

# Univerzita Karlova v Praze

## Přírodovědecká fakulta

**Studijní program:** Molekulární biologie a biochemie organismů

**Studijní obor:** Speciální chemicko-biologické obory



**Nicole Matějčková**

Heteroploidie v buňkách kostní dřeně u dětí s akutní lymfoblastickou leukemií (ALL)

Heteroploidy in bone marrow cells of children with acute lymphoblastic leukemia (ALL)

**Bakalářská práce**

**Vedoucí závěrečné práce:** Doc. RNDr. Zuzana Zemanová, CSc.

Praha, 2014



**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a samostatně a že jsem uvedl/a všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 7.5.2014

Nicole Matějčková

.....

## **Poděkování**

Chtěla bych poděkovat doc. RNDr. Zuzaně Zemanové, CSc. za odborné vedení, cenné rady a za pomoc při zpracování této práce. Dále bych ráda poděkovala prof. Ing. Kyře Michalové, DrSc. za možnost vykonávat odbornou praxi v laboratoři. Mé poděkování patří i pracovníkům laboratoře CNC ÚLBDL VFN a 1.LF UK v Praze za spolupráci a pomoc při zpracování dat. V neposlední řadě bych ráda poděkovala rodině za trpělivost a podporu při studiu.

## Abstrakt ČJ

Akutní lymfoblastická leukemie je nejčastějším nádorovým onemocněním u dětí. Jedná se o heterogenní onemocnění, u kterého byla popsána celá řada rekurentních chromosomových aberací. Mezi nejvýznamnější aberace spojené s dobrou prognózou patří translokace t(12;21)(p13;q22), při které vzniká fúzní gen *ETV6/RUNX1* a tzv. hyperdiploidie. Naopak nejvýznamnější prognosticky nepříznivé nálezy jsou translokace t(9;22)(q34;q11) vedoucí ke vzniku fúzního genu *BCR/ABL1*, přestavby *MLL* genu a tzv. hypodiploidie.

Tzv. heteroploidie, patří mezi nejčastější cytogenetické nálezy u dětských ALL.

Charakteristickým rysem je nenáhodné zmnožení či ztráta chromozomů z diploidní sady.

K nejvýznamnějším nálezům patří hyperdiploidie, při které dochází k nenáhodnému zmnožení některých chromozomů. Hyperdiploidie je spojena s velmi dobrou prognózou, vliv dalších strukturních aberací na prognózu je předmětem dalšího zkoumání. Další prognosticky významnou skupinou v rámci heteroploidii je hypodiploidie. Jedná se o poměrně vzácný nález, který je doprovázen obvykle velmi špatnou prognózou. U hypodiploidie dochází k nenáhodným ztrátám chromozomů. Hypodiploidie může být v některých případech maskovaná zdvojeným hyperdiploidním klonem, což ztěžuje její identifikaci.

Přesná a včasná cytogenetická analýza heteroploidních buněk je velmi důležitá, protože přispívá ke správnému určení diagnózy a prognózy onemocnění a tím i k volbě odpovídající terapie.

**Klíčová slova:** dětská leukemie, akutní lymfoblastická leukemie, heteroploidie, modální počet hyperdiploidie, hypodiploidie, karyotyp, cytogenetika, FISH

## Abstrakt AJ

Acute lymphoblastic leukemia is the most common type of cancer in children. It is a very heterogenous disease in which many recurrent chromosomal abnormalities have been described. The most important chromosomal abnormalities associated with a good prognosis are t(12;21)(p13;q22) which result in *ETV6/RUNX1* fusion and hyperdiploidy. On the contrary findings suggesting a poor prognosis are t(9;22)(q34;q11) leading to fusion gene *BCR/ABL1*, *MLL* rearrangements or hypodiploidy.

Heteroploidy is one of the most frequent findings in childhood ALL. It is characterised by nonrandom gain or loss of chromosomes from diploid cells. One of the most important findings in childhood ALL is hyperdiploidy where a non-random gain of chromosomes is present. Hyperdiploidy has a favorable prognosis and the impact of additional structural aberrations requires further research. Another prognostically important group of heteroploidy is hypodiploidy. It is a quite rare finding and has a very poor outcome. There are non-random acquired chromosome losses observed in hypodiploid cells. Hypodiploid cell line may be masked with a doubled hyperdiploid clone which makes it difficult to identify.

Proper and early cytogenetical analysis of heteroploid cells is very important as it contributes assigning correct diagnosis and risk stratification, making it easier to choose adequate therapy.

**Key words:** childhood leukemia, acute lymphoblastic leukemia, heteroploidy, modal number, hyperdiploid, hypodiplid, karyotype, cytogenetics, FISH

## Seznam zkratek

|           |   |
|-----------|---|
| ALL       | Akutní lymfoblastická leukemie  |
| AML       | Akutní myeloidní leukemie   |
| array CGH | komparativní genomová hybridizace na čipu   |
| B-ALL     | ALL vycházející z B-lymfocytů   |
| BAC       | bacterial artificial chromosome   |
| DAPI      | fluorescenční barvivo ( <i>2-(4-amidinofenyl)-1H-indol-6-carboxamidin</i> )                                 |
| del       | delece  |
| DI        | DNA index   |
| DNA       | deoxyribonukleová kyselina  |
| EFS       | přežití bez události ( <i>event free survival</i> )   |
| FACS      | průtokový cytometr ( <i>flow cytometry cell sorter</i> )  |
| FISH      | fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace  |
| HeH       | vysoká hyperdiploidie ( <i>High Hyperdiploidy</i> )   |
| HeL       | nízká hyperdiploidie ( <i>Low Hyperdiploidy</i> )   |
| HoH       | vysoká hypodiploidie ( <i>High Hypodiploidy</i> )   |
| HoL       | nízká hypodiploidie ( <i>Low Hypodiploidy</i> )   |
| ISCN      | International System of Cytogenetic Nomenclature  |
| LOH       | ztráta heterozygoty   |
| mBAND     | mnohobarevné pruhování  |
| mFISH     | mnohobarevná fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace   |
| p         | krátké rameno chromozomu  |
| q         | dlouhé rameno chromozomu  |
| RFLP      | Polymorfismus délky restrikčních fragmentů ( <i>restriction fragment length polymorphism</i> )              |
| SNP array | čipová technologie založená na jednonukleotidových polymorfismech ( <i>single nucleotide polymorphism</i> ) |
| T-ALL     | ALL vycházející z T-lymfocytů   |
| TT        | téměř triploidní/tetraploidní buněčná linie ( <i>near triploid/tetraploid</i> )                             |
| WBC       | množství bílých krvinek ( <i>White Blood Cells</i> )  |
| wUPIDs    | celochromozomové uniparentální isodisomie   |

## Obsah

|   |    |
|---|----|
| Úvod .....  | 1  |
| Leukemie u dětí .....   | 2  |
| Akutní lymfoblastická leukemie (ALL) .....                                      | 5  |
| Chromozomové abnormality u dětí s B-ALL .....                                   | 5  |
| Heteroploidie u dětských B-ALL .....  | 7  |
| Hyperdiploidie.....   | 8  |
| Nízká hyperdiploidie (HeL) .....  | 10 |
| Vysoká hyperdiploidie (HeH) .....   | 10 |
| Téměř triploidní/tetraploidní buněčná linie (near-triploid/tetraploid, TT)..... | 13 |
| Hypodiploidie.....  | 15 |
| Vysoká hypodiploidie (HoH) .....  | 15 |
| Nízká hypodiploidie (HoL) .....   | 17 |
| Téměř haploidní buněčná linie .....   | 17 |
| Použité metody.....   | 21 |
| Konvenční cytogenetická analýza .....   | 21 |
| Molekulárně cytogenetické metody .....  | 22 |
| FISH (fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace) .....                           | 22 |
| Modifikace FISH.....  | 23 |
| array CGH .....   | 24 |
| Závěr.....  | 27 |
| Použitá literatura .....  | 28 |



## Úvod

Akutní lymfoblastická leukemie (ALL) patří mezi nejčastější nádorová onemocnění u dětí. Vzniká v důsledku poruchy proliferace u jedné hematopoetické buňky z lymfoidní linie, která vede k rozvoji maligního klonu. Jedná se o velmi heterogenní onemocnění. Cytogenetická analýza nádorových buněk kostní dřeně představuje jeden z hlavních nástrojů pro zařazení pacientů do diagnostických podskupin a pro volbu vhodného léčebného postupu. V kombinaci s fluorescenční *in situ* hybridizací (FISH) a dalšími metodami pomáhá k identifikaci chromozomových aberací, které nacházíme asi u 90 % případů ALL.<sup>1</sup> Získané chromozomové aberace mohou být dvojího typu, početní a strukturní, a u většiny z nich známe jejich prognostický význam. I přes výrazné pokroky v diagnostice i léčbě tohoto onemocnění dochází u 15-20% dětí s ALL k relapsu.<sup>2</sup>

V bakalářské práci se budu věnovat zejména odchylkám v modálním počtu chromozomů (tzv. heteroploidii). Heteroploidie nacházíme asi u 40 % nemocných a jedná se tak o jeden z nejčastějších cytogenetických nálezů. V nádorových buňkách pozorujeme nenáhodný zisk či ztrátu jednoho i více chromozomů, ale mechanismus tohoto děje není zcela objasněn. Nejvýznamnější skupinu tvoří pacienti s vysokou hyperdiploidii, kteří mají více než 50 chromozomů a relativně nejlepší prognózu. Vysokou hyperdiploidii nacházíme asi u 30% pacientů.

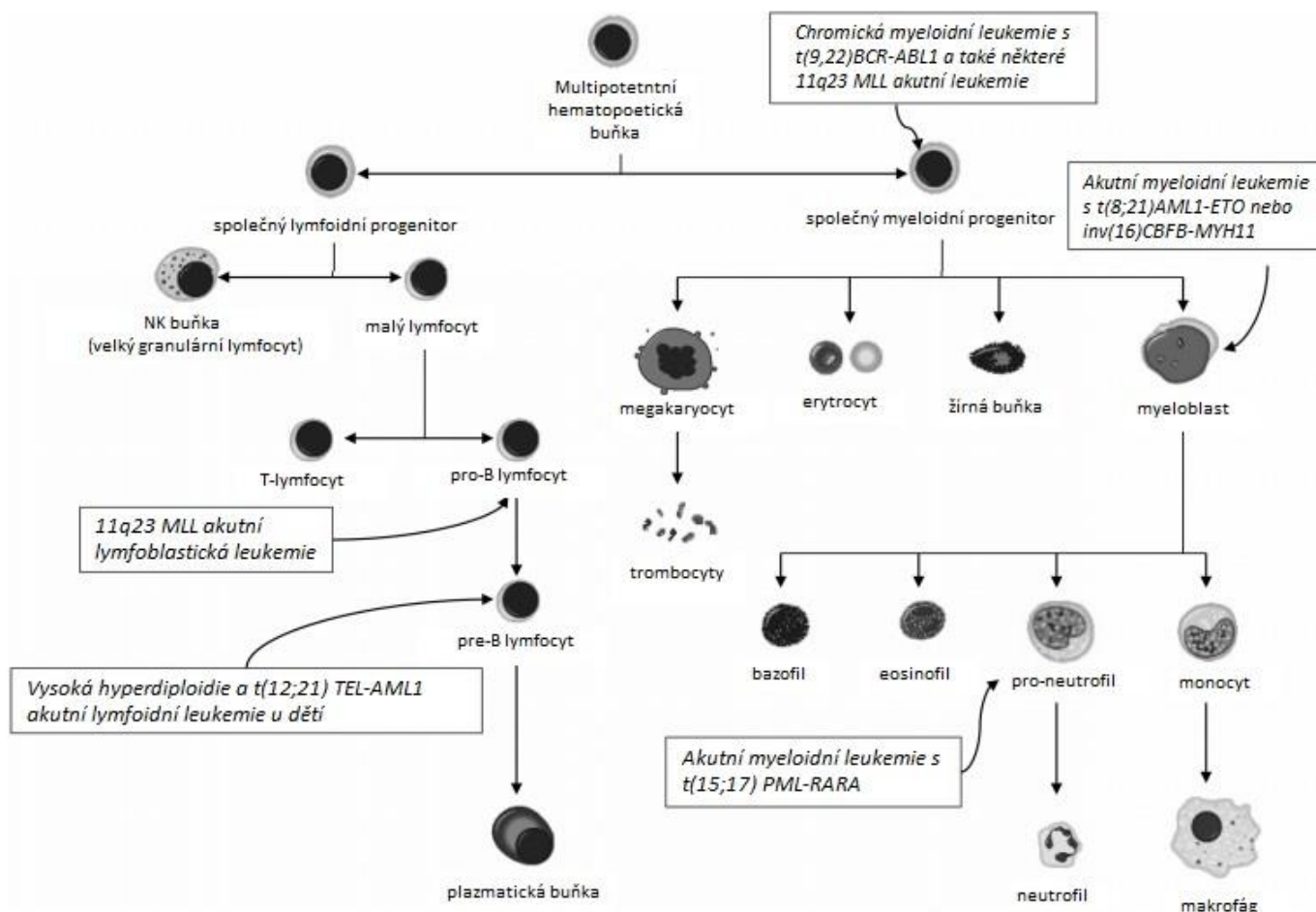
Dalším významným nálezem je hypodiploidie s méně než 46 chromozomy, která je naopak spojována se špatnou odpovědí na léčbu a velmi špatnou prognózou. Přesto, že se jedná o relativně vzácný nález (~5-7 % nemocných), jeho včasná detekce je vzhledem k prognostickému významu velmi důležitá. Správná identifikace hypodiploidního klonu je však v řadě případů velmi obtížná. Překážkou ve správné diagnostice může být např. maskování hypodiploidního klonu jeho zdvojenou hyperdiploidní kopií. Do skupiny s hyperdiploidii dále řadíme poměrně vzácnou skupinu nemocných s téměř triploidním/tetraploidním počtem chromozomů, u kterých pozorujeme odlišné chování nemoci a ne zcela jasnou prognózu.<sup>2</sup>

