

Prognostička vrijednost citogenetskih promjena u liječenju akutne leukemije

Davidović-Mrsić, Sanja

Doctoral thesis / Disertacija

2011

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/um:nbn:hr:105:019367>

Rights / Prava: [In copyright/Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-23**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine](#)
[Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Sanja Davidović-Mrsić

**Prognostička vrijednost citogenetskih
promjena u liječenju akutne leukemije**

DISERTACIJA

Zagreb, 2011.

Rad je izrađen u Kabinetu za imunocitogenetiku, KBC Zagreb.

Mentor rada : prof.dr.sc. Boris Labar

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. ETIOLOGIJA I PATOGENEZA	2
1.2. INCIDENCIJA	5
1.3. KLASIFIKACIJA AML	5
1.4. CITOGENETSKE PROMJENE U AML	10
1.4.1. Prognostička podjela akutnih mijeloičnih leukemija	13
2. CILJ I HIPOTEZA	18
3. MATERIJALI I METODE	19
3.1. ISPITANICI	19
3.2. DIJAGNOSTIKA I LIJEČENJE AML	20
3.2.1. Protokol AML 10 EORTC	21
3.2.2. Protokol AML 12 EORTC	21
3.2.3. Transplantacija krvotvornih matičnih stanica	21
3.2.4. Protokol za akutnu promijelocitnu leukemiju	21
3.3. MATERIJAL	22
3.4. METODE	22
3.4.1. Metode citogenetske analize	22
3.4.2. Konvencionalna citogenetika	23
3.4.3. Fluorescentna in situ hibridizacija	23
3.4.4. Protokol – kultura stanica koštane srži	23
3.4.5. Protokol – kultura stanica periferne krvi	24
3.4.6. Protokol GTG – pruganja	24
3.4.7. Protokol - Fluorescentna in situ hibridizacija - FISH	25
4. REZULTATI	27
4.1. Numeričke promjene u ispitanika s AML	30
4.2. Strukturne promjene u ispitanika s AML	41
4.3. Prognostičke skupine u ispitanika s AML	47
4.3.1. Vjerovatnost postizanja KR u ispitanika s AML	48
4.3.2. Vjerovatnost preživljjenja bez znakova bolesti u ispitanika s AML	49
4.3.3. Vjerovatnost relapsa u ispitanika s AML	51
4.3.4. Rizični činitelji u ispitanika s AML	52

5.	RASPRAVA	56
6.	ZAKLJUČCI	63
7.	SAŽETAK	64
8.	SUMMARY	65
9.	LITERATURA	66
10.	ŽIVOTOPIS	79

Popis oznaka i kratica

AL	Akutna leukemija
ALL	Akutna limfocitna leukemija
AML	Akutna mijeloična leukemija
AML1	Gen Acute Myeloid Leukemia 1
ANL	Akutna nediferencirana leukemija
APL	Akutna promijelocitna leukemija
ATRA	Transretinoična kiselina
CBFb	Subunit b of core binding factor
CD	Razlikovni antigen na površini stanice (Cluster of Differentiation – diferencijacijska skupina antigena)
DIK	Diseminirana intravaskularna koagulacija
DNK	Deoksiribonukleinska kiselina
EGIL	European Group for the Immunological Characterization of Leukemias
ETO	Gen Eight Twenty One
FAB	Francusko-američko-britanska podjela akutnih leukemija
FISH	Fluorescence in situ Hybridization – fluorescentna hibridizacija in situ
GTG	G-bands by trypsin using Giemsa
HTLV	Human T- Leukemia Virus – virus humane T-leukemije
I-FISH	Interfazna fluorescentna hibridizacija in situ
Inv (16)	Inverzija kromosoma 16 (<i>strukturna promjena</i>)
ISCN	International System for Human Cytogenetics
KS	Koštana srž
LDA	Leukocitni diferencijacijski antigen
LSI	Lokus specifična proba
MLL	Mixed-lineage leukemia gene
MP	Mijeloperoksidaza
m-RNA	Glasnička ribonukleinska kiselina
MYH11	Myosis Heavy Chain
NSE	Nespecifična esteraza
p	kratki krak kromosoma
PCR	Lančana reakcija polimeraze (eng.Polymerase Chain Reaction)

PK	Periferna krv
PML	Gen Promyelocytic Leukemia
q	kratki krak kromosoma
RARA	Retinoic Acid Receptor, alfa
RT-PCR	Reverzna transkripcija i lančana reakcija polimeraze (eng.Reverse Transcription and Polymerase Chain Reaction)
SCIT	Severe Combined Imunodeficiency – teški kombinirani deficit imunosnog sustava
SE	Specifična esteraza
SZO	Svjetska zdrastvena organizacija (<i>World Health Organisation</i>)
SŽS	Središnji živčani sustav
t	Translokacija (<i>strukturna promjena</i>)

1. UVOD

Akutne leukemije (AL) su klinički, morfološki i genetski heterogena skupina zločudnih bolesti nastale neoplastičnom transformacijom krvotvornih matičnih stanica (1). Ovisno o podrijetlu stanica leukemije se dijele u dvije skupine: mijeloične (AML, nelimfocitne) i limfocitne (ALL, limfoblastične), a na temelju kliničke slike na akutne i kronične.

Prvi prikaz slučaja AML u medicinskoj literaturi dao je Friedrick (2), a akutne leukemije je kao posebnu bolest prvi opisao Epstein davne 1889. godine (3,4,5,6,7). Ako se ne liječi, bolest završava smrtno zbog nedostatne funkcije krvotvornog sustava unutar 3-6 mjeseci. Nove definicije kao i razdiobe AML polaze od bioloških, antigenskih i molekularnih značajki leukemijskih stanica (8,9)

1.1. ETIOLOGIJA I PATOGENEZA

Etiologija leukemija zasad nije sasvim jasna ali se zna da su za nastanak leukemije osim genetskih čimbenika važni i čimbenici okoliša (10).

Leukemija nastaje zbog promjena u genomu matične hematopoetske stanice. Diobom te stanice nastaje nova populacija stanica koja nosi istovjetne biološke značajke tj. nastaje maligni klon stanica. Nastala populacija stanica ima prednost u rastu i na taj način potiskuje zdravu populaciju stanica. Kada je tako nastala klonalna populacija stanica dovoljno velika, uzrokuje klinički prepoznatljivu bolest, akutnu leukemiju (11).

Povećana učestalost akutne leukemije u nekim nasljednih bolesti i u jednojajčanim blizanaca upućuje na postojanje nasljedne predispozicije za nastanak leukemije. Međutim nasljedna osnova nastanka leukemije u pojedinih obitelji s povišenom incidencijom nije do danas u potpunosti objašnjena, jer ne postoji jasan način nasljeđivanja preosjetljivosti za nastanak leukemije. Prihvatljiva je teza kako postoji genetska sklonost za nastanak akutne leukemije, te da će se leukemija pojaviti u onih ljudi s genetskom sklonošću u kojih se zbog djelovanja drugih mogućih činitelja prijeđe odgovarajući kritični prag (11,12). U tablici 1. predviđene su nasljedne bolesti s povećanim rizikom za nastanak akutne leukemije. Akutna leukemija učestalija je u bolesnika s kongenitalnim bolestima kao što su Downov, Bloomov, Klinefelterov, Fankonijev i Wiskott-Aldrichov sindrom (13,14,15).

Tablica 1. Nasljedne i stečene bolesti s povišenom učestalošću akutnih leukemija

NASLJEDNE BOLESTI	TIP LEUKEMIJE
<i>Downov sindrom</i>	
<i>Turnerov sindrom</i>	<i>AML , ALL</i>
<i>Neurofibromatoza</i>	
<i>Von-Recklinghausen</i>	
<i>Bloomov sindrom</i>	
<i>Klinefelterov sindrom</i>	
<i>Fankoni anemija</i>	<i>AML</i>
<i>Kostmanova</i>	
<i>agranulocitoza</i>	
<i>Ataxia teleangiectasia</i>	
<i>Osteogenesis imperfekta</i>	<i>ALL</i>
<i>SCID*</i>	

*SCID= kombinirani deficit imunološkog sustava

Ionizacijsko zračenje uzrokuje leukemiju u eksperimentalnih životinja (16). U ljudi postoji izrazita korelacija između izlaganja zračenju i nastanka leukemije (17). Izlaganje kemijskim tvarima kao što su benzen i drugi aromatski ugljikovodici, kao i liječenje alkilirajućim agensima ili drugim citostaticima povećava učestalost AML (18). Kombinacija zračenja i citostatika u liječenju bolesnika s nekom malignom bolesti (Hodgkinovom bolešću) ima kumulativni leukemogeni učinak (19). Neki virusi mogu izravno dovesti do zločudne pretvorbe hematopoetskih stanica. Virusi iz porodice retrovirida, primjerice humani T-leukemija-limfoma virus tip I (HTVL-I), mogu izravno uzrokovati nastanak akutne leukemije (20). Epstein-Barr virus može dovesti do nastanka limfoma (21).

