

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

Prognosztikai vizsgálatok krónikus myeloid leukémiában

dr. Kajtár Béla

Doktori iskola: Klinikai orvostudományok
Doktori iskola vezetője: prof. dr. Komoly Sámuel
Program: Molekuláris pathomorphologia
Program- és témavezető: prof. dr. Pajor László



Pécsi Tudományegyetem
Orvostudományi Kar
Pathológiai Intézet

Pécs, 2011.

Rövidítések jegyzéke

ABL1	c-abl onkogén 1, receptor tirozin-kináz
AP	akcelerált fázis
ATM	ataxia teleangiectasia mutált
BC	blasztos krízis
BCR	breakpoint cluster region
BCR-ABL DF	kétfúziós <i>BCR-ABL1</i> FISH szonda
BCR-ABL SF	egyfúziós <i>BCR-ABL1</i> FISH szonda
CCyR	teljes citogenetikai válasz (0/20 metafázis Ph+)
CEP8	8-as kromoszóma centromerikus régiójára specifikus FISH szonda
CHR	teljes hematológiai válasz
CML	krónikus myeloid leukémia
CMR	teljes molekuláris válasz ($\leq 0,01$ v. $0,0032\%$ <i>BCR-ABL1/ABL1</i> arány)
CP	krónikus fázis
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
ELN	Európai Leukémia Hálózat
e13a2	M-Bcr-nek megfelelő, <i>BCR-ABL1</i> töréspont (b2a2)
e14a2	M-Bcr-nek megfelelő, <i>BCR-ABL1</i> töréspont (b3a2)
e19a2	μ -Bcr-nek megfelelő <i>BCR-ABL1</i> töréspont (p230 fehérjét eredményez)
e1a2	m-Bcr-nek megfelelő <i>BCR-ABL1</i> töréspont (p190 fehérjét eredményez)
FISH	fluoreszcencia <i>in situ</i> hibridizáció
MCyR	major citogenetikai válasz (0-7/20 metafázis Ph+)
mCyR	minor citogenetikai válasz (8-13/20 metafázis Ph+)
minCyR	minimális citogenetikai válasz (14-19/20 metafázis Ph+)
MMR	major molekuláris válasz ($\leq 0,1\%$ <i>BCR-ABL1</i> a nemzetközi skálán)
NCyR	nincs citogenetikai válasz (20/20 metafázis Ph+)
OCT1	organikus kationtranszporter 1
PCR	polimeráz láncreakció
PCyR	parciális citogenetikai válasz (1-7/20 metafázis Ph+)
Ph ¹	Philadelphia-kromoszóma
RB1	retinoblastoma 1
ROC-analízis	„receiver operating characteristic” analízis
RQ-PCR	valós idejű, kvantitatív PCR
RT-PCR	reverz transzkripciót követő polimeráz láncreakció
SD-1	Ph+ ALL-s beteg vérésejtjeiből származó B lymphoblastos sejtvonal
XPB	xeroderma pigmentosum B

Bevezetés

A krónikus myeloid leukémia (CML) szinte paradigmájává vált a modern onkológiának. A CML volt az első leukémia, melyet leírtak 165 évvel ezelőtt. A CML kapcsán észlelték az első, malignitással összefüggő citogenetikai eltérést, a Philadelphia-kromoszómát (Ph-kromoszóma), és a CML volt az első, melynek patogenezisében egy génfúziónak, az abnormális tirozin-kináz aktivitású fehérjét eredményező *BCR-ABL1* gén kialakulásának központi szerepet tulajdonítottak. A BCR-ABL1 fehérje felismerése új irányvonalat nyitott az onkoterápiában, a CML volt az első betegség, melynek kapcsán a molekulárisan célzott terápia igazán látványos eredményeket hozott. Mindezek mellett a CML volt az első betegség, melynek terápiájának nyomon követéséhez részletes molekuláris és genetikai stratégiát dolgoztak ki.

Az ezredfordulón megjelent, első tirozin-kináz gátló gyógyszer, az imatinib soha nem látott eredményeket hozott a CML kezelésében; a 8 éves teljes túlélés 85%, a progresszió gyakorisága csupán 8%, mely az esetek túlnyomó többségében a kezelés első három évében fordul elő.

A gyógyszer azonban nem minden beteg számára hatásos. A betegek 20-25%-a nem mutat kívánatos mértékű terápiás választ, 8-10%-uk intoleráns a gyógyszerre. Az ő számukra a kedvező túlélés nem garantált, felmerül az igény hatékonyabb tirozin-kináz gátlásra. Ma már két második generációs tirozin-kináz gátló, a nilotinib és a dasatinib is elérhető a CML-es betegek kezelésében, melyek az imatinibhez képest hamarabb, mélyebb terápiás választ képesek kiváltani, túlélés szempontjából előnyük vizsgálata jelenleg is zajlik.

Alapvető fontosságú kérdés, hogy milyen módszerrel lehet a lehető legkorábban felismerni azokat a betegeket, akik számára az imatinib kezelés nem elég hatásos. Jelenleg ez a módszer elsősorban a terápiás válasz vizsgálata a kezelés meghatározott időpontjaiban, mely a csontvelői sejtek karyotipizálásával, valós idejű kvantitatív polimeráz láncreakcióval (RQ-PCR), illetve fluoreszcencia *in situ* hibridizációval (FISH) történhet.

Fontos kérdés, hogy milyen tényezők vezetnek imatinib rezisztenciához. Ezek pontos ismerete segíthet a hatékony terápiás stratégia kialakításában, amivel az imatinib kezelésre nem megfelelően reagáló betegek túlélése is javítható.

Tisztázatlan kérdés, hogy a transzlokáció különböző töréspontjainak mi a jelentősége a betegség fenotípusának meghatározásában. A különböző töréspontok következtében eltérő

BCR-ABL1 transzkriptum és fehérje képződik, és bár ezek eltérő *in vitro* transzformációs potenciállal rendelkeznek, nem világos, hogy mi a prognosztikai jelentőségük.

Bár általánosan elfogadott tétel, hogy a *BCR-ABL1* transzlokáció szükséges és elégséges feltétele a CML kialakulásának, néhány megfigyelés felveti annak a lehetőségét, hogy a transzlokáció nem mindig elsődleges citogenetikai eltérés, megjelenhet korábbi genetikai instabilitás következményeként is. Ennek a lehetőségnek a tisztázása szintén alapvető fontosságú, hiszen a terápia jelenleg csupán a *BCR-ABL1* pozitív sejtek szelektív elpusztítására épít.