## Leukemie u dětí

Leukemie je nejčastějším nádorovým onemocněním u dětí a tvoří přibližně 30% všech dětských nádorů. Ročně onemocní asi 150 dětí na 1 mil. obyvatel. Nejvíce nemocných je mezi 2. a 5. rokem věku a častěji onemocní chlapci než dívky (1,2:1). Signifikantně nižší výskyt leukemií nacházíme u obyvatel na středním východě a u afroamerické populace po celém světě. Ostatní etnické či geografické rozdíly v incidenci leukemií nejsou významné. Obecně je vyšší výskyt leukemií spojován s rozvinutými státy.<sup>3</sup>

Dětské leukemie jsou velice variabilní jak v biologickém původu, tak v klinickém projevu. Genetické abnormality pozorujeme asi u 90 % případů dětských leukemií. U jednotlivých subtypů pozorujeme odlišný vývoj nemoci – věk nemocných, odpověď na léčbu spojenou s prognózou onemocnění, citlivost na různá chemoterapeutika atd. Akutní leukemie u dětí dělíme na ALL, která má původ v lymfoidní vývojové řadě a tvoří asi 80-85 % dětských leukemií, a AML, vznikající změněnou proliferací myeloidní linie krevních buněk, která zastupuje asi 15 % dětských leukemií. Jednotlivé typy leukemií rozlišujeme na základě imunofenotypu, krevního obrazu, karyotypu a dalších parametrů.<sup>4,5</sup>

Leukemie jsou charakteristické klonálním vývojem patologických buněk (blastů), které se kumulují zejména v kostní dřeni a infiltrují periferní krev. Leukemogeneze začíná zpravidla nádorovou transformací jediné buňky, ze které se vyvíjí maligní klon. Leukemie proto postihuje pouze konkrétní linii krevních buněk, v závislosti na okamžiku mutace v průběhu maturace krevních elementů (obrázek 1). Z počátku nemoci nacházíme identické aberace ve všech nádorových buňkách. S postupem onemocnění může docházet ke vzniku dalších aberací a heterogenita genomu nádorových buněk tak může být ukazatelem stádia vývoje nemoci či její agresivity.<sup>6</sup> Získané chromozomové abnormality úzce korelují se subtypem nemoci. Díky cytogenetickému vyšetření můžeme pacienty zařadit do diagnostických podskupin a přispět k volbě nejvhodnějšího léčebného postupu a určit prognózu onemocnění.<sup>7</sup>



**Obrázek 1: Hematopoéza.** Krevní buňky jsou odvozené od multipotettních progenitorů. Téměř každá zde zmíněná buňka má neoplastický protějšek, který prezentuje stejné morfologické vlastnosti. (Wiemels a kol., 2012)<sup>14</sup>

Dětské leukemie vznikají pravděpodobně dvou-krokovým mechanismem. K první mutaci může docházet již v prenatálním vývoji, ale pro rozvoj leukemie je nutná ještě další událost, která samotné onemocnění spustí. Ionizující záření je jediným známým faktorem, který může vyvolat rozvoj leukemie *de novo*.<sup>8</sup> Některé další faktory mohou mít klíčový vliv za předpokladu předchozí mutace v konkrétních genech – zpravidla protoonkogenech, tumorsupresorech a dalších regulátorech buněčného cyklu a dělení. Tyto faktory mohou při tzv. tiché fázi (*silent phase*) nemoci fungovat jako její spouštěče. Mezi ně patří zejména infekce a imunitní reakce na ně, neionizující záření, vybrané chemikálie (např. benzen) a v neposlední řadě také dědičné genetické faktory.<sup>9</sup>

Teorii prenatálního původu některých leukemií podporuje velmi časný rozvoj onemocnění. Například ALL se změnami *MLL* genu u dětí se nejčastěji rozvine již v 6 měsících věku. Teorii podporují i výsledky novorozeneckých vyšetření (tzv. suché kapky krve na novorozeneckých kartičkách) či vyšetření pupečnickové krve, které dokazují přítomnost mutací již před či v době narození a tím i jejich prenatální původ. Genetické abnormality se mohou vyskytovat i u zcela zdravých jedinců, u nichž se leukemie nikdy nerozvine.<sup>10,11,12</sup>

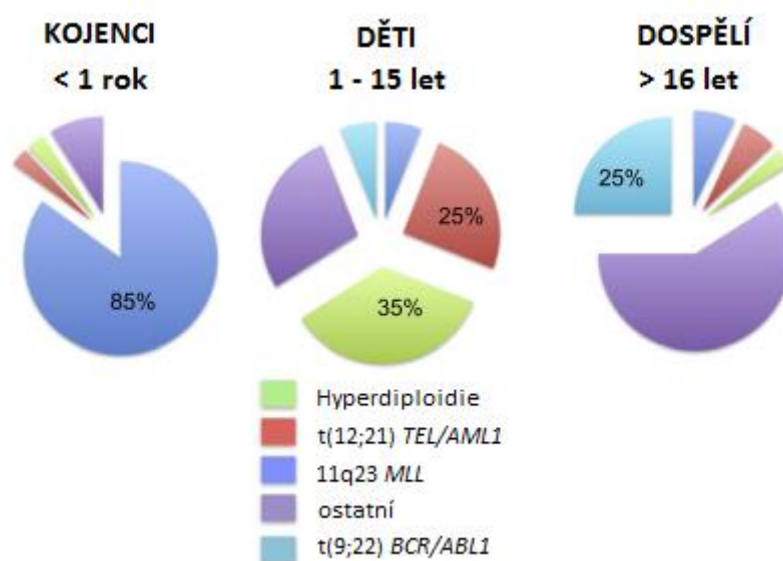
Do skupiny se zvýšeným rizikem vzniku leukemie patří děti s dědičnými genetickými poruchami, jako je Downův syndrom, neurofibromatóza<sup>13</sup>, Fanconio anemie, Bloomův či Shwachman-Diamondův syndrom. S přítomností genetických abnormalit roste pravděpodobnost vzniku dalších mutací<sup>14</sup> a tyto děti mají i horší prognózu oproti dětem bez dědičné genetické choroby. Například u Downova syndromu se u 3-10% novorozenců rozvine porucha myeloproliferace, ze které se v důsledku další mutace v 13-33% stane leukemie. Děti s Downovým syndromem mají asi 500krát vyšší pravděpodobnost vzniku AML a 20krát vyšší pravděpodobnost vzniku ALL než děti bez vrozené genetické poruchy.<sup>15</sup>

## Akutní lymfoblastická leukemie (ALL)

Akutní lymfoblastická leukemie je nejrozšířenější formou dětské leukemie, zastupující asi 85 % všech dětských leukemií. Jedná se o heterogenní lymfoproliferativní onemocnění. Díky moderní terapii se v současné době daří vyléčit až 80 % dětí s tímto onemocněním. Včasná a přesná diagnóza je klíčová pro zařazení do diagnostické skupiny a pro volbu odpovídající léčby. Akutní lymfoblastickou leukemii můžeme dále rozdělit na B-ALL a T-ALL, v závislosti na prekursoru, ze kterého vycházejí. U dětí častěji nacházíme B-ALL, u kterých má cytogenetický nález signifikantní význam, na rozdíl od T-linie ALL.<sup>16</sup>

### Chromozomové abnormality u dětí s B-ALL

Chromozomové změny mohou být strukturní či numerické. Nejdůležitějšími prognostickými faktory spojenými s dobrou prognózou jsou translokace  $t(12;21)(p13;q22)$  vedoucí ke vzniku fúzního genu *ETV1/RUNX6* (dříve *TEL/AML1*) - a hyperdiploidie. Naopak nejčastější nálezy spojené se špatnou prognózou jsou translokace  $t(9;22)(q34;q11)$ , kterou vzniká fúzní gen *BCR/ABL1* na tzv. Philadelphském chromozomu, přestavby *MLL* genu (11q23) a hypodiploidie.<sup>17</sup>



**Obrázek 2:** Rozložení subtypů akutní lymfoblastické leukemie podle věku.

Grafy ukazují značné rozdíly ve frekvenci výskytu cytogenetických abnormalit u leukemií v závislosti na věku. (Wiemels a kol., 2012)<sup>14</sup>

## Rozdělení do prognostických skupin dle cytogenetického nálezu

### Dobrá prognóza

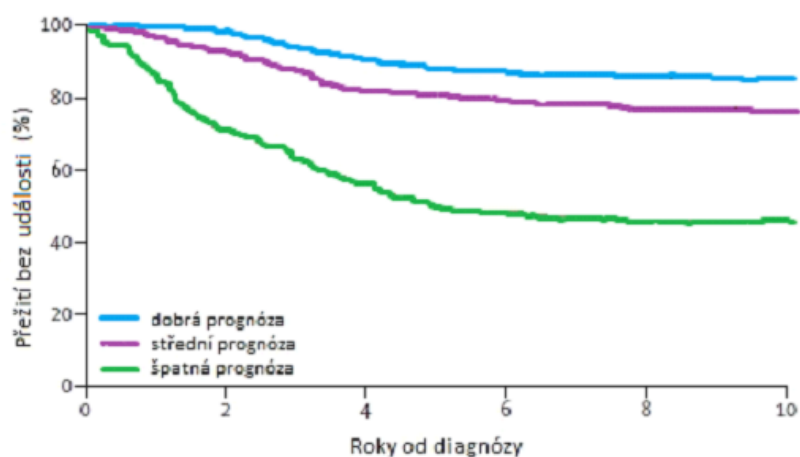
- **Vysoká hyperdiploidie** (51-66 chromozomů)
- *ETV6/RUNX1* (dříve *TEL/AML1*) vzniklý t(12;21)(p13;q22)

### Střední prognóza

- *TCF3/PBX1* vzniklý t(1;19)(q23;p13)
- *IGH-CEBP*
- *IGH-ID4*
- del(6q)
- abnormální 9p
- abnormální 11q
- dup(1q)
- -7
- dic(9;20)(p13;q11)
- dic(9;12)(p11-21;p11-13)
- ostatní abnormality
- normální karyotyp

### Špatná prognóza

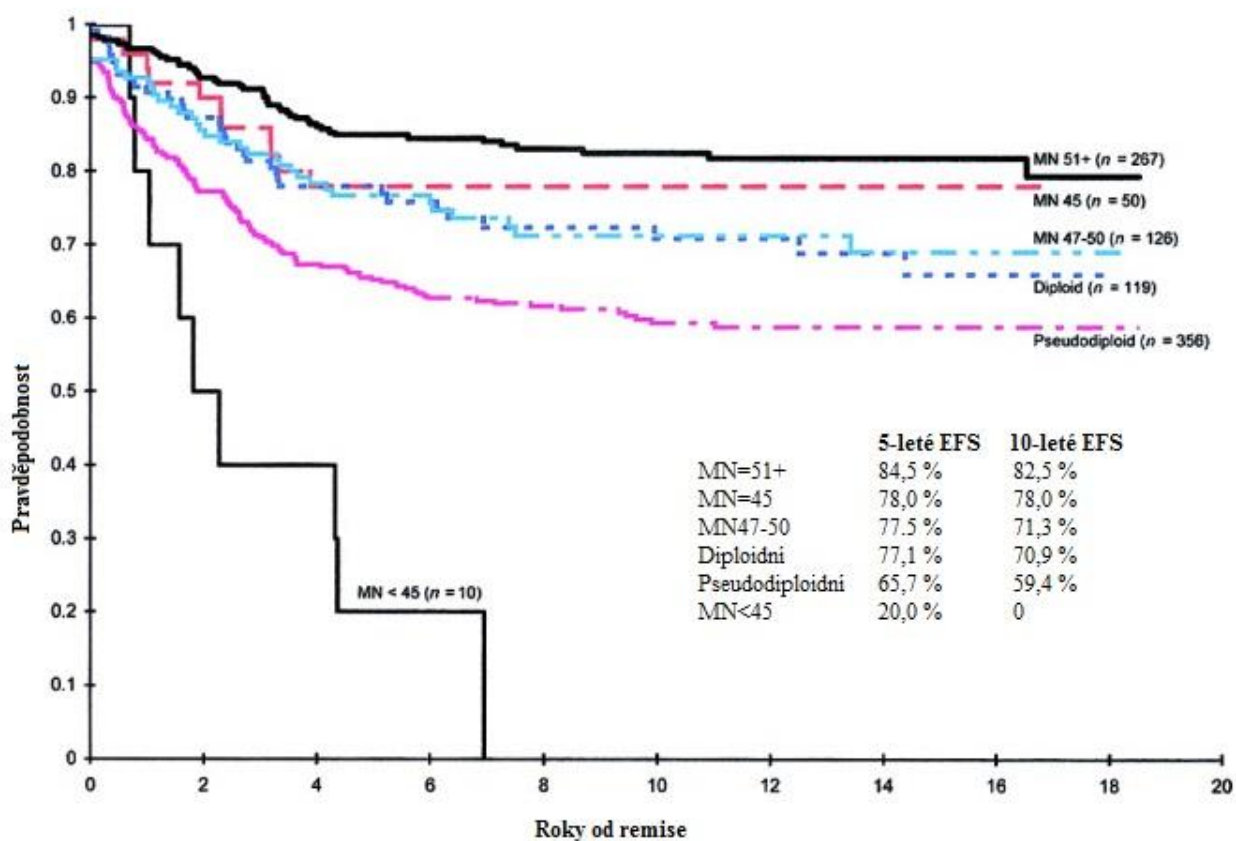
- *BCR/ABL1* vzniklý t(9;22)(q34;q11.2)
- iAMP21 (intra-chromozomální amplifikace 21)
- přestavby *MLL*
- **téměř haploidní** linie (<30 chromozomů)
- **nízká hypodiploidie** (30-39 chromozomů)
- *TCF3/HLF* vzniklý t(17;19)(q23;p13)
- abnormální 17p
- delece 13q