Osnovni patogenetski poremećaj u akutnim leukemijama u načelu odgovara promjenama koje karakteriziraju sve maligne bolesti; a to je neprimjeren, nekontroliran rast

leukemijskih stanica. Stanice leukemije brzo proliferiraju i potiskuju normalne stanice koštane srži. Smanjenje normalnih progenitorskih stanica u koštanoj srži (KS) uzrokuje anemiju, infekcije i krvarenja, što je i karakteristika ove bolesti. Leukemijske stanice proliferiraju primarno u koštanoj srži te cirkuliraju u krvi, ali mogu infiltrirati i druga tkiva kao što su npr. limfni čvorovi, slezena, jetra, koža, gingive i središnji živčani sustav (22). Mehanizam nastanka leukemijske transformacije malo je poznat, ali je sigurno da je osnova u bazičnim promjenama deoksiribonukleinske kiseline (DNK) koje prenose maligne karakteristike u transformirane stanice i potomke (23). Promjene u genomu uzrokuju patološku aktivaciju gena tzv. staničnih onkogena koji su smješteni uz brojne specifične kromosomske strukturne promjene. Radi strukturnih promjena kao što su npr. translokacije događa se ili povećana ekspresija onkogena ili pak dolazi do fuzije dvaju segmenata dvaju gena, pri čemu nastaje novi fuziski gen i time novi fuziski protein. Ponekad je za nastanak leukemije važna interakcija najmanje dviju različitih promjena ili mutacija gena (24).

1.2. INCIDENCIJA

Incidencija akutnih leukemija jest 3 do 6 oboljelih godišnje na 100 000 stanovnika, a za AML incidencija je između 0.2 i 9.2 na 100 000 stanovnika (25).

Incidencija akutnih leukemija često je ovisna o dobi kao na primjer u AML koja je učestalija u starijoj životnoj dobi ($45 > \text{god.}$). Neke leukemije učestalije su u muškaraca nego u žena npr. U AML-je odnos muškog spola prema ženskom 4.6 / 3.0 (26).

1.3. KLASIFIKACIJA AML

Kriterij za postavljanje dijagnoze akutne leukemije jest nalaz leukemijskih stanica u koštanoj srži, u perifernoj krvi (PK) i u ekstramedularnim tkivima. Koštana srž obično je hipercelularna uz infiltraciju leukemijskih blasta i redukciju normalne hematopoeze.

Tradicionalno, podjela leukemija je polazila od morfoloških značajki leukemijskih stanica, tj. koja je stanična loza zahvaćena, mijeloična ili limfocitna (27,28). Najnovija podjela uključuje sve one kliničke, biološke i laboratorijske pokazatelje koji uz dijagnozu određuju i prognozu akutne leukemije. Prema smjernicama za klasifikaciju i dijagnozu Svjetske zdravstvene organizacije iz 2001. i 2008. godine (*SZO, eng. WHO, World Health Organization*) podjela akutnih mijeloičnih leukemija uz klinička i fenotipska obilježja leukemijskih stanica (morfologija, citokemija, imunofenotipizacija, citogenetika i molekularna) uključuje i prognozu akutne leukemije (29). To je prva podjela leukemija koja govori o važnosti promjena u genomu stanice pri postavljanju dijagnoze AML.

Temelj modernog pristupa podjeli AML je upravo obavezno pretraživanje genoma na poznate nam specifične promjene koje imaju dijagnostičku, terapijsku ali i prognostičku vrijednost.

Prema SZO iz 2008.godine AML su podijeljene na 7 skupine (tablica 2.), a određene su veličinom tumorske mase (od majmanje 20% blasta ili više u koštanoj srži, perifernoj krvi).

U prvoj skupini su AML-a s ponavljajućim (specifičnim) citogenetskim promjenama, kao što su AML s translokacijom $t(8;21)(q22;q22)/AML1(CBF-alfa)/ETO$, akutna promijelocitna leukemija s $t(15;17)(q22;q11-12)/PML/RAR-alfa$ i varijantama, AML s eozinofilijom u koštanoj srži $inv(16)(p13;q22)$ ili $t(16;16)(p13;q11)/CBF-beta/MYH11$. Akutne mijeloične leukemije s tim promjenama ubrajaju se u skupinu AML povoljne prognoze za razliku od AML-e s promjenama lokusa 11q23/MLL (*eng. Myeloid Lymphoid Leukemia or Mixed Lineage Leukemia*), promjene lokusa 3q26, te kompleksne promjene

koje se ubrajaju u prognostički nepovoljnu skupinu AML-a . U drugoj podskupini su AML-e sa promjenama pridruženim mijelodisplaziji i njihova prognoza je loša. Sekundarne AML, treća podskupina leukemija, obično su posljedica kemoterapije. Taj tip AML-a ima nepovoljnu prognozu. Četvrta skupina su AML ne klasificirane drugačije, zatim skupina mijeloidni sarkom te mijeloidne proliferacije vezane uz Downov sindrom i sedma skupina AML- blastične plazmocitoidne neoplazme dendritičkih stanica. Udio blasta u koštanoj srži ili perifernoj krvi potreban za postavljanje dijagnoze AML iznosi 20% ili više mijeloblasta i/ili monoblasta/promonocita i/ili megakarioblasta ovisno o AML tipu . U pojedinih bolesnika kada je nađena specifična promjena u kariotipu udio blasta može biti i nešto manji od 20% ali ne manji od 15-18%.

Podjela Svjetske zdravstvene organizacije na neki način je moderna nadopuna na klasičnu-staru francusko-američko-britansku citomorfolo-citokemijsku podjelu (FAB eng. *French-American-British Classification*) akutnih leukemija.

Za rutinsku klasifikaciju akutnih mijeloičnih leukemija još uvijek se uz novu podjelu SZO primjenjuje i FAB - citomorfološka klasifikacija (tablica 3 i 3a). Zajednička francusko-američko-britanska skupina autora podijelila je AML u podtipove ovisno o stupnju diferencijacije i sazrijevanja leukemijskih stanica (30). Osnovni morfološki pokazatelj akutnih leukemija jest stanica tipa blasta koja predstavlja nediferenciranu ili slabo diferenciranu stanicu krvotvornog tkiva.

Ono što je važno naglasiti, a to je da se u rutinskoj dijagnostici dokazuje i/ili isključuje postojanje specifičnih promjena genoma u određenog tipa/podtipa AML. Temeljem pridruživanja specifičnih promjena genoma i imunofenotipa klasičnoj citomorfološko-citokemijskoj FAB klasifikaciji napravljena je „*privremena* " poveznica između stare FAB podjele i nove podjele SZO.

Tablica 2. Podjela akutnih mijeloičnih leukemija – SZO

1. AML s ponavljajućim citogenetskim promjenama
- AML s t(8;21)(q22;q22), (<i>AML1/ETO;RUNX1-RUNX1T1</i>)
- Akutna promijelocitna leukemija AML s t(15;17)(q22;q11-12) i varijantama, (<i>PML/RAR-alfa</i>)
- AML s eozinofilijom u koštanoj srži inv(16)(p13;q22) ili t(16;16)(p13;q11), (<i>CBF-beta/MYH11</i>)
- AML s 11q23 (<i>MLL</i>) promjenom, t(9;11)(p22;q23);MLLT3-MLL
- AML s t(6;9)(p23;q34);DEK-NUP214
- AML s inv(3)(q21;q26) ili t(3;3)(q21;q26); RPN1-EVI1
- AML s mutacijom NPM1, AML s mutacijom CEBPA
2. AML s znacima mijelodisplazije
- AML iz prethodne mijelodisplazije
- AML bez prethodne mijelodisplazije
3. AML – sekundarne nakon terapije
- Nakon alkilirajućih tvari
- Nakon epipodofilotoksina (neke ALL)
- Ostale AML
4. AML koje nisu drugdje uvrštene
- AML minimalno diferencirana (FAB – M0)
- AML bez sazrijevanja (FAB – M1)
- AML sa sazrijevanjem (FAB – M2)
- Akutna mijelomonocitna leukemija (FAB – M4)
- Akutna monocitna leukemija (FAB – M5a i M5b)
- Akutna eritroidna leukemija (FAB – M6a i M6b)
- Akutna megakariocitna leukemija (FAB – M7)
- Akutna bazofilna leukemija
- Akutna panmijeloza s mijelofibrozom
5. Mijeloični sarkom
6. Mijeloidne proliferacije u Downovom sindromu
7. Blastična plazmocitoidna neoplazma dendritičkih stanica

Tablica 3. Morfološka razdioba akutne mijeloične leukemije-FAB

Podtip	%	Morfologija	Reaktivnost na specifična bojanja i markere			
			Peroksidaza ili Sudan black	Nespecifična esteraza	PAS	Tipični proteinski marker
M0, nediferencirana	3	Primitivne stanice, stanice se ne boje	-	-	-	CD34,CD33,CD13
M1, AML bez znakova sazrijevanja	20	Vrlo malo azurofilnih granula	+/-	+/-	-	CD34,CD33,CD13
M2, AML sa znakovima sazrijevanja	25	Blasti s promijelocitnim granulama, prisutni Auerovi štapići	+++	+/-	-	CD34,CD33,CD15, CD13
M3, promijelocitna	10	Hipergranularni promijeloci s multiplim Auerovim štapićima	+++	+	+/-	CD33,CD13(HLA-DR)
M4, akutna mijelomonocitna leukemija	20	Prisustvo monocitoidnih stanica u perifernoj krvi, jedan od podtipova je M4 s eozinofilima	+/-	+++	-	CD34,CD33,CD15, CD14,CD13
M5, akutna monocitna leukemija	20	Identificirana su dva podtipa: (a) bez znakova diferencijacije; (b) sa znacima diferencijacije uz 80% promonocita i monocita	-	+++	+/-	CD33,CD15,CD14, CD13
M6, akutna eritroleukemija	5	Dominacija eritroblasta i značajni nalaz displastične eritroidne loze	+/-	-	+++	CD33, glikoforin
M7, akutna megakariocitna leukemija	5	Nediferencirani blasti koji reagiraju na antitrombocitna protutijela te sadrže trombocitnu peroksidazu	-	+/-	++	CD33, CD41