Célkitűzések

1. A FISH szerepének meghatározása a CML-es betegek nyomon követésében.
2. Az automatizált FISH analízis előnyeinek meghatározása a manuális FISH vizsgálathoz képest a CML-es betegek nyomon követésének szempontjából.
3. Az imatinib-rezisztens esetekben a rezisztencia genetikai, illetve molekuláris hátterének elemzése.
4. A CML-ben ritkán előforduló *BCR-ABL1* töréspontok prognosztikai jelentőségének vizsgálata.
5. A másodlagos citogenetikai eltérések értelmezési nehézségeinek bemutatása egy CML-es beteg követése kapcsán.
6. A Philadelphia-kromoszóma pozitív (Ph+) és negatív sejtekben egyidejűleg jelentkező, másodlagos citogenetikai eltérések jelentőségének meghatározása két CML-es beteg kapcsán.

Anyag és módszerek

Minták

A vizsgálatok alapját 356 CML-es beteg összesen 2900 csontvelői és/vagy perifériás vérmintája képezte. A minták 2003 és 2011 között érkeztek laboratóriumunkba elsősorban Pécsről, Szekszárdról, Szombathelyről, Zalaegerszegről, Tatabányáról, illetve Veszprémből.

Karyotipizálás

A csontvelői mintákon 24, illetve 48 órás tenyésztést követően, valamint tenyésztés nélkül végeztünk G-sávozással citogenetikai vizsgálatot. Minden minta esetén legalább 20 metafázist igyekeztünk értékelni. A karyotípusokat a Nemzetközi Humán Citogenetikai Nomenklátúra alapján írtuk le.

Fluoreszcencia in situ hibridizáció

A FISH vizsgálatokat kereskedelmi forgalomban kapható, kétszínű, egy-, illetve kétfúziós szondákkal (BCR-ABL SF, BCR-ABL DF, Vysis Inc.) végeztük. A manuális értékelés során 200 sejtet vizsgáltunk, az álpozitivitás felső határát egészséges felnőttek mintái alapján, átlag + 2 SD módszerrel határoztuk meg. FISH vizsgálatra alvadásgátolt perifériás vér, illetve csontvelői mintákat használtunk.

Az automatizált FISH analízis egy Metafer 4.0 képfelvevő és képanalizáló szoftverrel, valamint egy Zeiss Axioplan2ie MOT motorizált, epifluoreszcens mikroszkóppal történt.

A konszekutív FISH vizsgálatok során először kereskedelmi forgalomban kapható, 8-as centromerikus szondával (CEP8, Vysis Inc.) végeztünk vizsgálatot, majd a Metafer 4.0 rendszerrel felvételeket készítettünk a sejtekről, majd a jelölés eltávolítását követően rehibridizáció történt BCR-ABL DF szondával. A korábban rögzített koordináták és galéria képek alapján az első lépésben analizált sejtek visszakereshetőek voltak, így vizsgálni tudtuk a 8-as centromert érintő számbeli eltérések, illetve a *BCR-ABL1* transzlokáció egymáshoz való viszonyát.

PCR vizsgálatok

A PCR vizsgálatok reverz transzkripciót követően a 'Europe Against Cancer' program által ajánlott primer kombinációkkal történtek. Kvalitatív vizsgálatkor nested PCR vizsgálat történt, az RNS minőségének ellenőrzése *ABL1* 2-es és 3-as exonoknak megfelelő primerekkel történt.

A kvantitatív *BCR-ABL1* vizsgálatot Ipsogen BCR-ABL FusionQuant kittel a gyári protokollnak megfelelően végeztük, reverz transzkripciót követően. Laboratóriumunk 2010-ben egy országos standardizációs programban vett részt, módszerünk Nemzetközi Konverziós faktora 0,9253.

ABL1 kináz domén mutációjának vizsgálata

Az *ABL1* kináz domén pontmutációinak kimutatása direkt, bidirekcionális szekvenálással történt BigDye 1.1 cycle sequencing kit és ABI PRISM 310 (Applied Biosystems, CA, USA) automata kapilláris elektroforézis készülék felhasználásával. A jelölés reverz transzkripciót, majd a *BCR-ABL1* kináz doménjének szelektív, heminested PCR felsokszorozását követően történt.

Eredmények és megbeszélés

1. A FISH szerepének meghatározása a CML monitorizálása kapcsán

A FISH lehetséges szerepe a CML-es betegek követése során a bizonyítottan prognosztikai értéket hordozó csontvelői karyotipizálás kiváltása lehet. Ennek felderítése érdekében a krónikus fázisú CML-es betegek követéses mintái közül 150 perifériás vérminta esetén BCR-ABL SF szondával végzett FISH vizsgálat eredményét hasonlítottuk össze az egyidőben végzett csontvelői karyotipizálás eredményével. A FISH teljes citogenetikai válasz (CCyR, 20 metafázisból 0 Ph+) esetén 0 – 13,0% közötti *BCR-ABL1* pozitivitást mutatott (átlag 5,0%). Receiver operating characteristic (ROC) analízis alapján 7%-os FISH határérték bizonyult a legjobbnak a CCyR fennálltnak, vagy hiányának megítélése szempontjából. Ezzel a határértékkel 81%-os szenzitivitással és 84%-os specificitással lehetett a CCyR jelenlétét meghatározni a FISH alapján.

Tekintettel arra, hogy a CCyR és a parciális citogenetikai válasz (PCyR, 20 metafázisból 1 – 7 Ph+) között jelentős az átfedés, megvizsgáltuk, hogy mi a major citogenetikai válasz (MCyR) – CCyR vagy PCyR – és a FISH kapcsolata. 15 %-os határértéket használva az MCyR fennállta 95%-os szenzitivitással és 96%-os specificitással határozható meg a perifériás vérmintán elvégzett FISH segítségével, BCR-ABL SF szonda alkalmazása esetén.

120 perifériás mintát vizsgáltunk a fentiekhez hasonlóan BCR-ABL DF szondával. 1% határérték bizonyult a legjobbnak, ezt használva a CCyR fennállta 91%-os szenzitivitással és 96% specificitással, 15%-os határérték mellett az MCyR 99% szenzitivitással, és 90%-os specificitással volt meghatározható.