**Obrázek 3:** Rozdělení nemocných s ALL do prognostických skupin dle cytogenetického nálezu a graf přežití bez události dle Kaplan-Meyera. Podle UK Medical Council ALL97/99. (Moorman a kol., 2010)<sup>2</sup>

## Heteroploidie u dětských B-ALL

Změny v modálním počtu chromozomů u dětí s ALL reprezentují asi 40 % případů, což je řadí mezi nejčastější cytogenetické nálezy. Jedná se o nenáhodný zisk či ztrátu jednoho či více chromozomů. Nejvýznamnější skupinu tvoří tzv. hyperdiploidie s >46 chromozomy. Naopak v hypodiploidním karyotypu dochází ke ztrátám chromozomů a jejich počet je nižší než 46. Tento nález bývá spojován s velmi špatnou prognózou.<sup>18</sup> Podle některých studií mají strukturní či komplexní chromozomové aberace v heteroploidním karyotypu významný vliv na klinický vývoj onemocnění a zhoršují jeho prognózu.<sup>19,20</sup> Jiné studie tento fenomén nepotvrzují a modální počet chromozomů považují za nejdůležitější prognostický faktor.<sup>2, 21</sup>



**Obrázek 4:** Doba přežití bez události (EFS) dle modálního počtu chromozomů u pacientů s akutní lymfoblastickou leukémií (ALL). MN=modální počet chromozomů. (Raimondi a kol, 2003)<sup>42</sup>

## Hyperdiploidie

Za hyperdiploidii označujeme nález s klonálním výskytem více než 46 chromozomů. Jedná se o nenáhodné zmnožení jednoho či několika chromozomů. Hyperdiploidie se nejčastěji vyskytuje u pre-B-ALL a B-ALL (kolem 95 %), vzácně ji ale nacházíme i u T-ALL (kolem 5 %). Podle celkového počtu chromozomů, který koreluje s hodnotou DNA indexu (DI) dělíme hyperdiploidie do několika skupin. Nález 47-50 chromozomů ( $DI < 1.16$ ) nazýváme nízká hyperdiploidie (HeL – *low hyperdiploidy*), více než 50 chromozomů ( $1.16 \leq DI < 1.50$ ) pak označujeme jako vysoká hyperdiploidie (HeH – *high hyperdiploidy*). Nejčastějším nálezem bývá 51-65 chromozomů. Za téměř triploidní (TT – *near triploid/tetraploid*) označujeme nález 68-80 chromozomů ( $1.50 \leq DI < 1.75$ ), resp. za téměř tetraploidní označujeme karyotyp s více jak 80 chromozomy ( $DI \geq 1.75$ ). Nejčastěji zmnožené chromozomy (u >50 % případů) jsou 4, 6, 8, 10, 14, 17, 18, 20, 21 a X. Většinou se, až na chromozom 21, vyskytují ve třech kopiích. Chromozom 21 je obecně nejčastěji zmnoženým chromozomem a může se vyskytovat ve 3-4 kopiích. Naopak vzácně jsou popisovány trisomie chromozomů 1, 2, 3, 12 a 16.<sup>22</sup>

Přesto, že získání jednotlivých chromozomů je nenáhodný, mechanismus vzniku hyperdiploidie není zatím zcela objasněn. Existuje několik teorií: ztráta několika chromozomů z původně tetraploidní buňky, postupný získání chromozomů v následných buněčných cyklech či získání několika chromozomů během jednoho abnormálního buněčného dělení. V malém procentu případů může dojít ke zmnožení téměř haploidního klonu (23-29 chromozomů). Současné studie se nejvíce přiklánějí k mechanismu simultánního získání několika chromozomů, ale ani ostatní teorie nebyly dosud přesvědčivě vyvráceny.<sup>23</sup>

Jeden z možných mechanismů vzniku hyperdiploidie zahrnuje nejprve vznik tetraploidní buňky zdvojením zdravé diploidní a následně postupnou ztrátou chromozomů. Předpokládali bychom tedy, že u chromozomů přítomných ve dvou kopiích najdeme asi u 1/3 z nich ztrátu heterozygoty, za předpokladu ztráty chromozomu nezávisle na parentálním původu či jiných externích vlivech. V praxi bylo ale ověřeno, že v naprosté většině případů (99-100 %) je heterozygotní konstituce u diploidních chromozomů zachována, tedy jeden z homologů je paternálního a jeden maternálního původu. Další molekulárně genetické analýzy ukázaly na možný vznik hyperdiploidie touto cestou asi u 30 % případů, ale pro zpřesnění těchto dat je nezbytné v této oblasti provést cílenější výzkum u více pacientů.<sup>22,24</sup>



Další možnost vzniku hyperdiploidie se popisuje jako postupný zisk chromozomů během několika buněčných dělení. Tato cesta by dobře korelovala s teorií klonálního vývoje u leukemií, avšak neshoduje se s cytogenetickými nálezy. Zpravidla nenacházíme vedlejší subklony, které by nutně musely vznikat při tomto vývoji maligního klonu. Na molekulární úrovni bychom očekávali u 66 % poměr alel tetrasomických chromozomů u heterozygotů 1:3, kde chromozom od jednoho z rodičů nese nějakou mutaci či dává buňce proliferativní výhodu. Paulsson a kol. (2009) uvádí pouze 2 známé případy, u kterých byl na základě molekulární analýzy tento alelický poměr popsán. Z toho vyplývá, že tetrasomie nejpravděpodobněji vznikla dvojitou nondisjunkcí během jednoho dělení buňky, nikoliv jako následná událost.<sup>25</sup>

Zejména z důvodu velmi charakteristického nenáhodného vzoru, který nacházíme v hyperdiploidních karyotypech, se může zdát poslední teorie simultánního zisku nadpočetných chromozomů nepravděpodobná. Dosud zjištěná data ale ukazují, že nejčastěji vzniká hyperdiploidie právě během jediného abnormálního buněčného dělení, kdy dochází k zisku všech nadpočetných chromozomů.<sup>22,25</sup> Předpokládáme zachování poměru alel u disomických i tetrasomických chromozomů 2:2 a u trisomií pak alelický poměr 2:1. Takovýto výsledek dostáváme nejčastěji i z klinických vyšetření, a proto se udává, že tímto mechanismem může vznikat asi 70 % případů hyperdiploidie.<sup>22</sup>

Patofyziologickou podstatu zisku několika konkrétních chromozomů během jednoho buněčného dělení se dosud nepodařilo objasnit, je ale možné, že je to následek kancerogenního procesu či působení exogenních faktorů, spíše než náhodná porucha dělicího aparátu buňky či mutace na samotných chromozomech.<sup>22</sup> Ukazuje se, že hyperdiploidní karyotyp nemusí být samostatně příčinou rozvoje onemocnění. Je pravděpodobné, že musí dojít k dalším kryptickým aberacím či mutacím, které jsou pro leukemogenezi nezbytné. Tyto aberace ale nebyly přesně popsány.<sup>22</sup>

### *Nízká hyperdiploidie (HeL)*

Nízká hyperdiploidie se liší od vysoké hyperdiploidie nejen počtem a vzorem nadpočetných chromozomů, ale i klinickými ukazateli. Je charakterizována počtem 47-50 chromozomů a nacházíme ji asi u 10-15 % dětí s ALL. Dle současných zjištění je spojována se středně dobrou až mírně lepší prognózou oproti pacientům s počtem 46 a méně chromozomů (4 leté EFS asi 75 %). Nejčastěji nacházíme zmnožené chromozomy X, 8, 10 a 21. Ve většině případů (asi 70 %) nacházíme 47 chromozomů, ale tomuto nálezu není přikládán zvláštní prognostický význam. Výjimku tvoří děti s ALL s trisomií 21 (47,XX/XY,+21) jako jedinou abnormalitou v nádorových buňkách, u nichž pozorujeme lepší prognózu v rámci skupiny se 47-50 chromozomy.<sup>26</sup>

U pacientů s nízkou hyperdiploidií také poměrně často (i u více než 50 %) nacházíme strukturní aberace v hyperdiploidním karyotypu. Nejčastěji dochází ke změnám na 1q, 6q, 12p a 19p. Mírně horší prognózu oproti vysoké hyperdiploidii může ovlivňovat mnoho faktorů. Pravděpodobné ale je, že celkové množství genetické informace i přítomné strukturní aberace jsou velmi důležité pro vývoj a povahu onemocnění.<sup>26,27</sup>

### *Vysoká hyperdiploidie (HeH)*

Vysoká hyperdiploidie je charakterizovaná více než 50 chromozomy a vyskytuje se u 25-30 % dětských B-ALL. Nález vysoké hyperdiploidie je spojován s obecně nejlepší prognózou ve srovnání s ostatními cytogenetickými nálezy (6-leté EFS asi 90 %). Včasný záchyt a diagnóza jsou velmi důležité, protože můžeme v těchto případech zvolit mírnější léčbu a tím eliminovat její pozdní následky.<sup>28</sup>

Heteroploidní klon bývá poměrně silně zastoupen ve vzorku kostní dřeně, ale i přes to se mnohdy nepodaří hyperdiploidii pomocí pruhovacích technik zachytit. Příčinou může být výskyt kryptického klonu, který se nedělí v *in vitro* podmínkách nebo nález nedostatečného počtu kvalitních mitóz. Kromě konvenční cytogenetické analýzy se k detekci hyperdiploidií používá metoda stanovení DNA indexu pomocí průtokové cytometrie (FACS). Průtokový cytometr detekuje celkové množství DNA v buňce a srovnává naměřené hodnoty se stanoveným normálem (DI=1). Výsledkem je hodnota poměrného množství DNA v patologických buňkách, u hyperdiploidií tedy hodnoty vyšší než 1.<sup>29</sup> Výrazně lepší záchyt patologických klonů umožňuje metoda I-FISH, pomocí které zároveň přesně identifikujeme zmožené chromozomy a počet jejich kopií.<sup>30</sup> Tento postup umožňuje odhalit 1/3 případů,

kteře měly v konvenční analýze normální výsledek a dokonce 60 % u kterých nebylo předchozí konvenční vyšetření úspěšné.<sup>31</sup>

Možných vysvětlení velmi dobré prognózy a dobré reakce na léčbu u dětí s vysokou hyperdiploidií je několik. Buňky s vysokou hyperdiploidií vykazují vyšší citlivost k některým chemoterapeutikům, jako jsou kortikosteroidy, L-asparagináza či metotrexát. Je známo, že tyto leukemické buňky v sobě kumulují metotrexát kvůli zvýšené expresi jeho přenašečů, což výrazně zvyšuje jeho účinek.<sup>25</sup> Další souvislost s dobrou odpovědí na léčbu může mít zvýšená aktivace apoptotických drah v leukemických buňkách, kterou pozorovali na *in vitro* kulturách specificky u buněk s vysokou hyperdiploidií Ch. Ito a kol. (1999). Z jejich pozorování také vyplývá, že tyto buňky mají horší schopnost růstu mimo mikroklima kostní dřeně.<sup>32</sup>

Prognóza dětí s vysokou hyperdiploidií se může lišit dle konkrétního počtu chromozomů. Podle některých autorů mají nejlepší prognózu pacienti s počtem 58-66 chromozomů. S klesajícím počtem chromozomů dochází k mírnému zhoršení prognózy. Přesto se celková šance na přežití pohybuje okolo 90 %.<sup>28</sup>

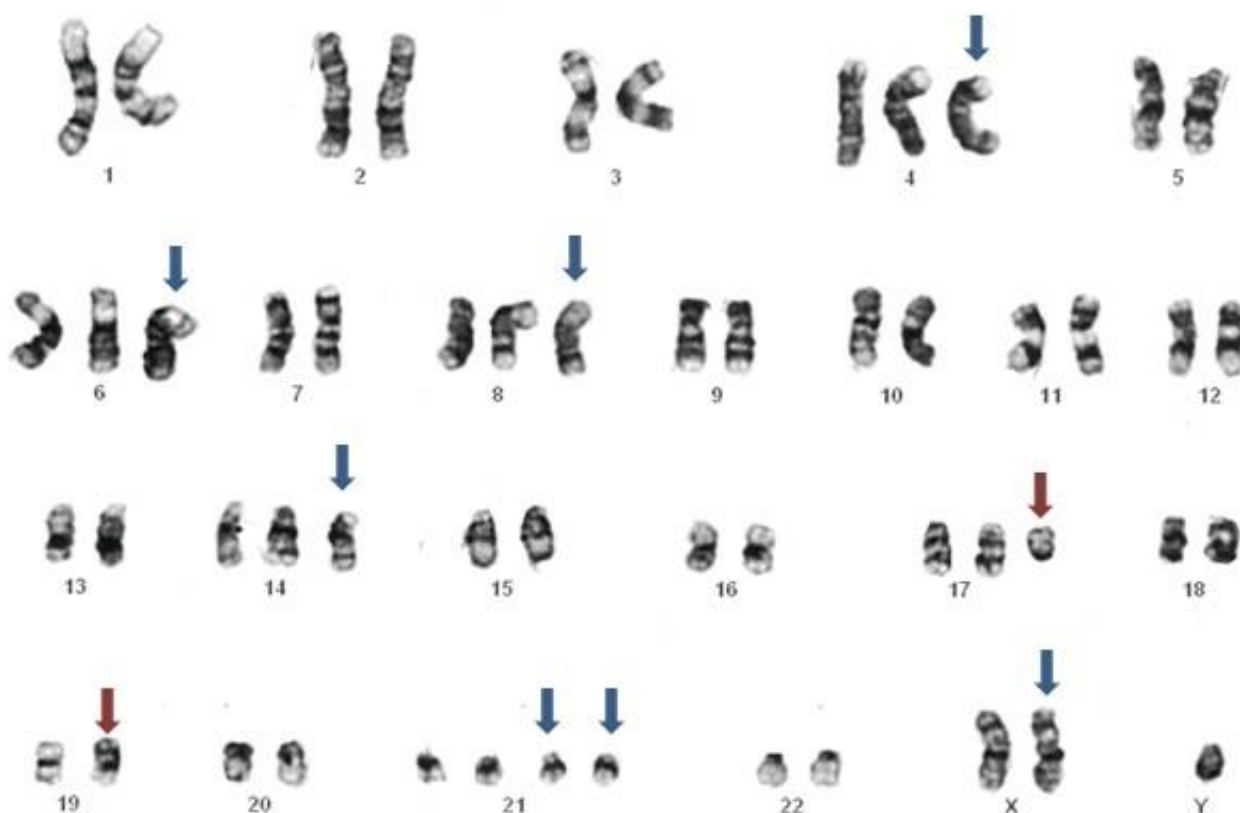
Podle některých prací je zmnožení některých konkrétních chromozomů u případů vysoké hyperdiploidie považováno za prognosticky významné. Například Heerema a kol. předpokládají, že zmnožení chromozomu 10 a/nebo 17 v kombinaci s modálním počtem 63-66 chromozomů značí velmi dobrou prognózu, naopak s trisomií chromozomu 5 spojují středně dobrou prognózu.<sup>33,34</sup>