Tablica 3a. Citomorfološke, citokemijske, imunofenotipske, citogenetske i molekularne značajke AML

FAB	Citokemija	Imunofenotipizacija	Citogenetika	Molekularne promjene
AML-M0	Negativna	CD13,CD33,	t(10;11)	<i>CALM-AF10</i>
AML-M1	MP(+/-); SE(+/-)	CD13, CD33, HLA-DR	t(10;11) trisomija 11 del(5) del(7) +8	<i>CALM-AF10</i> duplicacija <i>MLL</i>
AML-M2	MP(++);SE(++)	CD13,CD33,HLA-DR,CD34;	t(8;21) t(7;11) t(6;9)	<i>AML1-ETO</i> <i>NUP98-HOXA9</i> <i>DEC-CAN</i>
AML-M3	MP(+++);SE(+++)	CD13,CD33,	t(15;17) t(11;17) t(5;17)	<i>PML-RARα</i> <i>PLZF-RARα</i> <i>NPM-RARα</i>
AML-M4	MP(++);SE(+);NSE(++)	CD14, CD13,CD33, CD11b,HLA-DR	inv(16)* t(8;16)** t(6;9) t(9;9) t(7;11)	<i>CBFβ-MYH11*</i> <i>MOZ-CBP**</i> <i>DEC-CAN</i> <i>SET-CAN</i> <i>NUP98-HOXA9</i>
AML-M5	MP(-/+),SE(-),NSE(++)	MO1,My4,HLA-DR	11q23 translokacija	Fuzija MLL s jednim od partner gena
AML-M6	MP(-),SE(-),NSE(-)	Glikoforin A, CD33	t(3;5)	<i>NPM-MLF1</i>
AML-M7	MP(-),SE(-),NSE(-)	CD41a,CD33,CD34, HLA-DR		

MP – mijeloperoksidaza; **SE** – specifična klor-acetat esteraza; **NSE** – nespecifična esteraza;

* - javlja se samo u AML-M4eo (akutna mijelomonocitna leukemija s eozinofilijom)

** - javlja se samo u AML-M4 s eritrofagocitozom

1.4. CITOGENETSKE PROMJENE U AML

U humanoj patologiji zabilježene su različite kromosomske promjene, koje možemo svrstati u nekoliko osnovnih kategorije (31).

Numeričke promjene (aberacije) predstavljaju promjenu broja kromosoma tj. svako odstupanje od normalnog diploidnog ($2n$) broja kromosoma koji je karakterističan za određenu vrstu.

Strukturne kromosomske promjene podrazumjevaju promjenu rasporeda genskog materijala (lokusa) uzduž krakova kromosoma. Strukturne su promjene posljedica kromosomskih lomova i grešaka u spajanju odlomljenih segmenata, te je promjena popraćena morfološkom promjenom kromosoma. Najčešće strukturne promjene uključuju translokacije kromosoma, pri čemu dolazi do stvaranja fuzijskih gena koji se povezuju s patogenezom leukemijskog bujanja. U bolesnika sa akutnom leukemijom često se nalaze složene, kompleksne kromosomske promjene gdje se opisuje maligni klon sa numeričkim i strukturnim promjenama zajedno (klon s tri i više promjena).

Prema usvojenoj standardizaciji, internacionalni sistem za klasifikaciju, ISCN 2005, (eng. *International System for Human Cytogenetics, ISCN 2005*) klon se definira kada dvije ili više stanica imaju višak istog kromosoma ili isti strukturni kromosomski poremećaj, odnosno tri ili više stanica s manjkom određenog kromosoma. Stanice jednog klena, međutim, ne moraju biti citogenetski homogene, već se u tijeku bolesti mogu pojaviti dodatne promjene i razvoj supklonova (32,33).

Činjenica da maligne stanice obilježava nestabilnost genoma i postupna akumulacija kromosomskih promjena ukazuje na različitu ulogu kromosomskih promjena u tijeku razvoja bolesti. Razlikuju se stoga primarne i sekundarne promjene/klonovi. Primarne promjene često se pojavljuju same, prisutne su u početnim stadijima bolesti, te se smatra da imaju važnu ulogu u procesu maligne transformacije. Primarni kromosomski poremećaji su ujedno poremećaji specifični za pojedine tipove i podtipove bolesti tj. podtipove akutne leukemije (tablica 4.).

Sekundarne promjene nikada ne nastaju same, pojavljuju se tijekom evolucije klena, dominantan su kromosomski poremećaj u kasnijim stadijima bolesti i

smatraju se odgovornim za intenzivnu proliferaciju stanica, metastaziranje te rezistenciju na liječenje (34).

Tablica 4. Primarne citogenetske promjene u AML

Promjena	Tip promjene	Morfologija
1p36 1p11	t(1;13)(p36;q21) t(1;7)(p11;p11)	Dismegakariopoeza Sekundarna AML, najčešće AML-M4
2p21	t(2;11)(p21;q23)	Isto kao i kromosom 1
3q21 3q21-25 3q21 i 3q26	t(1;3)(p21;q23) t(3;5)(q21-25;q31-35) ins(3;3)(q26;q21q26) inv(3)(q21q26)	Isto kao i kromosom 1 Abnormalni megakariocit i trombociti
4	+4	AML-M2 i AML-M4
5 5q 5q31-35	-5 del(5q) t(3;5)(q21-25;q31-35)	Sekundarna AML Sekundarna AML Abnormalni megakariociti i trombociti
6p23 6q27	t(6;9)(p23;q34) t(6;11)(q27;q23)	AML-M2 i AML-M4 sa bazofilijom AML-M5, većinom AML-M5a
7 7p11 7q	-7 t(1;7)(p11;p11) del(7q)	Sekundarna AML Isto kao kromosom 1 Sekundarna AML
8 8p11 8q22	+8 t(8;16)(p11;p13) t(8;21)(q22;q22)	AML-M5 sa fagocitozom AML-M2 sa Auerovim štapićima i eozinofilijom
9p21-22 9q 9q34	t(9;11)(p21-22;q23) del(9q) t(6;9)(p23;q34) t(9;22)(q34;q11)	AML-M5, većinom AML-M5a Isto kao i kromosom 6 AML-M1 i AML-M2
10p14	t(10;11)(p14;q13-14)	AML-M4 i AML-M5
11q13-14 11q23	del/t(11)(q13-14) t(10;11)(p14;q13-14) del/t(11)(q23) t(2;11)(q27;q23) t(6;11)(q27;q23) t(9;11)(p21-22;q23) t(11;17)(q23;q25) t(11;19)(q23;p13)	AML-M4 i AML-M5 Isto kao kromosom 10 AML-M4 i AML-M5, većinom AML-M5a Isto kao kromosom 2 Isto kao kromosom 6 Isto kao kromosom 9
12p11-13	del/t(12p)	Sekundarna AML, AML-M4 ili AML-M2 s bazofilijom
15q22	t(15;17)(q22;q11-12)	AML-M3 i AML-M3v
16p13 16p13 i 16q22	t(8;16)(p11;p13) inv(16)(p13q22) t(16;16)(q22) del(16)(q22)	Isto kao kromosom 8 AML-M4 sa eozinofilijom
17p11-q11 17q11-12 17q25	i(17q) t(15;17)(q22;q11-12) t(11;17)(q23;q25)	Isto kao kromosom 15 isto kao kromosom 11
19p13	t(11;19)(q23;p13)	Isto kao kromosom 11
20q	del(20q)	AML-M6
21 21q22	+21 t(8;21)(q22;q22)	Isto kao kromosom 8
22q1	t(9;22)(q34;q11)	Isto kao kromosom 9

Kao što postoji specifičnost nekih primarnih kromosomskih promjena, tako se pretpostavlja i postojanje specifičnosti, sekundarnih promjena u nekim tipova i podtipova akutnih leukemija kao što je trisomija 21 u AML-4 ili trisomija, tetrasomija 8 u M2.

1.4.1. Prognostička podjela akutnih mijeloičnih leukemija

Prema nalazu promjena u kariotipu (genomu) bolesnika sa AML-om moguće je napraviti određene prognostičke podjele koje daju smjernice u liječenju i prognozi bolesnika s AML (35). Brojne kliničke ali i biološke osobine u međusobnoj interakciji određuju prognozu AML. Upravo je to temelj nove podjele SZO. Među prognostičke čimbenike ubrajaju se dob i opće stanje bolesnika, prethodna hematološka bolest i/ili prethodna kemo-terapija ili radio-terapija, broj leukocita pri dijagnozi, FAB podtip, te citogenetske i molekularne promjene u leukemijskim stanicama.

Poznavanje specifičnik promjena i/ili učestalijih promjena koje se javljaju u određenog tipa/podtipa AML-je omogućuje plansko pretraživanje na poznate nam promjene u bolesnika s urednim nalazom kariotipa (36,37).