A karyotipizálás és az RQ-PCR eredményei is szoros korrelációt mutattak. 1% *BCR-ABL1/ABL1* határértéket használva az RQ-PCR eredmény alapján a CCyR fennállta ugyan 98%-os specificitással, de csupán 82%-os szenzitivitással volt megbecsülhető. Az MCyR és a 10% RQ-PCR összefüggése szempontjából a specificitás és a szenzitivitás 95%, illetve 90% volt.

A CML-es betegek nyomon követésének alapvizsgálata a csontvelő karyotipizálása. A vizsgálathoz csontvelő aspiráció szükséges, ráadásul a kimutathatóság határa viszonylag magas; 14%-nyi Ph-pozitivitás az, ami 95%-os biztonsággal kimutatható. A teljes és a parciális citogenetikai válaszokat együttesen major citogenetikai válaszként kell kezelni, hiszen néhány százalékos Ph-pozitivitás esetén jelentős az átfedés a két kategória között.

Az érzékeny, valós idejű PCR vizsgálat (RQ-PCR) egyre inkább teret nyer a CML nyomon követésében, segítségével akár 10^{-4-5} nagyságrendű reziduális betegség is kimutatható. Számos tanulmány alapján a vizsgálat szoros korrelációt mutat a karyotipizálás eredményével, a vizsgálat eredménye azonban egészen eltérő biológiai jelentést hordoz. Az összefüggés a karyotipizálással csupán a kezelés előrehaladtával válik szorossá; ha nincs teljes citogenetikai válasz, a citogenetikai kategóriák nem ítéltetők meg biztonsággal.

A FISH sejtalapú vizsgálat, elvégezhető akár perifériás vérmintán is. Érzékenysége több nagyságrenddel elmarad az RQ-PCR érzékenységétől, így azt kiváltani nem tudja. A kimutathatóság határa a használt szondától függően 2 – 9%. A jelenlegi nemzetközi ajánlásokban nem tisztázott a FISH pontos szerepe a CML nyomon követésének szempontjából.

Vizsgálataink alapján a FISH szerepe a terápia nyomon követése során az MCyR és a CCyR fennállásának megítélése lehet. Az Európai Leukémia Hálózat ajánlása alapján szuboptimális a válasz, ha a kezelés 6. hónapjában nincs MCyR, vagy a 12. hónapjában nincs CCyR, és terápiás kudarcnak felel meg az, ha a kezelés 12. hónapjában nincs MCyR, vagy a 18. hónapban nincs CCyR. A már kialakult MCyR, vagy CCyR elvesztése kedvezőtlen prognosztikai jel a kezelés bármely időpontjában. A fentiek azok az esetek, amikor a karyotipizálás sikertelensége, vagy hozzáférhetetlensége esetén a FISH alkalmazása felmerül. Az MCyR, illetve CCyR meglétét FISH alapján nagyobb szenzitivitással lehet megítélni, mint RQ-PCR segítségével, így a drágább, vagy potenciálisan veszélyesebb kezelés bevezetését jelentő terápiás kudarc kijelentése körültekintőbben történhet.

2. Az automatizált és a manuális FISH összehasonlítása

Beállítottunk egy automatizált mikroszkópos rendszert egyfúziós *BCR-ABL1* FISH szonda értékelésére, majd az automatizált analízis eredményeit összevetettük a manuális értékelésével. Először pozitív és negatív kontroll minták használatával megtanítottuk az automatizált rendszert a sejtek, illetve a különböző színű FISH jelek megfelelő felismerésére. A sejt felismerést elsősorban az összetapadt sejtek zavarták, melyeket a rendszer egyedi sejtnek ismert fel. Ezek kizárása a sejtek geometriai paramétereinek alapján könnyen lehetséges volt, a kizárás után a sejt felismerés 99,9% specificitással és 88,7%-os szenzitivitással történt.

A műszer a különböző színű FISH jeleket 80,9% és 84,9%-os pontossággal ismert fel. A helytelen jelfelismerés nem várt jelszámot eredményezett a sejtekben. A nem megfelelő jelszámú sejtek kizárása után a megmaradt sejtekben a helyes jelfelismerés 99,6%-os volt.

A fentieket követően a pozitív és a negatív sejtek megkülönböztetése a piros és a zöld FISH jelek közötti legkisebb távolság alapján történt. Az automatizált analízis álpozitivitása és álnegativitása 6,7%, illetve 5,5% volt. A manuális értékelés esetében az értékek 5,8%, illetve 2,7% voltak.

A továbbiakban 18 CML-es beteg perifériás vérmintáján végzett FISH manuális és automatizált analízisét hasonlítottuk össze. Olyan betegek mintáit választottuk, akik kis arányú, a kimutathatósági határ közelében elhelyezkedő mértékű reziduális betegséggel rendelkeztek. A manuális értékelést három vizsgáló végezte, egymástól függetlenül.

Az automatizált és a manuális értékelés eredményei szoros korrelációt ($R^2 = 0,99$) mutattak, az eredmények különbségeinek átlaga csupán 3,7% volt. Az automatizált analízis reprodukálhatósága lényegesen jobbnak bizonyult, mint a manuálisé. A három manuális vizsgáló eredményei kb. 20%-os tartományban tértek el egymástól, a 18 minta közül 12 esetben az egyik vizsgáló nem értett egyet a másik kettővel abban, hogy van-e a mintában az álpozitivitási határt meghaladó pozitivitás. Az automatizált analízist a manuálishoz hasonlóan háromszor 200 sejtet végezve az eredmények csupán kb. 8%-os tartományban különböztek, ami lényegében a mintavételi hibának felel meg. A 18 minta közül csupán 7 esetben nem volt egyértelmű, hogy a minta pozitív, vagy negatív.

A vizsgálat alapján kijelenthető, hogy elfogadható pontosságú automatizált FISH analízis lehetséges. Bár az álpozitivitási és álnegativitási arányok nem jobbak, mint a manuális analízis esetében, de kiküszöbölhető a vizsgálók közötti variabilitás, így a vizsgálat precizitása már 200 vizsgált sejt esetében is javul. Az automatizáció a vizsgált sejt szám jelentős növelését is lehetővé teszi, aminek határt csupán az informatikai háttér szab.