Až u 50 % případů vysoké hyperdiploidie nacházíme další strukturní aberace. Většina strukturních aberací je nebalancovaná, dochází ke ztrátě či zisku genetického materiálu. Mezi nejčastější nálezy patří duplikace dlouhého ramena chromozomu 1 [dup(1q)], delece dlouhého ramena chromozomu 6 [del(6q)] a méně často také izochromozomy 7 [i(7q)] a 17 [i(17q)]. Duplikace 1q signifikantně souvisí s trisomií chromozomu 5. Izochromozom 17 se nejčastěji vyskytuje v karyotypech bez trisomie 17, a je pravděpodobné, že souvislost s leukemogenezí mohou mít geny lokalizované na dlouhém ramenu chromozomu 17. Přes objasnění těchto strukturních přestaveb jejich vliv na patogenezi onemocnění zůstává předmětem dalšího zkoumání.<sup>19,20,35</sup>

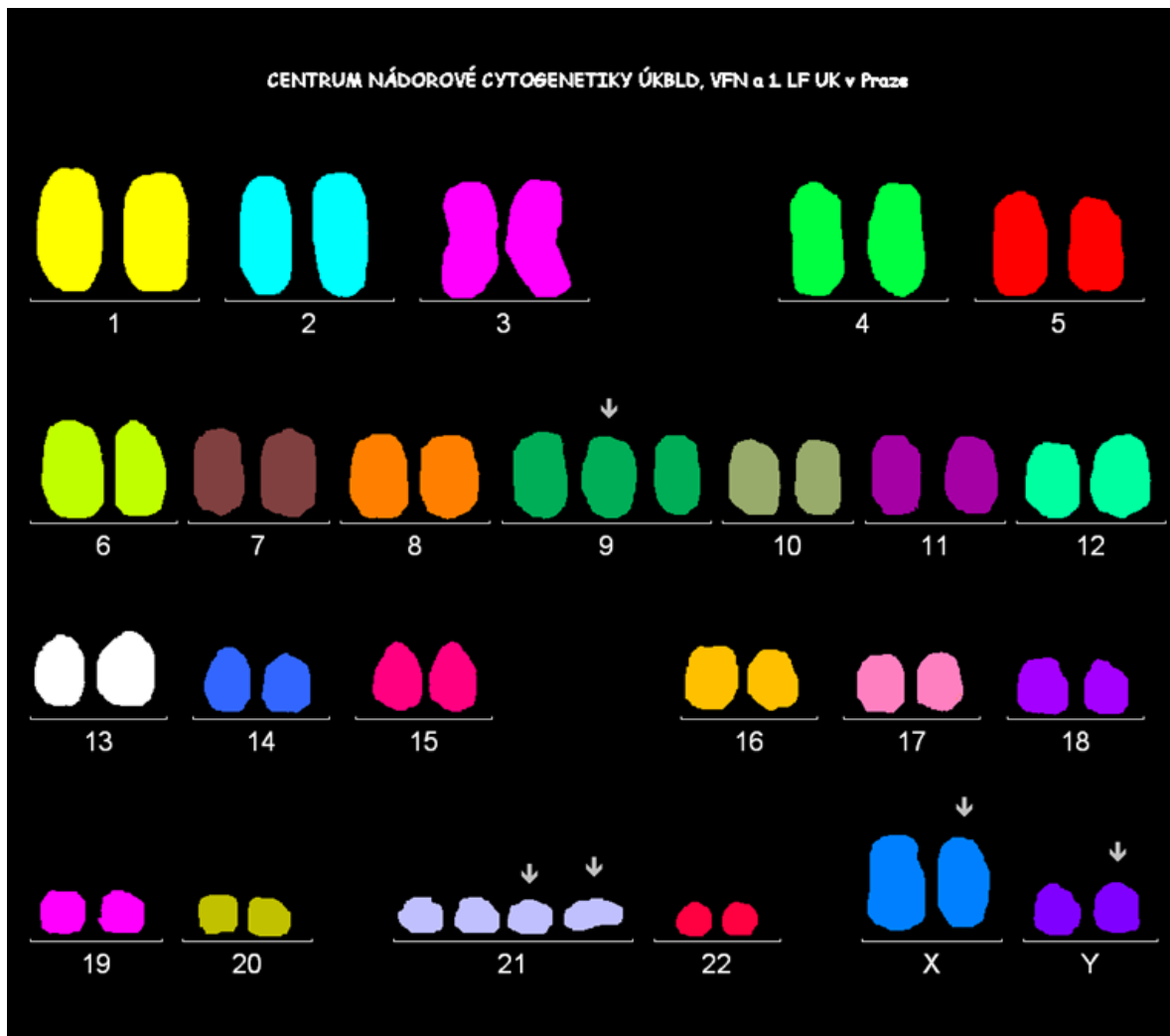
Se zavedením technologií s vysokou rozlišovací schopností (micro array) objevujeme poměrně velké množství submikroskopických aberací, které se mohou vyskytovat v hyperdiploidním karyotypu. Nejčastěji může docházet k mikrolecím, zpravidla na

chromozomech, které nebývají zmnoženy. Tyto mikrodelece mohou zasahovat i geny, které souvisí s leukemogenezí, např. *TEL* (12p13.2), *PAX5* (9p13.2), *CDKN2A* (9p21.3) nebo *IKZF1* (7p12.2).<sup>21,35,36</sup>

Translokace specifické pro ALL můžeme vzácněji najít i v karyotypech s vysokou hyperdiploidií. V důsledku translokací dochází ke vzniku fúzních genů *BCR/ABL* - translokace t(9;22)(q34;q11), *ETV6/RUNX1* (dříve *TEL/AML1*) - translokace t(12;21)(p13;q22) a *TCF3/PBX1* – t(1;19)(q23;p13). Produkty těchto fúzních genů se účastní regulace genové exprese, čímž mohou podpořit rozvoj leukemie.<sup>37</sup> Opačné názory podporují zjištění, že produkty těchto translokací nemusí být v hyperdiploidním klonu exprimovány, na rozdíl od naprosté většiny nádorových buněk bez nálezu vysoké hyperdiploidie.<sup>25</sup>



**Obrázek 5:** Příklad karyotypu pacienta s hyperdiploidií a balancovanou translokací t(17;19) 54,XY,+X,+4,+6,+8,+14,+17,t(17;19)(q22;p13),+21,+21 (A.J.Dawson a kol., 2011)<sup>57</sup>



**Obrázek 6: Hyperdiploidie.** Výsledek analýzy metodou mFISH. (Převzato z databáze Centra nádorové cytogenetiky VFN a 1.LF UK)

### *Téměř triploidní/tetraploidní buněčná linie (near-triploid/tetraploid, TT)*

Téměř triploidní/tetraploidní karyotyp je poměrně vzácný a nacházíme jej asi u 1-2,5 % dětí s hyperdiploidii. Ve většině studií bývá tato skupina zařazena pod hyperdiploidie, ale vzhledem k odlišnému chování onemocnění je vhodné popsat ji samostatně. Častější je nález téměř tetraploidního počtu chromozomů, který nacházíme asi u  $\frac{3}{4}$  případů. Zbývajících  $\frac{1}{4}$  tvoří skupina s téměř triploidním karyotypem. Téměř triploidní buňky mají 68-80 chromozomů a téměř tetraploidní 80-103 chromozomů.<sup>38,39</sup>

Prognóza nemocných s téměř TT počtem chromozomů není zcela jasná, protože se jedná o velmi vzácné onemocnění. Pui a kol. (1990) uvádí, že téměř triploidní nález se výrazně neodlišuje klinicky ani prognosticky od běžného ALL. Naproti tomu u pacientů s téměř tetraploidním karyotypem pozorovali odlišné znaky a zhoršenou prognózu.<sup>38</sup>

Novější studie (Raimondi a kol., 2006; Lemež a kol., 2010) řadí pacienty s téměř tri/tetraploidním počtem chromozomů do skupiny s nízkým rizikem a dobrou prognózou onemocnění srovnatelnou s vysokou hyperdiploidií. Příčinou zařazení do lepší prognostické skupiny může být zlepšení a vyšší intenzita léčby, což vede ke statisticky lepšímu přežití bez události (EFS).<sup>39,40</sup> Všechny výše zmíněné studie byly z důvodu vzácného výskytu tohoto nálezu prováděny na malých souborech pacientů, proto nemůžeme na jejich základě udělat jednoznačné závěry.

Proces formování téměř tri/tetraploidního karyotypu nebyl dosud zcela objasněn, ale nabízí se několik možných variant, zahrnujících nondisjunkci, ztrátu chromozomů z tetraploidní buňky, multipolární mitózu či zdvojení chromatinu téměř diploidních nebo diploidních buněk. Je pravděpodobné, že téměř triploidní/tetraploidní klony mohou vznikat vícero mechanismy, což může mít vliv na prognózu onemocnění. Některé nedávné poznatky naznačují, že tetraploidizace je jedním z procesů, které se účastní rozvoje téměř tetraploidních maligních klonů a pravděpodobně souvisí s proliferativní či růstovou výhodou těchto buněk.<sup>41,40</sup>

Téměř triploidní buňky nacházíme asi u 0,3 % dětí s ALL, jedná se tedy o poměrně vzácný nález. V porovnání s téměř tetraploidním nálezem pozorujeme statisticky mírně horší prognózu (5-let EFS 75 %).<sup>39</sup>

Podle dřívějších zdrojů nacházíme téměř tetraploidní počet chromozomů asi u 1 % dětských ALL. Tito pacienti patří do poměrně heterogenní skupiny s převahou T-ALL, specifickými morfologickými vlastnostmi a možná i horší prognózou.<sup>38</sup> Novější studie popisují téměř tetraploidní karyotyp u 0,7-2,2 % dětských ALL. Většina pacientů vykazuje znaky B-ALL, velmi častý výskyt fúzního genu *ETV1/RUNX6* a dobrou odpověď na léčbu. Proto bývá tato skupina řazena do kategorie s nízkým rizikem.<sup>40</sup>

Prognosticky významné strukturní abnormality běžné u dětských ALL byly z důvodu ojedinělosti diagnózy v téměř tetraploidních buňkách popsány jen u malého počtu pacientů, a proto nemůžeme vyvodit případnou signifikantní souvislost s výskytem TT.<sup>40</sup>

## Hypodiploidie

Za hypodiploidii označujeme nález méně než 46 chromozomů a nacházíme ji asi u 5-7 % případů ALL. Při vzniku hypodiploidie dochází k nenáhodným ztrátám jednoho či několika chromozomů. Nejčastěji, asi u 80% hypodiploidií, nacházíme v nádorových buňkách 45 chromozomů. Buněčné klony s méně než 45 chromozomy nacházíme u zbylých 20 %.<sup>42</sup>

Na základě modálního počtu chromozomů v leukemických buňkách můžeme i hypodiploidii rozdělit do menších podskupin. Největší skupinou je vysoká hypodiploidie, do níž řadíme pacienty s 42-45 chromozomy. Nízká hypodiploidie je popisována jako nález 33-41 chromozomů. Téměř haploidní skupinu pak tvoří nález do 32 chromozomů a nejčastěji nacházíme 23-29 chromozomů. Tyto skupiny se navzájem liší věkovou distribucí nemocných, cytogenetickým nálezem a dalšími klinickými vlastnostmi, které ovlivňují prognózu onemocnění a úspěšnost léčby.<sup>42,43</sup>

### *Vysoká hypodiploidie (HoH)*

Vysoká hypodiploidie je nejpočetnější skupinou v rámci hypodiploidií. Až u 80 % pacientů s hypodiploidií nacházíme 45 chromozomů, naopak nález 42 - 44 chromozomů je poměrně vzácný (kolem 5 % hypodiploidií). Někteří autoři zařazují do skupiny hypodiploidií se 45 chromozomy i případy, kdy dochází nebalancovanou translokací ke tvorbě dicentrického chromozomu. V těchto případech se sice jedná o modální počet chromozomů 45, ale nejedná se o klasickou heteroploidii. U většiny pacientů je tento nález doprovázen komplexními změnami v karyotypu.<sup>42</sup>