Ta saznanja određuju smjernice da se svaka AML morfološki M2 pretražuje na postojanje specifične promjene tj. na translokaciju t(8;21)(q22;q22)/AML1/ETO, M3 na t(15;17)(q22;q11-12)/PML/RAR α , M4 na inv(16)(p13;q22)/CBF β , a sve AML pretražuju se na promjene lokusa 11q23/MLL (38).

Promjene kariotipa opisuju se u oko 65-80% bolesnika s AML (39). Kompletna remisija postiže se u oko 50% bolesnika s normalnim (urednim N/N) kariotipom. Oko 55% bolesnika s AML pri dijagnozi ima samo jednu promjenu u kariotipu i u 15-20% slučajeva to su monosomije i/ili trisomije pojedinih kromosoma. Kariotipske promjene mogu zahvaćati i više kromosoma istovremeno u oko 45% bolesnika (40). U AML-M3, 80% bolesnika ima samo jednu promjenu u kariotipu (slično je i u M2, M4) za razliku od AML-M6 gdje se jedna kariotipska promjena nalazi u 25% bolesnika (41,42).

Promjene broja kao primarne promjene kariotipa u AML nalaze se pri dijagnozi više od 40%. Oko 14% numeričkih promjena pripada trisomijama i monosomijama pojedinih parova kromosoma (4,5, 7, 8, 9, 11, 13, 21, 22). Od numeričkih promjena u AML nalazimo češće zahvaćenost kromosoma 8 i to kao trisomiju u AML-M2, M4 i M5 (5%), monosomiju 7 (3%) te trisomiju 13 (2%) kao izoliranu kromosomsku promjenu u AML-M1, M2, M4 i M5 (43).

Specifične/učestalije kromosomske promjene koje nalazimo u bolesnika sa AML prikazuje tablice 5 i to su istodobno promjene koje imaju prognostičku

vrijednost ukoliko se nađu. U većini bolesnika radi se o recipročnim, balansiranim translokacijama (44,45).

Tablica 5. Specifične kromosomske promjene u AML

Promjena	Učestalost	Leukemija	Komentar
t (8;21)(q22;q22)	5-12%	M2	Dobra prognoza
t (15;17)(q22;q21)	97%	M3, M3v	Dobra prognoza
inv (16)(p13q22)	10 – 20%	M4 s eozinofilijom	Dobra prognoza
t (9;11)(p22;q23)		M5	Loša prognoza
t (6;9)(p23;q32)	50%	M2,M4	Loša prognoza
inv (3)(q21q26)	3-5%	M5 s fagocitozom	Loša prognoza
t (3;3)		M1,M4,M6	Loša prognoza
numeričke promjene +8,-5,-7	40%	AML-svi podtipovi	Loša prognoza
delecije krom.	40%	M4,M1 do M7	Loša prognoza
5q-,-5,-7	7-10%	AML-svi podtipovi	Nepoznata
kompleksne	<10%		Loša prognoza

Translokacija $t(8;21)(q22;q22)/AML1/ETO$ ima dobru prognozu u mlađih bolesnika s AML-M2 ukoliko se nalazi kao jedina promjena genoma, a kompletna remisija (KR) postiže se u oko 85%. Učestalost te translokacije u svih AML je oko 10%, a u AML-M2 i do 35%. Ta recipročna translokacija može se naći i u M4 te u M1 ali izuzetno rijetko. Najčešće se nalazi kao samostalna promjena (20%), a u 10% slučajeva ima pridruženu trisomiju ili monosomiju i to najčešće kromosoma 8, te strukturnu promjenu kao što je del(9q). Varijante $t(8;21)$ uključuju tri i više kromosomskih lokusa i često su u sastavu kompleksnih nalaza (46,47).

U više od 90% bolesnika s AML-M3 nalazi se translokacija $t(15;17)(q22;q11-21)/PML/RAR\alpha$ (31). Bolesnici u kojih se nađe $t(15;17)$ bez drugih promjena u kariotipu imaju dobru prognozu, a kompletna remisija postiže se u $> 80\%$ slučajeva. Dodatne kromosomske promjene mogu se naći u oko 35% slučajeva, a jedna od češćih je i trisomija 8 ili del(9q). Dodatne promjene kao i varijantne translokacije $t(11;17)(q23;q21)$, $t(11;17)(q13;q21)$ i $t(5;17)(q35;q21)$ mjenjaju prognozu bolesti (48,49).

Inverzija $inv(16)(p13q22)$, $t(16;16)(p13;q22)/CBF\beta$ odnosno delecija kromosoma 16, $del(16)(q22)$ nalaze se u 20% bolesnika s AML-M4 i 5-10% u ukupnom broju AML. Bolesnici imaju dobru prognozu. Promjena se može naći u M2 ili M5, te u M4 bez eozinofilije ali rijeko. U 2/3 slučajeva dodatne promjene su +8, +22, te del(7q) koje mjenjaju prognozu bolesti (50,51).

Bolesnici kod kojih se nađu strukturne promjene na kromosomu 5 i to najčešće kao del(5q) u oko 7% ili strukturna promjena kromosoma 7, imaju lošiju prognozu nego ostali bolesnici.

Promjene lokusa 11q23/MLL u AML, češće se nalaze u M5 nego li u M4 (20%), M1 ili M5b (10%) te u M2 (oko 5% bolesnika). Lokus 11q23 sudjeluje u velikom broju strukturnih promjena, njih preko pedesetak od kojih $t(9;11)(p21;q23)$, $t(10;11)(p12;q23)$ ili $t(11;19)(q23;p13)$ češće nalazimo u AML. Translokacija

$t(9;11)(p21;q23)$ nalazi se češće u M5a (70%), te M4 (10%) slučajeva. Promjene lokusa 11q23/MLL vežu se uz lošu prognozu bolesti te pojavom dodatnih

kromosomskih promjena od kojih su većina promjene broja i to, +X, +8, +19, +21. Osim translokacija i delecija lokus 11q23 može biti duplicitan ili amplificiran što također govori u prilog loše prognoze bolesti (52,53,54).

Translokacija t(6;9)(p23;q34) nađe se češće u bolesnika s M4 te u AML-M2 i bazofilijom (55).

Inverzija inv(3) ili translokacija t(3;3) kao i druge strukturne promjene kromosoma 3, udružene su s povećanjem broja trombocita i nalazimo ih češće u M1, M4 i M6 (56). Strukturne promjene u koje je uključen kromosom 3 vežu se uz lošu prognozu bolesti i često se nalaze uz druge promjene kariotipa kao što su trisomije pojedinih kromosoma npr. +8 ili +21.

U AML opisane su i kompleksne promjene kariotipa ali iznimno rijetko (<10%). Kompleksne promjene kariotipa češće nalazimo u AML-M0 (20%), AML-M7 (<10%) nego u ostalih tipova AML. Radi se pretežno o nebalansiranim strukturnim promjenama kromosoma 5 i 7 (15-20%) uz koje nalazimo druge strukturne te numeričke promjene kariotipa. Prognoza tih bolesnika je loša.

Promjene kariotipa važan su prognostički činitelji za postizanje KR u bolesnika s AML (57).

Drugi prognostički činitelji (osim promjena u kariotipu) koji mijenjaju uspjeh uvodne terapije su: dob, citomorfološki podtip leukemije, veličina tumorske mase, molekularni markeri te prisustvo komplikacija (58).

Dob bolesnika predstavlja jedan od najznačajnijih prognostičkih činitelja (59). U mlađih bolesnika terapijski uspjeh uvodne terapije značajno je bolji. Podtipovi AML umjeren su prognostički činitelj. U bolesnika s akutnom promijelocitnom leukemijom (AML-M3), jedna od kliničkih značajki je prisustvo DIK-a, koji može izazvati smrtonosna krvarenja u središnji živčani sustav (SŽS). Primjenom trans-retinoične kiseline može se izazvati diferencijacija promijeloblasta te bolesnik uvesti u kompletну remisiju bolesti. Ova terapija je terapija izbora u liječenju bolesnika.

Već 1973. godine objavljeni su prvi radovi koji su ukazivali da bolesnici koji imaju uredan kariotip (N/N), imaju bolje prezivljjenje od bolesnika koji imaju uredan i patološki klon (N/A), a posebno od bolesnika koji su imali samo patološki klon (AA) (60).

Prema "Fourth International Workshop on Chromosomes in leukaemia" citogenetske promjene mogu se podijeliti u podgrupe obzirom na prognostičko značenje, odnosno na postizanje i trajanje kompletne remisije bolesti (61). Uz poznate nam specifične promjene kariotipa potrebno je definirati i druge promjene genoma, konvencionalnim i molekularnim tehnikama kao što su tehnike fluorescentne in situ hibridizacije te PCR metode. Spomenute metode omogućavaju identifikaciju kriptičnih ali i vrlo kompleksnih promjena koje određuju terapiju i prognozu bolesnika s AML (62,63,64).

