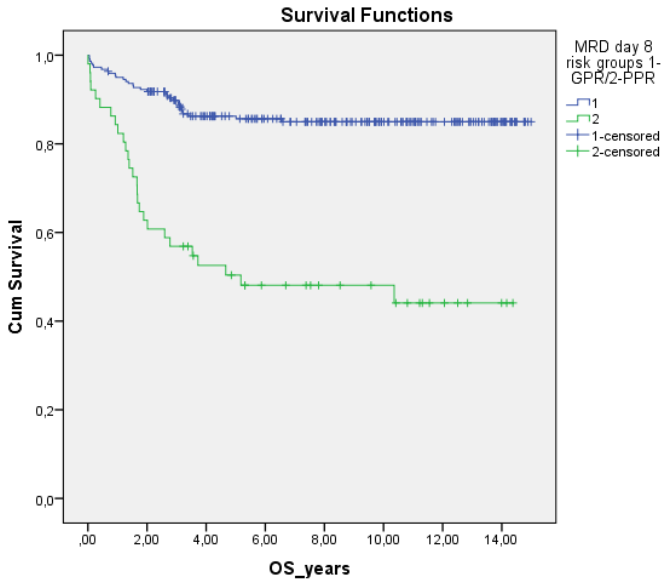
Установи се, че зависимостта на преживяемостта от рисковата група по BFM критерии е статистически значима (*p< 0,001)* (фиг.18).



OS (5-год.)
1 – 92,8 ± 0,040
2 – 86,8 ± 0,028
3 – 54,5 ± 0,61
p < 0,001

Фигура 18. OS (5-год.) по рискови групи (по BFM)

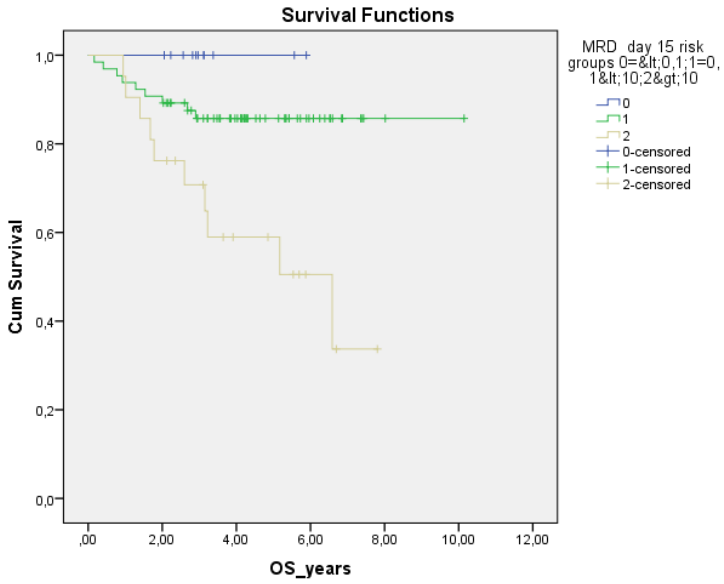
При изследване за зависимостта на преживяемостта от отговора на терапия на ден 8 се установи статистически значима разлика (*p< 0,001)* между двете групи (фиг.19).



OS (5-год.)
1 – 86,2 ± 0,026
2 – 50,4 ± 0,071
p < 0,001

Фигура 19. OS (5-год.) според отговор на ден 8

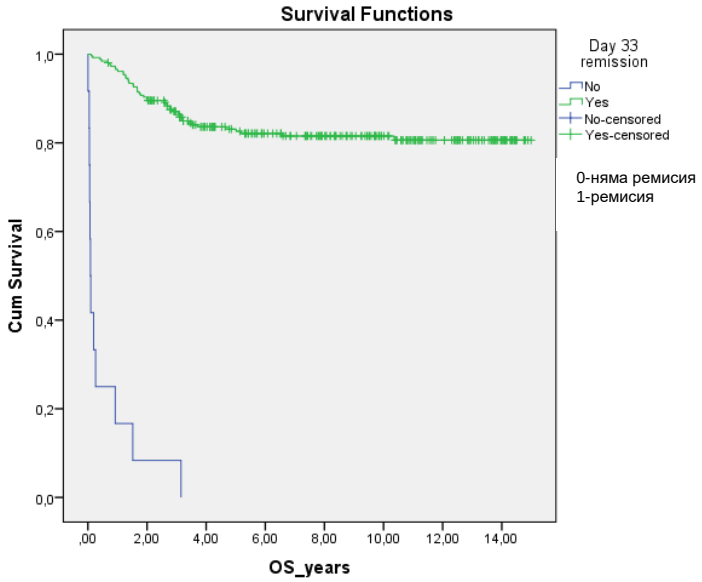
Статистически значима е зависимостта (*p<0,002)* на преживяемостта и от отговора на терапия на ден 15 (фиг.20)



OS (5-год.)
0 – 100,0 ± 0,000
1 – 85,7 ± 0,044
2 – 59,0 ± 0,113
p < 0,002

Фигура 20. OS (5-год.) според отговор на ден 15

Потвърди се очакването за значима зависимост (*p< 0,001*) на преживяемостта от постигането на ремисия на ден 33 (фиг.21).



OS (5-год.)
0 – 00,0 ± 0,000
1 – 83,1 ± 0,024
p < 0,001

Фигура 21. OS (5-год.) според отговор на ден 33

3.1.3. За да проверим дали наличието на генетичен фактор е в зависимост от останалите рискови фактори извършихме дисперсионен анализ (табл.20)

Таблица 20. Дисперсионен анализ по метода на Kruskal - Wallis

	Възраст при диагноза	**WBC при диагноза**	**NCI рискови групи**	**BFM рискови групи**	**MRD Ден 8**	**Имунофенотип**
Chi-Square	33,851	38,31016	47,979	40,018	20,302	270,000
df*	6	6	6	6	6	6
Asymp. Sig.	,000	,000	,000	,000	,002	,000

*****Групираща вариабилна: генетичен маркер – *BCP-*други*=0, ETV6-RUNX1=1; TCF3-PBX1=2; BCR-ABL1=3; MLL-rearrang.=4; SIL-TAL1=5; T-* други *=6;*

3.2. От проведените анализи по генетични подгрупи получихме следните резултати:

- ✓ *ETV6-RUNX1(+)* ОЛЛ

Средната продължителност на наблюдение на групата с аномалията е 98 месеца, а на групата BCP-други – 89 месеца.

Ранен отговор на лечение е отчетен като:

1) отговор към преднизолон на ден 8 – 52 деца (93%) с GPR при групата с маркер срещу 141 деца (92%) от групата без маркер, което не представлява статистически значима разлика;

2) постигната ремисия на ден 33 - отчетен е при 100% от пациентите с *ETV6-RUNX1(+)* ОЛЛ (55 случаи, една ранна смърт) Резултатът не се различава статистически значимо от групата без маркер – 148 ремисии (96% от случаите) (табл.21).

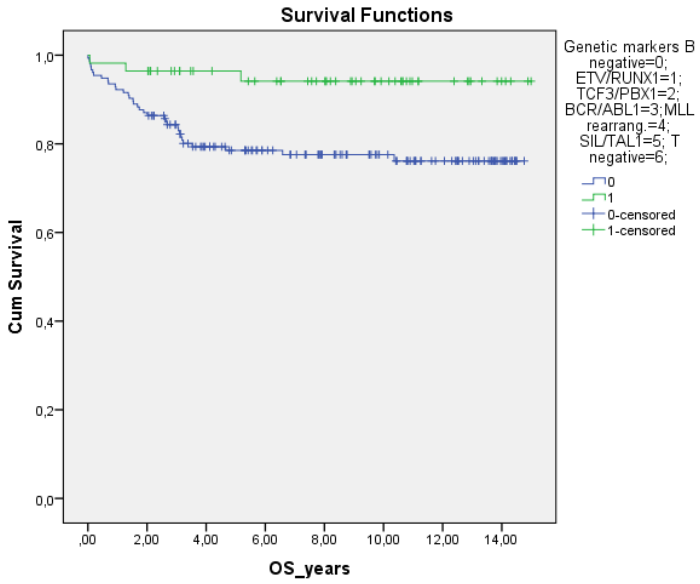
Вероятността за 5-годишна OS на *ETV6-RUNX1(+)* ОЛЛ е 96,4 ± 0,03, сигнификантно по-висока (*p<0,001),* в сравнение с тази при BCP-ОЛЛ (78,5 ± 0,03). Същото се отнася и за EFS (90,1 ± 0,04 с/у 71,6 ± 0,04, *p=0,007*) (фиг.22 и 23). 5-годишната кумулативна честота за събитие се изчислява на 8,9% при групата с маркер, за разлика от групата без маркер, където е 27,9%. До 24-ия месец (в хода на терапията) при първата група са отчетени 2 събития или 33% (1 рецидив и 1 ранна смърт), а при втората – 26 събития или 57% (4 случая на ранна смърт и 22 рецидива). На 40-и месец, при пациентите с маркер, настъпилите събития са 3 (50%), от които 2 рецидива и 1 ранна смърт, докато при негативните за маркер достигат 42 (91%), от които рецидивите са 38, а останалите са случаи на ранна смърт.

Различна е продължителността за настъпване на рецидив при двете групи, като при BCP-други е 25 месеца, а при пациентите с маркер – 41 месеца. Всички рецидиви при *ETV6-RUNX1(+)* пациенти са лекувани с противорецидивно лечение, включващо и КМТ. Два рецидива са завършили фатално, а при един от останалите е отчетен следващ рецидив и нова продължителна ремисия. В табл. 21 са представени данните за пациентите с рецидив от всички групи.

Таблица 21. Характеристики на пациентите с рецидиви по генетични подгрупи

Променлива	***ETV6-RUNX1*(+) пациенти**	***TCF3-PBX1* (+) пациенти**	***BCR-ABL1*(+) пациенти**	***MLL-реаранж* (+) пациенти**	**BCP-други**	***SIL-TAL1(+)* пациенти**	***SIL-TAL1(-)* пациенти**
Брой пациенти с рецидив N (%)	5 (100)	6 (100)	3 (100)	4 (100)	42(100)	2 (100)	8 (100)
Пол N (%) **Момчета** **момичета**	 3 (60) 2 (40)	 4 (66) 2 (33)	 3 (100) 0 (0)	 2 (50) 2 (50)	 30 (71) 12 (29)	 2 (100) 0 (0)	 7 (88) 1 (12)
Възраст (при диагноза) **<1 година** **1-6 години** **> 6 години**	 0 4 (80) 1 (20)	 0 (0) 3 (50) 3 (50)	 0 (0) 0 (0) 3 (100)	 3 (75) 0 (0) 1 (25)	 1 (2) 24 (57) 17 (40)	 0 (0) 0 (0) 2 (100)	 0 (0) 1 (12) 7 (88)

Продължителност на ремисия							
< 24 мес.	1 (20)	6 (100)	1 (33)	3 (75)	22 (52)	2 (100)	7 (88)
24–36 мес.	1 (20)	0 (0)	0 (0)	1 (1)	13 (31)	0 (0)	0 (0)
> 36 мес.	3 (60)	0 (0)	2 67)	0 (0)	7 (16)	0 (0)	1(12)
Рискова група (при диагноза) N (%)							
SR	2 (40)	1 (17)	0 (0)	0 (0)	4 (14)	0 (0)	0 (0)
MR	2 (40)	2 (33)	0 (0)	0 (0)	21 (46)	0 (0)	6 (75)
HR	1 (20)	3 (50)	3 (100)	4 (100)	17 (40)	2 (100)	2 (25)
Прогноза (живи) N (%)							
Да	3 (60)	1 (17)	1 (33)	0 (0)	12 (29)	0 (0)	3 (38)
Не	2 (40)	5 (83)	2 (67)	4 (100)	30 (71)	2 (100)	5 (62)
Вид на рецидива							
КМ	2	3 (50)	2 (67)	2 (50)	36 (86)	2 (100)	1 (12)
Екстрамедул.	0	1 (17)	0 (0)	0 (0)	2 (5)	0 (0)	3 (38)
Комбиниран	3	2 (33)	1 (33)	2 (50)	4 (10)	0 (0)	4 (50)



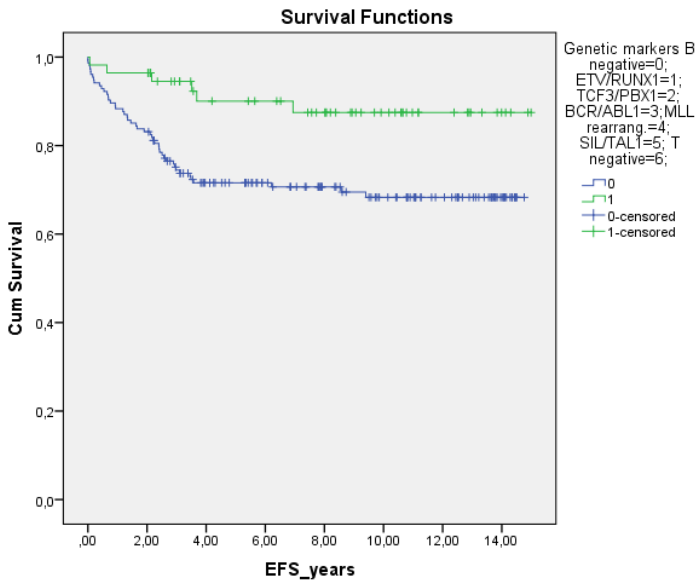
OS (5-год.)

0 – 78,5 ± 0,034

1 – 96,4 ± 0,025

p < 0,001

Фигура 22. Сравнителен анализ на OS между *ETV6-RUNX1*(+) (гр.1) и BCP-други (гр.0)



EFS (5-год.)

0 – 71,6 ± 0,037

1 – 90,1 ± 0,043

p = 0,007

Фигура 23. Сравнителен анализ на EFS между *ETV6-RUNX1*(+)(гр.1) и BCP-други (гр.0)

За изследване на стойността на молекулярния маркер като фактор със самостоятелна (независима) прогностична стойност за преживяемостта (OS) се извърши мултивариационен анализ (Proportional hazard (Cox) regression). Наличието на *ETV6-RUNX1* се проявява като добър прогностичен фактор (коефициент *Beta* с отрицателен знак) със независима стойност (*p=0,008*), за разлика от възрастта, също с независима стойност, но с негативно прогностично значение (коефициент *Beta* – с положителен знак). Данните са представени в табл. 22.

Таблица 22. Мултивариационен анализ за *ETV6-RUNX1*(+) ОЛЛ

	Beta	***t-value***	***Wald - Statist.***	***p***	***Risk ratio***	***Risk ratio 95% lower***	***Risk ratio 95% upper***
ETV6-RUNX1+	-1,6020	-2,64889	7,016641	0,008080	0,201502	0,061589	0,65926
Възраст (години)	0,0778	-1,82250	3,321516	0,048388	0,925113	0,850825	1,00589
Левк. (x10³/ mm³)	0,0077	1,33890	1,792657	0,180612	0,992350	0,981257	1,00357
MRD ден 8	0,6523	0,94243	0,888168	0,345981	0,520821	0,134117	2,02251

BFM Risk group	0,5724	1,66226	2,763111	0,096470	1,772554	0,902562	3,48114

Chi-square = 20,4172 df = 11 p = 0,03998

✓ *TCF3-PBX1*(+) ОЛЛ

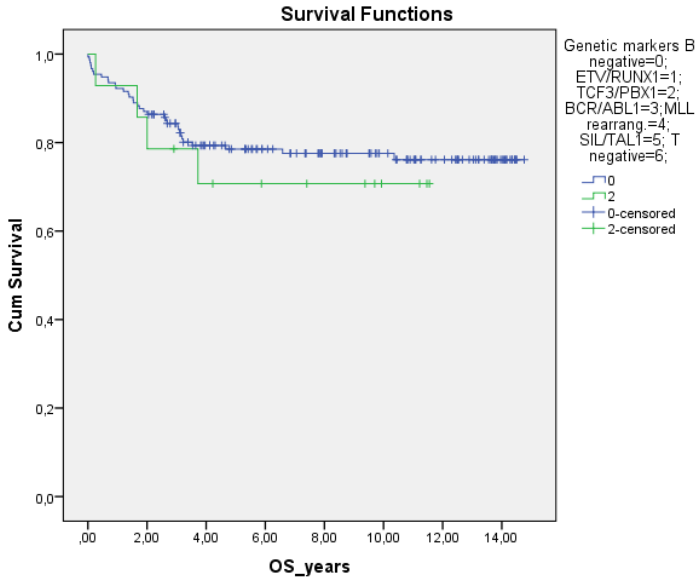
Средната продължителност на наблюдение на групата е 78 месеца.

Ранен отговор на лечение:

1) на ден 8 – значимо по-лош отговор (със статистически значима разлика) при групата с маркер - само 8 деца (57%) са с добър преднизолонов отговор (GPR) срещу 141 деца без маркер (92%).

2) на ден 33 е отчетена ремисия при 13 (93%) от пациентите - с аномалията и резултатът не се различава статистически значимо от процентът ремисии в групата без маркер – 148 пациенти (96%) (табл. 21).

Вероятността за 5-годишна OS на *TCF3-PBX1(+)* ОЛЛ е 70,7 ± 0,12 като не се различава сигнификантно (*p=0,592)* от тази на BCP-ОЛЛ, съответно 78,5 ± 0,03. Същото се отнася и за EFS (57,1 ± 0,13 с/у 71,6 ± 0,04, *p=0,227*), въпреки че разликата изглежда съществена (фиг. 24 и 25). Средното време за настъпване на рецидива е 12 месеца, т.е. всичките 6 рецидива (100%) настъпват още в хода на лечението, за разлика от групата без маркер, при която средното време за настъпване на рецидива е 25 месеца (табл. 21).



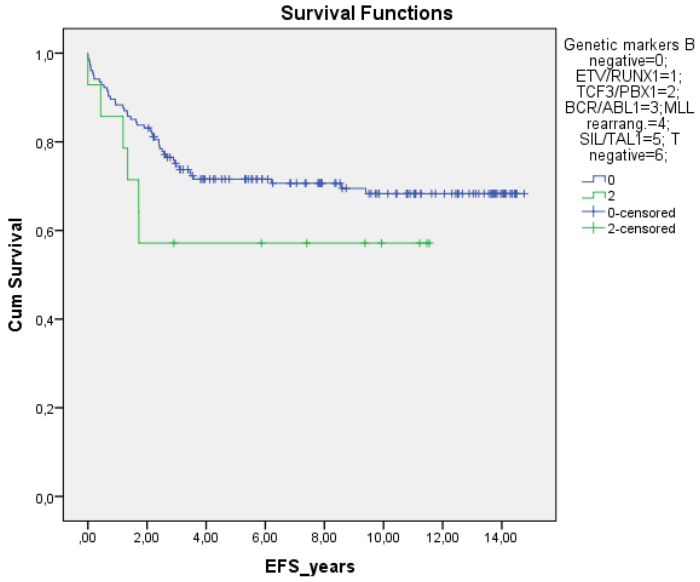
OS (5-год.)

0 – 78,5 ± 0,034

2 – 70,7 ± 0,124

p <0,592

Фигура 24. Сравнителен анализ на OS между *TCF3-PBX1(+)* (гр.2) и BCP-други (гр.0)



EFS (5-год.)

0 – 71,6 ± 0,037

2 – 57,1 ± 0,134

p =0,227

Фигура 25. Сравнителен анализ на EFS между *TCF3-PBX1(+)* (гр.2) и BCP-други (гр.0)

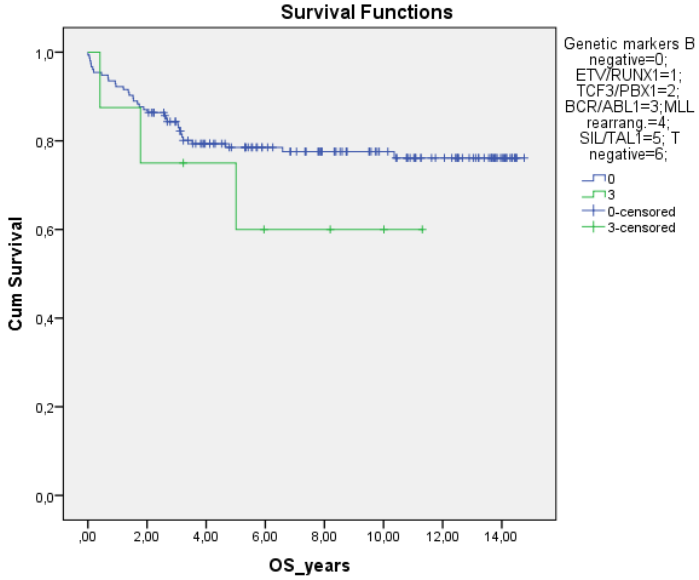
✓ *BCR-ABL1(+) ОЛЛ*

Средната продължителност на наблюдение на групата е 72 месеца.

Ранен отговор на лечение е отчетен като: 1) отговор към преднизолон на ден 8 – 5 деца (63%) с GPR при групата с маркер срещу 141 деца (92%) от групата без маркер, което представлява статистически значима разлика; 2) постигната ремисия на ден 33 - за групата с аномалията е отчетен при 100% от пациентите,

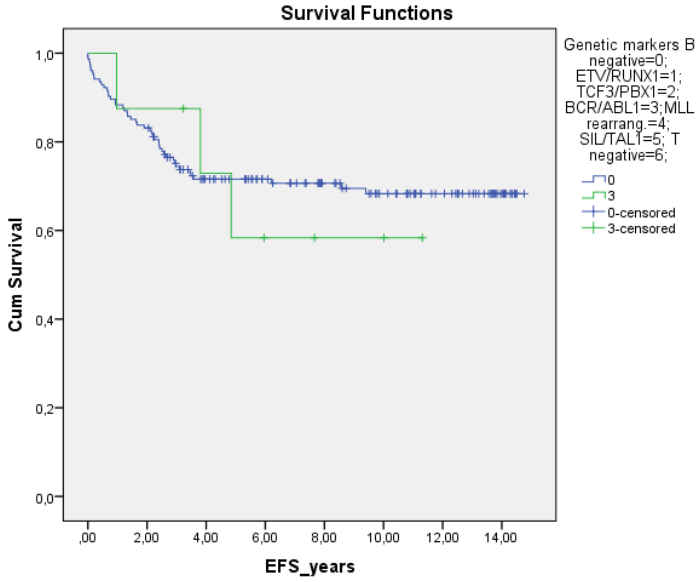
поради което не се различава значимо статистически от групата без маркер – 148 или 96%от случаите (табл. 21).