U vysoké hypodiploidie pozorujeme přibližně rovnoměrné rozložení pacientů ve všech věkových skupinách. Vedle výskytu B-imunofenotypu se objevují i případy T-ALL, které se u ostatních skupin hypodiploidií téměř nevyskytovaly. Nález 45 chromozomů je spojován se středně dobrou prognózou (3-leté EFS 66 %), odpovídající průměrné hodnotě všech dětských ALL nezávisle na cytogenetickém nálezem, čímž se výrazně odlišuje od ostatních hypodiploidií. U T-buněčné ALL ale pozorujeme výrazně zhoršenou prognózu onemocnění.<sup>43</sup>

Chromozomové abnormality u skupiny se 45 chromozomy jsou výrazně homogennější než u ostatních heteroploidii. Zdvojené buněčné klony nebyly v tomto případě pozorovány. Při ztrátě celého chromozomu chybí asi v polovině případů jeden z pohlavních chromozomů a obvyklé jsou také ztráty chromozomů 7, 9, 13 a 17. Opakovaně pozorovanou strukturní aberací jsou delece dlouhého ramena chromozomu 6 [del(6q)]. Nálezy prognosticky významných translokací pro dětské ALL [t(9;22)(q34;q11), t(4;11)(q21;q23), t(1;19)(q23;p13)] se vyskytují výjimečně. Vzniku dicentrického chromozomu se většinou účastní alespoň jeden z chromozomů 9, 12 a 7. Nejčastěji pozorujeme aberantní dic(9;12)(p11;p11.2), dic(9;20)(p11~13;q11) a dic(7;9)(p11.2;p11), které jsou zpravidla spojované s dobrou prognózou. Neobvyklé dicentrické chromozomy se objevují u T-buněčné ALL.<sup>42,43</sup>

V některých studiích byla popsána asi ve 1/4 případů přítomnost fúzního genu *ETV6/RUNX1* vzniklého translokací t(12;21)(p13;q22), který je exprimován pouze v buňkách s modálním počtem chromozomů 45. U buněk s jinou heteroploidii nebyl transkript fúzního genu pozorován<sup>42</sup> V jiných studiích byli pacienti s touto a obdobnými translokacemi vyřazeni ze studie z důvodu známého a dominantního efektu na klinický obraz a prognózu onemocnění, ve snaze prognosticky posoudit vliv samotné hypodiploidie.<sup>43</sup>

Navzdory stále se zlepšujícím výsledkům léčby dětí s ALL (asi 80 % úspěšnost) dochází u zbylých přibližně 20 % případů k pozdnímu relapsu onemocnění. Další studie, které pomohou přesněji identifikovat příčiny vzniku hypodiploidie, mohou být zásadní pro určení správné diagnózy. Dle specifických parametrů je nezbytné u této skupiny onemocnění vyvinout individuální diagnostické a léčebné postupy, aby se zlepšila úspěšnost léčby.<sup>44</sup> Zlepšení by mohlo přinést i zavedení moderních diagnostických metod do rutinní praxe k doplnění dnes používaných vyšetření.



## *Nízká hypodiploidie (HoL)*

Nízká hypodiploidie se odlišuje od ostatních skupin hypodiploidie cytogeneticky i klinicky. Z hlediska chromozomových aberací nacházíme podobné zachované disomie jako v případě téměř haploidní konstituce (X, Y, 21, 18, 14 a 10), doplněné o další nenáhodně zachované chromozomové páry. Nejčastěji 1, 11 a 19, které nacházíme u naprosté většiny nemocných, u více než  $\frac{3}{4}$  nacházíme zachované páry chromozomů 5,6, 8, 10 a 22 a dvě kopie chromozomů 2 a 12 u více než poloviny případů. Naopak velmi zřídka nacházíme disomické chromozomy 3, 4, 13, 15 a 16 a chromozomy 7 a 17 byly přítomné pouze v 1 kopii u všech dosud popsáných případů. V případech nízké hypodiploidie můžeme nacházet současně i hyperdiploidní linii, která vznikla zdvojením hypodiploidního klonu, ale výrazný vliv přítomnosti zdvojeného klonu na prognózu onemocnění nebyl pozorován.<sup>43</sup>

U pacientů s nízkou hypodiploidii nacházíme aditivní strukturní aberace v hypodiploidním buněčném klonu poměrně často. Signifikantně vyšší výskyt některé z těchto aberací nebyl pozorován. Nejčastěji se nízká hypodiploidie objevuje u pacientů mezi 9 a 20 rokem. U dětí s nízkou hypodiploidii je prognóza velmi špatná (3-leté EFS asi 30 %), u dospělých se udává ještě mírně horší (3-leté EFS 20-30 %).<sup>43,45</sup>

## *Téměř haploidní buněčná linie*

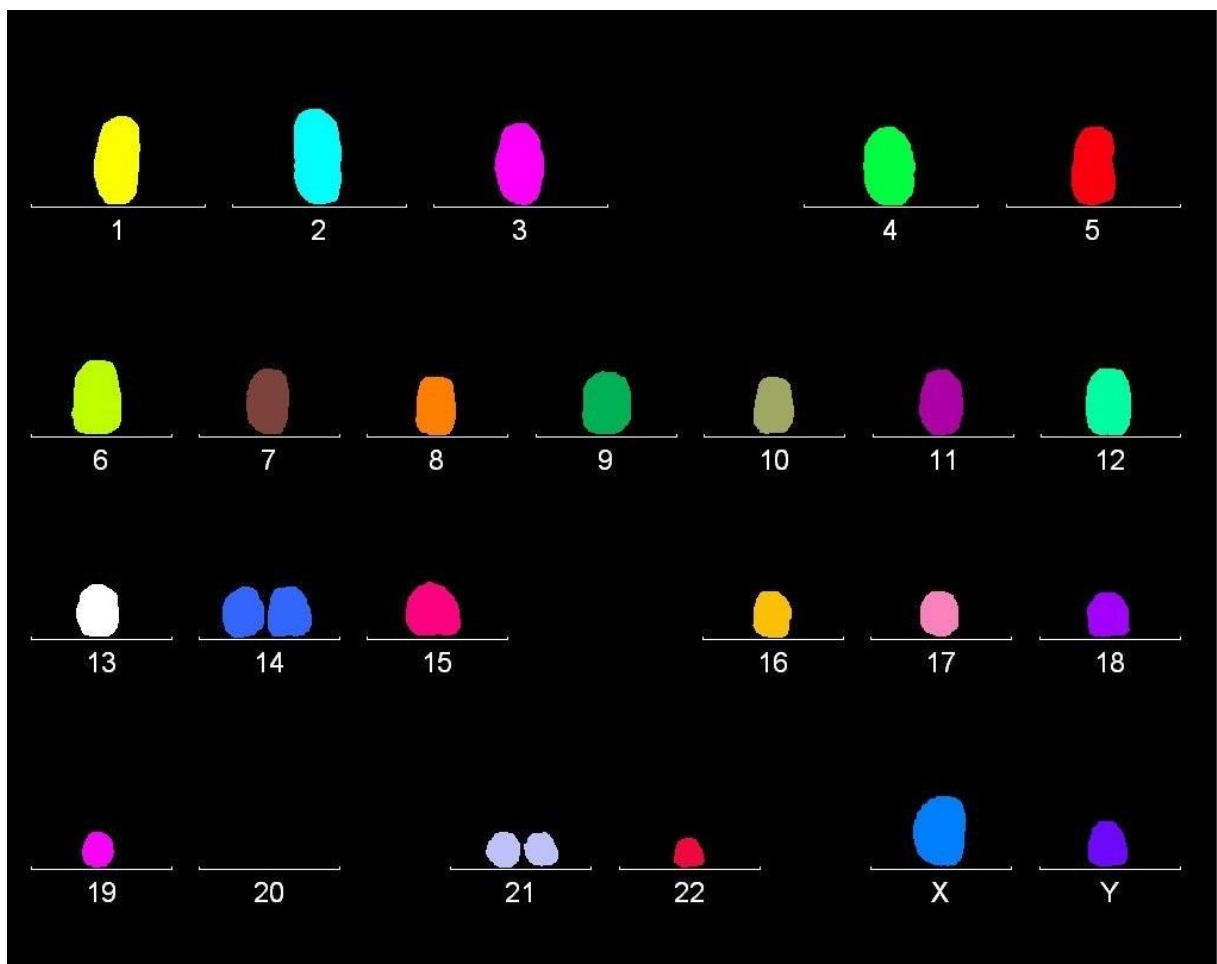
Nález téměř haploidního počtu chromozomů je diagnosticky nejvýznamnější mezi hypodiploidii, protože je spojený se špatnou prognózou a nedostatečná léčba může vést k relapsu či progresi onemocnění. V leukemických buňkách nacházíme haploidní sadu s nenáhodně zachovanými disomiemi. U téměř všech pacientů nacházíme obvykle dvě kopie chromozomu 21, dále mají nejčastěji zachovaný počet kopií chromozomy X, Y, 18, 14 a 10. Buněčné klony s téměř haploidním počtem chromozomů pravděpodobně vznikají během jednoho aberantního buněčného dělení z důvodu přítomnosti multipolárního dělicího vřetenka či částečného párování homologních chromozomů během mitózy. Dodnes však není jasné, zda takovéto dělení předchází nádorové transformaci či je jejím důsledkem.<sup>42,46</sup> Některé zdroje ale podporují teorii, že vznik hypodiploidního klonu je primární událostí v leukemogenezi a je příčinou rozvoje leukemie.<sup>45</sup>

Současně s hypodiploidní linií buněk se v kostní dřeni často objevuje její zdvojená kopie, která může být v čase diagnózy dominantní. Běžnými diagnostickými postupy může dojít k záměně této linie s obvyklou hyperdiploidií, která je spojována s dobrou prognózou, což může zapříčinit volbu nesprávného léčebného postupu. V takovýchto případech se v kostní dřeni mohou ideálně vyskytovat dva patologické klony. Jeden téměř haploidní, který bývá v čase diagnózy v minimálním zastoupení a druhý hyperdiploidní, který je zdvojenou kopií téměř haploidního klonu a zpravidla se vyskytuje ve většině patologických buněk. V čase relapsu onemocnění se poměrné zastoupení těchto klonů může obrátit. V praxi ale ve většině případů ale odhalíme pouze jeden patologický klon.<sup>24,47</sup>

Hyperdiploidie vzniklé touto cestou mají oproti ostatním případům specifický cytogenetický nále. V literatuře je většina případů charakterizována výskytem tetrasomií a disomií zatímco trisomické chromozomy nacházíme méně často.<sup>25</sup> V případě heterozygotní konstituce mají tetrasomické chromozomy poměr alel 2:2 a u disomických chromozomů pozorujeme plošnou ztrátu heterozygoty, což jen potvrzuje vznik zdvojením téměř haploidní sady.<sup>22,25</sup>

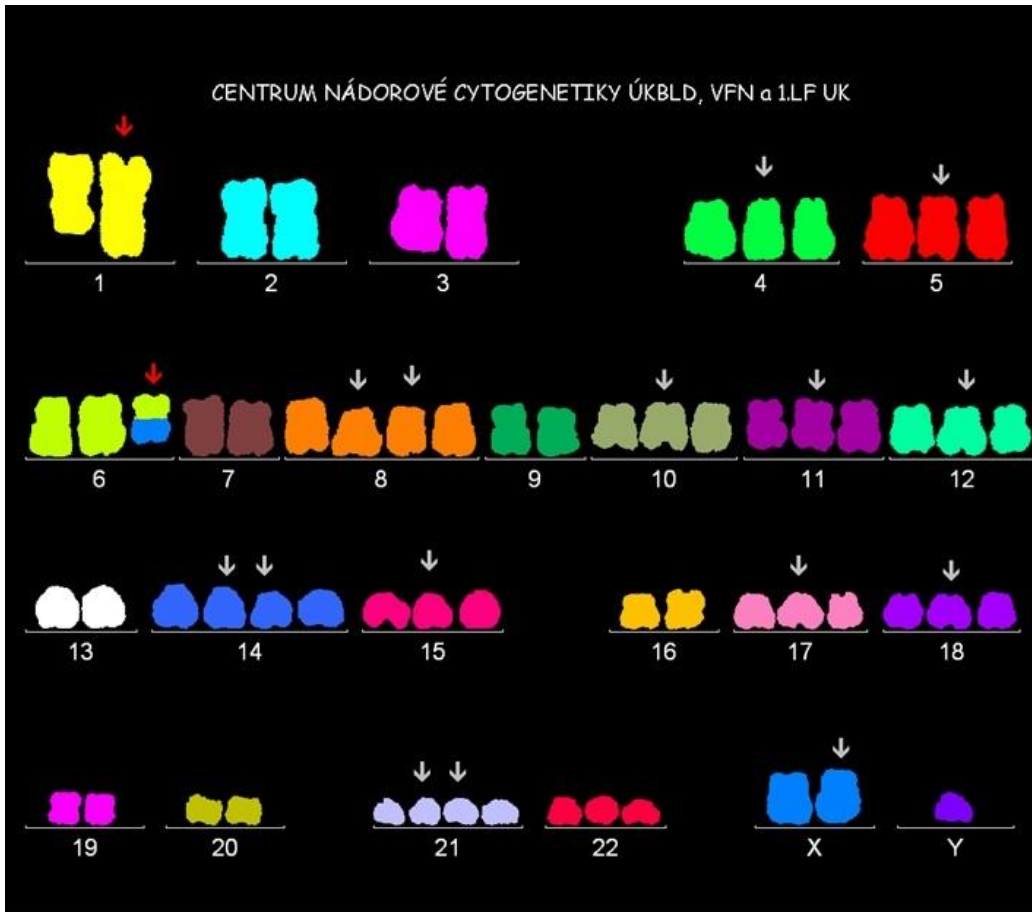
Možné zlepšení diagnostiky přináší kombinace klasických vyšetření, jako je konvenční cytogenetická analýza či stanovení DNA indexu pomocí průtokové cytometrie, a moderních postupů. Využitím metod FISH a M-FISH můžeme přesně identifikovat počet jednotlivých chromozomů a zjistit, které chromozomy se nacházejí v jedné, dvou, třech či čtyřech kopiích. Původ zdvojené hypodiploidní sady můžeme také potvrdit metodami jako je RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), SNP array (Single Nucleotide Polymorphism), CGH array (Comparative Genomic Hybridisation) či Next-Generation-Sequencing, kterými zkoumáme získané celo-chromozomové uniparentální isodisomie (wUPIDs, whole-chromosome uniparental isodisomies) a ztrátu heterozygoty (LOH, Loss Of Heterozygoty) u disomických chromozomů, tj. potvrdíme, že mají původ u jednoho z rodičů a vznikly endoreduplikací téměř haploidní sady. Naopak u tetraploidních chromozomů je heterozygotita zachována. Tyto moderní diagnostické metody přináší nástroj, který je schopný analyzovat celý genom a odlišit zdvojenou hypodiploidní sadu od běžné hyperdiploidie na základě analýzy heterozygoty.<sup>46,45,44</sup>