Tablica 6. Prognostičke skupine za AML

Povoljna	Nepovoljna	Intermedijarna
<i>t (8 ;21)</i>	<i>promjena kromosoma 5</i>	
<i>t (15;17)</i>	<i>promjena kromosoma 7</i>	
<i>inv (16)</i>	<i>promjena lokusa 11q23</i>	<i>uredan nalaz ili druge neklasificirane</i>
<i>t(16;16)</i>	<i>promjene lokusa 3q21-26 +8</i>	<i>promjene kariotipa</i>
<i>Dob < 50</i>	<i>kompleksni kariotip</i>	
<i>L < 30,000/μl</i>	<i>Dob > 60 L > 30,000/μl</i>	

2. CILJ I HIPOTEZA

Kromosomske promjene (promjene u genomu stanice) imaju veliki značaj u dijagnostici, klasifikaciji, terapiji te u procjeni prognoze bolesnika s određenim tipom/podtipom akutne leukemije. Tip citogenetske promjene određuje terapijski pristup tj. izbor intenziteta liječenja. Ako citogenetske promjene prema podjeli Svjetske zdravstvene organizacije (*SZO, eng. WHO, World Health Organization*) ukazuju na dobru prognozu dobar se terapijski učinak postiže standardnom kemoterapijom. Kada se radi o citogenetskim promjenama loše prognoze neophodno je provesti agresivno liječenje koje uključuje intenzivnu kemoterapiju i transplantaciju krvotvornih matičnih stanica. Specifični ciljevi ispitivanja su:

- *Odrediti učestalost i tip citogenetskih promjena u akutnih mijeloičnih leukemija*
- *Utvrđiti učestalost citogenetskih promjena u pojedinih citomorfoloških podtipova akutnih mijeloičnih leukemija*
- *Utvrđiti prognostičku važnost citogenetskih promjena u procjeni odgovora na uvodnu terapiju akutnih mijeloičnih leukemija*

Hipoteza ispitivanja je definirati i procjeniti značaj (vrijednost) kromosomskih promjena za prognozu u naših bolesnika s akutnom mijeloičnom leukemijom.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. ISPITANICI

U retrospektivno ispitivanje bilo je uključeno 536 novo-dijagnosticiranih bolesnika s akutnom mijeloičnom leukemijom u dobi od 16 do 60 godina koji su liječeni u Zavodu za hematologiju Klinike za unutrašnje bolesti Kliničkog bolničkog centra i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Tablica 7. prikazuje značajke ispitanika uključenih u istraživanje. Svi su ispitanici potpisali informativni pristanak za dijagnostiku i liječenje.

Tablica 7. Značajke ispitanika s AML

Karakteristike ispitanika	AML
<i>Ukupno</i>	536
<i>Dob , median, raspon</i>	36 (16-60)
<i>Spol Ž / M</i>	266 / 270
<i>Blasti % u KS *</i> <i>median</i> <i>raspon</i>	46 21-99
<i>Leukociti x10⁹/L *</i> <i>median</i> <i>raspon</i> <i>L > 30 x 10</i> <i>L < 30 x 10</i>	19 0.8 -323 202 (38%) 334 (62%)
<i>N/N, uredan nalaz</i>	173 (32%)
<i>N/A, A/A, patološki nalaz</i>	363 (68%)
<i>Medijan praćenja (raspon) mj.</i>	61,6 (6 – 84)

* pri dijagnozi bolesti

3.2. DIJAGNOSTIKA I LIJEČENJE AML

Dijagnoza AML temeljila se na integraciji dobivenih podataka o staničnoj morfologiji, izražaju površinskih biljega na stanicama tj. citogenetskim i molekularnim promjenama genoma.

Kriterij za postavljanje dijagnoze akutne leukemije bio je nalaz leukemijskih stanica u koštanoj srži (više od 20% blasta), u perifernoj krvi i u ekstramedularnim tkivima. Rutinska dijagnostička obrada sastojala se od anamneze, pregleda te slijedeće obrade:

1. Kompletan krvni slikan, Advia 2120, Bayer, Hematološki laboratorij KZZLD KBC Zagreb.
2. Mijelogram, citološke i citokemijske analize stanica koštane srži i periferne krvi. Zavod za citologiju, KBC Zagreb.
3. Imunofenotipizacija stanica koštane srži, protočni citometar - FACSCcan i FACScalibur (BD Biosciences Europe). Svi stanični parametri analizirani su s pomoću računalnoga programa CellQuest (BD Biosciences Europe). Coulter, Zavod za imunologiju KZLD, KBC Zagreb.
4. Citogenetska i molekularna (FISH) analiza stanica koštane srži i periferne krvi, Kabinetu za imunocitogenetiku, Klinika za pedijatriju, KBC Zagreb.

Liječenje AML uključuje kemoterapiju i transplantaciju krvotvornih matičnih stanica (65). Uvodnom kemoterapijom nastoji se postići kompletan remisija bolesti (manje od 5% blasta u KS uz nalaz neutrofilnih granulocita $>1,0 \times 10^9/L$ i trombocita $>100 \times 10^9/L$ u krvi). U postremisijskom razdoblju primjenjuje se nekoliko vidova liječenja. Ako se AML ne liječi nakon KR vrlo brzo dolazi do njene ponovne pojave. Otprije 50-75% odraslih postiže KR sa standardnom kemoterapijom, a dugotrajno preživljenje 20-30% bolesnika. U stratifikaciji bolesnika prvenstveno se kao najvažniji prognostički čimbenik koristi citogenetski nalaz i promjene u kariotipu. Bolesnici uključeni u ovo istraživanje liječeni su standardnim programima za liječenje bolesnika s akutnom mijeloičnom leukemijom :

3.2.1. Protokol AML 10 EORTC-a :

Uvodna terapija: Idarubicin 10 mg ili Daunorubicin 50 mg ili Mitoksantron 12 mg (dan 1, 3 i 5) + Etopozid 100 mg/m² (1-5. dan) + Citozar 25 mg/m² u bolusu, zatim 100 mg/m² (1-10. dan)

Konsolidacija: Idarubicin 10 mg ili Daunorubicin 50 mg ili Mitoksantron 12 mg (4-6. dan) + Citozar 2x500 mg/m² (1-6. dan)

Prikupljanje krvotvornih matičnih stanica uz primjenu granulocitnog faktora rasta (G-CSF) nakon konsolidacije ili prikupljanja koštane srži bez prethodne kemoterapije za bolesnike koji nisu kandidati za alogeničnu TKMS.

3.2.2. Protokol AML 12 EORTC-a :

Uvodna terapija: Daunorubicin 50 mg/m² (dan 1, 3, 5) + Etopozid 50 mg/m² (1-5. dan) + Citozar 100 mg/m² (1-10. dan) ili Citozar 2x3000 mg/m² (dan 1, 3, 5, 7)

Konsolidacija : Daunorubicin 50 mg/m² (4-6. dan) + Citozar 2x500 mg/m² (1-6. dan)

Prikupljanje krvotvornih matičnih stanica uz primjenu granulocitnog faktora rasta (G-CSF) nakon konsolidacije za bolesnike koji nisu kandidati za alogeničnu TKMS.

3.2.3. Transplantacija krvotvornih matičnih stanica:

Za TKMS primjenjen je standardni program pripreme busulfana u kombinaciji s ciklofosfamidom. Busulfan u dane -8, -7, -6, -5 te Ciklofosfamid u dane -3 i -2 doze

Prevencija reakcije transplantata protiv primatelja (GvHD, eng. graft-versus-host disease) za bolesnike koji su liječeni alogeničnom TKMS provedena je kombinacijom ciklosporina i metitreksata.

3.2.4. Protokol za akutnu promijelocitnu leukemiju

Bolesnici s APL liječeni su prema posebnom programu koji uključuje transretinoičnu kiselinu (ATRA):

Uvodna terapija: ATRA 45 mg/m² (1-30.dana) + Idarubicin 12 mg/m² (2, 4, 6, 8)

Konsolidacija 1: Citozar 1 g/ m² (1-4.dan) + Idarubicin 5 mg/m² (1-4.dana)

Konsolidacija 2: Mitoksantron 10 mg/m² (1-5.dan) + Etopozid 100 mg² (1-5.dan)

Konsolidacija 3: Citozar 3x150 mg/m² s.c. (1-5.dan) + Idarubicin 12 mg/m² (1.dan) + 6-tioguanin 2x70 mg/m² (1-5.dan)

Održavanje: 6-merkaptopurin 90 mg/m² /d + Metotreksat 15 mg/m² 1x tjedno ili ATRA 45 mg/m² 1-15. dan svaka tri mjeseca.

3.3. MATERIJAL

Kod svih ispitanika pri dijagnozi bolesti uzet je uzorak koštane srži dobiven punkcijom sternuma (češće) ili biopsijom spine superior posterior kriste ilijake. Koštana srž prikupljala se u epruvetu s heparin-litijem, a potrebna količina koštane srži ovisno o celularnosti bila je 2-3 mL. Istovremeno uzimao se i uzorak periferne krvi i to 5-10 mL u epruvetu s heparinom kako bi se isključilo postojane konstitucijskih promjena. Uzorci su se morali odmah ili što ranije (unutar 24 sata) dostaviti u laboratorij (prema preporukama) kako bi se sačuvala vijabilnost stanica KS i PK. Istovremeno KS uzimala se za citomorfologiju, imunofenotipizaciju, citogenetiku, molekularnu (PCR, RT-PCR) analizu te za banku stanica KS.