Ráadásul, az automatizált analízis során minden megvizsgált sejtmagról digitális felvétel is készül, így nem csak az értékelés, de a dokumentáció is megvalósul. A sejtmagok koordinátáinak rögzítésével relokalizációs vizsgálatok is lehetővé válnak, így akár immunfenotipizálással, vagy további FISH vizsgálatokkal is kombinálható az analízis.

3. Az imatinib-rezisztencia tényezői CML-ben

48 imatinib rezisztenciát mutató CML-es beteg esetében vizsgáltuk meg a rezisztencia háttérében álló citogenetikai, illetve molekuláris tényezőket. Csontvelői karyotipizálást, FISH-t, kvalitatív, valamint kvantitatív PCR vizsgálatokat végeztünk. A megfigyelt paramétereket 98 rezisztenciát nem mutató beteg hasonló jellemzőivel hasonlítottuk össze.

A Ph-transzlokáció típusa, a töréspontok közelében kialakult interstíciális deléciók, valamint a BCR-ABL1 transzkriptum típusa (b2a2, illetve a b3a2 töréspont) nem mutatott eltérő gyakoriságot a rezisztens, illetve a rezisztenciát nem mutató esetek között, így vélhetően nem mutat összefüggést a terápiás válasszal.

A rezisztens betegek 29%-ában figyeltünk meg *ABL1* kináz domén pontmutációt. Az irodalomban a mutációk gyakorisága tág tartományban, 21 – 90% között változik, attól függően, hogy milyen fázisban, milyen szintű (citogenetikai, vagy hematológiai) rezisztenciát vizsgáltak. A betegek csupán 13%-ában (6/48) lehetett a megfigyelt pontmutáció felelős az imatinib rezisztenciáért, hiszen a többi esetben később jelent meg, mint maga a rezisztencia. Nem zárható ki annak a lehetősége, hogy az adott mutáció vizsgálatunk érzékenységi határa alatti mennyiségben már a rezisztencia észlelése előtt is jelen volt. A rezisztencia azonban a reziduális leukémiás klón felszaporodását jelenti; ha ilyenkor egy mutáció a leukémiás sejtek csupán kis hányadában van jelen, akkor aligha lehet közvetlenül felelős a várt terápiás válasz elmaradásáért.

A fenti eredmény meglepő annak fényében, hogy az *ABL1* kináz domén mutációkat a tirozin kináz inhibitor rezisztencia egyik leggyakoribb okaként tartják számon, de számos tanulmány felveti annak a lehetőségét, hogy a mutációk nem közvetlen okozói a rezisztenciának, inkább a rezisztenciához vezető genetikai instabilitás indikátorai.

A rezisztenciát mutató betegek 46%-ában (22/48) a Ph-transzlokáció mellett megjelenő, addicionális citogenetikai eltérés igazolódott. 14/48 esetben a Ph-kromoszóma duplikációját, 1/48 esetben *BCR-ABL1* amplifikációt figyeltünk meg, mely gyakoriságok hasonlóak az irodalomban leírt gyakoriságokhoz: 7/32, illetve 2/32.

Az imatinib rezisztenciát mutató esetekben a leggyakrabban klonális evolúció, illetve az *ABL1* kináz domén pontmutációi mutatkoztak, de nem egyértelmű ezek oki szerepe. 14 esetben semmilyen citogenetikai, vagy molekuláris eltérést sem sikerült igazolni. Feltételezhető, hogy a nem megfelelő terápiás válasz hátterében gyakran a mindennap használandó okozó gyógyszer nem kellő rendszerességű szedése, vagy kedvezőtlen farmakokinetikai tényezők állnak.

4. Ritka *BCR-ABL1* töréspontok prognosztikai jelentősége CML-ben

Három olyan krónikus fázisú CML-es beteg esetét vizsgáltuk, akiknél kizárólag m-bcr töréspontú *BCR-ABL1* transzkriptum igazolódott. Monocytosis egyik esetben sem volt jelen. Egyikük interferon kezelés mellett kialakult akcelerált fázis miatt, a másik két beteg elsővonalbeli kezelésként részesült imatinib terápiában. Mindhárom beteg esetében teljes hematológiai válasz alakult ki, ám egyiküknél citogenetikai válasz nem jelentkezett, 5 éves követés alatt további progresszió nem történt. A másik két beteg egyikének betegsége a kezelés 19. hónapjában visszaesett, majd myeloblastos krízis alakult ki, a beteg a kezelés 39. hónapjában elhunyt. A harmadik beteg 3 éves követés után teljes citogenetikai választ mutat.

Egy további krónikus fázisú CML-es beteget vizsgáltunk, akinél μ -bcr töréspontú *BCR-ABL1* mRNA jelenléte igazolódott. Kezdetben interferon kezelés indult, majd emelt dózisú imatinib terápiára, végül allogén csontvelő transzplantációra került sor átmeneti javulást követő blasztos krízis jelentkezése miatt. A transzplantáció után teljes citogenetikai válasz alakult ki, ám 5 hónappal később ismét blasztos krízis jelentkezett. Bár sikerült újra teljes citogenetikai választ elérni, a beteg szeptikus sokkban elhunyt.

A CML-es betegek többségében a *BCR* gén töréspontja a major breakpoint cluster region-ben (M-bcr) található, melynek közvetkeztében 210 kDa kiméra fehérje keletkezik. Ritkán, a betegek kb. 1%-ában a töréspont máshol helyezkedik el. Ilyen alternatív töréspontok a m-bcr (e1a2 transzkriptum), ami akut lymphoblastos leukémiában gyakori, és 190 kDa fehérjét eredményez, illetve a még ritkább, μ -bcr (e19a2 transzkriptum), ami 230 kDa tömegű fehérjéhez vezet. A különböző *BCR-ABL1* fehérjék *in vitro* eltérő transzformációs potenciállal rendelkeznek. Az irodalom alapján m-bcr töréspontú *BCR-ABL1* transzkriptum kizárólagos jelenléte CML-ben monocytosissal, valamint kedvezőtlen prognózissal társul, míg

a μ -bcr töréspont krónikus neutrophil leukémiához hasonlóan a neutrophil granulocyták túlsúlyával, és enyhébb lefolyással társul.