Nález téměř haploidní ALL je nejčastější u dětí kolem 7 let (od 2 do 15), u dospělých byly popsány pouze jednotlivé případy. Děti s maskovanou hypodiploidíí mají stejně špatnou prognózu jako ty s čistou hypodiploidíí (3-leté EFS asi 30 %). Stále není zřejmé, jak buňky, kterým chybí téměř polovina genetické informace mohou přežít. Je-li zachování 2 kopií chromozomu 21 nezbytné pro přežití těchto buněk, vzhledem k tomu, že byl nalezen ve všech dosud popsaných případech, se také dále zkoumá. Růstová výhoda i schopnost odolávat intenzivní chemoterapii může být důsledkem plošné ztráty funkčnosti tumor supresorových genů. Další molekulárně genetické analýzy založené na expresním profilu buněk s odlišnou ploidií by mohly odhalit konkrétní geny, které způsobují vysoký maligní potenciál buněk s téměř haploidním počtem chromozomů.<sup>43,45,47</sup>



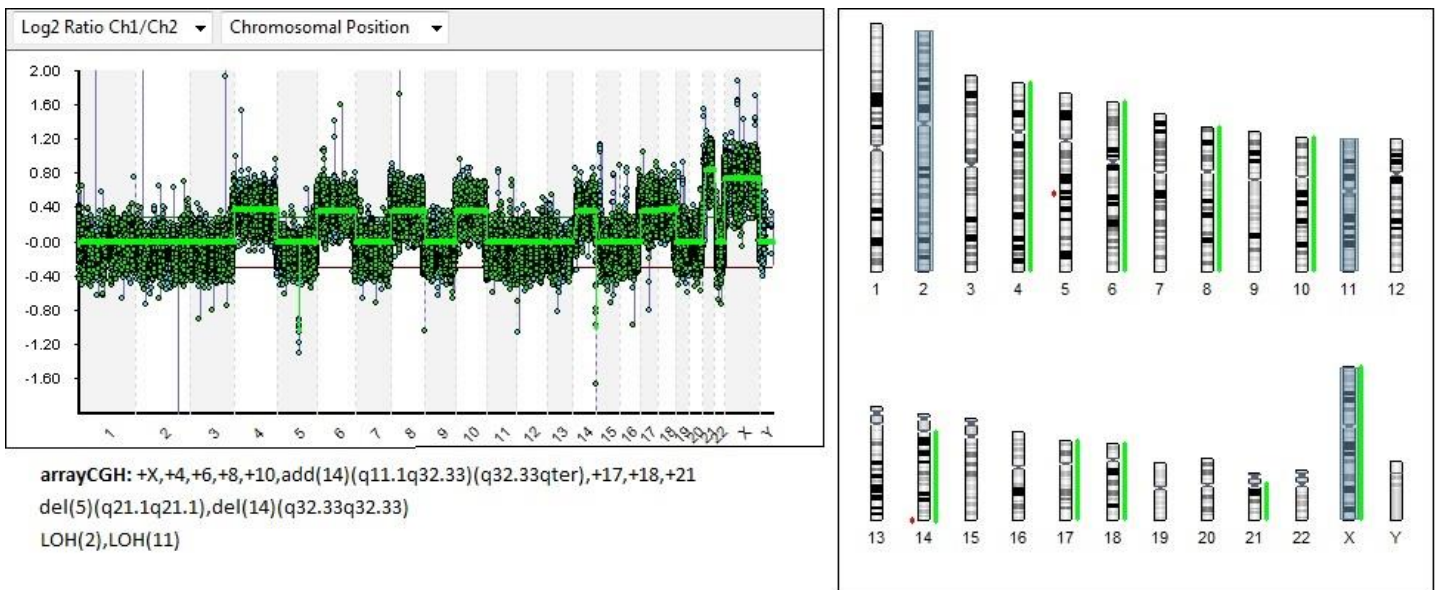
25,XY,-1,-2,-3,-4,-5,-6,-7,-8,-9,-10,-11,-12,-13,-15,-16,-17,-18,-19,-20,-20,-22

**Obrázek 7: Téměř haploidní karyotyp.** Analýza provedená metodou mFISH. (Převzato z databáze Centra nádorové cytogenetiky VFN a I.LF UK)



63,X,Y,+X,dup(1)(q21.1q32.2),+4,+5,der(6)t(X;6)(q24;q11),+8,+8,+10,+11,+12,+14,+14,+15,+17,+18,+21,+21,+22

**Obrázek 8:** Příklad vyšetření metodou mFISH a doplněný mBAND chromozomu 1. U pacienta pozorujeme mnohačetné zmnožení chromozomů, intrachromozomální duplikaci chr.1 a derivovaný chromozom, který vznikl nebalancovanou translokací mezi chromozomy 6 a X. (Převzato z databáze Centra nádorové cytogenetiky VFN a I.LF UK)



**Obrázek 9:** Příklad vyšetření metodou arrayCGH. Pacient s mnohočetnými zmnoženími chromozomy a ztrátou heterozygoty u chromozomů 2 a 11. Příklad hyperdiploidie, která pravděpodobně vznikla duplikací hypodiploidního klonu. (Převzato z databáze Centra nádorové cytogenetiky VFN a I.LF UK)

## Použité metody

### Konvenční cytogenetická analýza

Základem cytogenetického vyšetření je analýza metafázních chromozomů, které získáváme nejčastěji z buněk kostní dřeně a v některých specifických případech také z periferní krve. Po krátkodobé kultivaci (24h u buněk kostní dřeně a 48h u periferní krve) získáme v ideálním případě preparát s dělicími se buňkami, který posléze barvíme některou z pruhovacích technik a analyzujeme ve světelném mikroskopu. Dnes k analýze využíváme počítačové softwary od různých výrobců (např. MetaSystems, LIM, Leica, atd.) a někdy také systém Metafer, automaticky vyhledávající mitotické figury na mikroskopických preparátech. Výsledky obrazové analýzy zapisujeme dle aktuální nomenklatury ISCN (International System of Cytogenetic Nomenclature), nyní je platná verze z roku 2013.<sup>48</sup>

Buňky kostní dřeně kultivujeme při 37°C po dobu 24h v mediu RPMI nebo v jiném médiu podobného složení. Kultivaci zastavíme přidáním kolcemidu, který působí jako mitotický jed, blokující funkci dělicího vřetenka. Pro získání rozprostřených mitóz přidáme hypotonický roztok 0,075M KCl, který způsobí nabobtnání cytoplasmatických membrán a rozvolnění buněčného obsahu včetně chromozomů. Následně buňky fixujeme pomocí směsi methanolu a kyseliny octové v poměru 3:1. Po vytvoření optimálně koncentrované lehce opaleskující suspenze buněk kapeme na čistá podložní skla. Pro účinné rozprostření materiálu kapeme vzorky z výšky,<sup>49</sup> na podchlazená podložní skla nebo používáme přístroj s optimálním mikroklima (Hanabi Metaphase Spreader).

Takto připravený preparát po částečné degradaci chromozomů barvíme Wrightovým barvivem pro získání kvalitního G-pruhování. Rezoluce této metody se pohybuje kolem 5-10Mb.

Výsledkem celého procesu jsou stabilní preparáty, na kterých vyhledáváme mitózy a sestavujeme karyotyp. Dle výsledků klasické cytogenetické analýzy případně postupujeme k dalším molekulárně cytogenetickým vyšetřením.<sup>49,50</sup>

## Molekulárně cytogenetické metody

### FISH (fluorescenční *in situ* hybridizace)

Konvenční cytogenetická analýza není v mnohých případech dostačující pro identifikaci menších či komplexních chromozomových aberací. Nízká rezoluce, špatná kvalita mitóz, nízký mitotický index či omezená proliferační aktivita nádorových buněk *in vitro* bývají důvodem neúspěšnosti vyšetření. Také proto velmi často přistupujeme k molekulárně cytogenetickým analýzám.<sup>30</sup>

Nejčastěji používáme metodu fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) a její různé modifikace. Princip metody je založen na hybridizaci vyšetřované DNA s fluorescenčně značenými sondami, komplementárními k vyšetřovanému úseku. Výhodou metody je cílené, rychlé a citlivé vyšetření, kterým detekujeme změny nejen v mitózách, ale při použití vhodných sond i v interfázních jádrech (I-FISH). Pro většinu vyšetření tak není nezbytné nutné získat dělící se buňky, což výrazně zlepšuje možnosti diagnostiky. Za nevýhodu můžeme považovat omezené množství vyšetřovaných míst genomu a také závislost na sortimentu sond od komerčních dodavatelů.

Hybridizační roztok se sondou aplikujeme na sklo s fixovanými chromozomy, připravené stejným způsobem jako pro klasickou cytogenetickou analýzu. Poté necháme hybridizovat ve speciálních termostatech – např. HyBrite, které umožňují rychlé přechody mezi teplotou denaturace (70-80°C) a samotnou hybridizací při 37°C, dle předem určeného schématu udávaného výrobcem konkrétních sond. Po dokončení hybridizace odmyjeme nespecificky navázané sondy v sérii mycích roztoků, čímž eliminujeme pozadí, a následně detekujeme ve fluorescenčním mikroskopu.

Existuje několik typů sond navržených pro cílené vyšetření aberací, nejobvyklejších u konkrétních hematologických malignit. Pro detekci početních odchylek používáme sondy hybridizující k  $\alpha$ -satelitní DNA lokalizované v oblasti centromer jednotlivých chromozomů – sondy centromerické. Získáme tak rychlý přehled o případných aneuploidiiích či rozsáhlejších početních aberacích. Dalším typem jsou sondy lokus specifické, komplementární ke konkrétním genům či nejčastějším zlomovým oblastem na chromozomech. Slouží k detekci strukturních přestaveb ve smyslu translokací, delecí a amplifikací a je rovněž možné je využít k detekci početních odchylek.<sup>51</sup>

Strukturní aberace většího rozsahu je možné analyzovat pomocí malovacích sond pro celé chromozomy (WCP, whole chromosome painting), které obsahují sekvence z celých chromozomů.

## Modifikace FISH

Další vylepšení diagnostických možností cytogenetické a molekulárně cytogenetické analýzy genomu leukemických buněk přináší metoda mnohobarevné FISH (mFISH), díky které v jediném hybridizačním pokusu specificky označíme všechny chromozomy v karyotypu, tj. 22 autozomových párů a pohlavní chromozomy X a Y. K takovému značení stačí 5 fluorochromů, jejichž kombinacemi získáme 24 barevných odstínů, kterými označíme všechny chromozomy v karyotypu odlišnou barvou. Označením pomocí fluorescenčního barviva DAPI vizualizujeme veškerý chromatin, což nám umožňuje vyhledávat mitózy na preparátu. Za pomoci citlivé snímací kamery a softwaru pak v počítači dostaneme obraz, ve kterém je každému chromozomovému páru přiřazena falešná barva (tzv. pseudobarva). Díky jednotnému nabarvení celých chromozomů rozeznáme současně všechny aberace a komplexní přestavby přítomné v genomu nádorových buněk. Nevýhodou této techniky je, že neumožňuje přesně určit zlomová místa na přestavěných chromosomech a detekovat inverze a menší intrachromozomální aberace.<sup>52</sup>

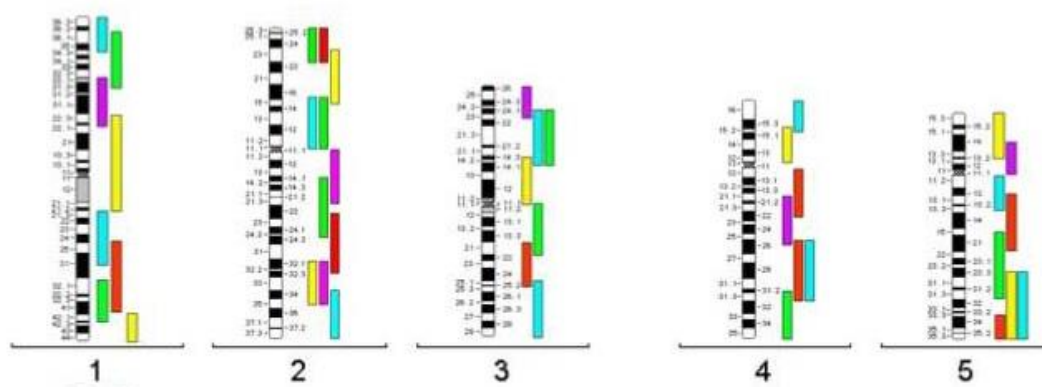
|    | Aqua | Green       | Orange | Red     | NIR*   |
|----|------|-------------|--------|---------|--------|
| 1  |      |             |        |         | Yellow |
| 2  | Cyan |             |        |         |        |
| 3  |      |             |        | Magenta |        |
| 4  |      | Light Green |        |         |        |
| 5  |      |             | Red    |         |        |
| 6  |      | Light Green |        |         | Yellow |
| 7  | Cyan |             |        |         |        |
| 8  |      |             |        | Magenta |        |
| 9  |      |             | Red    |         | Yellow |
| 10 | Cyan | Light Green |        |         |        |
| 11 |      | Light Green |        | Magenta |        |
| 12 |      | Light Green | Red    |         |        |
| 13 | Cyan |             |        | Magenta |        |
| 14 |      |             | Red    |         |        |
| 15 |      |             | Red    | Magenta |        |
| 16 | Cyan | Light Green |        |         | Yellow |
| 17 |      | Light Green |        | Magenta |        |
| 18 |      | Light Green | Red    |         |        |
| 19 | Cyan |             | Red    | Magenta |        |
| 20 |      |             | Red    | Magenta | Yellow |
| 21 |      |             | Red    | Magenta | Yellow |
| 22 | Cyan | Light Green |        | Magenta |        |
| X  |      |             | Red    |         |        |
| Y  | Cyan |             | Red    | Magenta |        |