3.4. METODE

3.4.1. Metode citogenetske analize

Uzorci KS i PK koji su uzeti pri dijagnozi bolesti i nakon provedene terapije koristili su se za izradu kratkotrajnih staničnih kultura (direktna, 24, 48, te 72 - sata), bez stanične stimulacije. Protokoli kultiviranja stanica KS i PK standardni su protokoli koji se koriste u citogenetici hemoblastoza (66,67,68). Uspjeh citogenetske analize ovisio je o kvaliteti uzorka kao i o primjenjenim tehnikama. Promjene kariotipa (genoma) objektivizirane su konvencionalnom metodom GTG-pruganja (*Gimza-Tripsin-Gimza*)(69) i molekularnom metodom fluorescentne *in situ* hibridizacije, FISH (*eng. Fluorescence In Situ Hybridization*) (70,71,72). Za interpretaciju promjena kariotipa korišten je Internationalni sistem za klasifikaciju, ISCN 2005 (33).

3.4.2. Konvencionalna citogenetika

Tehnike konvencionalne–klasične citogenetike koriste isključivo metafaze za opis promjena kariotipa, što zahtjeva metafaze zadovoljavajuće kvalitete i zadovoljavajućeg mitotskog indeksa, tj. broja. Kako bi se identificirale promjene u kariotipu (maligni klon) bilo je potrebno pogledati i analizirati 20-25 metafaza po svakom uzorku KS i/ili PK. Metodom GTG-pruganja dobiva se uvid u morfologiju i kompleksnost promjena kariotipa i u većini slučajeva ta metoda predstavljala je bazu daljne obrade (67). Drugim riječima konvencionalno GTG-pruganje kromosoma je morfološko-deskriptivna metoda i početak svake citogenetske analize (kariotipizacije).

3.4.3. Fluorescentna in situ hibridizacija

Fluorescentna in situ hibridizacija molekularna je metoda kojom se identificiraju i vizualiziraju specifični slijedovi DNA i mRNA molekule. Metodom je moguće dokazati promjene dijelova gena, ili pojedinih gena, te specifične kromosomske regije pojedinih kromosoma. Metoda interfazne FISH-e (I-FISH) koristila se za pretraživanje na poznate, specifične promjene genoma u određenih tipova/podtipova AML (70). Uz obavezno pretraživanje na specifične promjene tehnika I-FISH koristila se i u identifikaciji mnogih drugih promjena genoma. Zbog svoje visoke specifičnosti i osjetljivosti (za centromerne, lokus specifične, translokacijske probe osjetljivost je 10^{-5}) FISH metoda bila je rutinska metoda u dijagnosticiranju promjena kariotipa u AML. Za dokaz postojanje promjene bilo je potrebno pogledati 300 interfaznih jezgri kao i pozitivne (+) te negativne (-) kontrole za svaku pojedinu probu .

3.4.4. Protokol – kultura stanica koštane srži

Na automatskom brojaču određen je broj stanica s jezgrom (celularnost uzorka) i postotak blasta u uzorku KS. U svaku epruvetu s hranilištem (4-6 epruveta) po 5 mL (gotovo hranilište Chromosome Synchro M, EuroClone S.p.A. Italy) bilo je potrebno staviti $1-2 \times 10^6$ stanica/mL. Nakon inkubacije u termostatu na 37°C , 30 min. dodaje se otopina A (Synchrokit solution A, EuroClone S.p.A. Italy). Šesnaest sati poslije (inkubacija) dodaje se u staničnu kulturu otopina B (Synchrokit solution B, EuroClone S.p.A. Italy). Pet sati kasnije u staničnu kulturu dodaje se $40 \mu\text{L}$ Colhicina (Sigma-Aldrich) koncentracije $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ i

inkubira se 40 min. na sobnoj temperaturi. Epruvete se nakon inkubacije centrifugiraju 5 min./2000 rpm. kako bi se odvojio stanični dio od nadtaloga. Na talog stanica dodaje se 5 mL hipotonične otopine KCl 0,075M i ostavi se na sobnoj temperaturi 10 min. Ponovnim centrifugiranjem 5 min./2000 rpm. i odvajanjem nadtaloga na stanice se dodaje 5 mL Ibraimove otopine (3:1 metanol/octena kiselina, Merck). Dalnjim centrifugiranjem dolazi se do stanične suspenzije koja se koristi u izradi preparata za konvencionalnu citogenetsku i molekularnu FISH analizu. Preostali dio stanične suspenzije arhivirao se u banku suspenzija.

Na sijalinizirana predmetna stakla (5 za svaku staničnu kulturu) stavlja se 50 µL stanične suspenzije i takva stakla koriste se za GTG-pruganje i za FISH dijagnostiku. Za svakog bolesnika (uzorak KS) napravi se 20 - 40 nativnih preparata.

3.4.5. Protokol – kultura stanica periferne krvi

U svaku epruvetu s hranilištem njih ukupno dvije po 5 mL (gotovo hranilište Chromosome synchro P, EuroClone S.p.A. Italy) bilo je potrebno staviti 1-2 x^{10⁶} stanica/mL pune krvi. Nakon inkubacije u termostatu na 37°C, 48 sati dodaje se otopina A (Synchrokit solution A, EuroClone S.p.A. Italy). Šesnaest sati poslije dodaje se u staničnu kulturu otopina B (Synchrokit solution B, EuroClone S.p.A. Italy). Pet sati kasnije u staničnu kulturu dodaje se 40 µL Colhicina (Sigma, Aldrich) koncentracije 10 µg/mL te se ikubira 40 min. Epruvete se nakon toga vremena centrifugiraju 5 min./2000 rpm. kako bi se odvojio stanični dio od nadtaloga. Na talog stanica dodaje se 5 mL hipotonične otopine KCl 0,075 M i ostavi se na sobnoj temperaturi 10 min. Ponovnim centrifugiranjem 5 min./2000 rpm. i odvajanjem nadtaloga na stanice se dodaje 5 mL Ibraimove otopine (3:1 metanol/octena kiselina, Merck). Dalnjim centrifugiranjem epruveta sa stanicama dolazi se do stanične suspenzije koja se koristi u izradi preparata. Na sijalinizirana predmetna stakla stavlja se 50 µL stanične suspenzije PK i takva stakla koriste se za GTG-pruganje, a po potrebi i za FISH dijagnostiku.

3.4.6. Protokol GTG - pruganja

Osušena nativna predmetna stakla ostave se preko noći u termostatu na 55 - 60°C. Predmetna stakalca se tretiraju otopinom tripsina (Sigma, Aldrich), kroz

30 do 40 sec. Nakon toga predmetna stakalca se ispiru u Ringerovoj otopini na temperaturi od 2 do 5 °C. Stakla se potom bojaju u otopini *Giemse* (Merck, pH 6.8) kroz 5 do 10 minuta te ispiru u puferu i destiliranoj vodi. Posušena predmetna stakla gledaju se pod svjetlosnim mikroskopom uz korištenje imerzionog ulja za mikroskopiranje (Merck).

3.4.7. Protokol - Fluorescentna in situ hibridizacija - FISH

Kodenaturacija :

Obilježi se područje interesa na staklu dijamantnom olovkom.

Za svako područje interesa potrebno je odpipetirati u epruvetu za mikrocentrifugiranje slijedeće sastojke : 7 µl LSI hibridizacijskog pufera, 1 µl probe i 2 µl sterilne vode. Svi sastojci moraju biti sobne temperature.

Epruveta se centrifugira 1 - 3 sekunde.

Zatim se protrese na vortexu i ponovo centrifugira.

10 µl probe nanese se na staklo i odmah pokrije pokrovnicom.

Pokrovnica se zaljepi ljepilom.

Staklo stavimo u Hybrite (73°C 1 minutu, 37°C 16 – 24 sata)

Ispiranje :

70 ml smjese 0.4 x SSC / 0.3% NP – 40 ulije se u kadiku po Coplinu i zagrije u vodenoj kupelji na 73 ±1°C.

70 ml smjese 2 x SSC / 0.1% NP – 40 ulije se u kadiku po Colinu. Temperatura prilikom korištenja otopine mora biti sobna.

Staklo izvadimo iz Hybrite- a , skinemo pokrovnicu i odmah ga uronimo u smjesu 0.4 x SSC / 0.3% NP – 40 na 2 minute.

4. Staklo prebacimo u smjesu 2 x SSC / 0.1% NP – 40 1 minutu

Detekcija :

Stakla se osuše u mraku.

Doda se 10 µl pozadinske boje na područje interesa i odmah se pokrije pokrovnicom. Za probe SpectrumGreen™ i SpectrumAqua™ kao pozadinska boja koristi se ili DAPI II ili Propidium Iodide, a za probu SpectrumOrange™ isključivo DAPI II. Ako hibridiziramo istovremeno probe sa sva tri fluorofora preporuča se kao pozadinsku boju koristiti DAPI II.

Kompletan postupak hibridizacije vođen je specifičnim programima ovisno o probama koje su korištene i u potpunosti je automatiziran i standardiziran (HYBriteTM, Vysis GmbH).