Вероятността за 5-годишна OS на *BCR-ABL1*(+) ОЛЛ е 75,0 ± 0,18 като не се различава сигнификантно (*p=0,323*) от тази на ВСР-ОЛЛ, съответно 78,5 ± 0,03. Същото се отнася и за EFS (58,3 ± 0,19 с/у 71,6±0,04, p=0,227) (фиг. 26 и 27). Кумулативният риск от рецидив до 5-та година е 38%, като средното време за настъпване е 38 месеца. Фатално са завършили два рецидива, при третия е постигната втора ремисия.



OS (5-год.)
0 – 78,5 ± 0,034
3 – 75,0 ± 0,182
p = 0,323

Фигура 26. Сравнителен анализ на OS между *BCR-ABL1(+)* (гр.3) и ВСР-други (гр.0)



EFS (5-год.)
0 – 71,6 ± 0,037
3 – 58,3 ± 0,186
p = 0,779

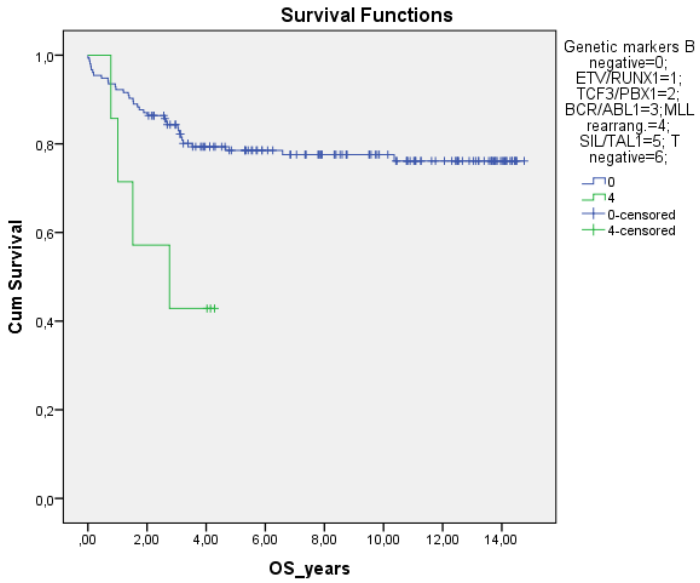
Фигура 27. Сравнителен анализ на EFS между *BCR-ABL1(+)* (гр.3) и ВСР-други (гр.0)

✓ *MLL-rearrangement*

Средната продължителност на наблюдение на групата е 27 месеца.

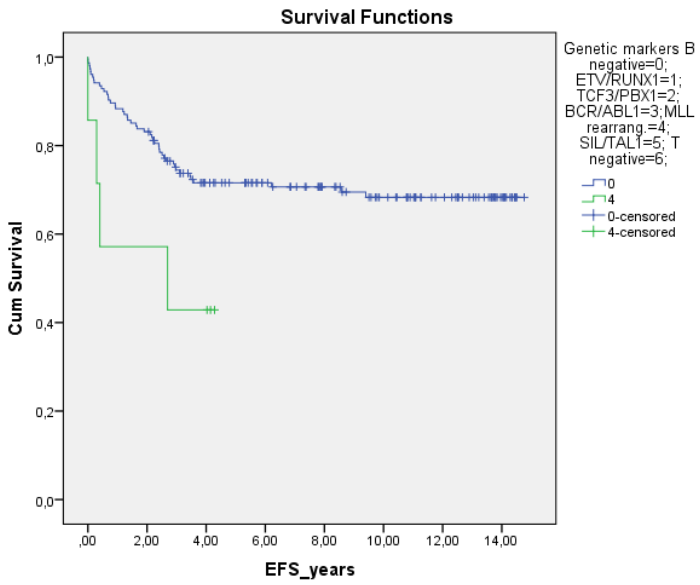
Ранен отговор на лечение е отчетен като: 1) отговор към преднизолон на ден 8 – 4 деца (57%) с GPR при групата с маркер срещу 141 деца (92%) от групата без маркер, което представлява статистически значима разлика; 2) постигната ремисия на ден 33 - за групата с аномалията е отчетен при 6 деца (86%) от пациентите, поради което не се различава значимо статистически от групата без маркер – 148 или 96% от случаите (табл. 21).

Вероятността за 5-годишна OS при *MLL-реар.* ОЛЛ е 42,9 ± 0,19, сигнификантно различна (*p<0,011*) от тази на BCP-ОЛЛ, съответно 78,5 ± 0,03. Същото се отнася и EFS (42,9 ± 0,19 с/у 71,6 ± 0,04, p=0,227) (фиг. 28 и 29). За групата са характерни изключително ранните рецидиви (преди 6-ия месец от лечението при 2 от случаите, както и непостигане на ремисия при 1 от случаите). Всички рецидиви са завършили фатално.



OS (5-год.)
0 – 78,5 ± 0,034
4 – 42,9 ± 0,187
p <0,011

Фигура 28. Сравнителен анализ на OS между *MLL-реар.* (гр.4) и BCP-други (гр.0)



EFS (3-год.)
0 – 71,6 ± 0,037
4 – 42,9 ± 0,187
p <0,039

Фигура 29. Сравнителен анализ на EFS между *MLL-реар.* (гр.4) и BCP-други (гр.0)

✓ *SIL-TAL1(+)* ОЛЛ

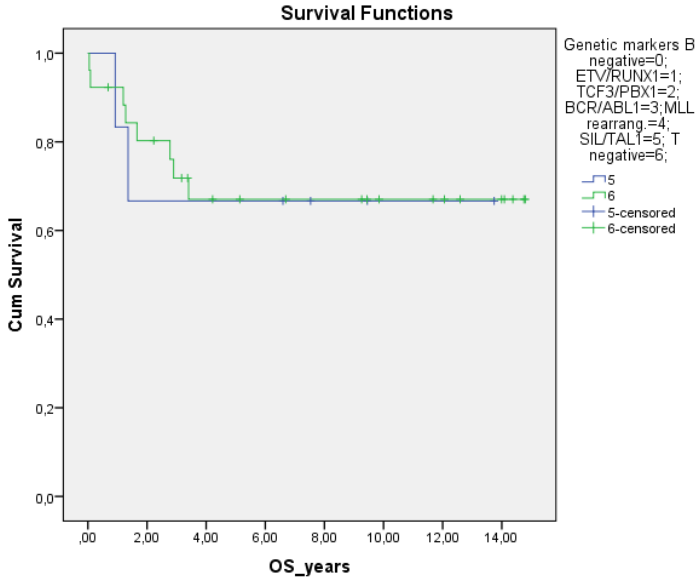
Средната продължителност на наблюдение на групата с маркер е 79 месеца, а на групата без маркер – 81 месеца.

Ранен отговор на лечение е отчетен като: 1) отговор към преднизолон на ден 8 – 3 деца (50%) с GPR при групата с маркер срещу 19 деца (73%) от групата без маркер, което представлява статистически значима разлика; 2) постигната ремисия на ден 33 - за групата с аномалията е отчетен при 5 пациенти (83%), поради което не се различава статистически значимо от групата без маркер – 24 или 92% от случаите (табл. 21).

Вероятността за 5-годишна OS при *SIL-TAL1(+)* ОЛЛ е 66,7 ± 0,19 и е идентична с тази при *SIL-TAL1(-)* ОЛЛ - 67,0 ± 0,1 (*p<0,916*) . Същото се отнася и за EFS (66,7 ± 0,19 с/у 60,4 ± 0,04, *p=0,72*) (фиг. 30 и 31).

Рецидиви (2 случая) от групата с положителен маркер са ранни (преди 18-ти месец от диагнозата), костно-мозъчни и имат лоша прогноза. При другата група ранните събития са 4, от които 2 случая на ранна смърт и 2 случая на рецидив, което представлява 22% от всички рецидиви в тази група. Очертава се характерно за групата екстрамедуларно ангажиране (при 7 или 88% от случаите),

както и сравнително по-добрата крайна прогноза, без разликата да е статистически значима.



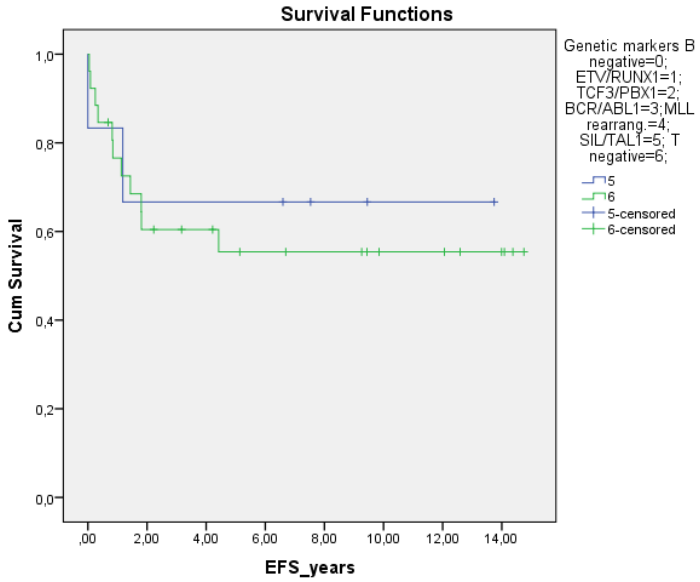
OS (5-год.)

5 – 66,7 ± 0,192

6 – 67,0 ± 0,096

p = 0,916

Фигура 30. Сравнителен анализ на OS между *SIL-TAL1(+)* (гр.5) и Т-други (гр.6)



EFS (3-год.)

5 – 66,7 ± 0,192

6 – 60,4 ± 0,098

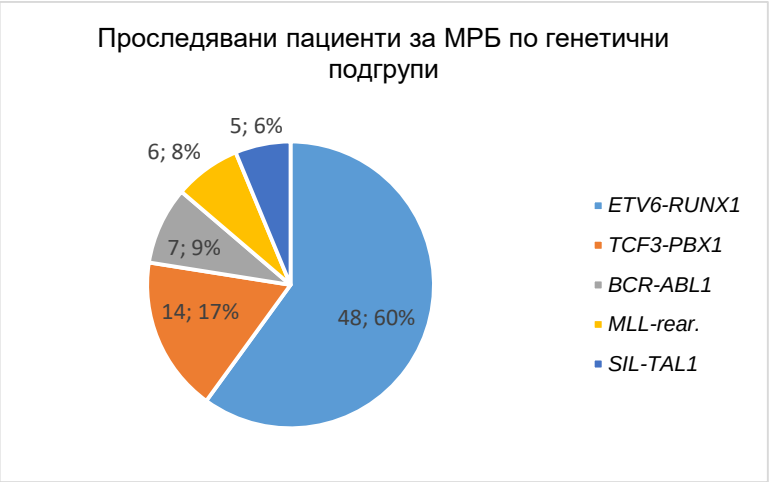
p = 0,721

Фигура 31. Сравнителен анализ на EFS между *SIL-TAL1(+)* (гр.5) и Т-други (гр.6)

Малкият размер на всички генетични подгрупи с изключение на *ETV6-RUNX1*(+) ОЛЛ не позволи коректно провеждане на мултивариационен анализ.

4. Резултати от проследяване на нивото на МРБ чрез RT-PCR

В нашето проучване за мониториране на МРБ бяха използвани нивата на експресия на установените при диагнозата фузионни гени на различни етапи в хода на терапията. Проследявани са общо 80 пациента от всички 91 (88%) с диагностицирани генетични аномалии, с разпределение по генетични подгрупи, показано на фиг. 32.



Фигура 32. Дял на проследяваните за МРБ пациенти по генетични подгрупи

Количествената оценка на мониторираните нива на експресия на фузионните гени е адаптирана чрез скала, както следва:

3.1.4. на I-ви етап амплификация - положителна (+) реакция, съответстваща на повече от 1.10^{-2} или >1% положителни клетки;

3.1.5. на I-ви етап амплификация слабо положителна и II-ри етап реамплификация положителна реакция, съответстващи на приблизително 1.10^{-2} до 1.10^{-3} или <1 - 0,1% положителни клетки;

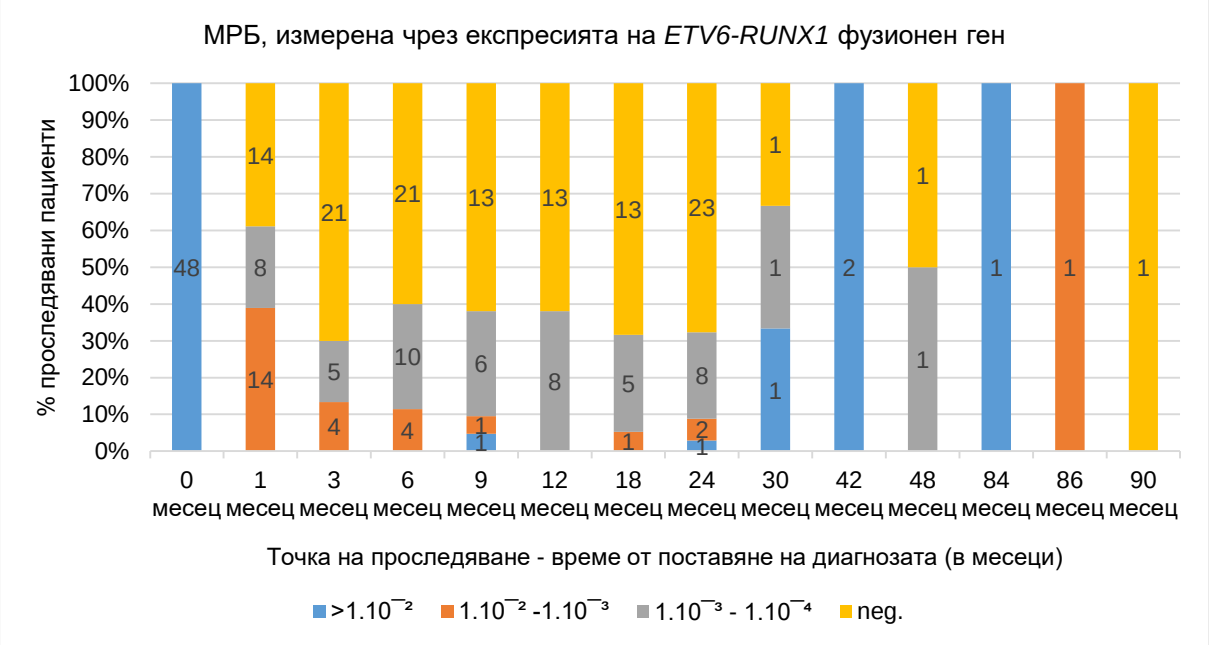
3.1.6. на II-ри етап реамплификация - слабо положителна реакция, съответстваща приблизително на 1.10^{-3} до 1.10^{-4} или <0,1 - 0,01% положителни клетки;

3.1.7. на II-ри етап реамплификация - отрицателна реакция, съответстваща на $<1.10^{-4}$ или не се откриват положителни клетки;

Според нивата на МРБ, измерени чрез полуколичествен анализ на установената експресия на фузионните гени, пациентите се стратифицираха в четири групи: пациенти с нива на МРБ над 1.10^{-2}; пациенти с нива на МРБ под 1.10^{-2} и над 1.10^{-3}; пациенти с нива на МРБ под 1.10^{-3} и над 1.10^{-4}; пациенти с негативирана МРБ (молекулярна ремисия).

- ✓ *ETV6-RUNX1 (+)* ОЛЛ

За целия период на наблюдение, нивото на МРБ е измерено чрез експресията на фузионния ген с RT-PCR, при 48 пациента (86%) от диагностицираните 56 с *ETV6-RUNX1(+)* ОЛЛ. В края на индукционната фаза (1 месец) МРБ е оценена при 36 от 48 проследявани пациенти (75%), преди консолидацията (3 месец) при 30 (63%), след консолидация (6 месец) – при 35 (73%), преди поддържащо лечение (9 месец) – при 21 (44%), по време на поддържащо лечение: на 12 месец - при 21 деца (44%), на 18 месец - при 19 (40%), в края на терапията (24-ти месец) - при 34 (71%). Допълнително са оценени данните при пациентите с настъпил рецидив. Съответните нива са представени на фиг. 33.



Фигура 33. МРБ при групата с *ETV-RUNX1* фузионен ген

След края на индукционната фаза (1 месец, ден 33) пълно негативиране на МРБ се установява при 14 пациенти (39%), нива на МРБ под 1.10^{-4} при 8 (22%), и нива на МРБ под 1.10^{-2} и над 1.10^{-3} при 14 (39%). Високи нива на МРБ не бяха установени в нито един случай. В следващата точка на проследяване (3-ти месец) – негативиране на МРБ (молекулярна ремисия) е достигнато при 21 пациенти (70%), а много ниско ниво (под 10^{-4}) при 5 случая (16%). Само при 13% от пациентите нивото на МРБ се задържа в границите под 1.10^{-2} и над 1.10^{-3}. В следващите пунктове на проследяване съотношенията между групите с различни нива на МРБ се задържат, като групите пациенти с много добър ефект от терапията - много ниско или негативно МРБ представляват 90%. Появата на случаи с високо ниво на МРБ над 1.10^{-2} на 9, 24, 42 и 84 месец от проследяването отразяват настъпването на общо 5 рецидиви - 1 много ранен, 1 ранен и 3 късни.

В случаите с настъпил рецидив, ниво на МРБ от диагнозата до рецидива е проследявано при 4 случая. В момента на отчетена ремисия 3-ма от тях са били с ниво на МРБ в диапазана на сравнително по-високите нива (под 1.10^{-2} и над 1.10^{-3}), а при 2-ма от пациентите същото високо ниво се задържа и на 6-ия месец от проследяването. Или, при 3 от 14 деца (21%) с ниво на МРБ под 1.10^{-2} и над 1.10^{-3} на ден 33 е настъпил рецидив, докато от общо 14 с негативна МРБ само при 1 (7%) пациент има рецидив.

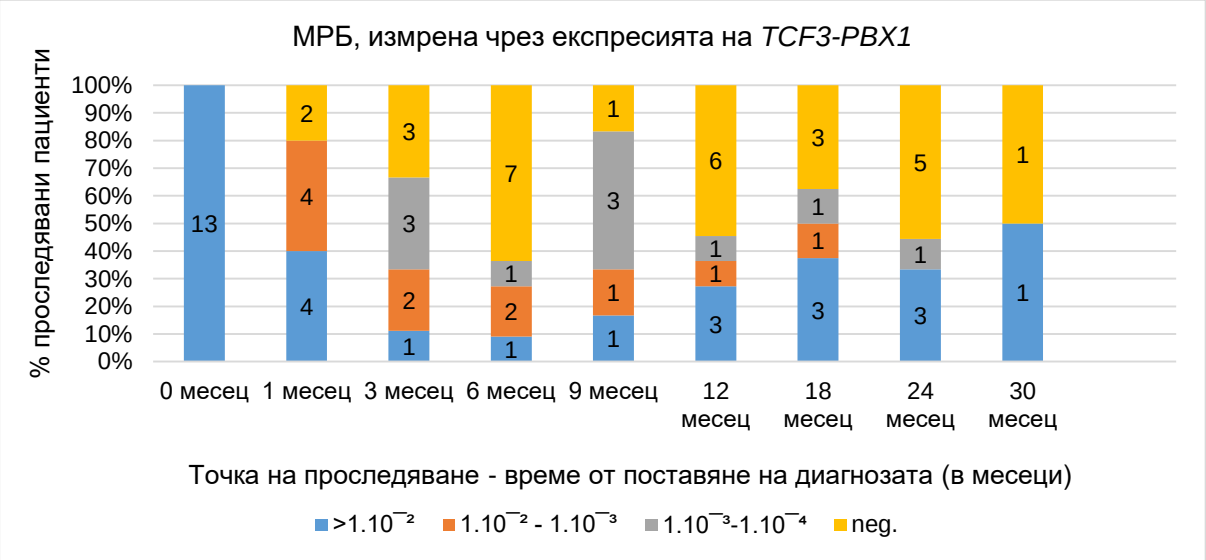
При преустановяване на терапията 23 (68%) от пацинетите са в молекулярна ремисия (МРБ негативни), 8 (24%) са са с ниски нива (под 1.10^{-4}), 2 (6%) МРБ са с относително високи (под 1.10^{-2} и над 1.10^{-3}), а при 1 пациент е регистриран рецидив при ниво над 1.10^{-2}. За периода на проучването е настъпил рецидив само при един от пациентите, чието МРБ ниво на 24-ия месец е отчетено като негативно.

При спиране на лечението (24 месец) измерима резидуална болест е установена при 11 (32%) от изследваните 34 пациенти, като при единствения пациент с високо ниво (над 1.10^{-2}) е установен настъпил рецидив. При нито едно от останалите 10 деца, с установено наличие на МРБ, не е регистриран рецидив в последвалия период на наблюдение.

✓ *TCF3-PBX1*(+) ОЛЛ

За периода на наблюдение, при диагностицираните 14 пациента с *TCF3-PBX1*(+) ОЛЛ, нивото на МРБ е проследявано при 13 (93%). Допълнително, в един случай аномалията е установена в момента на рецидива и проследяването е отчитано след 12-ия месец.

В края на 1-ия месец (индукционна фаза) нивото на МРБ е оценено при 10 от 13 проследявани случаи (77%). Преди консолидацията (3-ти месец) са проследени 9 (69%), след консолидация (6-ти месец) 11 (85%), преди поддържащо лечение (9-ти месец) 6 (46%), по време на поддържащо лечение (12-ти месец) 11 (79%), 18-ти месец 8 (57%), в края на терапията (24-ти месец) 9 (64%). Двама от пациентите са екзитирали по време на лечението (фиг. 34).