MetaSystems  
**24Xyte**  
Labelling Scheme  
Multicolor  
FISH Probe Kit  
for Human Chromosomes  
  
\*NIR: Near Infrared

**Obrázek 10: Značící schéma mFISH firmy MetaSystems pro 24 lidských chromozomů.**  
(převzato z: [http://www.metasystems-international.com/index.php?option=com\\_joodb&view=article&joobase=5&id=72%3Ad-0125-060-di&Itemid=285](http://www.metasystems-international.com/index.php?option=com_joodb&view=article&joobase=5&id=72%3Ad-0125-060-di&Itemid=285))

Pro přesnější lokalizaci zlomových míst na chromozomech používáme metodu mnohobarevného pruhování s vysokou resolucí, tzv. mBAND. Sondy pro mBAND se připravují tak, že DNA jednotlivých chromozomů získaná mikrodisekcí přímo z cytogenetického preparátu nebo průtokovou cytometrií je fragmentována na několik překrývajících se úseků, které jsou opět označeny pomocí 5 fluorochromů dle specifického barevného schématu (obrázek č.11). Po nasnímání obrazu z fluorescenčního mikroskopu a s použitím speciálního software pak ve výsledku získáme mnohobarevně napruhované chromozomy. Metodu mBAND používáme pro analýzu delecí, amplifikací, duplikací a pro přesné určení zlomových míst. Běžně se neaplikuje na celý genom, ale jen cíleně na konkrétní chromozomy vybrané na základě analýzy metodou mFISH.



**Obrázek 11:** Značící schéma mBAND pro chromozomy 1-5 od firmy MetaSystems. (převzato z: [http://www.metasystems-international.com/index.php?option=com\\_joobd &view=article&joobase=5&id=76%3Ad-02nn-nnn-di&Itemid=285](http://www.metasystems-international.com/index.php?option=com_joobd&view=article&joobase=5&id=76%3Ad-02nn-nnn-di&Itemid=285))

## array CGH

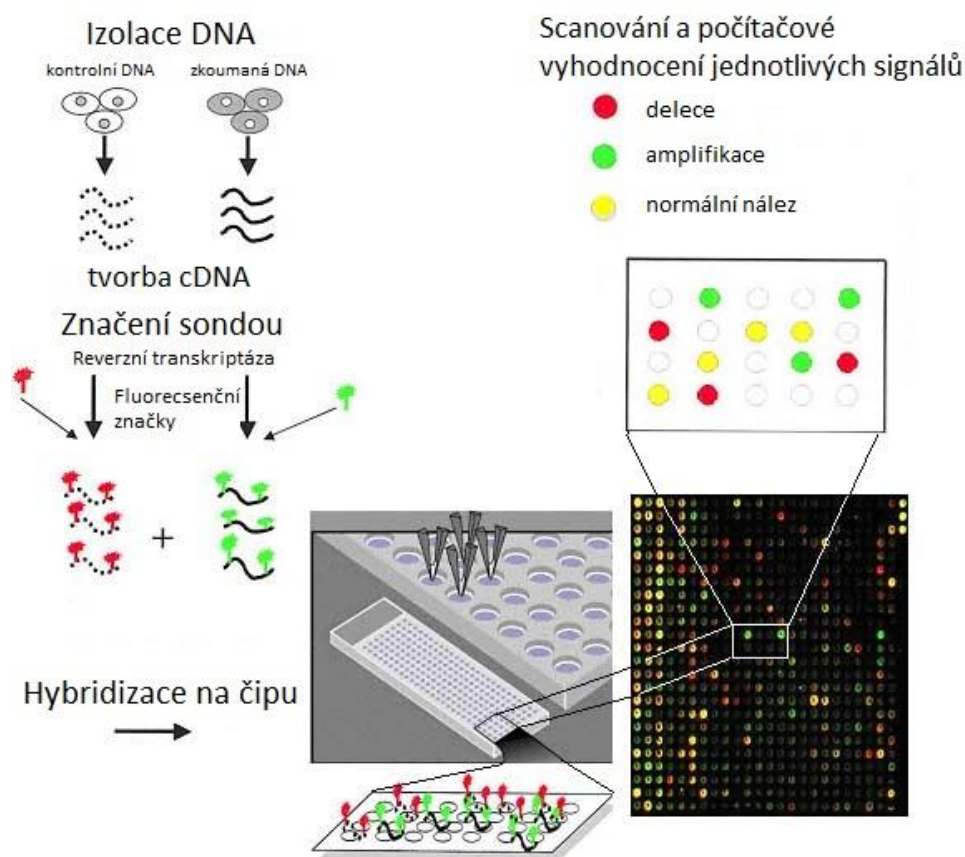
Metodou, která umožňuje sledovat změny v množství DNA kopií ve studovaném vzorku je komparativní genomová hybridizace, která je založena na využití tzv. čipů jako templátu pro hybridizaci (array CGH). Díky komplexní analýze a vysoké citlivosti se čipové technologie, i přes svou finanční náročnost, stávají postupně součástí molekulárně cytogenetické analýzy nádorových buněk.

Array CGH byla vyvinuta v roce 1997 nejdříve za využití BAC sond,<sup>53</sup> později s použitím synteticky připravovaných oligonukleotidů.<sup>54,55</sup> Dnes máme možnost používat mnoho různých čipů od různých výrobců, nejlépe vyhovujících potřebám konkrétního vyšetření – např. Affymetrix, Agilent, BlueGnome, Illumina aj.



Metoda je založená na současné hybridizaci rozdílně značené celogenomové DNA získané z nádorových buněk a kontrolní DNA na čip, na kterém se jednotlivé fragmenty vážou na sekvence (nebo BAC klony) imobilizované na čipu.

DNA nejdříve izolujeme z fixovaných buněk kostní dřeně a následně značíme rozdílnými fluorochromy – například referenční vzorek fluorochromem Cy3 (červená barva) a vyšetřovanou DNA fluorochromem Cy5 (zelená barva). Následně oba vzorky hybridizujeme na čip dle návodu příslušného výrobce. Výsledkem hybridizace jsou různě barevné body v čipovém rastru, reprezentující jednotlivé krátké úseky genomové DNA. Analýzu provádíme za pomoci citlivých skenerů (nejčastěji laserových) a speciálního počítačového software (např. BlueFuse multi, BlueGnome), který vyhodnotí intenzitu fluorescenčních signálů v jednotlivých bodech a přiřazuje je ke konkrétním lokusům na chromozomech.



**Obrázek 12:** Schéma arrayCGH (převzato z: <http://nanohub.org/resources/17797/watch?resid=17915>)

Za normální nález považujeme shodné zastoupení červené a zelené barvy (oranžový signál). V případě, že převládá zelený signál odpovídající vyšetřované DNA, jedná se o duplikaci či amplifikaci příslušného úseku. Naopak když je dominantní červený signál odpovídající kontrolní DNA, znamená to, že ve vyšetřované DNA došlo k delecí daného úseku.<sup>56</sup>

Za pomoci speciálního software pak sestavujeme kompletní karyotyp a následně popisujeme přítomné aberace podle platné ISCN.

Výhodou metody je vysoké rozlišení (<400bp), detekce veškerých nebalancovaných změn v jednom pokusu a nezávislost na buněčném dělení. Nevýhodou metody je, že umožňuje detekovat pouze klony s minimálně 20 - 50% zastoupením ve studovaném vzorku v závislosti na použité platformě a neumožňuje zachytit balancované aberace.

## Závěr

Cytogenetická analýza je v současné době nedílnou součástí vyšetření všech hematologických malignit. Identifikace chromozomových aberací v nádorových buňkách přispívá zejména ke stanovení diagnózy, určení průběhu a stadia nemoci, sledování úspěšnosti terapie a v neposlední řadě ke stanovení prognózy onemocnění a volbě vhodné terapie.

U dětí s akutní lymfoblastickou leukémií patří mezi významné prognostické ukazatele modální počet chromozomů v leukemických blastech. Heteroploidie byly popsány jako nenáhodné klonální změny počtu chromozomů v leukemických buňkách kostní dřeně. Nacházíme je asi u 40 % dětí s ALL. Mezi prognosticky nejvýznamnější heteroploidie patří vysoká hyperdiploidie (>50 chromozomů), která je provázána relativně nejlepší prognózou. Díky včasné diagnóze je možné v těchto případech zvolit mírnější léčebný protokol a tím eliminovat pozdější následky léčby.

Vzácný, ale prognosticky významný je nález hypodiploidie (<46 chromozomů), který je spojován s velmi špatnou prognózou. Včasný záchyt a správná diagnostika jsou pro děti s hypodiploidií klíčové. S použitím všech dostupných metod by bylo možné dosáhnout lepšího záchytu tohoto vzácného onemocnění, jehož identifikace je často velmi obtížná. Přesná detekce hypodiploidie, která je často maskována hyperdiploidním klonem, by mohla přispět ke zlepšení výsledků léčby a tím zvýšit šance na přežití těchto pacientů.

V současné době se stále rozšiřují možnosti diagnostiky a je důležité rozeznat případy, ve kterých je vhodné tyto metody použít. Zároveň je nezbytné navrhnout nejvhodnější postup ke správné a efektivní identifikaci mnohdy skrytých rekurentních chromozomových aberací. Přesná analýza genomových změn v leukemických buňkách u dětí s ALL přispívá nejen k lepšímu pochopení příčin a mechanismů vzniku a rozvoje leukemie, ale v budoucnu může přispět i k vývoji nových diagnostických a léčebných přístupů.

## Použitá literatura

1. De Braekeleer E, Basinko A, Douet-Guilbert N, Morel F, Le Bris MJ, Berthou C, Morice P, Férec C, De Braekeleer M. Cytogenetics in pre-B and B-cell acute lymphoblastic leukemia: a study of 208 patients diagnosed between 1981 and 2008. *Cancer Genet Cytogenet.* 2010;200(1):8–15. doi:10.1016/j.
2. Moorman A V, Ensor HM, Richards SM, Chilton L, Schwab C, Kinsey SE, Vora A, Mitchell CD, Harrison CJ. Prognostic effect of chromosomal abnormalities in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia: results from the UK Medical Research Council ALL97/99 randomised trial. *Lancet Oncol.* 2010;11(5):429–38. doi:10.1016/S1470-2045(10)70066-8.
3. Stiller CA, Parkin DM. Geographic and ethnic variations in the incidence of childhood cancer. *Br Med Bull.* 1996;52(4):682–703.
4. Greaves M. Childhood leukaemia. *Br Med J.* 2002;324:283–287.
5. Metayer C, Milne E, Clavel J, Infante-Rivard C, Petridou E, Taylor M, Schuz J, Spector LG, Dockerty JD, Magnanij C, Pombo-de-Oliveira MS, Sinnett D, Murphy M, Romann E, Mongeo P, Ezzat S, Mueller BA, Scheurer ME, Armstrong BK, Birch J, Kaatsch P, Koifman S, Lightfoot T, Bhatti P., Bondy ML, Rudant J, O'Neillm K, Miligi L, Dessypris N, Kanga AY, Buffler PA. The Childhood Leukemia International Consortium. *Cancer Epidemiol.* 2013;37(3):336–47. doi:10.1016/j.canep.2012.12.011.
6. Ding L, Raphael BJ, Chen F, Wendl MC. Advances for studying clonal evolution in cancer. *Cancer Lett.* 2013;340(2):212–9. doi:10.1016/j.canlet.2012.12.028.
7. Lampert F, Harbott J, Borkhardt A. Cytogenetic Aspects of Childhood Leukemias. *Klin Padiatr.* 2013;225(S 01):S30–S33. doi:10.1055/s-0033-1337960.
8. Wiemels JL, Cazzaniga G, Daniotti M, Eden OB, Addison GM, Masera G, Saha V, Biondi A, Greaves MF. Prenatal origin of acute lymphoblastic leukaemia in children. *Lancet.* 1999;354(9189):1499–503.
9. Eden T. Aetiology of childhood leukaemia. *Cancer Treat Rev.* 2010;36(4):286–97. doi:10.1016/j.ctrv.2010.02.004.
10. Greaves M. In utero origins of childhood leukaemia. *Early Hum Dev.* 2005;81(1):123–9. doi:10.1016/j.earlhumdev.2004.10.004.
11. Zuna J, Burjanivova T, Mejstrikova E, Zemanova Z, Muzikova K, Meyer C, Horsley S W, Kearney L, Colman S, Ptoszkova H, Marschalek R, Hrusak O, Stary J, Greaves M, Trka J. Covert Preleukemia Driven by MLL Gene Fusion. 2009;107(October 2008):98–107. doi:10.1002/gcc.