Za vizualizaciju GTG-pruganja i fluorescentnog signala koristio se svjetlosnofluorescentni mikroskop sa pripadajućim setom filtera (BX50, Olympus i AXIOPLAN 2, Carl Zeiss Jena GmbH, Germany). U analizi koristila su se dva programa za analizu slike i signala i to za GTG-pruganje program Ikaros (Automatic Karyotyping System, MetaSystems) te za I-FISH program Isis (FISH Imaging, MetaSystems, Germany). Kompjuterizacija i informatizacija omogućila je detaljnu obradu slika i signala. U bazu podataka pohranjivane su slike i nalazi za svakog bolesnika (ispitanika) i to pri dijagnozi bolesti te u vremenu praćenja. Nalaz citogenetske obrade sadržavao je kvantitativne i kvalitativne podatke o analizi slike i signala.

Metodom I-FISH u svih ispitanika s AML rađeno je obavezno pretraživanje na specifične, poznate nam promjene kariotipa kao što su:

t(8;21)(q22;q22)/AML1/ETO, za AML-M2 po FAB klasifikaciji
t(15;17)(q22;q11-21)/PML/RAR α , za AML-M3 po FAB klasifikaciji
inv(16q)(p13q22), t(16;16)/CBF β , za AML-M4 po FAB klasifikaciji
11q23/MLL, za sve AML

Metoda I-FISH koristila se i za objektivizaciju drugih promjena genoma kao npr.

t(9;11), t(6;9), 3q26, +5/-5, +7/-7, +8/-8, +13/-13, +21/-21, +22/-22.

4. REZULTATI

Podaci o ispitanicima obrađeni su primjenom metoda neparametrijske statistike. Vjerojatnost preživljjenja bolesnika (univarijantna analiza) izračunata je primjenom standardnih tablica preživljjenja, Kaplan-Meier metodom (73,74). Utjecaj prognostičkih činitelja objektiviziran je primjenom multivariatne analize - Cox regresijski model (75). Podaci su prikazani tabelarno i grafički.

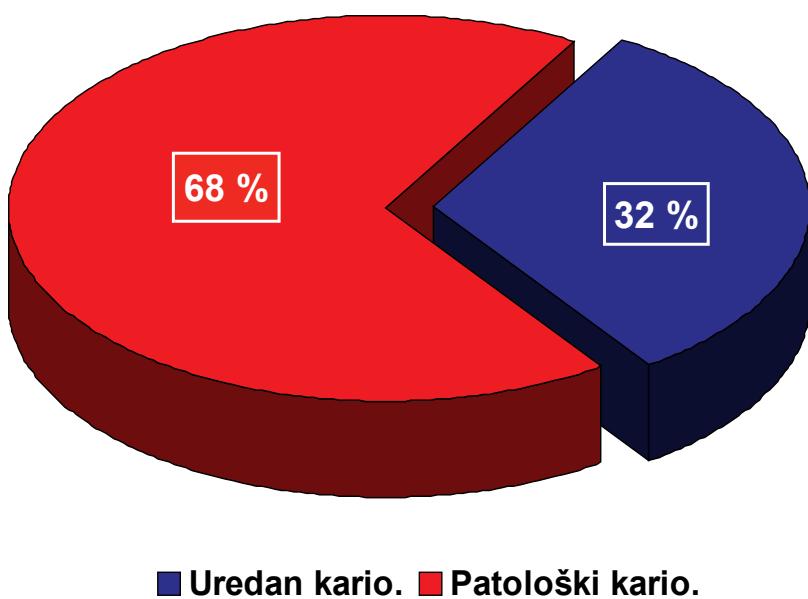
Relaps bolesti definiran je kao porast blasta u koštanoj srži $>10\%$ u dva nalaza punkcije koštane srži učinjena u intervalu od 2 tjedna.

Preživljenje bez znakova bolesti definirano je kao vremenski period od postizanja prve kompletne remisije do smrti ili pojave relapsa bolesti.

Preživljenje je definirano kao vremenski period od završetka uvodne terapije do smrti ili pojave relapsa, odnosno povrata bolesti.

U istraživanje je uključeno 536 ispitanika s novootkrivenom akutnom mijeloičnom leukemijom.

U 173 (32%) ispitanika s AML nađen je uredan (N/N) nalaz kariotipa, dok je patološki nalaz kariotipa (N/A, A/A) nađen u 363 (68%) ispitanika (slika 1.). U patološkom nalazu kariotipa 87/363 (24%) ispitanika uz normalan (uredan) klon stanica imao je i patološki (N/A) klon stanica. U većine ispitanika 276/363 (76%) u koštanoj srži nađen je samo patološki klon stanica (A/A).



Slika 1. Rezultat citogenetske analize u ispitanika s AML

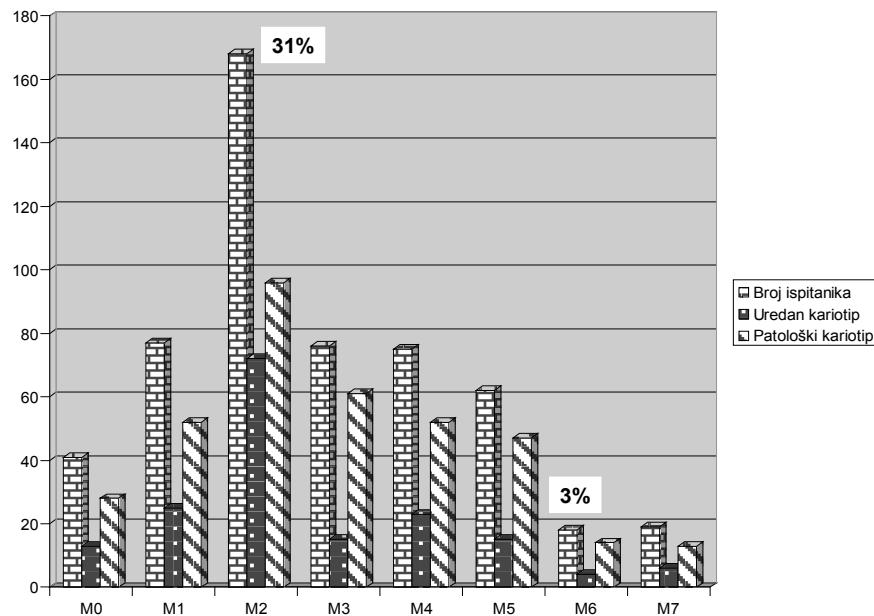
Učestalost podtipova AML prema FAB klasifikaciji prikazan je u tablici 8.

Akutna mijeloična leukemija M2 podtipa prema FAB klasifikaciji dijagnosticirana je u 168/536 (31%) ispitanika i ujedno je najučestaliji podtip AML za razliku od AML-M6 koja je nađena u 18/536 (3%) ispitanika s AML. Najviše urednih nalaza kariotipa u ispitanika s AML nađeno je u AML-M2, 72/536 (13%) za razliku od AML-M6 gdje je uredan nalaz kariotipa nađen u samo 4/536 (1%) ispitanika. Patološki nalaz kariotipa nađen je najviše u ispitanika s AML-M2, 96/536 (18%), a najmanje patoloških nalaza nađeno je u AML-M7, 13/536 (2%) ispitanika (slika 2.).

Tablica 8. Učestalost podtipova AML prema FAB klasifikaciji

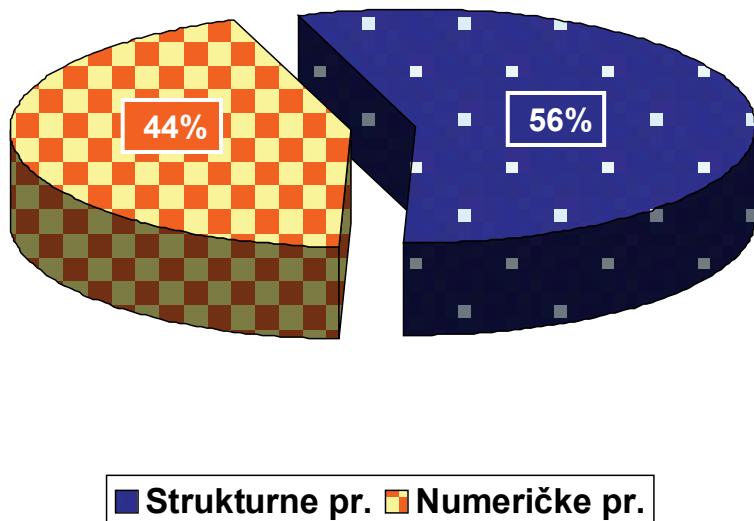
FAB	Ukupno podtip	% N=536	N/N karotip	% N=536	Patologija	% N=536	% N=363
M0	41	8%	13	2%	28	5%	8%
M1	77	14%	25	5%	52	10%	14%
M2	168	31%	72	13%	96	18%	26%
M3	76	14%	15	3%	61	11%	17%
M4	75	14%	23	4%	52	10%	14%
M5	62	12%	15	3%	47	9%	13%
M6	18	3%	4	1%	14	3%	4%
M7	19	4%	6	1%	13	2%	4%
\sum^*	536	100%	173 / 32%		363 / 68%		

\sum^* ukupno



Slika 2 . Učestalost podtipova AML prema FAB klasifikaciji

Učestalost nađenih promjena (numeričkih i strukturnih) u kariotipu ispitanika s AML prikazan je na slici 3.