Фигура 34. МРБ при групата с *TCF3-PBX1* фузионен ген

След края на индукционната фаза пълно негативиране на МРБ се установява при 2 деца или 20% от изследваните, нива на МРБ под 1.10^{-4} не се

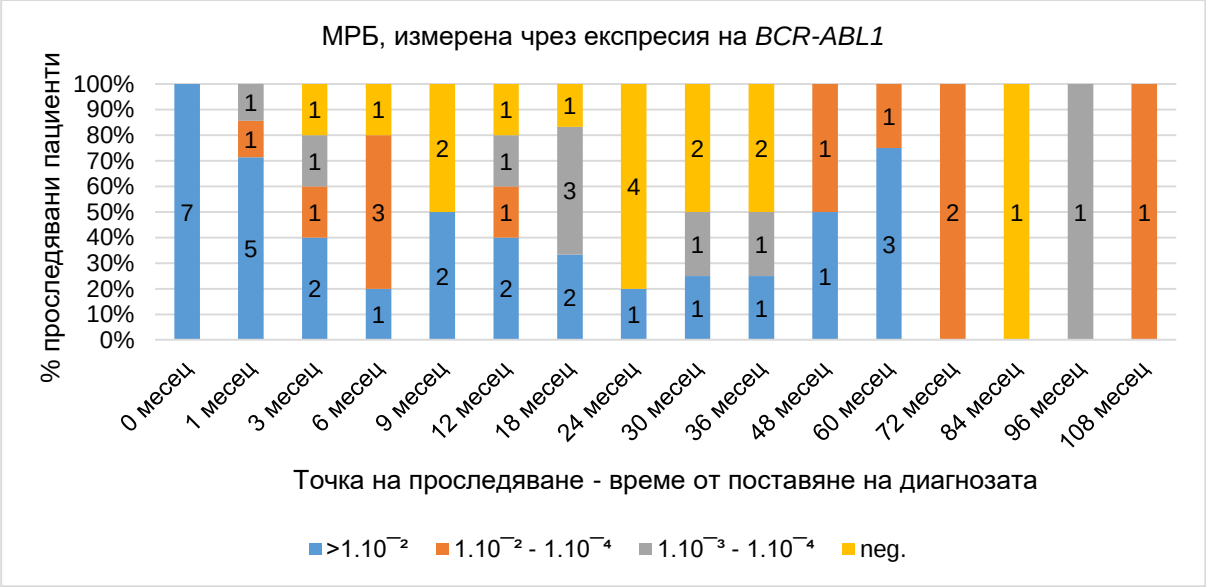
регистрира при нито един от пациентите, МРБ под 1.10^{-2} и над 1.10^{-3} - при 4 деца (40%), а при други 4 се установяват високи нива на МРБ (над 1.10^{-2}). В следващата точка на проследяване (3-ти месец) – негативиране на МРБ е достигнато при 3 пациенти (33%), много ниско ниво на МРБ (под 10^{-3}) при други 3. В 2 случая (22%) нивото се задържа в границите под 1.10^{-2} и над 1.10^{-3}, а при 1 пациент нивото е високо – над 1.10^{-2}. На 6-ти месец процентът на пациентите с негативирана МРБ е най-висок – 64% (7) пациента, един пациент е с много ниско ниво – под 1.10^{-3}, 2 пациенти (15%) имат ниво на МРБ - под 1.10^{-2} и над 1.10^{-3}, при 1 пациент се задържа над 1.10^{-2}. Важно е да се отбележи, че всички пациенти с ниво на МРБ над 1.10^{-3} (общо 3) на 6-ти месец са рецидивирали, както и единственият пациент с ниво над 1.10^{-2} на 3-ти месец, като това представлява 2/3 от рецидивиралите в тази генетична подгрупа пациенти. В следващите точки на проследяване, всички пациенти с ниво на МРБ над 1.10^{-2} са рецидив. При пациента, чиято аномалия е установена за първи път при рецидива, не е регистрирана промяна в експресията на фузионния ген в еволюция, което е израз на резистентност към противорецидивното лечение.

- ✓ *BCR-ABL1 (+)* ОЛЛ

За периода на наблюдение, при 7 пациента (88%) от диагностицираните 8 пациента с *BCR-ABL1(+)* ОЛЛ, нивото на МРБ е проследявано от момента на диагнозата през целия период на лечение, а при осмия пациент аномалията е установена в момента на рецидива – 60-ти месец от началото на заболяването.

За групата се отчитат следните тенденции: на 1-ви месец от началото на лечение (след индукционна фаза) – при 5 пациенти (71%) персистира много високо ниво на МРБ – над 1.10^{-2}. Негативиране на МРБ се установява сравнително късно и рядко, като при последващи изследвания нивото на експресия е променливо. При 1 пациент, след пълно негативиране на 9-ти месец и задържаща се молекулярна ремисия, лечението (в т.ч. TKI) е прустановено на 36 месец от началото на заболяването. При друг, с ранна молекулярна ремисия (3 месец) настъпва летален изход, в резултат на токсичност от проведената

терапия. При 2 пациенти персистира много високо ниво на МРБ (над 1.10^{-2}) без положително повлияване, и не е регистрирано значително отслабване на експресията, като при единият заболяването завършва с летален изход на 18-ти месец от началото. В другия случай, находката става основание за смяна на прилаганите TKI и за периода на наблюдение – 60 месеца - не е регистриран хематологичен рецидив . Данните от проследяването са представени на фиг.35.

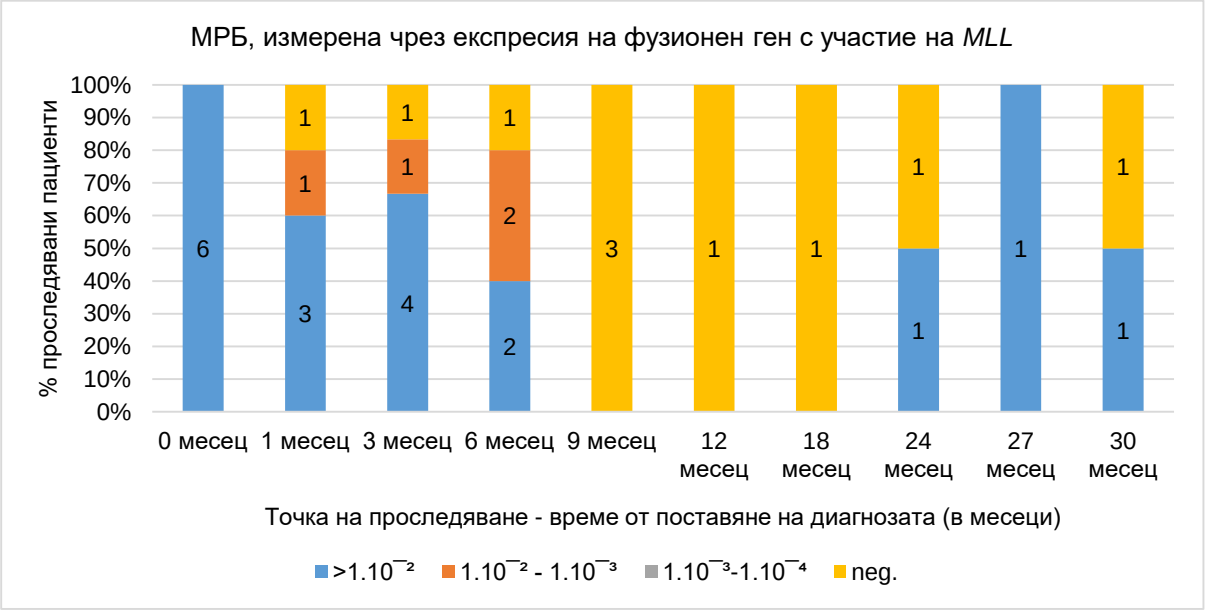


Фигура 35. МРБ при групата с *BCR-ABL1* фузионен ген

✓ *MLL – реаранжирани* ОЛЛ

За периода на наблюдение, при диагностицираните 7 пациента с *MLL* - реаранжиране, нивото на МРБ, е проследявано при 6 пациента (86%). За тази генетична подгрупа се очертава тенденция за продължително задържане (3 и 6 месеца от началото на заболяването) на високи нива на МРБ (над 1.10^{-2}), като проява на резистентност на заболяването, съответно при 4 (67%) и 2 (33%) деца. В еволюция, при 3 от тях е наблюдаван летален изход преди 12-ти месец от диагнозата. При 2 от пациентите с ниски нива на МРБ на 6-ти месец се отчита продължителна ремисия в последващия период, като при единия пациент, след първоначално негативиране на МРБ, настъпва позитивиране на реакцията, следвано от изявен хематологичен рецидив 3 месеца по-късно (27-ми месец от началото). Единственият пациент с ранно негативиране на МРБ на 1-ия месец

не е в кърмаческа възраст и остава в трайна молекулярна ремисия . Данните са представени на фиг. 36.

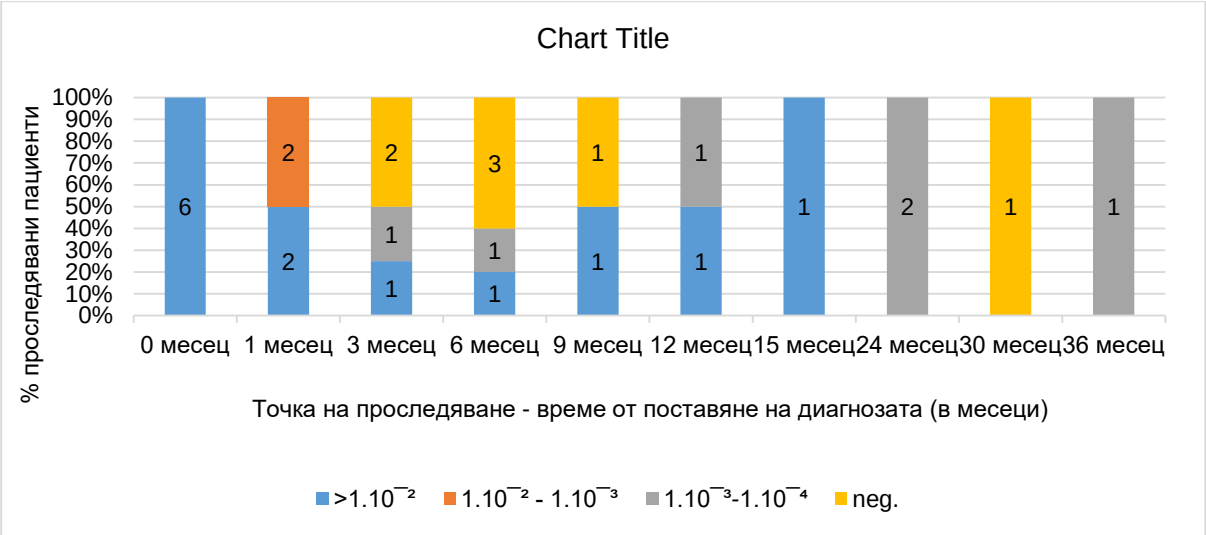


Фигура 36. МРБ при групата с *MLL-peap.*

✓ *SIL-TAL1(+)* ОЛЛ

За периода на наблюдение, при диагностицираните 6 пациента с *SIL-TAL1(+)* ОЛЛ, нивото на МРБ, е проследявано при 5 (83%) от всички. Малкият брой пациенти не позволява очертаване на тенденции. При 1 от пациентите, задържащото се високо ниво на маркера отразява състояние на персистираща бластоза, с практическа липса на терапевтичен отговор. При друг пациент, след негативиране на МРБ е отчетено ново позитивиране и хематологичен рецидив 3 месеца по-късно. Пациентите с негативирана МРБ на 3-ти и 6-ти месец остават в дълготрайна ремисия.

Данните са представени на фиг. 37.



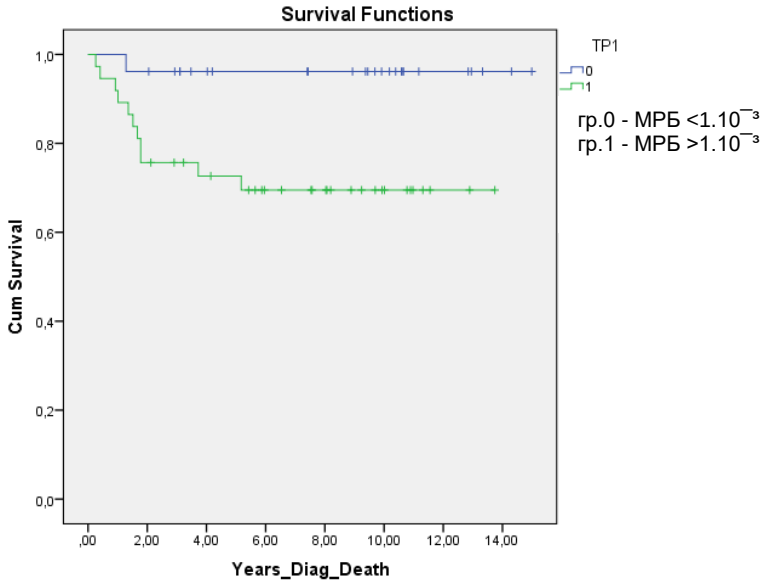
Фигура 37. МРБ при групата със *SIL-TAL1* фузионен ген

За нашата група пациенти, значението на мониторирането на МРБ, измерена чрез нивото на експресия на фузионни гени, се определи чрез еднофакторен анализ със сравняване на кривите на преживяемост общо за всички пациенти, положителни за някой от фузионни гени (*ETV6-RUNX1, TCF3-PBX1, BCR-ABL1, MLL-rear., SIL-TAL1*). За целта, пациентите бяха разпределени в две групи в зависимост от нивото на МРБ в две точки на проследяване, както следва:

- след края на индукционната терапия (или Ден 33), с измерена МРБ при общо 63 пациента, като:
  - ✓ група 0 са пациенти със слабо положителна реакция на II-ри етап реамплификация, съответстваща приблизително на положителни клетки 1.10^{-3} до 1.10^{-4} или с отрицателна реакция, съответстваща на $<1.10^{-4}$ – общо 26 пациенти (41%);
  - ✓ група 1 са всички останали пациенти с по-високи нива на МРБ – общо 37 пациенти (59%).

- след края на консолидационната фаза (или 3-ти месец), с измерена МРБ при 71 пациента, като:
  - ✓ група 0 са пациенти с отрицателна реакция, съответстваща на $<1.10^{-4}$ положителни клетки – общо 39 (55%);
  - ✓ група 1 са всички останали пациенти с по-високи нива на МРБ – общо 32 (45%) пациенти.

При сравняване на кривите на преживяемост (OS и EFS) между двете групи пациенти, в зависимост от нивото на МРБ след края на индукционната фаза, се отчете статистически значима разлика (фиг. 38 и 39).



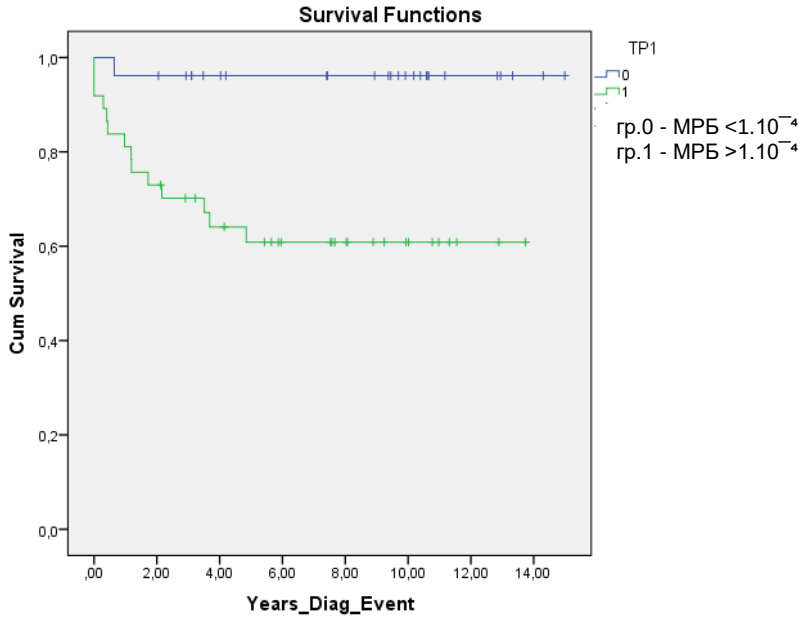
OS (5-год.)

0 – 96,2 ± 0,038

1 – 73,1 ± 0,074

p < 0,013

Фигура 38. Сравнителен анализ на OS между групите с различни нива МРБ след края на индукция (Ден 33)



EFS (5-год.)

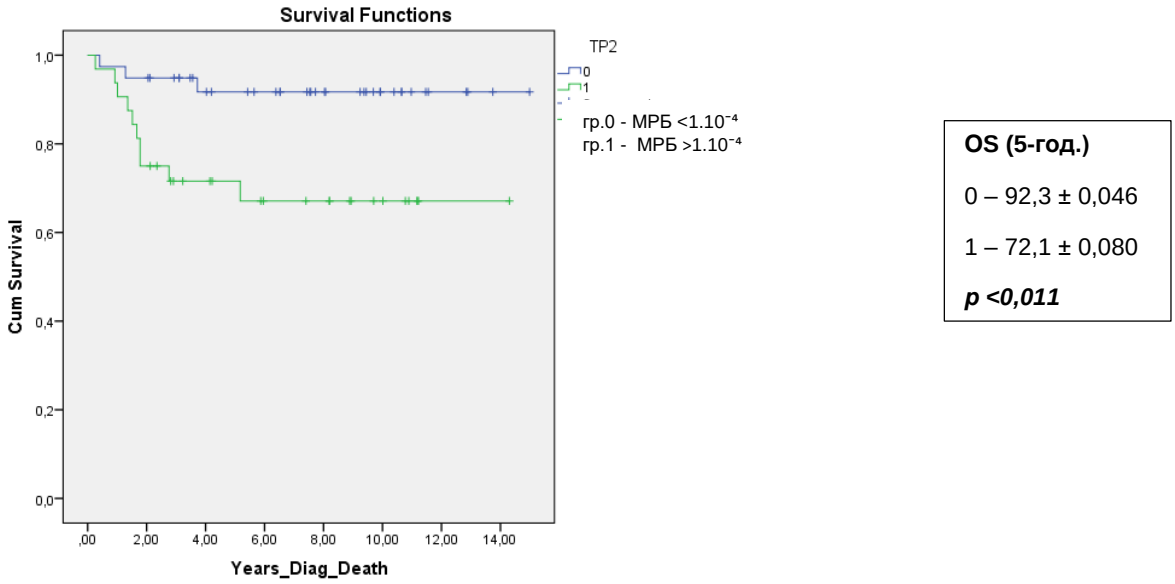
0 – 96,2 ± 0,038

1 – 61,3 ± 0,082

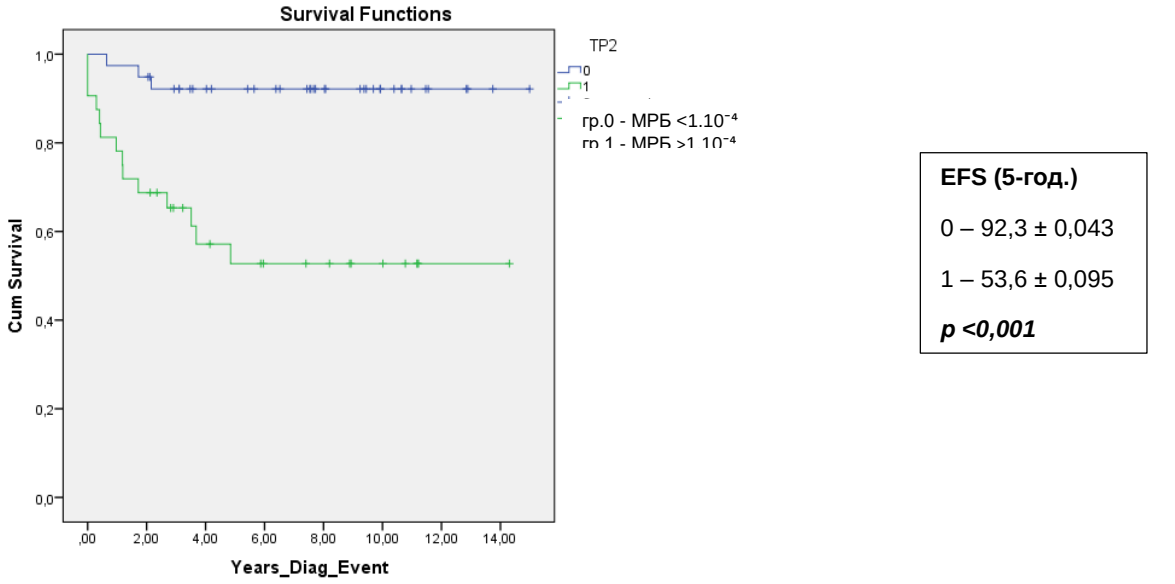
p <0,003

Фигура 39. Сравнителен анализа на EFS между групите с различни нива МРБ след края на индукция (Ден 33)

Статистически значима разлика се установи и при сравняване на кривите на преживяемост (OS и EFS) между двете групи пациенти, в зависимост от нивото на МРБ в края на консолидационната фаза (фиг.40 и 41).



Фигура 40. Сравнителен анализа на OS между групите с различни нива МРБ след края на консолидация (3-ти месец)



Фигура 41. Сравнителен анализа на EFS между групите с различни нива МРБ след края консолидация (3-ти месец)

ОБСЪЖДАНЕ

1. Резултати, отнасящи се до честотата и демографската характеристика на установените чрез RT-PCR генетични подгрупи ОЛЛ пациенти, лекувани в КДКХО – София.