12. Zuna J, Madzo J, Krejci O, Zemanova Z, Kalinova M, Muzikova K, Zapotocky M, Starkova J, Hrusak O, Horak J, Trka J. ETV6/RUNX1 (TEL/AML1) is a frequent prenatal first hit in childhood leukemia. *Blood*. 2011;117(1):368–369. doi:10.1182/blood-2010-09-309070.
13. Stiller C a, Chessells JM, Fitchett M. Neurofibromatosis and childhood leukaemia/lymphoma: a population-based UKCCSG study. *Br J Cancer*. 1994;70(5):969–72.
14. Wiemels J. Perspectives on the causes of childhood leukemia. *Chem Biol Interact*. 2012;196(3):59–67. doi:10.1016/j.cbi.2012.01.007.
15. Seewald L, Taub JW, Maloney KW, McCabe ERB. Acute leukemias in children with Down syndrome. *Mol Genet Metab*. 2012;107(1-2):25–30. doi:10.1016/j.ymgme.2012.07.011.
16. Harrison CJ. Acute lymphoblastic leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2001;14(3):593–607. doi:10.1053/beha.2001.0156.
17. Poppe B, Philippé J, Benoit Y. Novel cryptic chromosomal rearrangements in childhood acute lymphoblastic leukemia detected by multiple color fluorescent in situ hybridization. *Hematol J*. 2005;90(9):6–12.
18. Harrison CJ. The detection and significance of chromosomal abnormalities in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2001;15:49–59. doi:10.1054/drup.2001.0150.
19. Zemanova Z, Michalova K, Sindelarova L, Smisek P, Brezinova J, Ransdorfova S, Vavra V, Dohnalova A, Stary J. Prognostic value of structural chromosomal rearrangements and small cell clones with high hyperdiploidy in children with acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res*. 2005;29(3):273–81. doi:10.1016/j.leukres.2004.07.004.
20. Pui CH, Raimondi SC, Dodge RK, Rivera GK, Fuchs LA, Abromowitch M, Look AT, Furman WL, Crist WM, Williams DL. Prognostic importance of structural chromosomal abnormalities in children with hyperdiploid (greater than 50 chromosomes) acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1989;73(7):1963–7.
21. Paulsson K, Heidenblad M, Mörse H, Borg A, Fioretos T, Johansson B. Identification of cryptic aberrations and characterization of translocation breakpoints using array CGH in high hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2006;20(11):2002–7. doi:10.1038/sj.leu.2404372.
22. Onodera N. Formation of a hyperdiploid karyotype in childhood acute lymphoblastic leukemia [see comments]. *Blood*. 1992;80(July1):203–208.
23. Panzer-Grümayer ER, Fasching K, Panzer S, Hettinger K, Schmitt K, Stöckler-Ipsiroglu S, Haas OA. Nondisjunction of chromosomes leading to hyperdiploid childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia is an early event during leukemogenesis. *Blood*. 2002;100(1):347–9. doi:10.1182/blood-2002-01-0144.

24. Paulsson K, Mörse H, Fioretos T, Behrendtz M, Strömbeck B, Johansson B. Evidence for a single-step mechanism in the origin of hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*. 2005;44(2):113–22. doi:10.1002/gcc.20222.
25. Paulsson K, Johansson B. High Hyperdiploid Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*. 2009;660(May):637–660. doi:10.1002/gcc.
26. Raimondi SC, Roberson PK, Pui CH, Behm FG, Rivera GK. Hyperdiploid (47-50) acute lymphoblastic leukemia in children. *Blood*. 1992;79(12):3245–52.
27. Mrózek K, Heerema NA, Bloomfield CD. Cytogenetics in acute leukemia. *Blood Rev*. 2004;18(2):115–36. doi:10.1016/S0268-960X(03)00040-7.
28. Dastugue N, Suciú S, Plat G, Frank Speleman F, Cavé H, Girard S, Bakkus M, Pagès MP, Yakouben K, Nelken B, Uyttebroeck A, Gervais C, Lutz P, Teixeira MR, Heimann P, Ferster A, Rohrlích P, Collonge MA, Munzer M, Luquet I, Boutard P, Sirvent N, Karrasch M, Bertrand Y, Benoi Y. Hyperdiploidy with 58-66 chromosomes in childhood B-acute lymphoblastic leukemia is highly curable: 58951 CLG-EORTC results. *Blood*. 2013;121(13):2415–23. doi:10.1182/blood-2012-06-437681.
29. Nygaard U, Larsen J, Kristensen TD, Wesenberg F, Jonsson OG, Carlsen NT, Forestier E, Kirchhoff M, Larsen JK, Schmiegelow K, Christensen IJ. Flow cytometric DNA index, G-band karyotyping, and comparative genomic hybridization in detection of high hyperdiploidy in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2006;28(3):134–140.
30. Rittebach J, Hiddemann W, Beck J. Detection of hyperdiploid karyotypes (>50 chromosomes) in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL) using fluorescence on situ hybridization (FISH). *Leukemia*. 1998;12:427–433.
31. Harrison CJ, Moorman A V, Barber KE, Broadfield ZJ, Cheung KL, Harris RL, Jalali GR, Robinson HM, Strefford JC, Stewart A, Wright S, Griffiths M, Ross FM, Harewood L, Martineau M. 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;129(4):520–30. doi:10.1111/j.1365-2141.2005.05497.x.
32. Ito C, Kumagai M, Manabe A, Raimondi SC, Behm FG, Murti KG, Rubnitz JE, Pui CH, Campana D. Hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia with 51 to 65 chromosomes: a distinct biological entity with a marked propensity to undergo apoptosis. *Blood*. 1999;93(1):315–20.
33. Heerema NA, Sather HN, Sensel MG, Zhang T, Hutchinson RJ, Nachman JB, Lange BJ, Steinherz PG, Bostrom BC, Reaman GH, Gaynon PS, Uckun FM. Prognostic impact of trisomies of chromosomes 10, 17, and 5 among children with acute lymphoblastic leukemia and high hyperdiploidy (> 50 chromosomes). *J Clin Oncol*. 2000;18(9):1876–87. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10784628>.

34. Sandoval C, Mayer SP, Ozkaynak MF, Tugal O, Jayabose S. Trisomy 5 as a sole cytogenetic abnormality in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet.* 2000;118(1):69–71.
35. Paulsson K, Forestier E, Lilljebjörn H, Heldrup J, Behrendtz M, Young BD, Johansson B. Genetic landscape of high hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(50):21719–24. doi:10.1073/pnas.1006981107.
36. Schwab CJ, Chilton L, Morrison H, Jones L, Al-Shehhi H, Erhorn A, Russell LJ, Moorman AV, Harrison CJ. Genes commonly deleted in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: association with cytogenetics and clinical features. *Haematologica.* 2013;98(7):1081–8. doi:10.3324/haematol.2013.085175.
37. Braoudaki M, Tzortzatou-Stathopoulou F. Clinical cytogenetics in pediatric acute leukemia: an update. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2012;12(4):230–7. doi:10.1016/j.clml.2012.04.004.
38. Pui CH, Carroll a J, Head D, Raimondi SC, Shuster JJ, Crist WM, Link MP, Borowitz MJ, Behm FG, Land VJ, Nash MB, Pullen DJ, Look AT Near-triploid and near-tetraploid acute lymphoblastic leukemia of childhood. *Blood.* 1990;76(3):590–6.
39. Raimondi SC, Zhou Y, Shurtleff S a, Rubnitz JE, Pui C-H, Behm FG. Near-triploidy and near-tetraploidy in childhood acute lymphoblastic leukemia: association with B-lineage blast cells carrying the ETV6-RUNX1 fusion, T-lineage immunophenotype, and favorable outcome. *Cancer Genet Cytogenet.* 2006;169(1):50–7. doi:10.1016/j.cancergencyto.2006.04.006.
40. Lemez P, Attarbaschi A, Béné MC, Bertrand Y, Castoldi G, Forestier E, Garand R, Haas OA, Kagialis-Girard S, Ludwig WD, Matutes E, Mejstříková E, Pages MP, Pickl W, Porwit A, Orfao A, Schabath R, Starý J, Strobl H, Talmant P, van't Veer MB, Zemanová Z. Childhood near-tetraploid acute lymphoblastic leukemia: an EGIL study on 36 cases. *Eur J Haematol.* 2010;85(4):300–8. doi:10.1111/j.1600-0609.2010.01493.x.
41. Mkrtchyan H, Garcia Ney DR, de Ventura ES, Liehr T, Felix GR, de Jesus Marques-Salles T, Abdelhay E, Macedo Silva ML. Molecular cytogenetic studies characterize a near-triploid complex karyotype in a child with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet.* 2010;197(1):71–4. doi:10.1016/j.cancergencyto.2009.09.019.
42. Raimondi SC, Zhou Y, Mathew S, Shurtleff SA, Sandlund JT, Rivera GK, Behm FG, Pui CH. Reassessment of the prognostic significance of hypodiploidy in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer.* 2003;98(12):2715–22. doi:10.1002/cncr.11841.
43. Harrison CJ, Moorman A V, Broadfield ZJ, Cheung KL, Harris RL, Jalali GR, Robinson HM, Barber KE, Richards SM, Mitchell CD, Eden TOB, Hann IM, Hill FGH, Kinsey SE, Gibson BES, Lilleyman J, Vora A, Goldstone AH, Franklin IM, Durrant J, Martineau M. Three distinct subgroups of hypodiploidy in acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol.* 2004;125(5):552–9. doi:10.1111/j.1365-2141.2004.04948.x.

44. Homfeld L, Wei L, Diaz-Flores E, Walsh M, Zhang J, Ding L, Payne-Turner D, Churchman M, Andersson A, Chen SC, McCastlain K, Becksfort J, Ma J, Wu G, Patel SN, Heatley SL, Phillips LA, Song G, Easton J, Parker M, Chen X, Rusch M, Boggs K, Vadodaria B, Hedlund E, Drenberg C, Baker S, Pei D, Cheng C, Huether R, Lu C, Fulton RS, Fulton LL, Tabib Y, Dooling DJ, Ochoa K, Minden M, Lewis ID, To LB, Marlton P, Roberts AW, Raca G, Stock W, Neale G, Drexler HG, Dickins RA, Ellison DW, Shurtleff SA, Pui CH, Ribeiro RC, Devidas M, Carroll AJ, Heerema NA, Wood B, Borowitz MJ, Gastier-Foster JM, Raimondi SC, Mardis ER, Wilson RK, Downing JR, Hunger SP, Loh ML, Mullighan CG. The genomic landscape of hypodiploid acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet.* 2013;45(3):242–252. doi:10.1038/ng.2532.
45. Safavi S, Forestier E, Golovleva I, Barbany G, Nord KH, Moorman AV, Harrison CJ, Johansson B, Paulsson K. Loss of chromosomes is the primary event in near-haploid and low- hypodiploid acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 2013;27(1):248–50. doi:10.1038/leu.2012.227.
46. Chen C, Bartenhagen C, Gombert M, Okpanyi V, Binder V, Rottgers S, Bradtke J, Teigler-Schlegel A, Harbott J, Ginzel S, Thiele R, Fischer U, Dugas M, Hu J, Borkhardt A. Next-Generation-Sequencing-Based Risk Stratification and Identification of New Genes Involved in Structural and Sequence Variations in Near Haploid Lymphoblastic Leukemia. *Genes Chromosomes Cancer.* 2013;52:564–579. doi:10.1002/gcc.
47. Stark B, Jeison M, Gobuzov R, Krug, H, Glaser-Gabay L, Luria D, El-Hasid R, Harush M B, Avrahami G, Fisher S, Stein J, Zaizov R, Yaniv I. Near haploid childhood acute lymphoblastic leukemia masked by hyperdiploid line: detection by fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet Cytogenet.* 2001;128(2):108–13.
48. Shaffer LG, McGowan-Jordan J, Schmid M, eds. *ISCN 2013: an international system for human cytogenetic nomenclature.* Unionville, CT: Karger; :140. doi:ISBN 978-331-8022-537.
49. Michalová K. *Úvod do lidské cytogenetiky.* Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví v Brně; 1999:172. doi:80-7013-281-7.
50. Kuglík P, Oltová A. Současné možnosti cytogenetických vyšetření u hematologických malignit. In: *Hematologie, přehled maligních hematologických nemocí.* 2nd ed. Praha: GRADA publishing; 2008:349–57.
51. Zemanová Z, Michalová K, Brezinová J, Sindelárová L, Kurková S, Smísek P, Zuna J, Trka J, Starý J. Fluorescent in situ hybridization (FISH) in the diagnosis of acute childhood lymphatic leukemia (ALL). *Cas Lek Ces.* 2001;140(17):519–24.
52. Michalová K, Zemanová Z, Brezinová J. Multicolor fluorescence in situ hybridization (mFISH). *Cas Lek Ces.* 2001;140(4):99–103.



53. Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S, Nickolenko J, Benner A, Döhner H, Cremer T, Lichter P. Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes Chromosomes Cancer*. 1997;20(4):399–407. doi:10.1002/(SICI)1098-2264(199712)20:4<399::AID-GCC12>3.0.CO;2-I.
54. Brennan C, Zhang Y, Leo C, Feng B, Cauwels C, Aguirre A J, Kim M, Protopopov A, Chin L. High-Resolution Global Profiling of Genomic Alterations with Long Oligonucleotide Microarray. *Cancer Res*. 2004;64:4744–4748.
55. Carvalho B. High resolution microarray comparative genomic hybridisation analysis using spotted oligonucleotides. *J Clin Pathol*. 2004;57(6):644–646. doi:10.1136/jcp.2003.013029.
56. Dorritie K, Montagna C, Difilippantonio MJ, Ried T. Advanced molecular cytogenetics in human and mouse. *Expert Rev Mol Diagn*. 2004;4(5):663–76. doi:10.1586/14737159.4.5.663.
57. Dawson AJ, Yanofsky R, Vallente R, Bal S, Schroedter I, Liang L, Mai S. Array comparative genomic hybridization and cytogenetic analysis in pediatric acute leukemias. *Curr Oncol*. 2011;18(5):e210–7.