A megvizsgált négy eset nem támasztja alá az irodalom alapján feltételezett fenti összefüggéseket a megfigyelhető fenotípus és a ritka töréspontú BCR-ABL1 transzkriptumok között. A m-bcr típusú transzkriptum kizárólagos jelenléte kedvezőtlen kórlefoiyásra utal tanulmányunk alapján, hiszen három beteg közül kettő nem ért el CCyR-t, de egyik beteg sem mutatott monocytosist. A μ -bcr töréspontot mutató betegünk többszörös blasztos krízist követően életét veszttette.

Továbbra sem világos, hogy ugyanaz a genetikai eltérés miért képes eltérő fenotípust kiváltani, illetve, hogy mi az összefüggés a BCR-ABL1 fehérjék eltérő *in vitro* transzformációs képessége és az általuk okozott betegségek fenotípusa között.

5. A Ph-transzlokáció melletti citogenetikai eltérések értelmezésének nehézségei egy CML-es beteg követésének kapcsán

Egy 44 éves férfi esetében a CML diagnózisakor elvégzett karyotipizálás során a Ph-pozitivitás mellett további citogenetikai abnormalitások igazolódtak, melyek hat különböző kromoszómát érintettek. A halmozott másodlagos eltérések jelenléte agresszív lefolyású betegséget vetített elő. A megkezdett imatinib kezelés mellett neutro- és thrombocytopenia lépett fel, ezért a dózist csökkenteni kellett. A kezelés 8. hónapjában csupán minor citogenetikai válasz állt fenn, ami szuboptimális válasznak felel meg, de a 20. hónaptól teljes citogenetikai válasz, a 60. hónaptól major molekuláris válasz jelentkezett.

Az első kontroll citogenetikai vizsgálat során felmerült az eltérések konstitucionális jellege, ezért a karyotipizálást perifériás lymphocytákon is elvégeztük phorbol-acetát (TPA) mitogén-stimulációt követően. A vizsgálat során valamennyi metafázis Ph-negativitást mutatott, a korábban látott további eltérések azonban a sejtek 100%-ában jelen voltak. A későbbi vizsgálatok során a megfigyelt eltérések továbbra is valamennyi sejtben jelen voltak.

Ezt követően a beteg családjának három generációját átfogva, hét családtag esetében elvégeztük a perifériás lymphocyták karyotipizálását. A hat kromoszómát érintő három konstitucionális transzlokáció hat hozzátartozóban megfigyelhető volt, kettőben két eltérés is jelen volt, de mindhárom eltérés kizárólag a beteg mintáiban volt kimutatható.

A fenti eset jól mutatja, hogy míg a FISH és a PCR-alapú módszerek a *BCR-ABL1* transzlokáció célzott vizsgáló módszerei, a karyotipizálás az egész genomról szolgáltat adatot.

A másodlagos citogenetikai eltérések prognosztikai értékelését bizonyos esetekben ritkán előforduló, konstitucionális aberrációk nehezíthetik. Egyelőre nincs adat arra, hogy a konstitucionális citogenetikai eltérések növelnék a malignus hematológiai betegségek rizikóját, de esetünk rávilágít annak a lehetőségére, hogy halmozódó konstitucionális transzlokációkat eredményező genetikai instabilitás állhat a Philadelphia-transzlokáció hátterében is. Szerencsére a beteg, valamint testvérének gyermekei nem mutatják az öröklött genetikai instabilitás fokozódását, a családtagokban sem CML, sem egyéb malignus betegség nem jelentkezett.

6. A Philadelphia-pozitív és negatív sejtekben egyidejűleg jelentkező, másodlagos citogenetikai eltérések jelentősége két CML-es beteg kapcsán.

Egy 50 éves férfi, és egy 40 éves nő mintáit vizsgáltuk. Mindkét beteg esetében krónikus fázisú CML miatt imatinib kezelés indult. Mindkét beteg kezelése kapcsán az imatinib dózist átmenetileg csökkenteni kellett cytopeniák jelentkezése miatt. A citogenetikai nyomon követés során a két betegnél 6., illetve a 16. hónapban 8-as triszómia jelentkezett a Ph-pozitív és a Ph-negatív sejtekben egyaránt.

Mindkét beteg esetében imatinib kezeléssel csupán minor citogenetikai válasz volt elérhető, ezért dasatinib kezelésre váltottak. Egyik betegnél sem volt kimutatható *ABL1* kináz domént érintő pontmutáció. Átmeneti citogenetikai javulás után, mindkét beteg esetében jelentős reziduális betegség volt észlelhető 23, illetve 27 hónapnyi dasatinib kezelés után is. A legutolsó vizsgálatnál mind a két beteg esetében kimutatható volt mindhárom abnormális klón: a Ph-pozitív, a Ph-pozitív és 8-as triszómiát hordozó, valamint a Ph-negatív és 8-as triszómiát hordozó klón.

Interfázis FISH vizsgálattal megvizsgáltuk a két beteg mintáin a 8-as triszómia és a *BCR-ABL1* transzlokáció klonális viszonyát. Mindkét beteg esetében a nyomon követés korai szakaszától kezdve kimutatható volt mindhárom abnormális klón. A különböző klónok egyértelmű szelektív előnnyel nem rendelkeztek; az idő előrehaladtával mennyiségi változásaik egyértelmű trendet nem mutattak.

Mindkét beteg imatinibre, valamint dasatinibre egyaránt rezisztensnek bizonyult. Felmerül a lehetőség, hogy mindkét beteg esetében a 8-as triszómia a Ph-transzlokációt megelőzően kialakult genetikai instabilitás következménye. Ennek a lehetősége óriási jelentőségű: ha a CML-es sejtekre jellemző genetikai instabilitás, ami gyakran tirozin-kináz

gátlókkal szembeni rezisztenciát eredményez, nem a *BCR-ABL1* abnormalis tirozin-kináz funkciójának a következménye, hanem a Ph-transzlokációt megelőzően jön létre, akkor a gyorsan megkezdett, szelektív *BCR-ABL1* gátlás sem fogja azt megszüntetni, így terápia-rezisztenciára az újabb tirozin-kináz gátlók esetében is számítani kell. Ebben az esetben célszerűbb lenne a Ph-transzlokációt megelőző abnormalitás felderítése, és ennek célzott kezelése.