1.1. Честота на генетичните подгрупи

- ✓ *ETV6-RUNX1(*+) ОЛЛ

Първото описание на криптичната за конвенционалната цитогенетика t(12;21)[*ETV6-RUNX1]*(28) датира от 1994 год. с установена честота от 0,05% при новодиагностицираните пациенти. След идентифициране и секвениране на фузионните гени (29) и въвеждането на други диагностични техники (FISH, RT-PCR, Southern blot), тази генетична аномалия се оказва най-честата транслокация, срещаща се при 20-25% от педиатричните BCP-ОЛЛ (30-33) (табл.23)

Таблица 23. Честота на *ETV6-RUNX1(* +) ОЛЛ в различни страни

Автор	**Година**	**Страна**	***ETV6-RUNX1* (+) ОЛЛ (%)**
Ozbek et al. (196)	2003	Турция	28
Rubnitz et al. (197)	1997	САЩ	26
Avigad et al. (198)	1999	Израел	24
Artigas A CG et al. (199)	2006	Чили	23

A Borkhardt (200)	1997	Германия, Италия	22
Trka J et al. (201)	1999	Чехия, Словакия	26
Юрукова и съавт. (250)	**2019**	**България**	**23**
Magalhaes et al. (202)	2000	Бразилия	20
Liang DC et al. (203)	2002	Тайван	18
Tsang et al. (204)	2001	Китай	18
Martinez-Ramirez A. (205)	2001	Испания	17
Jamil et al. (206)	2000	САЩ	17
Spathas et al. (207)	1999	Великобритания	13
Eguchi-Eshimae et al. (208)	1998	Япония	10
Chopra et al. (209)	2015	Индия	7
Carranza C et al. (52)	2013	Гватемала	5
Garcia-Sanz et al. (210)	1999	Испания	3

Публикуваните данни демонстрират различия в регионалното разпределение на отделните генетични субтипове ОЛЛ, в частност *ETV6-RUNX1(+)* ОЛЛ, като отражение на генетични, расови и географски вариации сред различните популации. Съпоставянето на данните от различните проучвания е трудно, поради подчертаната разнородност на описваните групи пациенти – хетерогенни по численост, и особено по възрастова характеристика. Честотата на аномалията значително намалява с нарастване на възрастта (211). Особено подчертана е разликата с описваната честота на маркера в Испания (193), както и в други региони, където е налице популационно смесване и преобладаващо население с испански произход, в резултат на големи миграционни потоци (Калифорния, Гватемала, Индия) (52, 192). Сравнително по-ниска честота на *ETV6-RUNX1(+)* ОЛЛ се отчита и в страните от Източна Азия (191,192).

Намерената в България честота на *ETV6-RUNX1(+)* ОЛЛ е съпоставима с тази, описвана при другите европейски страни, поставяйки я на първо място по честота сред острите левкемии в детската възраст.

✓ *TCF3-PBX1(+) ОЛЛ*

За разлика от *ETV6-RUNX1(+)* ОЛЛ, съобщаваните данни за честота на *TCF3-PBX1* (+) ОЛЛ не се различават съществено между отделните групи и най-често варира в диапазона 2–6% от В-клетъчните ОЛЛ при деца (52, 72, 77, 195). Генотипът се установява със сигнификантно по-голяма честота при афро-американци (70).

Намерената честота в нашата група пациенти е съпоставима с литературните данни (52,72,77,195) (табл. 24)

Таблица 24. Честота на *TCF3-PBX1 (+)* ОЛЛ в различни страни

Автор	**Година**	**Страна**	***TCF3-PBX1 (+)* ОЛЛ (%)**
Asai (77)	2014	Япония	7,2
Raimondi (212)	1994	САЩ	6,5
Chopra et al.(209)	2015	Индия	6
Юрукова и съавт. (250)	**2019**	**България**	**5,9**
Fan et al.	2016	Китай	5,7
Jeha et al. (75)	2010	САЩ	5,6
Kager et al. (72)	2007	Австрия	3,6
Carranza C et al. (52)	2013	Гватемала	2
Andersen (213)	2011	Скандинавия	1,8

✓ *BCR-ABL1(+) ОЛЛ или Филаделфия позитивна (Ph+) ОЛЛ*

Характерно за *BCR-ABL1(+)* ОЛЛ е значителното нарастване по честота с повишаване на възрастта на пациентите. Така от честота 2-5% при деца (214–216), процентът на *Ph*+ ОЛЛ нараства до 13% във възрастта 15-24 години, до 31% във възрастта 25-34 години, достигайки до 44% при 35-44 годишните (82). Ето защо, съобщаваните честоти са в много силна зависимост от възрастовата характеристика на контингента пациенти. Сравнително по-висока честота за детската възраст (8-11%) се съобщава в Източна Азия (203,217).

Честотата на Ph+ ОЛЛ в нашата група пациенти е сходна на съобщаваната за европейските страни, САЩ и частично азиатските страни.

✓ *MLL- реаранжиране*

Подобно на *BCR-ABL1(+)* ОЛЛ, честотата на *MLL*-реаранжираните ОЛЛ нараства с възрастта, достигайки 11.8% при 15–24 годишните и 19.8% между 25 и 44 години (107). По-специфична особеност е, че аномалията е много разпространена до 6 месечна възраст (50-70% от кърмаческите ОЛЛ), след което честотата й значително намалява и достига 2%-3% за детската възраст (122-127).

Въпреки че описваната при нас група с *MLL-реаранжиране* е малка, честотата на аномалията, съпоставена с цялата група изследвани пациенти, е в очаквани стойности – 3%, като представлява около 70% от случаите в групата пациенти, диагностицирани под 1 година (5/7).

✓ del1p32*(SIL-TAL1)*

Т-ОЛЛ е сравнително по-рядка диагноза, представляваща 10-15% от всички ОЛЛ в детска възраст. Групата е изключително хетерогенна, на базата на досега описаните генетични анализи. В нашата група пациенти, случаите на имунофенотипно доказани Т-ОЛЛ са изследвани за *SIL-TAL1* молекулярен

маркер и установената честота от 19% е съпоставима със съобщаваната (9 - 26%) в други студии (166,169).

Въпреки, че ОЛЛ е най-честото онкологично заболяване в детската възраст, няма пълна яснота за етиологията на заболяването. Ето защо, регионалните различия в честотата и вариантите на левкемията представляват особен интерес, поради предположението, че се дължат на взаимодействието между факторите, отговорни за процеса на левкемогенезата. От една страна това е генетичната предиспозиция, в т.ч. вродените генетични синдроми, а от друга - фактори на околната среда. В основата на популационните и фенотипни различия е генен полиморфизъм, който е резултат от случайно възникващи мутации и селектирането им, главно под въздействие на външни фактори от обкръжението като радиационен фон, химически вещества, инфекции, имащи географско-регионални вариации (19,218). Разкриването на интимните механизми в процеса на взаимодействие би допринесло не само за изясняване на етиологията на онкологичните заболявания (29, 53-56), но вероятно ще отговори на въпроси, свързани с индивидуалния отговор на лечение, възникването на резистентност и рецидиви, а също идентифициране на инструменти за превенция (18,19).

1.2. Демографска характеристика на генетичните подгрупи

Анализирайки демографската характеристика на генетичните подгрупи от нашето проучване бихме могли да очертаем следните тенденции:

- ✓ в кърмаческата възраст вероятността да се установи друг генетичен маркер, освен *MLL- реаранжиране* е практически нищожна;
- ✓ във възрастовия диапазон от 1 до 9 години честотата на установяваните генетични маркери наподобява до голяма степен общото разпределение;
- ✓ над 10 годишна възраст нараства вероятността за високорискова левкемия, каквито са случаите на Т-ОЛЛ и Ph(+) ОЛЛ;

- ✓ пациентите с В-кл. ОЛЛ са на по-малка възраст в сравнение с пациентите с Т-кл. ОЛЛ;
- ✓ при разпределението по пол се отбелязва значително преобладаване на мъжкия в групите с *TCF3-PBX1, BCR-ABL1* и *SIL-TAL1,* за разлика от пациентите без маркер и тези с *ETV6-RUNX1,* при които е характерно общото за детската ОЛЛ разпределение. Групата с *MLL-реаранжиране* е твърде малка, за да може да се потвърди действително доминиране на женския пол и да се очертаят зависимости.

2. Резултати, отнасящи се до корелациите на основните клинико-лабораторни и имунофенотипни характеристики с наличието на най-честите молекулярно-генетични аномалии при деца с ОЛЛ.

✓ *ETV6-RUNX1(+) ОЛЛ*

Нашите пациенти с *ETV6-RUNX1(+)* ОЛЛ оформят група, която по характеристики отговаря на страндартно-рискова по NCI/Rome критериите. Характеризират се в 88% от случаите с възраст в диапазона над 1 и под 10 год. (респ. медиана 4 години) и в 83% от случаите - с начален левкоцитен брой под 50 000/мм^3. Статистически значима е разликата във възрастта, в сравнение с високо рисковите *MLL*-rear. и *BCR- ABL1*(+) ОЛЛ. За групата не е характерна начална екстрамедуларна левкемична инфилтрация, в т.ч. и начално ЦНС ангажиране. При 100% от случаите имунофенотипизацията доказва В-клетъчна принадлежност, а в над 60% от случаите в нашата група се открива аберантна експресия на един или повече миелоидни маркери (CD33, CD13). При нито един от случаите с *ETV6-RUNX1(+)* ОЛЛ не се открива и друга от аномалиите с най-голяма значимост – t(9;22), t(1;19), 11q23. При нашата група, тази констелация от характерна възраст, начален левкоцитен брой, имунофенотип е в унисон с данните от литературата (58,59,218).

Съществено е да се отбележи, че сравнителният анализ по клинични и лабораторни критерии не открива статистически значима разлика между *ETV6-RUNX1(+)* пациентите и тези без генетичен маркер, така че без молекулярно-генетично изследване те не биха могли да бъдат различени в дебюта. Изключение могат да направят някои имунофенотипни особености, без да бъдат патогномоничен критерий.

От друга страна, значимата положителна разлика в преживяемостта на *ETV6-RUNX1(+)* групата, спрямо останалите, прави идентификацията й по генетичен маркер особено важна още в началото на терапевтичния план, с оглед планиране на интензивността на лечението. Още повече, че т.нар. група BCP-други остава разнородна, а според данните от изследвания с най-новите техники за генетичен анализ, сред тези случаи съществен е дялът на остри левкемии, протичащи като високо-рискови, каквато е *Ph-like* ОЛЛ – неразпознаваема с възможностите на конвенционалните диагностични средства, но изискващи интензивно лечение и стриктно мониториране на терапевтичния отговор.

✓ *TCF3-PBX1(+) ОЛЛ*

В нашето проучване, по подобие на други проучвания (70), групата на *TCF3-PBX1(+)* ОЛЛ се асоциира с високо-рискови фактори: възраст над 10 години (43% от пациентите) и левкоцитоза >50 000/мм^3 (30%). Въпреки че не се отчита статистически значима разлика в сравнение с групата BCP-други, такава тенденция би могла да се очертае. В групата е значим превесът на мъжкия пол. Остеоартралгичният синдром е със сигнификантно по-висока честота и би могъл да се определи като типичен за тази група, като не разполагаме с подоби данни от литературата. За нашата група пациенти, не отчитаме по-често ЦНС-ангажиране в дебюта на заболяването, за разлика от съобщения на някои автори (75,219). По отношение на лабораторната констелация, се отбелязва тежката тромбоцитопения, което се свързва с по-тежко клинично протичане и предполага по-интензивна трансфузионна програма за такива пациенти още при поставяне на диагнозата. Характерният за групата пре-В-имунофенотип със CD34- бласти

(71) се доказва и за нашата група пациенти, без да се установява аберантна експресия на миелоидни маркери.

✓ *BCR-ABL1(+)ОЛЛ – Филаделфия позитивна (Ph+) ОЛЛ*

В групата на В-клетъчните левкемии, *Ph+* ОЛЛ се отличават с по-висока медиана на възрастта - 75% от пациентите попадат във високо-рисковата група по критерия за възраст над 10 години. Честотата на аномалията в тази възрастова група достига 10%. Характерни са подчертаната левкоцитоза, успоредно с високостепенна тромбоцитопения и анемичен синдром, като еволютивни белези на левкемичния процес.

✓ *MLL- реаранжирана ОЛЛ*

Най-ясно очертани, със специфичен облик, са пациентите с *MLL-реаранжирана* ОЛЛ. Нашата група напълно съответства на описваните в други проучвания характеристики: кърмаческа възраст, прояви на екстрамедуларна инфилтрация с ЦНС и бъбречно ангажиране (221). Често е хиперлевкоцитарното начало, без изразена анемия и тромбоцитопения, поради бързата експанзия на левкемичния клон в периферната кръв, което изпреварва развитието на хемопоетична недостатъчност. Остеоартралгичен синдром не е надежден симптом в тази възрастова група. Имунофенотипната характеристика отразява специфичния по-ранен матурационен стадий на бластната популация (про-В) със CD10- бластна популация, допълнително аберантна експресия на миелоидни маркери, както и на NG2 (neuron-glial antigen)(222,223). Такава аберантна експресия е характерна и за нашата група пациенти – налична при 5 (71%) деца, като това са всички деца от кърмаческата възраст, докато CD10- е бластната популация при всички (100%) случаи.

✓ *SIL-TAL1(+) ОЛЛ*

Пациентите с Т-клетъчна ОЛЛ и положителен *SIL-TAL1* маркер са подчертано по-големи деца, в нашата група само момчета, с изразена левкоцитоза и хиперлевкоцитоза. За разлика от *SIL-TAL1(-)* случаи, с характерното ангажиране на ЦНС и медиастинум, в групата няма случай на начално ЦНС-засягане, а медиастинално ангажиране е статистически значимо по-рядко (50% срещу 77% или *p=0,002*). С така очертания профил, всички пациенти са високо-рискови по NCI/Rome критериите.

3. Резултати, отнасящи се до значението на установените с RT-PCR генетични аномалии за отговора към лечение и прогнозата

В нашето проучване, значението на установените молекулярни маркери за отговора към лечение и прогнозата оценихме чрез анализ на резултатите от:

- ✓ сравняване на отговора към лечение на ден 8, разпределение по рискови групи, отговор към лечение на ден 33;
- ✓ изследване на съществуваща зависимост между наличен генетичен маркер и разпределението на фактори, имащи отношение към прогнозата;
- ✓ изследване на влиянието на различни фактори върху прогнозата;

За отделните генетични подгрупи анализирахме:

- ✓ показателите, отразяващи отговор към лечение и избор на терапевтичен режим;
- ✓ данните, получени при сравняване на преживяемостта на съответната група с маркер и групата, негативни за маркер;
- ✓ оценка на самостоятелното значение на молекулярния маркер чрез мултивариационен анализ (само за най-голямата група);

Получените резултати при сравняване на отговора към лечение на ден 8, 15 и 33-ти потвърждават доброто терапевтично повлияване, наблюдавано и описано и от други автори (60-63,225) за групата, положителна за *ETV6-RUNX1(+),* в сравнение с останалите генетични подгрупи. Въпреки, че отговорът

към лечение не оказва пряко влияние върху стратификацията при *BCR-ABL1(+)* и *MLL-реар.* ОЛЛ, тъй като те по дефиниция са високорискови, налице е подчертано по-лош отговор при тези цитогенетични групи, както и при *TCF3-PBX1(+)* ОЛЛ. За последната цитогенетична подгрупа, към която принадлежат случаи, квалифицирани като невисокорискови, които в последствие рецидивират, и то, рано, използваните стратификационни схеми вероятно не са съвсем удачни, което налага допълването им с по-надеждни предиктори.

Характерната висока честота на постигане на хематологична ремисия за детската ОЛЛ се потвърждава и за цялата наша група пациенти, както и за отделните подгрупи, разделени според наличие на гентичен маркер.

Чрез анализ на преживяемостта по метода на Kaplan-Meier, за групата наблюдавани пациенти, се потвърди влиянието на класическите прогностични фактори – възраст и начален левкоцитен брой. Групите бяха анализирани както по общоприетите критерии за прогностични групи на (NCI/Rome criteria), така и по критериите на BFM, тъй като дефинициите за категоризиране са различни, а стойностите имат пряко отношение към избор на терапевтичен режим. И при двете класификации влиянието е еднопосочно – с нарастване на левкоцитния брой и възрастта прогнозата се влошава (>50 000/мм^3*,* съотв. >20 000/мм^3*;* >10 год. и съотв. >6 год.). Прогноза при кърмаческата възраст (под 1 година) е изключително неблагоприятната. За нашата група пациенти, подобно на други проучвания, полът и имунофенотипната принадлежност не са оказват със сигнификантна прогностична значимост(224,225).

В настоящето проучване наличието на молекулярно-генетична аномалия се доказва като фактор с прогностично значение – налице е статистически значима разлика (*p<0,004*) в преживяемостта между отделните генетични групи. С най-добра прогноза е групата с *ETV6-RUNX1*(+) пациенти (OS - 96,4 ± 0,025), следвана от групата без маркер (OS - 78,5 ± 0,034). На трето място е групата с *TCF3-PBX1*(+) ОЛЛ (OS - 70,7 ± 0,124), следвана от пациентите с негативен *SIL-TAL* (67,0 ± 0,096), а непосредствено след тях тези с *SIL-TAL(+)* (OS - 66,7 ± 0,192). Групата с Филаделфия позитивна ОЛЛ (*BCR-ABL1* маркер) е с неблагоприятна OS 60,0 ± 0,182, а с най-ниска преживяемост са *MLL-реаранж.* ОЛЛ (OS - 42,9 ± 0,19).

Освен началните стратификационни критерии, за прогнозата на заболяването от терапията – отговор на преднизолон или т.нар. отговор на ден 8, резидуалната болест на ден 15, постигане на ремисия след индукционно лечение на ден 33, отчитане на нивото на МРБ (разгледано отделно). Резултатите от сравняване на преживяемостта при съответното групиране на пациентите са демонстративни и доказват, че ранната редукция и “изчистване“ на бластите определят сигнификантно по-добрата прогноза, а непостигането на ремисия е свързано единствено с краен неблагоприятен изход.

За разлика от критериите на NCI/Rome, групирането на пациентите по BFM отчита и отговора към лечението. Въпреки че високорисковите случаи се лекуват с по-интензивни химиотерапевтични режими, прогнозата при отделните групи остава сигнификантно различна – пациентите със стандартен и среден риск имат много по-благоприятна прогноза, в сравнение високо-рисковите.

Чрез дисперсионен анализ доказахме, че при групираща вариабилна „*генетичен маркер“* съществува сигнификантна разлика в разпределението по генетични групи на изследваните по-горе фактори. Най-вероятно генетичният фактор е един от компонентите, определящи биологичните характеристики на заболяването.

За да оценим влиянието на всеки от генетичните маркери върху прогнозата анализирахме отделните подгрупи.

✓ *ETV6-RUNX1(+) ОЛЛ*

За нашата група пациенти, на базата на получените резултати, доказахме, че наличието на t(12;21)*[ETV6-RUNX1]* е благоприятен прогностичен фактор както по отношение на OS (96,4 ± 0,03), така и за EFS (90,1 ± 0,04). Освен това, при условия на прилагане на стандартизиран диагностичен, стратификационен и терапевтичен алгоритъм, съгласно изискванията на възприетите протоколи ALL IC 2002 и ALL IC 2009, наличието на генетичния маркер има самостоятелно значение, независимо от останалите асоциирани фактори. Нашите резултати са в унисон с данни от множество други проучвания (60-63,225), като се подчертава фактът, че *ETV6-RUNX1(+)* ОЛЛ има благоприятна прогноза при съвременния терапевтичен подход. Лечението се отличава със сравнително по-интензивна

начална фаза за постигане на ранно максимално редуциране на бластната популация и продължителна, по-слабо натоварена поддържаща фаза. Този терапевтичен модел на интензивност, заедно със заложените стратификационните критерии, се оказват удачни за *ETV6-RUNX1(+)* ОЛЛ и резултатите при тази група са най-добри. Въпреки че наличието на маркера не е сред директните критерии за категоризация в рискови групи, установяването му предсказва добра прогноза. Доказването му, на практика, изключва вероятността за друга аномалия, асоциирана с висок риск.

В нашата група общият брой отчетени рецидиви е 68, сред които 5 (7%) на пациенти с *ETV6-RUNX1(+)* ОЛЛ. Такава ниска честота не оспорва и подкрепя благоприятното прогностично значение на фактора. В данни от други проучвания се цитира и значително по-висока честота на рецидиви (61). Приема се, че за пациентите с аномалията са характерни т.нар. „късни рецидиви“. Най-често за късни рецидиви се приемат настъпилите след 36 месец от диагнозата. В наблюдаваната от нас група, средният период за настъпване на *ETV6-RUNX1(+)* рецидиви е 41 месеца, а при общата група (BCP-ОЛЛ) - 25 месеца. Характерна за рецидивите също е относително по-често екстрамедуларно засягане като рецидивите са комбинирани. Освен това, противорецидивното лечение с постигане на нова ремисия често е успешно (227). Тези особености се отчитат и при нашата група с три (60%) комбинирани рецидива, постигнати са 4-ри ремисии, от които дълготрайни 3.

Благоприятната прогноза, асоциирана с маркера, създава предпоставки за редуциране на терапията с оглед на риска от ранни и късни усложнения, свързани с лечението. Подобен подход предполага допълнителна, по-прецизна диференциация на случаите вътре в групата, отчитайки главно обективни показатели, свързани с отговора на лечение и развитие на резистентност (49,228). Възможностите за това вероятно ще са свързани с натрупване и анализиране на информация, получена от най-новите геномни изследвания (229).

- ✓ *TCF3-PBX1(+) ОЛЛ*

В нашата група пациенти, общата преживяемост на групата с втората по честота генетична аномалия t(1;19)[*TCF3-PBX1]* е по-ниска, но не се различава статистически от преживяемостта при общата кохорта с маркер-негативни левкемии - BCP-други (OS - 70,7 ± 0,124 с/у 78,5 ± 0,034). Резултатите ни са в унисон с данни от проучвания на пациенти, лекувани със съвременни интензифицирани режими (75,76). В същото време обаче, преживяемостта съществено се различава от високите резултати при проучвания, съобщаващи преживяемост, сходна с тази на генетичните подтипове, асоциирани с най-добра прогноза – *ETV6-RUNX1(+)* (OS~90%) (75,76). Въпреки че не се установява сигнификантна разлика при съпоставяне на EFS между BCP-други и *TCF3-PBX1(+)* ОЛЛ (съответно 71,6 ± 0,037 и 57,1 ± 0,134, *p=0,227*), процентът на случаите с аномалията и рецидив е висок – 43%. Характеристиките на рецидивите при нашите пациенти с *TCF3-PBX1* съответстват на описаните като типични за групата – ранни, още в хода на терапията (средно до 12 месеца от началото на заболяването), комбинирани с екстрамедуларно засягане (ЦНС) и с крайно неблагоприятна прогноза. 50% от рецидивиралите пациенти не са категоризирани като високо-рискови при постаняне на диагнозата, поради липса на съответни критерии.

Всички рецидиви са квалифицирани като високорискови, прилаган е стандартен химиотерапевтичен подход. Излекуван е само 1 рецидивирал пациент с изолирано ЦНС-ангажиране, при 4-ма пациенти не е постигана втора ремисия, при 1 пациент след регистрирана хематологична ремисия е осъществена КМТ, но в ранния посттрансплантационен период отново е настъпил рецидив и последващ екзитус. Катастрофалната прогноза при пациенти с *TCF3-PBX1(+)* ОЛЛ и рецидив налага преосмисляне на стратификационните критерии и идентифициране на нови фактори, както и на терапевтичния подход и план, с ранно включване на иновативни средства (имунотепапия) за превъзмогване на евентуална химиорезистентност(230).

Във връзка с по-честото засягане на ЦНС, особено при рецидив, трябва да се отбележи, че при нашата група пациенти, ЦНС-ориентираната терапия не е модифицирана за тази група пациенти**,** както се препоръчва в някои от терапевтичните схеми(231), и е изпълнявана, съобразно указанията на общовалидния протокол за лечение.

По-лошите от очакваните резултати при нашата група налагат адаптация на терапевтичното поведение, съобразно адекватно проследяване и интерпретация на резултатите от проследяването на МРД, прецизиране на показанията за интензифициране както на терапията въобще, така и на ЦНС-насочената терапия.

✓ *BCR-ABL1(+)* ОЛЛ – Филаделфия позитивна (Ph'+) ОЛЛ

Очаквано групата на *BCR-ABL1(+)* ОЛЛ е малобройна и изводите следва да се интерпретират като тенденции, а не като закономерности. Допълнително трябва се подчертае фактът, че Ph(+) пациентите, диагностицирани след 2009 год. (общо 6) се лекуват с химиотерапия, комбинирана с прием на тирозиназни инхибитори (TKI), съобразно съвременен протокол (EsPhALL2009). Инхибитор е е добавен допълнително към лечението и на пациент, диагностициран година по-рано (2008 г.). При сравнителният анализ на преживяемостта при нашите пациенти не се установи статистически значима разлика между групата с Ph(+) ОЛЛ и групата без маркер. Освен размера на групата с маркер, тези резултати вероятно се дължат на подобрената преживяемост при Ph(+) ОЛЛ след добавянето на TKI към терапията от една страна. От своя страна, разнородността на т.нар. група без маркер, в която се очаква, че е съществен дялът на други високорискови ОЛЛ (147), определя сходните резултати. Така, постигнатите резултати (OS, EFS) при нашите пациенти с Ph(+) ОЛЛ са сравними с тези от други проучвания (93,95,96, 231).

Наличието на t(9;22)[*BCR-ABL1]* е един от общопризнатите маркери, асоцииращи се с лоша прогноза и присъства в задължителните критерии за стратификация на пациентите по рискови групи. Това налага не само допълването на терапията с TKI, но и предопределя приложението на високо-интензивни химиотерапия, като ролята на КМТ е дискутабилна(92-92).

Проследяването на нивата на експресия на *BCR-ABL1* – фузионните продукти (вж по-долу) беше основен критерий за адаптиране на терапията – преустановяване на терапията с TKI, превключване към втора генерация TKI, реализиране на Алогенна КМТ от родствен донор.

✓ *MLL – реар. ОЛЛ*

Малката група от пациенти с *MLL-реар. ОЛЛ* в нашето проучване напълно отразява отчитаните групата с най-ниска преживяемост (~40%) и съответно най-лоша прогноза. Заболяването проявява резистентност към терапия, въпреки че прилаганите режими са високо-интензивни. Рецидивите са ранни и протичат катастрофално, въпреки че при двама пациенти са осъществени и алогенни КМТ. Интересно е да се отбележи, че всички случаи с рецидив и неблагоприятно протичане са носители на най-честата за групата t(4;11)[*MLL-AF4]* и са с типична клинична изява. При двама от останалите пациенти реанжиранията на *MLL-гена* са с други партньорски гени. При пациенти на възраст над 10 г., въпреки че остава високо-рисково, еволюцията на заболяването е по-различна, с относително по-добра прогноза от тази при кърмаческа левкемия.

✓ *SIL-TAL1(+)* ОЛЛ

В нашата група пациенти с Т-клетъчна ОЛЛ, наличието на *SIL-TAL1* не оказва влияние върху преживяемостта, сравнямайки с *SIL-TAL1(-)* случаи. Както при *SIL-TAL1(+),* така и при *SIL-TAL1(-)* случаи, вероятността за обща преживяемост е аналогична на вероятността за липса на заболяване, което потвърждава наблюдаваната и в други студии изключително лоша прогноза на заболяването при пациенти с настъпил рецидив (79,164).

Допълнително, за нашата група пациенти, не се отчита статистически значима разлика в общата преживямостта при случаите с В-клетъчни ОЛЛ без генетични аномалии и Т-клетъчни, съответно 5-год. OS е 81,0 ± 0,026 и 67,1 ± 0,086, *p <0,108*, каквито са резултати се съобщават и в други студии (233,234). Все пак, личи съществена разлика в преживяемостта, въпреки статистическия резултат, имайки придвид различието в размера на сравняваните групи.

4. Резултати при проследяване на МРБ чрез нивото на експресия на фузионни гени

В съвременния подход за лечение на ОЛЛ, като най-успешна стратегия се счита адаптирането на интензивността на лечението, в зависимост от динамично отчитания терапевтичен отговор (174). Дори при терапевтичните схеми, базирани на този принцип, нивото на МРБ остава независим прогностичен фактор и чувствителен индикатор за настъпване на рецидив. Нива на МРБ под 1.10^{-4} се асоциират с благоприятен изход (235), като по-ниски нива и по-ранно негативиране се свързват с по-добра прогноза (236,237).

Съществуващите техники за измерване на МРБ се базират на различни таргети за идентификация на остатъчната бластна популация. Всеки от методите се отличава със специфична чувствителност. Така, с възможностите на ИФ могат да бъдат разгланичени левкемични клетки в количество 1.10^{-4} - 1.10^{-6} (123,235), с молекулярно-генетичните методи чувствителността се счита за най-висока и достига нива 1.10^{-6} (173). Допълнително, в контекста на отделните терапевтични протоколи, избраните за измерване времеви пунктове, в хода на лечението имат различна прогностична стойност. Най-важни времеви точки за проверка са средата на индукционната фаза, края на индукцията, края на консолидацията (181,239,240). Значение имат типът и дозовият режим на предшестващата химиотерапия (180,236,237). В резултат, получените данни на различни терапевтични групи предоставят информация, която често е трудно съпоставима и на практика липсва напълно унифициран подход, касаещ инкорпорирането на МРБ в клиничните алгоритми (173,241).

В нашето проучване, анализът от проследяване на МРБ чрез RT-PCR, очерта различни зависимости при отделните генетични подгрупи.

4.1. При групата на *ETV6-RUNX1(+)* ОЛЛ с подчертано благоприятна прогноза, се отчитат ниски нива на МРБ и постигане на много добър ранен молекулярно-генетичен отговор. Още на 1-и месец, пълно негативиране на МРБ се установява при 14 пациенти (39%), нива на МРБ под 1.10^{-4} при 8 (22%).След края на консолидационната фаза молекулярна ремисия е достигната при 21 пациенти (70%), а много ниско ниво (под 10^{-4}) при 5 случая (16%). Така

отчетената бърза редукция на обема на бластната популация отразява високата чувствителност към провежданото лечение и е свързана с добра прогноза, което е в съзвучие с данните от проучвания и на други групи (163,164). Отчитаме, че при пациенти с относително по-високо ниво на МРБ на 1-ви месец и последващо ново високо ниво на 6-ти месец, рискът от рецидив нараства. При късно настъпилите рецидиви (>12 месеца от края на терапията), при вече преустановено проследяване на МРБ, съответно не са регистрирани индикатори чрез молекулярно-генетично изследване за настъпващ рецидив.

Важно е да се отбележи, че при 1/3 от пациентите с *ETV6-RUNX1(+)* ОЛЛ, персистира установимо ниво на МРБ от проведени изследвания в момента на спиране на лечението. Въпреки това, при нито един от тях не е регистриран рецидив до края на периода на проследяване. Според информацията, с която разполагаме, подобни данни не са съобщавани в публикуваната литература. Вероятно това се дължи на факта, че стандартният подход за измерване на МРБ не включва продължително молекулярно проследяване след края на консолидационната фаза. От етиопатогенетична гледна точка, възможно обяснение е, че аномалията възниква пренатално (доказателство е наличието ѝ в новородени и здрави възрастни) (242,243), не е достатъчна, сама по себе си, да отключи малигнена трансформация като остава да персистира и след изчезване на левкемичния клон (30). Сходните и до голяма степен повтарящи се резултати при проследяването нивата на транскрипция на фузионния ген *ETV6-RUNX1* на 12-ти, 18-ти и 24-ти месец, налагат преосмисляне на възприетия ни план за мониториране. С голяма вероятност, придържане към следния план би могло да подобри информативната стойност на проследяване с RT-PCR: да се въведе изследване на 15-ти ден от индукцията, след което да се продължи с изследването в края на 1-вия месец (края на индукцията), и последващо проследяване на 3-ти месец (края на консолидационната фаза). В случай на задържане на високи нива на МРБ би следвало да се продължи проследяването на 3 – 6 месеца, с оглед адаптиране на терапевтичния план.

Отличните резултати при лечението на пациентите с *ETV6-RUNX1(+)* ОЛЛ в нашата група биха могли да станат основа за планова редукция в интензивността и продължителността на терапията. Трябва да се подчертае, обаче, че резултатите са постигнати именно в контекста на прилаганите терапевтични схеми и съответните актуални критерии за стратифициране,

поради което всяка модификация, особено редукция на лечението, следва да се инициира обосновано (240). Обективни аргументи, отразяващи разнородността на групата с *ETV6-RUNX1(+)* ОЛЛ вероятно ще бъдат изведени от бъдещи проучвания с най-новите диагностични съвременни техники като NGS (229).

4.2. Проследяването на МРБ при пациентите с *TCF3-PBX1*(+) ОЛЛ очерта специфичен, по-продължителен процес на редукция на бластната популация, в сравнение с *ETV6-RUNX1(+)* пациенти. Установено бе задържане на относително високи нива на МРБ при 80% от изследваните на 1-вия месец от терапията, а максимален ефект (негативиране на МРБ) при голямата част (64%) е постигнат едва на 6-тия месец от лечението.

В нашето проучване този пункт на изследване (след консолидационна и преди реиндукционна фаза) показва висока информативна стойност при *TCF3-PBX1*(+) ОЛЛ. Всички пациенти, освен един, при които нивото на МРБ остава установимо на 6-тия месец са рецидивирали през следващите 3 до 6 месеца. Данните подкрепят обсъждане на по-ефективна реиндукционната терапия при тази група, в т.ч. възможността за инкорпориране на алтернативен терапевтичен подход при пациенти със задържащо се установимо ниво на МРБ, напр. имунотерапия по подобие на протоколите за високо-рискови рецидиви, където наличието на *TCF3-PBX1* се счита за високо-рисков критерий (230).

4.3. От проследяването на МРБ при пациентите с *BCR-ABL1(+)* ОЛЛ се установява задържането на много високи нива на МРБ в края на индукционната фаза, което е обичайно за тази генетична подгрупа (237). Задържането на високи нива (при 5 от 7 пациенти), в хода на лечението, стана основание да се изследват допълнително настъпили мутации във фузионния ген и произтичаща от това резистентност. От клинична гледна точка, това е повод за адаптиране на таргетната терапия със смяна на TKI (преминаване към 2-ра генерация TKI), както и ескалация на лечението с осъществяване на алогенна КМТ (при един от пациентите). Интересен е случай със задържане на високи нива на МРБ, въпреки сменената терапия с втора генерация TKI при един от пациентите, като в хода на проследяване от 60 месеца това не се последва от хематологичен рецидив.

Персистирането на установима МРБ е използван като индикатор за продължаване на лечението с TKI дори след края на химиотерапията като поддържащо лечение. Обратно, негативиране и задържане на неустановима МРБ е прието като показание за спиране на лечението с TKI на 36 месец от началото на заболяването при 1 пациент, което се последва от дълготрайна ремисия.

Актуален остава въпросът за комбинираната токсичност при лечение с TKI, успоредно на интензивна полихимиотерапия. Съобщава се по-висока честота и степен на тежест хемато- и хепатотоксичност (244,245). В нашата група е регистриран един случай с тежки странични ефекти и летален изход в резултат от високостепенна токсичност при пациент с молекулярна ремисия, в хода на индуцирана костно-мозъчна хипоплазия при реализиране на интензивна терапия с т.нар. високо-рискови химиотерапевтични блокове.

4.4. Изключително сериозната прогноза при *MLL-peap.* ОЛЛ се потвърждава и при нашата група пациенти. В унисон с наблюдаваната клинична еволюция (прогресия) са нивата на проследяваната МРБ. Отчетените високи нива на резидуална болест над 10^{-2} в хода на лечението отразяват висока честота на терапевтична резистентност при кърмаческата левкемия и висок риск от рецидив. Единственият пациент с негативирана на 1-вия месец МРБ не е в кърмаческа възраст и МРБ е останала в неустановими нива при последващите контроли (36 месеца). При всички останали пациенти (5 или 83%) МРБ се е задържала във високи нива и заболяването е завършило фатално в 3 случаи още в първите 6-12 месеца от диагнозата.

4.5. За пациентите със *SIL-TAL1*(+) ОЛЛ се отчетоха следните особености: нито един пациент няма негативиране на МРБ след края на индукционната терапия; сравнително високите нива на МРБ се задържат; негативиране на МРБ на 3-ти и 6-ти месец е свързано с дългорайна ремисия. Данните в литературата са подобни, потвърждаващи сравнително по-късното настъпване на негативиране на МРБ при Т-клетъчни ОЛЛ. Прогностичната стойност на

изследването, проведено след края на консолидацията, е по-висока при тази група пациенти (246). Двама от нашите пациентите са с отчетено ниво на МРБ над 1.10^{-4} на 24-ти месец (преди спиране на терапията), но без хематологичен рецидив в последствие, без интензифициране на терапията и без преминаване към програма за КМТ. Не са ни известни подобни данни от литературата.

За да оценим значението на МРБ, проследена чрез нивото на експресия на установените при диагнозата фузионни гени, за прогнозата при заболяването, при голямата част от положителните пациенти проведохме контролни RT-PCR в хода на лечението.

При анализ на получените данни за OS и EFS, след разпределение на пациентите по групи единствено въз основа на критерия ниво на МРБ, в точки на проследяване 33-ти ден и 3-ти месец, се установи сигнификантна разлика в преживяемостта. Според нашите данни, на 33-ти ден при „cut-off“ ниво на МРБ 1.10^{-3}, OS е съотв. 96,2 ± 0,038 с/у 73,1 ±0,074 и p <0,013, а EFS - 96,2 ± 0,038 с/у 61,3 ± 0,082 и p < 0,003. За 3-ти месец при „cut-off“ ниво на МРБ 1.10^{-4} OS е съответно 92,3 ± 0,046 с/у 72,1 ± 0,08 и p < 0,011, а EFS е 92,3 ±0,043 с/у 53,6 ± 0,095 и p <0,001. Данните са съпоставими с тези от други проучвания, при които се подчертава значението на нивата на МРБ за прогнозата (248).

Резултатите са доказателствени за прогностичната значимост на фактора МРБ, както и за информативната стойност на проследяване по този метод. Освен прогностично значение, тези данни биха могли да се считат като индикативни за терапевтични интервенции, предоставяйки възможности за групов или индивидуализиран подход.

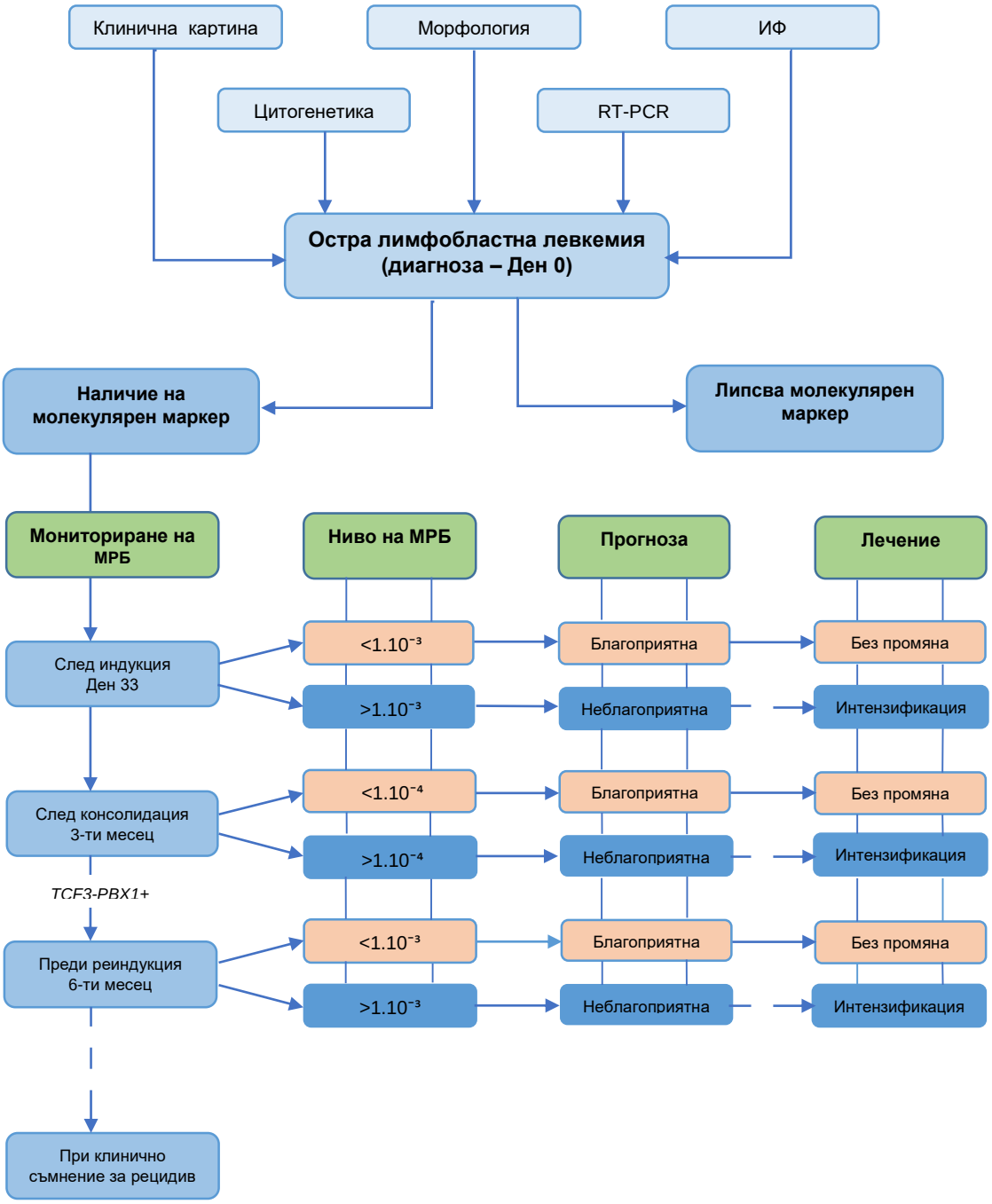
Измерването на експресията на специфичните за ОЛЛ фузионни гени чрез RT-PCR е един практически лесно приложим метод за проследяване на МРБ в случаите с установена при диагнозата генетична аномалия. Методът е с доказана висока специфичност, освен това е сравнително бързо и лесно изпълним. При интерпретиране на резултатите обаче, следва да се имат предвид съществуващите различия в експресията на фузионните гени. Така, по нивото на експресия на фузионните гени трудно би могъл да се определи с точност обема на бластната популация, тъй като няма еднозначно съотношението между PCR-продукт и брой левкемични клетки. Освен това,

възможно е прилаганото лечение да промени експресионните нива чрез повлияване на нивата на mRNA, както и да индуцира интрацелуларна нестабилност на RNA (174,247).

За оптимизиране на диагностичния процес и правилното интерпретиране на резултатите би следвало да се прилага унифициран подход при избора на етап от лечението, в който да се проследява нивото на МРБ, както и дефиниране на гранично ниво за диференциране на отделните групи пациенти. Според досегашните стандарти, като показателни се приемат изследванията за МРБ на етап: средата и края на индукционната фаза (15-ти и 33-ти ден), и края на консолидацията (3-ти месец) (249). Няма убедителни данни за стойността в клиничната практика на проследяване в следващите етапи от лечение (249). Счита се, че изследването в късните етапи на лечение няма практическо приложение, освен за доказване на подозиран клинично или от рутинни лабораторни изследвания рецидив. Въпреки това, проследяване на нивото при нашата група *TCF3-PBX1*(+) пациенти показа, че установимо ниво на МРБ на 6-ти месец е свързано с последващ рецидив.

На базата на получените резултати предлагаме алгоритъм за проследяване на МРБ при пациентите с установени генетични маркери, с възможности за евентуално оптимизиране на терапевтичния план (фиг.42).

Динамичното мониториране на МРБ като отражение на левкемичния товар има висока информативна стойност, когато се провежда по стандартизиран маниер. На този етап, възпритите и прилагани в нашия център терапевтични протоколи за групата пациенти, включени в нашето проучване, не предвиждат рестратифициране по рискови групи или адаптиране на терапията, в съответствие с нивата на МРБ, проследявани с молекулярно-генетично изследване.



Фигура 43. Алгоритъм за мониториране на МРБ чрез нивото на открити към диагноза фузионни гени

Заключение

Острата лимфобластна левкемия представлява хетерогенна група от заболявания с широк спектър от клинични прояви, лабораторни характеристики, терапевтичен отговор и прогноза. В основата на това разнообразие са взаимодействащи си генетични фактори. Тяхното идентифициране и изясняването на механизмите на левкемогенеза са обект на интензивни изследвания и проучвания.

В съвременните условия, коректното диагностициране на заболяването, стратифицирането на пациентите и изборът на терапия са обвързани с резултатите от генетичните изследвания. Диагностичният алгоритъм при деца с ОЛЛ се надгражда и понастоящем задължителен елемент са молекулярно-генетичните изследвания.

Резултатите от настоящото проучване, обхващащо голяма група пациенти, проследявани за дълъг период, отразяват успешното добавяне на молекулярно-генетичното изследване към диагностичния панел при деца с ОЛЛ в нашия център и потвърждават значението на получените данни за цялостния диагностично-лечебен процес.