Összefoglalás

1. Meghatároztuk a FISH lehetséges szerepét a CML nyomon követése során. A módszer segítségével akár perifériás vérminta alapján is nagy biztonsággal meg lehet határozni, hogy fennáll-e major, illetve teljes citogenetikai válasz, vagy sem. A kezelés kezdetén a szuboptimális válasz, illetve a terápiás kudarc pontosabban azonosítható a karyotipizálás sikertelensége esetén FISH segítségével, mint RQ-PCR-t használva.

2. Igazoltuk, hogy a FISH vizsgálat érzékenysége és megbízhatósága javítható az értékelés automatizálásával, hiszen az automatizáció a vizsgált sejtek számának jelentős növelését teszi lehetővé, a ráfordított idő növekedése nélkül. Ráadásul az értékelők közötti variabilitást kiküszöböli. Meghatároztuk az automatizált *BCR-ABL1* FISH analízis rendszerének részletes specifikációit, mely egyéb transzlokációk, illetve genetikai eltérések automatizált értékelésének is alapja lehet.

3. Megvizsgáltuk az általunk követett betegekben az imatinib rezisztencia hátterében álló molekuláris, illetve genetikai tényezőket. A leggyakoribb oknak a klonális citogenetikai evolúció bizonyult, az *ABL1* kináz domén mutáció az irodalmi adatoknál némileg kisebb arányban volt észlelhető. Számos eset kapcsán azt tapasztaltuk, hogy az *ABL1* kináz domén mutáció nem feltétlenül okozója az imatinib rezisztenciának, sokszor inkább csupán az indikátora a rezisztencia hátterében álló genetikai instabilitásnak.

4. Megállapítottuk, hogy a ritkán előforduló *BCR-ABL1* töréspontok nem jelentenek egyértelműen kedvezőtlenebb prognózist. A különböző *BCR-ABL1* mRNS és a megfigyelhető fenotípus összefüggése továbbra sem tisztázott.

5. Egy CML-es beteg, és családjának vizsgálata során a konstitucionális citogenetikai eltérések lehetséges szerepére, valamint az ezek kapcsán felmerülő differenciál diagnosztikai nehézségekre mutattunk rá.

6. Két eset alapos vizsgálatával alátámasztottuk azt a feltételezést, mely szerint a Philadelphia-transzlokáció lehet másodlagos eltérés CML-ben.

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, prof. dr. Pajor Lászlónak, aki nem csupán elindította tudományos tevékenységemet, de folyamatosan támogatta is azt, akitől megtanultam a tudományos igényű, tiszta gondolkodás fontosságát.

Hálásan köszönöm a Pathológiai Intézet minden munkatársának a mindennapokban nyújtott segítséget. Külön köszönettel tartozom Lacza Ágnesnek, László Renátának, Rozsnyai Blankának és Kiss Robertának, akik a molekuláris biológiai vizsgálatok terén nyújtottak pótolhatatlan segítséget. Köszönöm Hermes Juditnak és Kalász Verának a kitartó és áldozatos munkát a citogenetikai vizsgálatok terén.

Köszönettel tartozom dr. Méhes Gábornak, amiért a citogenetika rejtelseibe betekintést nyerhettem, köszönöm dr. Kereskai Lászlónak a baráti segítségnyújtást. Hálásan köszönöm dr. Alpár Donátnak azt a kollegiális segítséget, amit mind a munkám során, mind a dolgozat írása alatt folyamatosan nyújtott.

Továbbá köszönet illeti valamennyi hematológus kollégámat, akikkel a nap, mint nap beküldött minták kapcsán folyamatos munkakapcsolatban álltam és állok, illetve akik klinikai tapasztalatára a tudományos munkám során mindig is számíthattam. Végezetül szeretném hálámat kifejezni szerető családomnak, akik támogatása és megértése nélkül ez a munka nem valósulhatott volna meg.

Az értekezés alapját képező publikációk

Eredeti közlemények

- 1) **Kajtár B.** A BCR-ABL1 transzlokáció molekuláris biológiája. *Hemat Transzf.* 2007;40:124-34.
- 2) Andrikovics H, Nahajevszky S, Szilvási A, Bors A, Adám E, Kozma A, **Kajtár B**, Barta A, Poros A, Tordai A. First and second line imatinib treatment in chronic myelogenous leukemia patients expressing rare e1a2 or e19a2 BCR-ABL1 transcripts. *Hematol Oncol.* 2007;25(3):143-7. IF.: 1,875.
- 3) **Kajtár B**, Méhes G, Jáksó P, Kereskai L, Iványi J, Losonczy H, Egyed M, Tóth P, Tóth A, Gasztonyi Z, Dömötör M, Pajor L. A krónikus myeloid leukaemia citogenetikai és molekuláris monitorizálása. *Orv Hetil.* 2006;147(21):963-70.
- 4) **Kajtár B**, Méhes G, Lörch T, Deák L, Kneif M, Alpár D, Pajor L. Automated Fluorescent In Situ Hybridization (FISH) Analysis of t(9;22)(q34;q11) in Interphase Nuclei. *Cytometry A*, 2006 Jun;69(6):506-14. IF.: 3,293.
- 5) **Kajtar B**, Deak L, Kalasz V, Pajor L, Molnar L, Mehes G. Multiple constitutional chromosome translocations of familial nature in Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia: a report on a unique case. *Int J Hematol*, 2005 Nov;82(4):347-50. IF.: 1,670.

Idézhető absztraktok

- 1) **Kajtár B**, Alpár D, Tóth J, László R, Jáksó P, Kereskai L, Nagy Z, Pajor L. Factors of imatinib resistance in chronic myeloid leukemia. *Blood Rev.* 2007;21(S1):S78. IF.: 5,922.
- 2) **Kajtár B**, Tóth J, Alpár D, Jáksó P, Kereskai L, László R, Nagy Z, Pajor L. Simultaneous appearance of +8 in Ph+ and Ph- cells during imatinib treatment of CML: a report of two cases. *Blood Rev.* 2007;21(S1):S123. IF.: 5,922.
- 3) Méhes G, Deák L, Pajor L, Losonczy H, **Kajtár B**. Quantification of Leukemic Cells with the Philadelphia-translocation: Automated Spot Evaluation. *Blood.* 2003;102(11):216b. IF.: 10,120.

A témában tartott előadások:

- 1) A FISH szerepe a CML monitorizálásában. **Kajtár Béla**, Alpár Donát, Hermes Judit, Kereskai László, Pajor László. Magyar Haematológiai és Transzfúziológiai Társaság XXIII. Kongresszusa. Pécs, 2011. május 26-28.