Изводи:

1. Установяването на фузионни гени чрез RT-PCR при 1/3 от децата с ОЛЛ прави възможно класифицирането на случаите, съобразно критериите на последната СЗО класификация на миелоидните неоплазми и остра левкемия (The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia)(22).

2. От епидемиологична гледна точка, определянетото на честотата на молекулярно-генетичните маркери при ОЛЛ в детска възраст за България допълва профила на заболяването, в контекста на възможни етиопатогенетични взаимодействия.

3. Обособяването на клинико-лабораторни констелации, в асоциация с генетичния подвариант, подобрява възможностите на диагностичния и лечебен процес, изграждайки модели за комплексен и индивидуализиран подход.

4. Анализирането на данните от клиничните групи, с добавените данни от генетичните изследвания, позволява ново интерпретиране на резултатите и очертава превес на значението на едни спрямо други рискови фактори за отговора към лечение и прогнозата.

5. На базата на унифициран терапевтичен подход се доказват особеностите и значението на индивидуалния отговор към лечение. Обективната оценка чрез измерване на МРБ аргументира адаптиране и индивидуализиране на терапевтичния план.

6. Чрез молекулярно-генетичните изследвания се идентифицират реални терапевтични таргети, с възможности за повлияване и подобряване на прогнозата при съответната група пациенти.

Приноси

Приноси с научно-приложен и оригинален характер

1. Настоящото проучване, направено върху 271 педиатрични пациента с ОЛЛ, диагностицирани и лекувани за 13-годишен период в най-големия център за лечение на злокачествени заболявания при деца в страната, представлява най-мащабното проучване на такива пациенти в България.

2. За първи път в България се установява и описва честотата на разпределение на най-често срещаните клинично значими генетични подгрупи

при ОЛЛ в детска възраст, като мащабът на проучването позволява данните да бъдат отнесени към цялата страна.

3. На базата на съвременните тенденции за групиране на пациентите по наличие на генетичен маркер, за първи път в страната се описват асоциирани клинико-лабораторни констелации, които са съпоставими с публикуваните данни от други проучвания.

4. Направен е анализ на данните, отнасящи се до значението на молекулярно-генетичните маркери за отговора към лечение и прогнозата за отделните генетични подгрупи, като се доказва тяхната прогностична стойност. За най-голямата генетична подгрупа, *ETV6-RUNX1 (+)* ОЛЛ, генетичният маркер има самостоятелна благоприятна прогностична стойност.

5. Направените за първи път в нашата страна анализи върху проследяването на МРБ чрез детекция на експресията на фузионни гени при ОЛЛ доказват, че методът е достоверен и удобен за практиката, при оценка на терапевтичния отговор и адаптиране на терапевтичната стратегия. Задържането на високи нива на МРБ в края на индукцията и в края на консолидацията се свързва еднопосочно със статистически значимо влошаване на преживяемостта.

6. Изведен е препоръчителен режим за проследяване на МРБ. При установен фузионен ген при поставяне на диагнозата, нивото на експресията следва да се проследява на ден 33 и на 3-ти месец от лечението, като само за *TCF3-PBX1*(+) ОЛЛ се препоръчва допълнително изследване, тъй като задържане на високо ниво на 6-ти месец се свързва пряко с повишена вероятност от настъпване на рецидив.

7. Установимо нискостепенно ниво на МРБ при спиране на лечението в случаите с ETV6-RUNX1 (+) ОЛЛ не се асоциира с повишен риск от настъпване на рецидив.

8. Настоящото проучване наложи включването на молекулярното-генетичното изследване като задължителен компонент от диагностичния алгоритъм при пациентите с ОЛЛ в нашия център.

Приноси с потвърдителен характер

1. Установените честоти на молекулярно-генетичните подтипове сред детската ОЛЛ при нашите пациенти са характерни за кавказката раса и са сходни с описаните и в други европейски страни.

2. Описаната от други автори асоциация от демографски, клинико-лабораторни и имунофенотипни характеристики, се установява и при нашите групи пациенти, съответно групата с *ETV6-RUNX1 (+)* ОЛЛ имат показатели с благоприятна стойност, за разлика от *Ph(+)* ОЛЛ, *MLL – peap.* ОЛЛ и отчасти *TCF3-PBX1*(+) ОЛЛ.

3. Потвърждават се данните, че най-добри терапевтични резултати се постигат при пациентите с *ETV6-RUNX1 (+)* ОЛЛ, при които OS и EFS са съответно 96,4 ± 0,025 и 90,1 ±0,043.

4. Потвърждават се данните за най-неблагоприятна прогнозата при пациенти с *MLL-peap.,* при които OS и EFS са идентични и достигат едва 42,9 ±0,187.

5. Резултатите от нашето проучване потвърждават клиничната значимост на метода за мониториране на динамиката на МРБ чрез измерване нивото на експресия на установените при диагнозата фузионни гени.

БИБЛИОГРАФИЯ

Източници на английски език:

1. Pui C-H, Yang JJ, Hunger SP, Pieters R, Schrappe M, Biondi A, et al. Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: Progress Through Collaboration. J Clin Oncol. 2015;
2. Inaba H, Greaves M, Mullighan CG. Acute lymphoblastic leukaemia. Lancet (London, England). 2013/03/22. 2013 Jun 1;381(9881):1943–55.
3. Moorman A V. New and emerging prognostic and predictive genetic biomarkers in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. Haematologica. 2016;101(4):407–16.
4. Hunger SP, Lu X, Devidas M, Camitta BM, Gaynon PS, Winick NJ, et al. Improved survival for children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia between 1990 and 2005: a report from the children's oncology group. J Clin Oncol. 2012/03/12. 2012 May 10;30(14):1663–9.
5. Pui C-H, Mullighan CG, Evans WE, Relling M V. Pediatric acute lymphoblastic leukemia: where are we going and how do we get there? Blood. 2012 Aug 9;120(6):1165–74.
6. Greaves MF, Wiemels J. Origins of chromosome translocations in childhood leukaemia. Nat Rev Cancer. 2003 Sep 1;3:639.
7. Greaves M. Infection, immune responses and the aetiology of childhood leukaemia. Nat Rev Cancer. 2006 Feb 9;6:193.
8. Kinlen L, Doll R. Population mixing and childhood leukaemia: Fallon and other US clusters. Br J Cancer. 2004/06/29. 2004 Jul 5;91(1):1–3.
9. Matsuoka M, Jeang K-T. Human T-cell leukaemia virus type 1 (HTLV-1) infectivity and cellular transformation. Nat Rev Cancer. 2007 Apr 1;7:270.

10. Blackadar CB. Historical review of the causes of cancer. World J Clin Oncol. 2016;7(1):54.

11. Bailey HD, Metayer C, Milne E, Petridou ET, Infante-Rivard C, Spector LG, et al. Home paint exposures and risk of childhood acute lymphoblastic leukemia: findings from the Childhood Leukemia International Consortium. Cancer Causes Control. 2015/07/02. 2015 Sep;26(9):1257–70.

12. D'Andrea MA, Reddy GK. Health Risks Associated With Benzene Exposure in Children: A Systematic Review. Glob Pediatr Heal. 2018 Aug 17;5:2333794X18789275-2333794X18789275.

13. Ross JA. Maternal diet and infant leukemia: A role for DNA topoisomerase II inhibitors? Int J Cancer. 1999 Mar 25;78(S11):26–8.

14. Pendleton M, Lindsey Jr RH, Felix CA, Grimwade D, Osheroff N. Topoisomerase II and leukemia. Ann N Y Acad Sci. 2014/02/03. 2014 Mar;1310(1):98–110.

15. Stieglitz E, Loh ML. Genetic predispositions to childhood leukemia. Ther Adv Hematol. 2013;4(4):270–90.

16. Hampel H, Bennett RL, Buchanan A, Pearlman R, Wiesner GL. A practice guideline from the American College of Medical Genetics and Genomics and the National Society of Genetic Counselors: referral indications for cancer predisposition assessment. Genet Med. 2014 Nov 13;17:70.

17. Desai A V, Perpich M, Godley LA. Clinical Assessment and Diagnosis of Germline Predisposition to Hematopoietic Malignancies: The University of Chicago Experience. Front Pediatr. 2017;5(December):252.

18. Moriyama T, Relling M, Yang J. Inherited genetic variation in childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood. 2015;125(26):3988–96.

19. Lim JY-S, Bhatia S, Robison LL, Yang JJ. Genomics of racial and ethnic disparities in childhood acute lymphoblastic leukemia. Cancer. 2013/12/30. 2014 Apr 1;120(7):955–62.

20. Bennett JM, Catovsky D, Daniel M-T, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick HR, et al. Proposals for the Classification of the Acute Leukaemias French-American-

British (FAB) Co-operative Group. Br J Haematol. 1976 Aug 1;33(4):451–8.

21. Hossfeld DK. E.S. Jaffe, N.L. Harris, H. Stein, J.W. Vardiman (eds). World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Ann Oncol. 2002 Mar 1;13(3):490–1.

22. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. Blood. 2016 May 19;127(20):2391 LP – 2405.

23. Secker-Walker LM, Lawler SD, Hardisty RM. Prognostic implications of chromosomal findings in acute lymphoblastic leukaemia at diagnosis. Br Med J. 1978 Dec 2;2(6151):1529 LP – 1530.

24. Chromosomal Abnormalities and Their Clinical Significance in Acute Lymphoblastic Leukemia. Cancer Res. 1983 Feb 1;43(2):868 LP – 873.

25. Carroll AJ, Crist WM, Parmley RT, Roper M, Cooper MD, Finley WH. Pre-B cell leukemia associated with chromosome translocation 1;19. Blood. 1984 Mar 1;63(3):721 LP – 724.

26. Smith M, Arthur D, Camitta B, Carroll AJ, Crist W, Gaynon P, et al. Uniform approach to risk classification and treatment assignment for children with acute lymphoblastic leukemia. J Clin Oncol. 1996 Jan 1;14(1):18–24.

27. Harrison CJ. Cytogenetics of paediatric and adolescent acute lymphoblastic leukaemia. British Journal of Haematology. 2009.

28. Raimondi SC. Current status of cytogenetic research in childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood. 1993;81(9):2237–51.

29. P. Romana S, Le Coniat M, Berger R. t(12;21): A new recurrent translocation in acute lymphoblastic leukemia. Vol. 9, Genes, chromosomes & cancer. 1994. 186–191 p.

30. Ford AM, Bennett CA, Price CM, Bruin MC, Van Wering ER, Greaves M. Fetal origins of the TEL-AML1 fusion gene in identical twins with leukemia. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Apr 14;95(8):4584–8.

31. Wiemels JL, Cazzaniga G, Daniotti M, Eden OB, Addison GM, Masera G, et al.

Prenatal origin of acute lymphoblastic leukaemia in children. 1999;354:1499–503.

32. Wiemels JL, Ford AM, Van Wering ER, Postma A, Greaves M. Protracted and Variable Latency of Acute Lymphoblastic Leukemia;TEL-AML1; Gene Fusion In Utero. Blood. 1999 Aug 1;94(3):1057 LP – 1062.

33. Zuna J, Madzo J, Krejci O, Zemanova Z, Kalinova M, Muzikova K, et al.;ETV6/RUNX1;(TEL/AML1) is a frequent prenatal first hit in childhood leukemia.

34. Lausten-Thomsen U, Madsen HO, Vestergaard TR, Hjalgrim H, Nersting J, Schmiegelow K. Prevalence of t(12;21)[TEL-AML1];ETV6-RUNX1–positive cells in healthy neonates. Blood. 2011 Jan 6;117(1):186 LP – 189.

35. Alpar D, Wren D, Ermini L, Mansur MB, van Delft FW, Bateman CM, et al. Clonal origins of ETV6-RUNX1+ acute lymphoblastic leukemia: studies in monozygotic twins. Leukemia. 2014 Nov 12;29:839.

36. Morrow M, Horton S, Kioussis D, Brady HJM, Williams O. TEL-AML1 promotes development of specific hematopoietic lineages consistent with preleukemic activity. Blood. 2004 May 15;103(10):3890 LP – 3896.

37. van der Weyden L, Giotopoulos G, Rust AG, Matheson LS, van Delft FW, Kong J, et al. Modeling the evolution of ETV6-RUNX1-induced B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia in mice. Blood. 2011/05/31. 2011 Jul 28;118(4):1041–51.

38. Broadfield J, Hain RDW, Harrison CJ, Jalali GR, Mckinley M, Michalova K, et al. Complex chromosomal abnormalities in utero , 5 years before leukaemia *. 2004;307–12.

39. Schindler JW, Buren D Van, Foudi A, Krejci O, Qin J, Orkin SH. Article TEL-AML1 Corrupts Hematopoietic Stem Cells to Persist in the Bone Marrow and Initiate Leukemia. Stem Cell. 2009;5(1):43–53.

40. Li M, Jones L, Gaillard C, Binnewies M, Ochoa R, Garcia E, et al. Initially disadvantaged, TEL-AML1 cells expand and initiate leukemia in response to irradiation and cooperating mutations. Leukemia. 2013/02/26. 2013

Jul;27(7):1570–3.

41. Anderson K, Lutz C, van Delft FW, Bateman CM, Guo Y, Colman SM, et al. Genetic variegation of clonal architecture and propagating cells in leukaemia. Nature. 2010 Dec 15;469:356.

42. Stams WAG, Beverloo HB, den Boer ML, de Menezes RX, Stigter RL, van Drunen E, et al. Incidence of additional genetic changes in the TEL and AML1 genes in DCOG and COALL-treated t(12;21)-positive pediatric ALL, and their relation with drug sensitivity and clinical outcome. Leukemia. 2006 Jan 19;20:410.

43. Borst L, Wesolowska A, Joshi T, Borup R, Finn C, Andersen MK, et al. Genome-wide analysis of cytogenetic aberrations in ETV6 / RUNX1 -positive childhood acute lymphoblastic leukaemia. 2012;476–82.

44. Lilljebjörn H, Soneson C, Andersson A, Heldrup J, Behrendtz M, Kawamata N, et al. The correlation pattern of acquired copy number changes in 164 ETV6/RUNX1-positive childhood acute lymphoblastic leukemias. Hum Mol Genet. 2010/05/31. 2010 Aug 15;19(16):3150–8.

45. Mullighan CG, Goorha S, Radtke I, Miller CB, Coustan-Smith E, Dalton JD, et al. Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. Nature. 2007 Mar 7;446:758.

46. Ellinghaus E, Stanulla M, Richter G, Ellinghaus D, Te Kronnie G, Cario G, et al. Identification of germline susceptibility loci in ETV6-RUNX1-rearranged childhood acute lymphoblastic leukemia. Leukemia. 2012;26(5):902–9.

47. Papaemmanuil E, Rapado I, Li Y, Potter NE, Wedge DC, Tubio J, et al. RAG-mediated recombination is the predominant driver of oncogenic rearrangement in ETV6-RUNX1 acute lymphoblastic leukemia. Nat Genet. 2014/01/12. 2014 Feb;46(2):116–25.

48. Bokemeyer A, Eckert C, Meyr F, Koerner G, von Stackelberg A, Ullmann R, et al. Copy number genome alterations are associated with treatment response and outcome in relapsed childhood ETV6/RUNX1-positive acute lymphoblastic leukemia. Haematologica. 2014 Apr;99(4):706–14.

49. Grausenburger R, Bastelberger S, Eckert C, Kauer M, Stanulla M, Frech C, et al. Genetic alterations in glucocorticoid signaling pathway components are associated with adverse prognosis in children with relapsed ETV6/RUNX1-positive acute lymphoblastic leukemia. Leuk Lymphoma. 2016 May 3;57(5):1163–73.

50. Kuster L, Grausenburger R, Fuka G, Kaindl U, Krapf G, Inthal A, et al. ETV6/RUNX1-positive relapses evolve from an ancestral clone and frequently acquire deletions of genes implicated in glucocorticoid signaling. Blood. 2011 Mar 3;117(9):2658 LP – 2667.

51. van Delft FW, Horsley S, Colman S, Anderson K, Bateman C, Kempski H, et al. Clonal origins of relapse in [TEL-AML1]ETV6-RUNX1; acute lymphoblastic leukemia. Blood. 2011 Jun 9;117(23):6247 LP – 6254.

52. Carranza C, Granados L, Morales O, Jo W, Villagran S, Tinti D, et al. Frequency of the ETV6-RUNX1 , BCR-ABL1 , TCF3-PBX1 , and MLL-AFF1 fusion genes in Guatemalan pediatric acute lymphoblastic leukemia patients and their ethnic associations. 2013;206.

53. Romana SP, Poirel H, Leconiat M, Flexor MA, Mauchauffe M, Jonveaux P, et al. High frequency of t(12;21) in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia. Blood. 1995 Dec 1;86(11):4263 LP – 4269.

54. Karrman K, Forestier E, Andersen K, Autio K, Heim S, Hovland R. High incidence of the ETV6 / RUNX1 fusion gene in paediatric precursor B-cell acute lymphoblastic leukaemias with trisomy 21 as the sole cytogenetic change : a Nordic series of cases diagnosed 1989 – 2005. 2006;352–4.

55. Lee JW, Kim S. Outcome and Prognostic Factors for ETV6 / RUNX1 Positive Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia Treated at a Single Institution in Korea. 2017;49(2):446–53.

56. Wang Y, Zeng H. ETV6 / RUNX1 -positive childhood acute lymphoblastic leukemia in China : excellent prognosis with improved BFM protocol. 2018;4–9.

57. Ma SK, Wan TSK, Cheuk ATC, Fung LF, Chan GCF, Chan SY, et al. Characterization of additional genetic events in childhood acute lymphoblastic leukemia with TEL/AML1 gene fusion: a molecular cytogenetics study.

Leukemia. 2001;15(9):1442–7.

58. BARUCHEL A, CAYUELA JM, BALLERINI P, LANDMAN-PARKER J, CEZARD V, FIRAT H, et al. The majority of myeloid-antigen-positive (My+) childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemias express TEL-AML1 fusion transcripts. Br J Haematol. 2003 Nov 17;99(1):101–6.

59. Balatzenko G, Guenova M, Kalinova I, Belcheva M, Hristozova H, Kaleva V. Simultaneous occurrence of ETV6-RUNX1 and BCR-ABL1 (e1a2) transcripts in a child with B-cell acute lymphoblastic leukemia. Cancer Genet. 2013 Mar;206(3):97–101.

60. Loh ML, Goldwasser MA, Silverman LB, Poon W-M, Vattikuti S, Cardoso A, et al. Prospective analysis of TEL/AML1-positive patients treated on Dana-Farber Cancer Institute Consortium Protocol 95-01. Blood. 2006 Jun 1;107(11):4508 LP – 4513.

61. Forestier E, Heyman M, Mette K, Autio K, Borgstro G, Heim S, et al. Outcome of ETV6 / RUNX1 -positive childhood acute lymphoblastic leukaemia in the NOPHO-ALL-1992 protocol : frequent late relapses but good overall survival. 2008;(February):665–72.

62. Bhojwani D, Pei D, Sandlund JT, Jeha S, Ribeiro RC, Rubnitz JE, et al. ETV6-RUNX1-positive childhood acute lymphoblastic leukemia: improved outcome with contemporary therapy. Leukemia. 2011/08/26. 2012 Feb;26(2):265–70.

63. Rubnitz JE, Wichlan D, Devidas M, Shuster J, Linda SB, Kurtzberg J, et al. Prospective analysis of TEL gene rearrangements in childhood acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group study. J Clin Oncol. 2008 May 1;26(13):2186–91.

64. Forestier E, Schmiegelow K, NOPHO on behalf of the NS of PH and O. The Incidence Peaks of the Childhood Acute Leukemias Reflect Specific Cytogenetic Aberrations. J Pediatr Hematol Oncol. 2006;28(8).

65. Frost B-M, Forestier E, Gustafsson G, Nygren P, Hellebostad M, Jonsson OG, et al. Translocation t(12;21) is related to in vitro cellular drug sensitivity to doxorubicin and etoposide in childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood. 2004 Oct 15;104(8):2452 LP – 2457.

66. Woerden NLR, Pieters R, Loonen AH, Hubeek I, van Drunen E, Beverloo HB, et al. TEL/AML1 gene fusion is related to in vitro drug sensitivity for L-asparaginase in childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood. 2000 Aug 1;96(3):1094 LP – 1099.

67. Hunger SP. Chromosomal translocations involving the E2A gene in acute lymphoblastic leukemia: clinical features and molecular pathogenesis. Blood. 1996 Feb 15;87(4):1211 LP – 1224.

68. Wiemels JL, Leonard BC, Wang Y, Segal MR, Hunger SP, Smith MT, et al. Site-specific translocation and evidence of postnatal origin of the t(1;19) E2A-PBX1 fusion in childhood acute lymphoblastic leukemia. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002/11/01. 2002 Nov 12;99(23):15101–6.

69. Shearer BM, Flynn HC, Knudson RA, Ketterling RP. Interphase FISH to detect PBX1/E2A fusion resulting from the der(19)t(1;19)(q23;p13.3) or t(1;19)(q23;p13.3) in paediatric patients with acute lymphoblastic leukaemia. Br J Haematol. 2005 Mar 21;129(1):45–52.

70. Pui C-H, Relling M V, Downing JR. Acute Lymphoblastic Leukemia. N Engl J Med. 2004 Apr 8;350(15):1535–48.

71. Pui C, JT S, Pei D, al et. Results of therapy for acute lymphoblastic leukemia in black and white children. JAMA. 2003 Oct 15;290(15):2001–7.

72. Kager L, Lion T, Attarbaschi A, Koenig M, Strehl S, Haas OA, et al. Incidence and outcome of TCF3-PBX1-positive acute lymphoblastic leukemia in Austrian children. Haematologica. 2007 Nov 1;92(11):1561 LP – 1564.

73. Pui CH, Williams DL, Kalwinsky DK, Look AT, Melvin SL, Dodge RK, et al. Cytogenetic features and serum lactic dehydrogenase level predict a poor treatment outcome for children with pre-B-cell leukemia. Blood. 1986 Jun 1;67(6):1688 LP – 1692.

74. Crist WM, Carroll AJ, Shuster JJ, Behm FG, Whitehead M, Vietti TJ, et al. Poor prognosis of children with pre-B acute lymphoblastic leukemia is associated with the t(1;19)(q23;p13): a Pediatric Oncology Group study. Blood. 1990 Jul 1;76(1):117 LP – 122.