- 2) Az imatinib kezelés komplex monitorozása. Klinikai hematológia szintentartó tanfolyam. **Kajtár Béla**. Pécs, 2008. szeptember 18 – 20.
- 3) 8-as triszómia szimultán megjelenése Ph+ és Ph- sejtekben imatinib kezelés mellett. **Kajtár Béla**, Hermes Judit, Alpár Donát, Jáksó Pál, Kereskai László, Kiss Roberta, Nagy Ágnes, Pajor László. Magyar Humánogenetikai Társaság 2008. évi Konferenciája. Pécs, 2008. július 11 – 13.
- 4) Genetika a CML diagnózisában és követésében. **Kajtár Béla**. Magyar Haematológiai és Transzfúziológiai Társaság CML Munkacsoportjának Ülése. Budapest, 2007. november 9.
- 5) Factors of imatinib resistance in chronic myeloid leukemia. **Béla Kajtár**, Donát Alpár, Judit Hermes, Renáta László, Pál Jáksó, László Kereskai, Zsófia Nagy, László Pajor. Congress of the International Society of Haematology, European & African Division. Budapest, 2007. augusztus 29 - szeptember 02.
- 6) Reziduális betegség CML-ben. **Kajtár Béla**. Magyar Pathológus Társaság 65. Kongresszusa. Hajdúszoboszló, 2006. október 5-7.
- 7) A BCR-ABL transzlokáció molekuláris biológiája. **Kajtár Béla**. Molekulárisan célzott diagnózis és terápia a hematológiában. Kaposvár, 2006. február 24-25.
- 8) Automatizáció lehetősége interfázis cytogenetikában: FISH illetve kombinált pheno- és genotypizálás. **Kajtár Béla**, László Renáta, Pajor Gábor, Alpár Donát. Magyar Pathológus Társaság 64. Kongresszusa. Pécs, 2005. szeptember 22-24.
- 9) BCR/ABL transzlokáció cytogenetikai és molekuláris monitorizálása chronicus myeloid leukaemia esetében. **Kajtár Béla**, Kereskai László, Pajor László. Magyar Haematológiai és Transzfúziológiai Társaság XX. Kongresszusa. Budapest, 2005. május 26-28.
- 10) CML monitorizálás fluorescens in situ hybridizatio segítségével: Javítható a sensitivitás automatizációval? **Kajtár Béla**, Méhes Gábor, Pajor László. Magyar Humánogenetikusok V. Munkakonferenciája. Szeged, 2004. nov.11-13.
- 11) Konstitucionális kromoszóma transzlokáció halmozódás egy Ph-kromoszóma pozitív chronicus myeloid leukémiás beteg családjában. **Kajtár Béla**, Deák Linda, Pajor László, Molnár Lenke, Méhes Gábor. Magyar Humánogenetikusok V. Munkakonferenciája. Szeged, 2004. nov.11-13.
- 12) Automated Fluorescent In Situ Hybridization (FISH) analysis of translocation markers: Does it improve sensitivity and specificity compared to manual analysis? **Béla Kajtár**, Donát Alpár, László Pajor. XXII. International Congress of International Society of Analytical Cytology. Montpellier, 2004. máj. 22-27.

- 13) Automated detection of t(9;22) using MetaCyte. **Béla Kajtár**, László Pajor. Metafer User Meeting. Hohwacht, 2004. máj. 12-13.
- 14) Reciprocal translocations 3D analysis of interphase nuclei. **Kajtár Béla**, Alpár Donát, Pajor László. Magyar Haematológiai és Transzfúziológiai Társaság XIX. Kongresszusa. Debrecen, 2003. május 22-25.

Egyéb publikációk - eredeti közlemények

- 1) Váróczy L, Zilahi E, Gyetvai A, **Kajtár B**, Gergely L, Sipka S, Illés A. Fc-Gamma-Receptor IIIa Polymorphism and Gene Expression Profile Do Not Predict the Prognosis in Diffuse Large B-cell Lymphoma Treated with R-CHOP Protocol. *Pathol Oncol Res.* 2011 Jun 14. [Epub ahead of print]. IF. (2010): 1,483
- 2) Nagy Z, **Kajtár B**, Jáksó P, Dávid M, Kosztolányi S, Hermes J, Kereskai L, Pajor L, Alpár D. Evolutionary sequence of cytogenetic aberrations during the oncogenesis of plasma cell disorders. Direct evidence at single cell level. *Leuk Res.* 2011;35(8):1114-6. IF. (2010): 2,555
- 3) Pajor G, Somogyi L, Melegh B, Alpár D, **Kajtár B**, Farkas L, Kneif M, Bollmann D, Pajor L, Sule N. Urovysion: Considerations on modifying current evaluation scheme, including immunophenotypic targeting and locally set, statistically derived diagnostic criteria. *Cytometry A.* 2011;79(5):375-82. IF. (2010): 3,753
- 4) Csáthy L, Kappelmayer J, Szegedi I, **Kajtár B**, Kiss C, Hevessy Z. Classical and atypical neuroblastoma – Case reports *Cytometry B Clin Cytom.* 2011;80(2):134-6. IF. (2010): 2,307
- 5) Alpár D, Nagy G, Hohoff C, **Kajtár B**, Bartyik K, Hermes J, Jáksó P, Andrikovics H, Kereskai L, Pajor L. Sex chromosome changes after sex-mismatched allogeneic bone marrow transplantation can mislead the chimerism analysis. *Pediatr Blood Cancer.* 2010;55(6):1239-42. IF. 1,948
- 6) László R, Alpár D, **Kajtár B**, Lacza A, Ottóffy G, Kiss C, Bartyik K, Nagy K, Pajor L. Detection of early precursors of t(12;21) positive pediatric acute lymphoblastic leukemia during follow-up. *Pediatr Blood Cancer.* 2010;54(1):158-60. IF.: 1,948
- 7) Bedekovics J, Rejtő L, Telek B, Udvardy M, Újfalusi A, Oláh E, Hevessy Z, Kappelmayer J, **Kajtár B**, Méhes G. Mutáns nucleophosmin fehérje kimutatása akut myeloid leukaemiában: az NPMc+ AML biológiai és klinikai jellemzői. *Orv Hetil.* 2009;150(22):1031-5.
- 8) **Kajtár B**, Losonczy H. Krónikus lymphocytás leukaemia. *Orv Hetil.* 2008;149(17):806-7.