75. Jeha S, Pei D, Raimondi SC, Onciu M, Campana D, Cheng C, et al. Increased risk for CNS relapse in pre-B cell leukemia with the t(1;19)/TCF3-PBX1. Leukemia. 2009/03/12. 2009 Aug;23(8):1406–9.

76. Felice MS, Gallego MS, Alonso CN, Alfaro EM, Guitter MR, Bernasconi AR, et al. Prognostic impact of t(1;19)/ TCF3–PBX1 in childhood acute lymphoblastic leukemia in the context of Berlin–Frankfurt–Münster-based protocols. Leuk Lymphoma. 2011 Jul 1;52(7):1215–21. A

77. Asai D, Imamura T, Yamashita Y, Suenobu S, Moriya-Saito A, Hasegawa D, et al. Outcome of TCF3-PBX1 positive pediatric acute lymphoblastic leukemia patients in Japan: a collaborative study of Japan Association of Childhood Leukemia Study (JACLS) and Children's Cancer and Leukemia Study Group (CCLSG). Cancer Med. 2014/02/28. 2014 Jun;3(3):623–31.

78. Yen H-J, Chen S-H, Chang T-Y, Yang C-P, Lin D-T, Hung I-J, et al. Pediatric acute lymphoblastic leukemia with t(1;19)/TCF3-PBX1 in Taiwan. Pediatr Blood Cancer. 2017 Apr 24;64(10):e26557.

79. Pui C-H, Evans WE. Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia. N Engl J Med. 2006 Jan 12;354(2):166–78.

80. Aricò M, Valsecchi MG, Camitta B, Schrappe M, Chessells J, Baruchel A, et al. Outcome of Treatment in Children with Philadelphia Chromosome–Positive Acute Lymphoblastic Leukemia. N Engl J Med. 2000 Apr 6;342(14):998–1006.

81. WM C, AJ C, Shuster J, JF J, Head D, Borowitz M, et al. Philadelphia chromosome positive childhood acute lymphoblastic leukemia: Clinical and cytogenetic characteristics and treatment outcome. A Pediatric Oncology Group study. Vol. 76, Blood. 1990. 489–494 p.

82. Burmeister T, Schwartz S, Bartram CR, Gökbuget N, Hoelzer D, Thiel E. Patients' age and BCR-ABL frequency in adult B-precursor ALL: a retrospective analysis from the GMALL study group. Blood. 2008 Aug 1;112(3):918 LP – 919.

83. ROWLEY JD. A New Consistent Chromosomal Abnormality in Chronic Myelogenous Leukaemia identified by Quinacrine Fluorescence and Giemsa Staining. Nature. 1973 Jun 1;243:290.

84. Klein A de, Kessel AG van, Grosveld G, Bartram CR, Hagemeijer A, Bootsma D, et al. A cellular oncogene is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. Nature. 1982 Dec 23;300:765.

85. Quintás-Cardama A, Cortes J. Molecular biology of bcr-abl1–positive chronic myeloid leukemia. Blood. 2009 Feb 19;113(8):1619 LP – 1630.

86. Hantschel O. Structure, regulation, signaling, and targeting of abl kinases in cancer. Genes Cancer. 2012 May;3(5–6):436–46.

87. Notta F, Mullighan CG, Wang JCY, Poeppl A, Doulatov S, Phillips LA, et al. Evolution of human BCR–ABL1 lymphoblastic leukaemia-initiating cells. Nature. 2011 Jan 19;469:362.

88. Pastorczak A, Górniak P, Sherborne A, Hosking F, Trelińska J, Lejman M, et al. Role of 657del5 NBN mutation and 7p12.2 (IKZF1), 9p21 (CDKN2A), 10q21.2 (ARID5B) and 14q11.2 (CEBPE) variation and risk of childhood ALL in the Polish population. Leuk Res. 2011 Nov 1;35(11):1534–6.

89. Linabery AM, Blommer CN, Spector LG, Davies SM, Robison LL, Ross JA. ARID5B and IKZF1 variants, selected demographic factors, and childhood acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Oncology Group. Leuk Res. 2013/05/18. 2013 Aug;37(8):936–42.

90. Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, Ohno S, Segal GM, Fanning S, et al. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr–Abl positive cells. Nat Med. 1996 May 1;2:561.

91. Druker BJ, Sawyers CL, Kantarjian H, Resta DJ, Reese SF, Ford JM, et al. Activity of a Specific Inhibitor of the BCR-ABL Tyrosine Kinase in the Blast Crisis of Chronic Myeloid Leukemia and Acute Lymphoblastic Leukemia with the Philadelphia Chromosome. N Engl J Med. 2001 Apr 5;344(14):1038–42.

92. Schultz KR, Bowman WP, Aledo A, Slayton WB, Sather H, Devidas M, et al. Improved early event-free survival with imatinib in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: a children's oncology group study. J Clin Oncol. 2009/10/05. 2009 Nov 1;27(31):5175–81.

93. Schultz KR, Carroll A, Heerema NA, Bowman WP, Aledo A, Slayton WB, et al.

Long-term follow-up of imatinib in pediatric Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: Children's Oncology Group study AALL0031. Leukemia. 2014/01/20. 2014 Jul;28(7):1467–71.

94. Rives S, Estella J, Gómez P, López-Duarte M, de Miguel PG, Verdeguer A, et al. Intermediate dose of imatinib in combination with chemotherapy followed by allogeneic stem cell transplantation improves early outcome in paediatric Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukaemia (ALL): results of the Spanish Cooperative G. Br J Haematol. 2011 Jun 28;154(5):600–11.

95. Aricò M, Schrappe M, Hunger SP, Carroll WL, Conter V, Galimberti S, et al. Clinical outcome of children with newly diagnosed Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia treated between 1995 and 2005. J Clin Oncol. 2010/09/27. 2010 Nov 1;28(31):4755–61.

96. O'Brien SG, Guilhot F, Larson RA, Gathmann I, Baccarani M, Cervantes F, et al. Imatinib Compared with Interferon and Low-Dose Cytarabine for Newly Diagnosed Chronic-Phase Chronic Myeloid Leukemia. N Engl J Med. 2003 Mar 13;348(11):994–1004.

97. Kantarjian H, Shah NP, Hochhaus A, Cortes J, Shah S, Ayala M, et al. Dasatinib versus Imatinib in Newly Diagnosed Chronic-Phase Chronic Myeloid Leukemia. N Engl J Med. 2010 Jun 10;362(24):2260–70.

98. Saglio G, Kim D-W, Issaragrisil S, le Coutre P, Etienne G, Lobo C, et al. Nilotinib versus Imatinib for Newly Diagnosed Chronic Myeloid Leukemia. N Engl J Med. 2010 Jun 10;362(24):2251–9.

99. Ottmann OG, Larson RA, Kantarjian HM, le Coutre PD, Baccarani M, Hochhaus A, et al. Phase II study of nilotinib in patients with relapsed or refractory Philadelphia chromosome—positive acute lymphoblastic leukemia. Leukemia. 2012 Nov 9;27:1411.

100. Cortes JE, Kim D-W, Pinilla-Ibarz J, le Coutre P, Paquette R, Chuah C, et al. A phase 2 trial of ponatinib in Philadelphia chromosome-positive leukemias. N Engl J Med. 2013/11/01. 2013 Nov 7;369(19):1783–96.

101. Pfeifer H, Lange T, Wystub S, Wassmann B, Maier J, Binckebanck A, et al. Prevalence and dynamics of bcr-abl kinase domain mutations during imatinib

treatment differ in patients with newly diagnosed and recurrent bcr-abl positive acute lymphoblastic leukemia. Leukemia. 2012 Jan 9;26:1475.

102. Chang BH, Willis SG, Stork L, Hunger SP, Carroll WL, Camitta BM, et al. Imatinib resistant BCR-ABL1 mutations at relapse in children with Ph+ ALL: a Children's Oncology Group (COG) study. Br J Haematol. 2012/02/02. 2012 May;157(4):507–10.

103. Hu Y, Swerdlow S, Duffy TM, Weinmann R, Lee FY, Li S. Targeting multiple kinase pathways in leukemic progenitors and stem cells is essential for improved treatment of Ph+ leukemia in mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006/10/31. 2006 Nov 7;103(45):16870–5.

104. Kastner P, Dupuis A, Gaub M-P, Herbrecht R, Lutz P, Chan S. Function of Ikaros as a tumor suppressor in B cell acute lymphoblastic leukemia. Am J Blood Res. 2013 Jan 17;3(1):1–13.

105. Pfeifer H, Wassmann B, Bethge W, Dengler J, Bornhäuser M, Stadler M, et al. Randomized comparison of prophylactic and minimal residual disease-triggered imatinib after allogeneic stem cell transplantation for BCR–ABL1-positive acute lymphoblastic leukemia. Leukemia. 2012 Dec 5;27:1254.

106. Chen H, Liu K, Xu L, Liu D, Chen Y, Zhao X, et al. Administration of imatinib after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation may improve disease-free survival for patients with Philadelphia chromosome-positive acute lymphobla stic leukemia. J Hematol Oncol. 2012 Jun 8;5:29.

107. Lafage-Pochitaloff M, Baranger L, Hunault M, Cuccuini W, Lefebvre C, Bidet A, et al. Impact of cytogenetic abnormalities in adults with Ph-negative B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. Blood. 2017 Oct 19;130(16):1832–44.

108. Biondi A, Cimino G, Pieters R, Pui C-H. Biological and therapeutic aspects of infant leukemia. Blood. 2000 Jul 1;96(1):24 LP – 33.

109. Harrison CJ, Haas O, Harbott J, Biondi A, Stanulla M, Trka J, et al. Detection of prognostically relevant genetic abnormalities in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia: recommendations from the Biology and Diagnosis Committee of the International Berlin-Frankfürt-Münster study group. Br J Haematol. 2010 Aug 4;151(2):132–42.

110. Brown P. Treatment of infant leukemias: challenge and promise. Hematol Am Soc Hematol Educ Progr. 2013;2013:596–600.

111. Mancini M, Scappaticci D, Cimino G, Nanni M, Derme V, Elia L, et al. A comprehensive genetic classification of adult acute lymphoblastic leukemia (ALL): analysis of the GIMEMA 0496 protocol. Blood. 2005 May 1;105(9):3434 LP – 3441.

112. Harrison CJ, Hills RK, Moorman A V, Grimwade DJ, Hann I, Webb DKH, et al. Cytogenetics of Childhood Acute Myeloid Leukemia: United Kingdom Medical Research Council Treatment Trials AML 10 and 12. J Clin Oncol. 2010 Jun 1;28(16):2674–81.

113. Sansone R, Negri D. Cytogenetic features of neonatal leukemias. Cancer Genet Cytogenet. 1992;63(1):56–61.

114. Mahmoud HH, Ridge SA, Behm FG, Pui C-H, Ford AM, Raimondi SC, et al. Intrauterine monoclonal origin of neonatal concordant acute lymphoblastic leukemia in monozygotic twins. Med Pediatr Oncol. 2018 Nov 26;24(2):77–81.

115. Gale KB, Ford AM, Repp R, Borkhardt A, Keller C, Eden OB, et al. Backtracking leukemia to birth: Identification of clonotypic gene fusion sequences in neonatal blood spots. Proc Natl Acad Sci. 1997 Dec 9;94(25):13950 LP – 13954.

116. Muntean AG, Hess JL. The pathogenesis of mixed-lineage leukemia. Annu Rev Pathol. 2011/10/17. 2012;7:283–301.

117. Meyer C, Burmeister T, Gröger D, Tsaur G, Fechina L, Renneville A, et al. The MLL recombinome of acute leukemias in 2017. Leukemia. 2017/08/08. 2018 Feb;32(2):273–84.

118. Sam TN, Kersey JH, Linabery AM, Johnson KJ, Heerema NA, Hilden JM, et al. MLL gene rearrangements in infant leukemia vary with age at diagnosis and selected demographic factors: a Children's Oncology Group (COG) study. Pediatr Blood Cancer. 2011/07/28. 2012 Jun;58(6):836–9.

119. Steinhilber D, Marschalek R. How to effectively treat acute leukemia patients bearing MLL-rearrangements ? Biochem Pharmacol. 2018;147:183–90.

120. Andersson AK, Ma J, Wang J, Chen X, Gedman AL, Dang J, et al. The landscape

of somatic mutations in infant MLL-rearranged acute lymphoblastic leukemias. Nat Genet. 2015/03/02. 2015 Apr;47(4):330–7.

121. Sanjuan-Pla A, Bueno C, Prieto C, Acha P, Stam RW, Marschalek R, et al. Revisiting the biology of infant t(4;11)/MLL-AF4+ B-cell acute lymphoblastic leukemia. Blood. 2015 Dec 17;126(25):2676–85.

122. Pui C-H, Evans WE. A 50-Year Journey to Cure Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. Semin Hematol. 2013;50(3):185–96.

123. Kalina T, Flores-Montero J, van der Velden VHJ, Martin-Ayuso M, Böttcher S, Ritgen M, et al. EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. Leukemia. 2012 Sep 5;26:1986.

124. van der Linden MH, Valsecchi MG, De Lorenzo P, Möricke A, Janka G, Leblanc TM, et al. Outcome of congenital acute lymphoblastic leukemia treated on the Interfant-99 protocol. Blood. 2009 Oct 29;114(18):3764 LP – 3768.

125. Schultz KR, Pullen DJ, Sather HN, Shuster JJ, Devidas M, Borowitz MJ, et al. Prognostic markers from the Pediatric Oncology Group(POG) and Children ' s Cancer Group Risk- and response-based classification of childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia: a combined analysis. 2011;109(3):926–35.

126. Gaynon PS, Angiolillo AL, Carroll WL, Nachman JB, Trigg ME, Sather HN, et al. Long-term results of the children's cancer group studies for childhood acute lymphoblastic leukemia 1983–2002: A Children's Oncology Group Report. Leukemia. 2009 Dec 17;24:285.

127. Van der Velden VHJ, Corral L, Valsecchi MG, Jansen MWJC, De Lorenzo P, Cazzaniga G, et al. Prognostic significance of minimal residual disease in infants with acute lymphoblastic leukemia treated within the Interfant-99 protocol. Leukemia [Internet]. 2009 Feb 12;23:1073.

128. Johansson B, Moorman A V, Haas OA, Watmore AE, Cheung KL, Swanton S, et al. Hematologic malignancies with t(4;11)(q21;q23) – a cytogenetic, morphologic, immunophenotypic and clinical study of 183 cases. Leukemia. 1998 Apr 27;12:779.

129. Kotecha RS, Gottardo NG, Kees UR, Cole CH. The evolution of clinical trials for

infant acute lymphoblastic leukemia. Blood Cancer J. 2014 Apr 11;4(4):e200–e200.

130. Brown P, Pieters R, Biondi A. How I treat infant leukemia. Blood. 2018 Jan 1;

131. Paulsson K, Forestier E, Lilljebjörn H, Heldrup J, Behrendtz M, Young BD, et al. Genetic landscape of high hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010/11/22. 2010 Dec 14;107(50):21719–24.

132. Paulsson K, Johansson B. High hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. Genes, Chromosom Cancer. 2009 May 4;48(8):637–60.

133. Studd JB, Vijayakrishnan J, Yang M, Migliorini G, Paulsson K, Houlston RS. Genetic and regulatory mechanism of susceptibility to high-hyperdiploid acute lymphoblastic leukaemia at 10p21.2. Nat Commun. 2017 Mar 3;8:14616.

134. Harrison CJ, Moorman A V, Broadfield ZJ, Cheung KL, Harris RL, Reza Jalali G, et al. Three distinct subgroups of hypodiploidy in acute lymphoblastic leukaemia. Br J Haematol. 2004 Apr 19;125(5):552–9.

135. Holmfeldt L, Wei L, Diaz-Flores E, Walsh M, Zhang J, Ding L, et al. The genomic landscape of hypodiploid acute lymphoblastic leukemia. Nat Genet. 2013/01/20. 2013 Mar;45(3):242–52.

136. Nachman JB, Heerema NA, Sather H, Camitta B, Forestier E, Harrison CJ, et al. Outcome of treatment in children with hypodiploid acute lymphoblastic leukemia. Blood. 2007 Aug 15;110(4):1112–5.

137. Moorman A V, Robinson H, Schwab C, Richards SM, Hancock J, Mitchell CD, et al. Risk-Directed Treatment Intensification Significantly Reduces the Risk of Relapse Among Children and Adolescents With Acute Lymphoblastic Leukemia and Intrachromosomal Amplification of Chromosome 21: A Comparison of the MRC ALL97/99 and UKALL2003 Trials. J Clin Oncol. 2013 Sep 20;31(27):3389–96.

138. Heerema NA, Carroll AJ, Devidas M, Loh ML, Borowitz MJ, Gastier-Foster JM, et al. Intrachromosomal amplification of chromosome 21 is associated with inferior outcomes in children with acute lymphoblastic leukemia treated in contemporary standard-risk children’s oncology group studies: a report from the

children’s oncology group. J Clin Oncol. 2013/08/12. 2013 Sep 20;31(27):3397–402.

139. Rand V, Parker H, Russell LJ, Schwab C, Ensor H, Irving J, et al. Genomic characterization implicates iAMP21 as a likely primary genetic event in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. Blood. 2011 Jun 23;117(25):6848 LP – 6855.

140. Harrison CJ, Moorman A V, Schwab C, Carroll AJ, Raetz EA, Devidas M, et al. An international study of intrachromosomal amplification of chromosome 21 (iAMP21): cytogenetic characterization and outcome. Leukemia. 2013 Oct 29;28:1015.

141. Schwab CJ, Chilton L, Morrison H, Jones L, Al-Shehhi H, Erhorn A, et al. Genes commonly deleted in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: Association with cytogenetics and clinical features. Haematologica. 2013;98(7):1081–8.

142. Moorman A V, Richards SM, Robinson HM, Strefford JC, Gibson BES, Kinsey SE, et al. Prognosis of children with acute lymphoblastic leukemia (ALL) and intrachromosomal amplification of chromosome 21 (iAMP21). Blood. 2007 Mar 15;109(6):2327 LP – 2330.

143. Harrison CJ. Blood Spotlight on iAMP21 acute lymphoblastic leukemia (ALL), a high-risk pediatric disease. Blood. 2015 Feb 26;125(9):1383 LP – 1386.

144. Iacobucci I, Mullighan CG. Genetic Basis of Acute Lymphoblastic Leukemia. J Clin Oncol. 2017/02/13. 2017 Mar 20;35(9):975–83.

145. Mullighan CG, Su X, Zhang J, Radtke I, Phillips LAA, Miller CB, et al. Deletion of IKZF1 and prognosis in acute lymphoblastic leukemia. N Engl J Med. 2009/01/07. 2009 Jan 29;360(5):470–80.

146. Den Boer ML, van Slegtenhorst M, De Menezes RX, Cheok MH, Buijs-Gladdines JGCAM, Peters STCJM, et al. A subtype of childhood acute lymphoblastic leukaemia with poor treatment outcome: a genome-wide classification study. Lancet Oncol. 2009/01/08. 2009 Feb;10(2):125–34.

147. Roberts KG, Gu Z, Payne-Turner D, McCastlain K, Harvey RC, Chen I-M, et al. High Frequency and Poor Outcome of Philadelphia Chromosome-Like Acute Lymphoblastic Leukemia in Adults. J Clin Oncol. 2016/11/21. 2017 Feb 1;35(4):394–401.

148. Boer JM, Steeghs EMP, Marchante JRM, Boeree A, Beaudoin JJ, Beverloo HB, et al. Tyrosine kinase fusion genes in pediatric BCR-ABL1-like acute lymphoblastic leukemia. Oncotarget. 2016 Nov 22;8(3):4618–28.

149. Roberts KG, Reshmi SC, Harvey RC, Chen I-M, Patel K, Stonerock E, et al. Genomic and outcome analyses of Ph-like ALL in NCI standard-risk patients: a report from the Children's Oncology Group. Blood. 2018 Jan 1;

150. Roberts KG, Pei D, Campana D, Payne-Turner D, Li Y, Cheng C, et al. Outcomes of children with BCR-ABL1–like acute lymphoblastic leukemia treated with risk-directed therapy based on the levels of minimal residual disease. J Clin Oncol. 2014/07/21. 2014 Sep 20;32(27):3012–20.

151. Boer JM, Marchante JRM, Evans WE, Horstmann MA, Escherich G, Pieters R, et al. BCR-ABL1-like cases in pediatric acute lymphoblastic leukemia: a comparison between DCOG/Erasmus MC and COG/St. Jude signatures. Haematologica. 2015 Sep;100(9):e354–7.

152. Lilljebjörn H, Henningsson R, Hyrenius-Wittsten A, Olsson L, Orsmark-Pietras C, von Palffy S, et al. Identification of ETV6-RUNX1-like and DUX4-rearranged subtypes in paediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. Nat Commun. 2016 Jun 6;7:11790.

153. Vaskova M, Mejstrikova E, Kalina T, Martinkova P, Omelka M, Trka J, et al. Transfer of genomics information to flow cytometry: expression of CD27 and CD44 discriminates subtypes of acute lymphoblastic leukemia. Leukemia. 2005 Mar 10;19:876.

154. Zhang J, McCastlain K, Yoshihara H, Xu B, Chang Y, Churchman ML, et al. Deregulation of DUX4 and ERG in acute lymphoblastic leukemia. Nat Genet. 2016/10/24. 2016 Dec;48(12):1481–9.

155. Clappier E, Auclerc M-F, Rapion J, Bakkus M, Caye A, Khemiri A, et al. An intragenic ERG deletion is a marker of an oncogenic subtype of B-cell precursor

acute lymphoblastic leukemia with a favorable outcome despite frequent IKZF1 deletions. Leukemia. 2013 Sep 25;28:70.

156. Hirabayashi S, Ohki K, Nakabayashi K, Ichikawa H, Momozawa Y, Okamura K, et al. ZNF384-related fusion genes define a subgroup of childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia with a characteristic immunotype. Haematologica. 2017 Jan;102(1):118–29.

157. McClure BJ, Heatley SL, Kok CH, Sadras T, An J, Hughes TP, et al. Pre-B acute lymphoblastic leukaemia recurrent fusion, EP300-ZNF384, is associated with a distinct gene expression. Br J Cancer. 2018;118(7):1000–4.