- 9) Alpár D, Hermes J, Potó L, László R, Kereskai L, Jáksó P, Pajor G, Pajor L, **Kajtár B**. Automated FISH analysis using dual-fusion and break-apart probes on paraffin-embedded tissue sections. *Cytometry A*. 2008 Jul;73(7):651-57. IF.: 3,293.
- 10) Pajor G, Süle N, Alpár D, **Kajtár B**, Kneif M, Bolmman D, Somogyi L, Pajor L. Increased efficiency of detecting genetically aberrant cells by UroVysion test on voided urine specimens using automated immunophenotypical pre-selection of uroepithelial cells. *Cytometry A*. 2008;73(3):259-65. IF.: 3,293.
- 11) Szendrei T, Magyarlaci T, Kovács G, Nagy A, Szomor A, Molnár L, Dávid M, Tőkés-Füzesi M, Rideg O, Pótó L, Pajor L, **Kajtár B**, Losonczy H. Mutlidrogrezisztencia-vizsgálatok krónikus lymphoid leukémiában. *Orv Hetil*. 2008;149(4):161-167.
- 12) **Kajtár B**, Jáksó P, Kereskai L, Lacza A, Méhes G, Bodnár MA, Dombi JP, Gasztanyi Z, Egyed M, Iványi JL, Kovács G, Marton E, Palaczki A, Petz S, Tóth P, Sziládi E, Losonczy H, Pajor L. Prognosztikai faktorok komplex vizsgálata krónikus lymphocytás leukémiában. *Orv Hetil*. 2007;148(16):737-43.
- 13) Alpar D, **Kajtar B**, Kneif M, Jakso P, Laszlo R, Kereskai L, Pajor L. Automated detection of residual leukemic cells by consecutive immunolabeling for CD10 and fluorescence in situ hybridization for ETV6/RUNX1 rearrangement in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*. 2007;173(1):23-30. IF.: 1,559.
- 14) Pajor L, **Kajtár B**, Jáksó P, Lacza A, László R, Radványi G, Mórocz I, Tóth A, Varga G. Epstein-Barr virus-induced B-cell proliferation of Hodgkin's and Reed-Sternberg cell pheno- and genotype may develop in peripheral T-cell lymphomas. *Histopathology* 2006;49(5):553-57. IF.: 3,216.
- 15) Méhes G, Kovács G, **Kajtár B**, Lacza A, Varnai A, Losonczy H, Pajor L. Karyotype complexity and V(H) gene status in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*. 2006;91(10):1430-1. IF.: 5,032.
- 16) Pajor L, Lacza Á, Jáksó P, **Kajtár B**. Characteristics of TEL/AML-1 positive acute lymphoblastic leukemia in Hungarian children. *Med Pediatr Oncol*. 2001 Oct;37(4):409-11. IF.: 1,114.

Egyéb publikációk - idézhető absztraktok

- 1) Alpár D, Nagy Zs, **Kajtár B**, Feller D, Jáksó P, Dávid M, Kosztolányi Sz, Hermes J, Kereskai L, Pajor L. Initiating role of recurrent IgH translocations during the oncogenesis of plasma cell myeloma is questionable in a not negligible subset of cases. *Haematologica* 2011;S2(96):116. IF (2010):. 6,532

- 2) Méhes G, Bedekovics J, Rejtő L, Hevessy Zs, Kappelmayer J, Újfalusi A, **Kajtár B**, Udvardy M. Immunohistochemical demonstration of NPMc plus acute myeloid leukemia: biological and clinical features related to cytoplasmic nucleophosmin expression. *Virchows Archiv.* 2009;455(S1):260-61. IF.: 2,305.
- 3) Fazekas F, **Kajtár B**, Török M, Pór Á, Kovács I, Méhes G. Real-time quantitative allele-suppression (clamped) PCR assay for the determination of K-ras mutational status from paraffin embedded tumor samples. *Virchows Archiv.* 2009;455(S1):399-99. IF: 2,305.
- 4) Dávid M, Kosztolány Sz, Szomor Á, Alpár D, **Kajtár B**, Nagy Á, Kovács G, Csalódi R, Hermes J, Tábori J, Szalontay C, Losonczy H, Pajor L. Genetic prognostic factors and the outcome of autologous stem cell transplantation in plasma cell disorders. *Bone Marrow Transplant.* 2009;43(S1):S149-S49. IF.: 2,998.
- 5) Szomor Á, Vidra T, Csalódi R, **Kajtár B**, Kereskai L, Losonczy H, Dávid M. Tumour contamination of the graft predicts poor prognosis in T/0-cell non Hodgkin lymphoma after autologous hemopoietic stem cell transplantation. Retrospective study. *Haematologica.* 2008;93(S1):560-61. IF.: 5,978.
- 6) Jáksó P, Nagy Z, Kereskai L, Alpár D, **Kajtár B**, Pajor L. Analysis of polycythemia vera and essential thrombocythaemia by lineage specific investigation of JAK2V617F mutation and X-linked clonality assay. *Blood Rev.* 2007;21(S1):S123. IF.: 5,922.
- 7) Alpár D, **Kajtár B**, Tóth J, Nagy Z, Jáksó P, László R, Kereskai L, Pajor L. Automated evaluation of dual fusion and breakapart FISH probes on paraffin-embedded tissue sections. *Blood Rev.* 2007;21(S1):S124. IF.: 5,922.
- 8) Losonczy H, Kovács G, **Kajtár B**, Méhes G, Molnár L, Dávid M, Nagy Á, Szomor Á, Szendrei T, Pótó L, Pajor L. Influence of favourABL1e and unfavourABL1e genetic prognostic markers and CD 38 expression in chronic lymphocytic leukemia on treatment free interval and overall survival. Single center experience between 2002-2006. *Blood Rev.* 2007;21(S1):S140. IF.: 5,922.
- 9) Ottóffy G, **Kajtár B**, Kereskai L, Tornóczky T, Csernus K, Kajtár P. Vacuolated alveolar rhabdomyosarcoma cells mimicking FAB L3 lymphoblasts in bone marrow. *Blood Rev.* 2007;21(S1):S96. IF.: 5,922.

Impakt faktor összesen, idézhető absztraktok nélkül: 38,664

Idézhető absztraktok impakt faktora: 65,75