158. Shago M, Abla O, Hitzler J, Weitzman S, Abdelhaleem M. Frequency and outcome of pediatric acute lymphoblastic leukemia with ZNF384 gene rearrangements including a novel translocation resulting in an ARID1B/ZNF384 gene fusion. Pediatr Blood Cancer. 2016 Jul 8;63(11):1915–21.

159. Gu Z, Churchman M, Roberts K, Li Y, Liu Y, Harvey RC, et al. Genomic analyses identify recurrent MEF2D fusions in acute lymphoblastic leukaemia. Nat Commun. 2016 Nov 8;7:13331.

160. Roberts KG, Yang Y-L, Payne-Turner D, Lin W, Files JK, Dickerson K, et al. Oncogenic role and therapeutic targeting of ABL-class and JAK-STAT activating kinase alterations in Ph-like ALL. Blood Adv. 2017 Aug 30;1(20):1657–71.

161. Roberts KG, Li Y, Payne-Turner D, Harvey RC, Yang Y-L, Pei D, et al. Targetable Kinase-Activating Lesions in Ph-like Acute Lymphoblastic Leukemia. N Engl J Med. 2014;371(11):1005–15.

162. Clappier E, Grardel N, Bakkus M, Rapion J, De Moerloose B, Kastner P, 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 Jun 8;29:2154.

163. Hunger SP. Integrated Risk Stratification Using Minimal Residual Disease and Sentinel Genetic Alterations in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. J Clin Oncol. 2017;36(1):JCO.2017.76.050.

164. Pui CH, Pei D, Sandlund JT, Ribeiro RC, Rubnitz JE, Raimondi SC, et al. Long-term results of St Jude Total Therapy Studies 11, 12, 13A, 13B, and 14 for childhood acute lymphoblastic leukemia. Leukemia. 2009/12/10. 2010 Feb;24(2):371–82.

165. Zhang J, Ding L, Holmfeldt L, Wu G, Heatley SL, Easton J, et al. NIH Public Access leukaemia. 2012;481(7380):157–63.

166. Girardi T, Vicente C, Cools J, Keersmaecker K De. The genetics and molecular biology of T-ALL. 2017;129(9):2–4.

167. Cavé H, Suciu S, Preudhomme C, Poppe B, Robert A, Uyttebroeck A, et al. Clinical significance of HOX11L2 expression linked to t(5;14)(q35;q32), of HOX11 expression, and of SIL-TAL fusion in childhood T-cell malignancies: Results of EORTC studies 58881 and 58951. Blood. 2004;103(2):442–50.

168. Mansur MB, Emerenciano M, Brewer L, Sant'ana M, Mendonça N, Thuler LC santos, et al. SIL-TAL1 fusion gene negative impact in T-cell acute lymphoblastic leukemia outcome. Leuk Lymphoma. 2009 Jan 1;50(8):1318–25.

169. Ballerini P, Landman-parker J, Cayuela JM, Asnafi V, Labopin M, Gandemer V, et al. Impact of genotype on survival of children with T-cell acute lymphoblastic leukemia treated according to the French protocol FRALLE-93 : the effect of TLX3 / HOX11L2 gene expression on outcome. 2008;93(11).

170. Pombo-de-oliveira MS. The Profile of Immunophenotype and Genotype Aberrations in Subsets of Pediatric T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. 2019;9(April):1–10.

171. The ETO. L Etters To the. 2016;23(4):471–3.

172. Campana D, Pui C. Evidence-Based Focused Review Minimal residual disease – guided therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia Case presentations. Blood. 2017;129(14):1913–9.

173. Dongen JJM Van, Velden VHJ Van Der, Br M. Minimal residual disease diagnostics in acute lymphoblastic leukemia : need for sensitive , fast , and standardized technologies. 2015;125(26):3996–4009.

174. Kruse A, Abdel-azim N, Kim HN, Ruan Y, Phan V, Ogana H, et al. Minimal

Residual Disease Detection in Acute Lymphoblastic Leukemia. 2020;

175. van Dongen JJM, Macintyre EA, Gabert JA, Delabesse E, Rossi V, Saglio G, et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Leukemia. 1999;13(12):1901–28.

176. Conter V, Bartram CR, Valsecchi MG, Panzer-gru R, Arico M, Zimmermann M, et al. CME article 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(16):3206–14.

177. Campana D, Leung W. Clinical significance of minimal residual disease in patients with acute leukaemia undergoing haematopoietic stem cell transplantation. Br J Haematol. 2013 Jul 1;162(2):147–61.

178. CASPERSSON T, LOMAKKA G, ZECH L. The 24 fluorescence patterns of the human metaphase chromosomes — distinguishing characters and variability. Hereditas. 1971 Mar 1;67(1):89–102.

179. Harrison CJ, Moorman A V, Barber KE, Broadfield ZJ, Cheung KL, Harris RL, et al. Interphase molecular cytogenetic screening for chromosomal abnormalities of prognostic significance in childhood acute lymphoblastic leukaemia: a UK Cancer Cytogenetics Group Study. Br J Haematol. 2005 May 1;129(4):520–30.

180. Campana D. Minimal Residual Disease in Acute Lymphoblastic Leukemia. ASH Educ Progr B. 2010 Dec 4;2010(1):7–12.

181. Pui C-H, Pei D, Raimondi SC, Coustan-Smith E, Jeha S, Cheng C, et al. Clinical impact of minimal residual disease in children with different subtypes of acute lymphoblastic leukemia treated with Response-Adapted therapy. Leukemia. 2017;

182. Izraeli S. Application of genomics for risk stratification of childhood acute lymphoblastic leukaemia: from bench to bedside? Br J Haematol. 2010 Oct 1;151(2):119–31.

183. Harrison CJ, Haas O, Harbott J, Biondi A, Stanulla M, Trka J, et al. Detection of

prognostically relevant genetic abnormalities in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia: Recommendations from the Biology and Diagnosis Committee of the International Berlin-Frankfürt-Münster study group. British Journal of Haematology. 2010.

184. Terwilliger T, Abdul-Hay M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. Blood Cancer J. 2017;

185. Tasian SK, Hunger SP. Genomic characterization of paediatric acute lymphoblastic leukaemia: an opportunity for precision medicine therapeutics. Br J Haematol. 2017;176(6):867–82.

186. Bene MC, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A, et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). In: Leukemia. 1995. p. 1783—1786.

187. Gonzalez Garcia JR, Meza-Espinoza JP. Use of the International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN). Blood. 2006 Dec 1;108(12):3952 LP – 3953.

188. Isotalo PA, Wells GA, Donnelly JG. Neonatal and fetal methylenetetrahydrofolate reductase genetic polymorphisms: an examination of C677T and A1298C mutations. Am J Hum Genet. 2000/08/24. 2000 Oct;67(4):986–90.

189. Clark TG, Bradburn MJ, Love SB, Altman DG. Survival analysis part I: basic concepts and first analyses. Br J Cancer. 2003 Jul 21;89(2):232–8.

190. Kaplan EL, Meier P. Nonparametric Estimation from Incomplete Observations. J Am Stat Assoc. 1958 Nov 8;53(282):457–81.

191. Cox DR. Regression Models and Life-Tables. J R Stat Soc Ser B. 1972 Nov 8;34(2):187–220.

192. Bradburn MJ, Clark TG, Love SB, Altman DG. Survival Analysis Part II: Multivariate data analysis – an introduction to concepts and methods. Br J Cancer. 2003;89(3):431–6.

193. Pearson K. X. On the criterion that a given system of deviations from the

probable in the case of a correlated system of variables is such that it can be reasonably supposed to have arisen from random sampling. London, Edinburgh, Dublin Philos Mag J Sci. 1900 Jul 1;50(302):157–75.

194. Fisher RA. The Conditions Under Which χ^2 Measures the Discrepancey Between Observation and Hypothesis. J R Stat Soc. 1924 Nov 8;87(3):442–50.

195. Boyd WC. A Nomogram for the “Student”-Fisher t Test. J Am Stat Assoc. 1969 Nov 8;64(328):1664–7.

196. Ferrri A, Freschi M, Dell’Oro S. Prognostic significance of the histopathologic. Am J Surg Pathol. 201AD;25(3):95–102.

197. Rubnitz JE, Downing JR, Pui CH, Shurtleff SA, Raimondi SC, Evans WE, et al. TEL gene rearrangement in acute lymphoblastic leukemia: a new genetic marker with prognostic significance. J Clin Oncol. 1997 Mar 1;15(3):1150–7.

198. Avigad S, Kuperstein G, Zilberstein J, Liberzon E, Stark B, Gelernter I, et al. TEL-AML1 fusion transcript designates a favorable outcome with an intensified protocol in childhood acute lymphoblastic leukemia [1]. Leukemia. 1999;13(3):481–3.

199. Artigas A CG, Cabrera C ME, Melo A A, Páez F E, Arriagada M M, Astete A C, et al. Frecuencia de los genes de fusión TEL/AML1 y BCR/ABL en pacientes pediátricos con leucemia linfoblástica aguda . Vol. 134, Revista médica de Chile . scielocl ; 2006. p. 1367–76.

200. Borkhardt A, Cazzaniga G, Viehmann S, Valsecchi MG, Ludwig WD, Burci L, et al. Incidence and Clinical Relevance of TEL/AML1 Fusion Genes in Children With Acute Lymphoblastic Leukemia Enrolled in the German and Italian Multicenter Therapy Trials. Blood. 1997 Jul 15;90(2):571 LP – 577.

201. Zuna J, Hrušák O, Kalinová M, Mužíková K, Starý J, Trka J, et al. TEL/AML1 positivity in childhood ALL: average or better prognosis? Leukemia. 1999;13(1):22–4.

202. Magalhães IQ, Pombo-de-Oliveira MS, Bennett CA, Cordoba JC, Dobbin J, Ford AM, et al. TEL–AML1 fusion gene frequency in paediatric acute lymphoblastic leukaemia in Brazil. Br J Haematol. 2000 Oct 1;111(1):204–7.

203. Liang D-C, Shih L-Y, Yang C-P, Hung I-J, Chen S-H, Jaing T-H, et al. Multiplex RT-PCR assay for the detection of major fusion transcripts in Taiwanese children with B-lineage acute lymphoblastic leukemia. Med Pediatr Oncol. 2002 Jul 1;39(1):12–7.

204. Tsang KS, Li CK, Chik KW, Shing MMK, Tsoi WC, Ng MHL, et al. TEL/AML1 rearrangement and the prognostic significance in childhood acute lymphoblastic leukemia in Hong Kong. Am J Hematol. 2001 Oct 1;68(2):91–8.

205. Martínez-Ramírez A, Urioste M, Contra T, Cantalejo A, Tavares A, Portero JA, et al. Fluorescence in situ hybridization study of TEL/AML1 fusion and other abnormalities involving TEL and AML1 genes. Correlation with cytogenetic findings and prognostic value in children with acute lymphoblastic leukemia. Haematologica. 2001;86(12):1245–53.

206. Jamil A, Theil KS, Kahwash S, Ruymann FB, Klopfenstein KJ. TEL/AML-1 fusion gene: its frequency and prognostic significance in childhood acute lymphoblastic leukemia. Cancer Genet Cytogenet. 2000 Oct 15;122(2):73–8.

207. Spathas DH, Stewart J, Singer IO, Theriault A, Bovey M, Connor JM. Detection of t(12;21) in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia by Fluorescence In Situ Hybridization. Cancer Genet Cytogenet. 1999 Apr 1;110(1):7–13.

208. Eguchi-Ishimae M, Eguchi M, Tanaka K, Hamamoto K, Ohki M, Ueda K, et al. Fluorescence in situ Hybridization Analysis of 12;21 Translocation in Japanese Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. Japanese J Cancer Res 1998 Jul 1;89(7):783–8.

209. Chopra A, Soni S, Verma D, Kumar D, Dwivedi R, Vishwanathan A, et al. Prevalence of common fusion transcripts in acute lymphoblastic leukemia: A report of 304 cases. Asia Pac J Clin Oncol. 2015;11(4):293–8.

210. García-Sanz, Alaejos, Orfão, Rasillo, Chillón, Tabernero, et al. Low frequency of the TEL/AML1 fusion gene in acute lymphoblastic leukaemia in Spain. Br J Haematol. 1999 Dec 1;107(3):667–9.

211. Roberts KG. Genetics and prognosis of ALL in children vs adults. Hematology. 2018 Nov 30;2018(1):137–45.

212. Pui CH, Raimondi SC, Hancock ML, Rivera GK, Ribeiro RC, Mahmoud HH, et al. Immunologic, cytogenetic, and clinical characterization of childhood acute lymphoblastic leukemia with the t(1;19) (q23; p13) or its derivative. J Clin Oncol. 1994 Dec 1;12(12):2601–6.

213. Andersen MK, Autio K, Barbany G, Borgström G, Cavelier L, Golovleva I, et al. Paediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia with t(1;19)(q23;p13): clinical and cytogenetic characteristics of 47 cases from the Nordic countries treated according to NOPHO protocols. Br J Haematol. 2011 Oct 1;155(2):235–43.

214. Moorman A V. The clinical relevance of chromosomal and genomic abnormalities in B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. Blood Rev. 2012;26(3):123–35.

215. Carobolante F, Chiaretti S, Skert C, Bassan R. Practical guidance for the management of acute lymphoblastic leukemia in the adolescent and young adult population. 2020;1–25.

216. Bernt K, Hunger S. Current Concepts in Pediatric Philadelphia Chromosome-Positive Acute Lymphoblastic Leukemia. Front Oncol. 2014 Mar 25;4:54.

217. Pandita A, Harish R, Digra SK, Raina A, Sharma AA, Koul A. Molecular cytogenetics in childhood acute lymphoblastic leukemia: a hospital-based observational study. Clin Med Insights Oncol. 2015 Mar 24;9:39–42.

218. Moorman A V. New and emerging prognostic and predictive genetic biomarkers in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. Haematologica. 2016 Apr;101(4):407–16.

219. Borkhardt BA, Cazzaniga G, Viehmann S, Valsecchi MG, Ludwig WD, Burci L, et al. Incidence and Clinical Relevance of TEL/AML1 Fusion Genes in Children With Acute Lymphoblastic Leukemia Enrolled in the German and Italian Multicenter Therapy Trials. 2018;

220. Alsadeq A, Schewe DM. Acute lymphoblastic leukemia of the central nervous system: on the role of PBX1. Haematologica. 2017 Apr;102(4):611–3.

221. Britten O, Ragusa D, Tosi S, Mostafa Kamel Y. MLL-Rearranged Acute

Leukemia with t(4;11)(q21;q23)—Current Treatment Options. Is There a Role for CAR-T Cell Therapy? Vol. 8, Cells . 2019.

222. Prieto C, López-Millán B, Roca-Ho H, Stam RW, Romero-Moya D, Rodríguez-Baena FJ, et al. NG2 antigen is involved in leukemia invasiveness and central nervous system infiltration in MLL-rearranged infant B-ALL. Leukemia. 2017/09/25. 2018 Mar;32(3):633–44.

223. Borkhardt A, Wuchter C, Viehmann S, Pils S, Teigler-Schlegel A, Stanulla M, et al. Infant acute lymphoblastic leukemia – combined cytogenetic, immunophenotypical and molecular analysis of 77 cases. Leukemia. 2002;16(9):1685–90.

224. Pui C-H, Boyett JM, Relling M V, Harrison PL, Rivera GK, Behm FG, et al. Sex Differences in Prognosis for Children With Acute Lymphoblastic Leukemia. J Clin Oncol. 1999 Mar 1;17(3):818.

225. Vrooman LM, Silverman LB. Childhood acute lymphoblastic leukemia: update on prognostic factors. Curr Opin Pediatr. 2009;21(1).

226. Mao R, Hu S, Zhang Y, Du F, Zhang Y, Liu Y, et al. Prognostic Nomogram for Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: A Comprehensive Analysis of 673 Patients. Front Oncol. 2020 Sep 10;10:1673.

227. Lawson, Harrison, Richards, Oakhill, Stevens, Eden, et al. The UK experience in treating relapsed childhood acute lymphoblastic leukaemia: a report on the Medical Research Council UKALLR1 study. Br J Haematol. 2000 Mar 1;108(3):531–43.

228. Hoffmann J, Krumbholz M, Gutiérrez HP, Fillies M, Szymansky A, Bleckmann K, et al. High sensitivity and clonal stability of the genomic fusion as single marker for response monitoring in ETV6-RUNX1-positive acute lymphoblastic leukemia. Pediatr Blood Cancer. 2019 Aug 1;66(8):e27780.

229. Sun C, Chang L, Zhu X. Pathogenesis of ETV6/RUNX1-positive childhood acute lymphoblastic leukemia and mechanisms underlying its relapse. Oncotarget. 2017;8(21):35445–59.

230. Locatelli F, Zugmaier G, Mergen N, Bader P, Jeha S, Schlegel P-G, et al.

Blinatumomab in pediatric patients with relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia: results of the RIALTO trial, an expanded access study. Blood Cancer J. 2020;10(7):77.

231. Pui C-H, Howard SC. Current management and challenges of malignant disease in the CNS in paediatric leukaemia. Lancet Oncol. 2008;9(3):257–68.

232. Biondi A, Schrappe M, De Lorenzo P, Castor A, Lucchini G, Gandemer V, 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. 2012/08/14. 2012 Sep;13(9):936–45.

233. Möricke A, Zimmermann M, Valsecchi MG, Stanulla M, Biondi A, Mann G, et al. Dexamethasone vs prednisone in induction treatment of pediatric ALL: results of the randomized trial AIEOP-BFM ALL 2000. Blood. 2016 Apr 28;127(17):2101–12.

234. Place AE, Stevenson KE, Harris MH, Weinberg OK, Vrooman LM, Hunt SK, et al. Outcome of childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL): Results from DFCI protocol 05-001. J Clin Oncol. 2014 May 20;32(15_suppl):10015.

235. Vrooman LM, Blonquist TM, Harris MH, Stevenson KE, Place AE, Hunt SK, et al. Refining risk classification in childhood B acute lymphoblastic leukemia: results of DFCI ALL Consortium Protocol 05-001. Blood Adv. 2018 Jun 26;2(12):1449–58.

236. Berry DA, Zhou S, Higley H, Mukundan L, Fu S, Reaman GH, et al. Association of Minimal Residual Disease With Clinical Outcome in Pediatric and Adult Acute Lymphoblastic Leukemia: A Meta-analysis. JAMA Oncol. 2017/07/13. 2017 Jul 13;3(7):e170580–e170580.

237. Giovanni Cazzaniga, Paola De Lorenzo, Julia Alten, Silja Röttgers, Jeremy Hancock, Vaskar Saha, et al. Predictive value of minimal residual disease in Philadelphia-chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia treated with imatinib in the European intergroup study of post-induction treatment of Philadelphia-chromosome-positive acute lymphoblastic leukem. Haematologica. 2018 Jan 1;103(1 SE-Articles):107–15.

238. Wood BL. Principles of minimal residual disease detection for hematopoietic neoplasms by flow cytometry. Cytom Part B Clin Cytom. 2016 Jan 1;90(1):47–53.

239. Pui C-H, Pei D, Coustan-Smith E, Jeha S, Cheng C, Paul Bowman W, et al. Clinical Utility of Sequential Minimal Residual Disease Measurements in the Context of Risk-based Therapy in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: a Prospective Study. Lancet Oncol. 2015;16(4):465–74.

240. Schrappe M, Bleckmann K, Zimmermann M, Biondi A, Möricke A, Locatelli F, et al. Reduced-Intensity Delayed Intensification in Standard-Risk Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia Defined by Undetectable Minimal Residual Disease: Results of an International Randomized Trial (AIEOP-BFM ALL 2000). J Clin Oncol. 2017 Nov 17;36(3):244–53.

241. Maria J, Rocha C, Xavier SG, Eduardo M, Souza DL, Godoy J, et al. Current Strategies for the Detection of Minimal Residual Disease in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. Mediterr J Hematol Infect Dis. 2016;8:e2016024.

242. Olsen M, Madsen HO, Hjalgrim H, Gregers J, Rostgaard K, Schmiegelow K. Preleukemic TEL-AML1–positive Clones at Cell Level of 10−3 to 10−4 do not Persist into Adulthood. J Pediatr Hematol Oncol. 2006;28(11).

243. Schäfer D, Olsen M, Lähnemann D, Stanulla M, Slany R, Schmiegelow K, et al. Five percent of healthy newborns have an ETV6-RUNX1 fusion as revealed by DNA-based GIPFEL screening. Blood. 2018 Feb 15;131(7):821–6.

244. Slayton WB, Schultz KR, Kairalla JA, Devidas M, Mi X, Pulsipher MA, et al. Dasatinib Plus Intensive Chemotherapy in Children, Adolescents, and Young Adults With Philadelphia Chromosome-Positive Acute Lymphoblastic Leukemia: Results of Children's Oncology Group Trial AALL0622. J Clin Oncol. 2018/05/29. 2018 Aug 1;36(22):2306–14.

245. Wassmann B, Pfeifer H, Goekbuget N, Beelen DW, Beck J, Stelljes M, et al. Alternating versus concurrent schedules of imatinib and chemotherapy as front-line therapy for Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia (Ph+ALL). Blood. 2006;108(5):1469–77.

246. Schrappe M, Valsecchi MG, Bartram CR, Schrauder A, Panzer-Grümayer R,

Möricke A, et al. Late MRD response determines relapse risk overall and in subsets of childhood T-cell ALL: results of the AIEOP-BFM-ALL 2000 study. Blood. 2011 Aug 25;118(8):2077–84.

247. Gabert J, Beillard E, van der Velden VHJ, Bi W, Grimwade D, Pallisgaard N, et al. Standardization and quality control studies of ‘real-time’ quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia – A Europe Against Cancer Program. Leukemia. 2003;17(12):2318–57.

248. Qin X, Zhang M, Liu W. Application of minimal residual disease monitoring in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia. 2018;6885–95.

249. Ontario HQ. Minimal Residual Disease Evaluation in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: A Clinical Evidence Review. Ont Health Technol Assess Ser . 2016 Mar 8;16(7):1–52.

Източници на български език:

250. Юрукова, Н., Честота и демографска характеристика на генетичните подтипове Остра лимфобластна левкемия в детска възраст при пациенти на КДКХО – София, Списание Педиатрия, Том LIX, 1/2019