Slika 3. Prikaz učestalosti promjena kariotipa u ispitanika s AML

4.1. Numeričke promjene u ispitanika s AML

Promjene broja (numeričke promjene) kao primarne promjene kariotipa nađene su u 44% ispitanika s AML (slika 3). Najučestalije skupine numeričkih promjena u naših ispitanika prikazane su u tablici 9. i na slici 4. Kromosomi 5, 7, 8, 13, 21 i 22 bili su najčešće uključeni u numeričke promjene koje su nađene u naših ispitanika s AML.

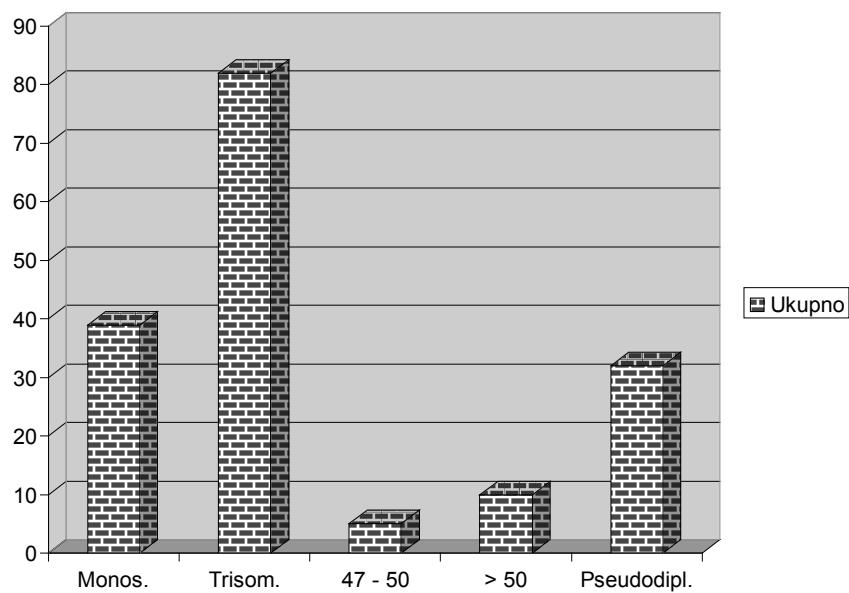
Najučestalija numerička promjena na ukupni broj ispitanika ($N=536$) bila je pseudodiploidija nađena u $190/536$, (35%). Najvećim dijelom pseudodiploidija bila je nađena kao sastavni dio kompleksnih nalaza kariotipa i to u $158/536$, (29%) slučajeva. Kao samostalna promjena pseudodiploidija nađena je u $32/536$ (6%) ili 9% ukupne patologije ispitanika s AML. Ostale numeričke promjene kao što su monosomije $39/536$ (7%), trisomije $82/536$ (15%), hiperdiploidije od 47-50 u $5/536$ (1%), te hiperdiploidije s više od 50 kromosoma u kariotipu $10/536$ (2%) nađene su ukupno u $136/536$ (25%) ispitanika s AML. Spomenute

numeričke promjene čine 37% (136/363) ukupne nađene patologije u naših ispitanika.

Trisomije po svojoj učestalosti bile su najčešće (samostalne) numeričke promjene u ispitanika s AML i njima pripada 23% ukupne patologije.

Tablica 9. Učestalost numeričkih promjena u ispitanika s AML

Promjena	\sum promjena	\sum 536	\sum 363
Monosomija	39	7%	11%
Trisomija	82	15%	23%
Hiperdiploidija 47- 50	5	1%	1%
Hiperdiploidija 50 >	10	2%	3%
Σ	136	25%	37%



Slika 4. Učestalost numeričkih promjena u ispitanika s AML

Učestalost numeričkih promjena u određenom citomorfološkom podtipu AML prema FAB klasifikaciji prikazan je u tablici 10 (slika 5.).

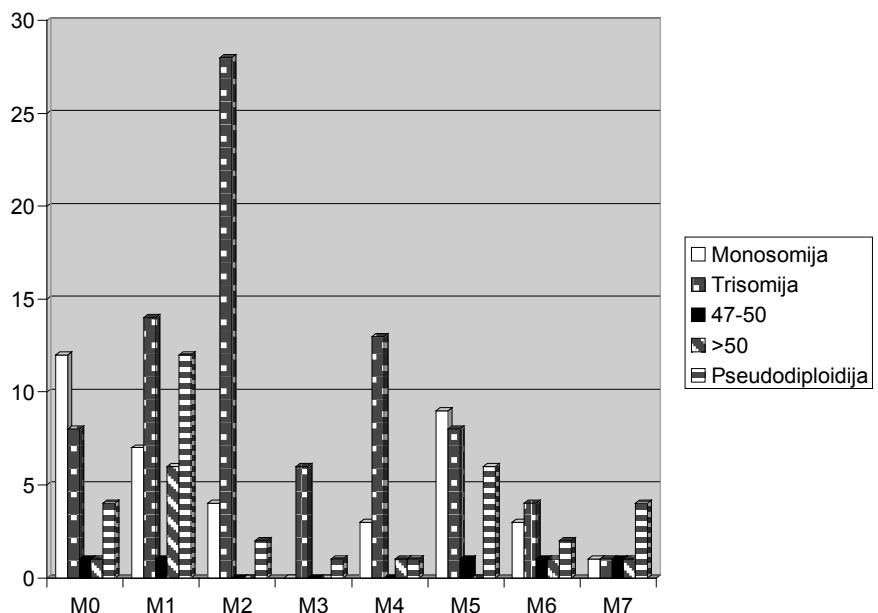
Monosomije kao izolirane, samostalne promjene nađene su najviše u AML-M0, 12/536 (2%), a nisu nađene u AML-M3.

Učestalost trisomija bila je najveća u AML-M2, 28/536, (5%) ispitanika, a najmanje u AML-M7, samo u jednog ispitanika. Trisomije i pseudodiploidije nađene su u svim podtipovima AML za razliku od monosomija i hiperdiploidija. Izolirana, samostalna hiperdiploidija od 47-50 kromosoma nije nađena u AML-M2, M3 i u M4, a hiperdiploidija s više od 50 kromosoma nije nađena u AML-M2, M3 i M5.

Spomenute numeričke promjene čine 47% ukupne patologije u ispitanika s AML, a najveći udio u spomenutoj patologiji numeričkih promjena imaju trisomije i to 23%.

Tablica 10. Učestalost numeričkih promjena u određenog podtipa AML

Promjena	M0	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	Σ	Σ 536	Σ 363
Monosomija	12	7	4	0	3	9	3	1	39	7%	11%
Trisomija	8	14	28	6	13	8	4	1	82	15%	23%
Hiperdiploidija 47-50	1	1	0	0	0	1	1	1	5	1%	1%
Hiperdiploidija 50 >	1	6	0	0	1	0	1	1	10	2%	3%
Pseudodiploidija	4	12	2	1	1	6	2	4	32	6%	9%

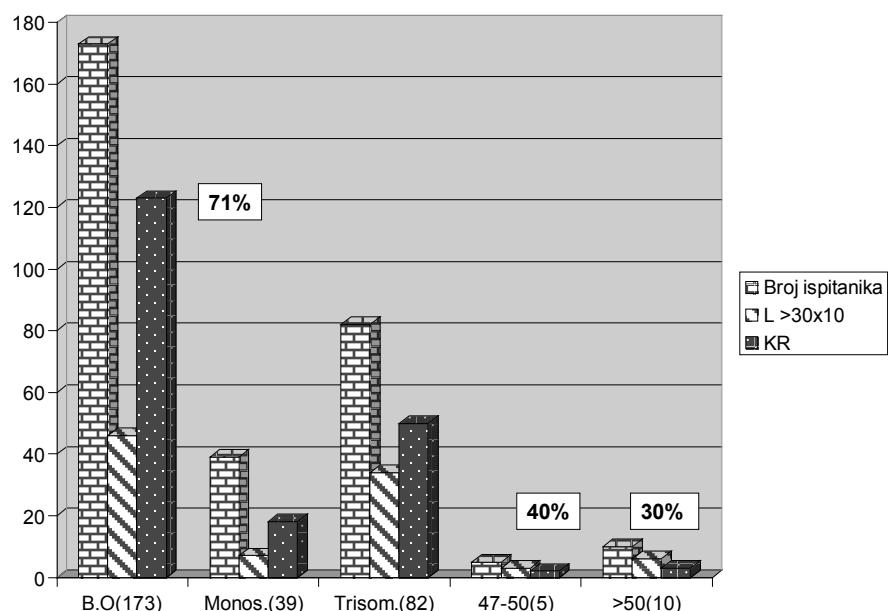


Slika 5. Učestalost numeričkih promjena u određenog podtipa AML

Karakteristike ispitanika s numeričkim promjenama prikazuje tablica 11 (slika 6.). U ispitanika s numeričkim promjenama nije bilo značajne razlike u dobi i nalazu udjela blasta u koštanoj srži pri dijagnozi bolesti. Najveći broj leukocita (60% ispitanika s $L>30\times 10^9/L$) nađen je u ispitanika s hiperdiploidijama u kariotipu ($P<0.001$). Najviše postignutih KR nađeno je u ispitanika s urednim nalazom i urednim ($N=46$) modalnim brojem kariotipa, 123/173 (KR=71%, $P<0.001$), te u skupini ispitanika s trisomijama 50/82 (KR=61%, $P<0.004$). Najmanje postignutih KR bilo je u skupini ispitanika s hiperdiploidijom >50 (KR=30%)

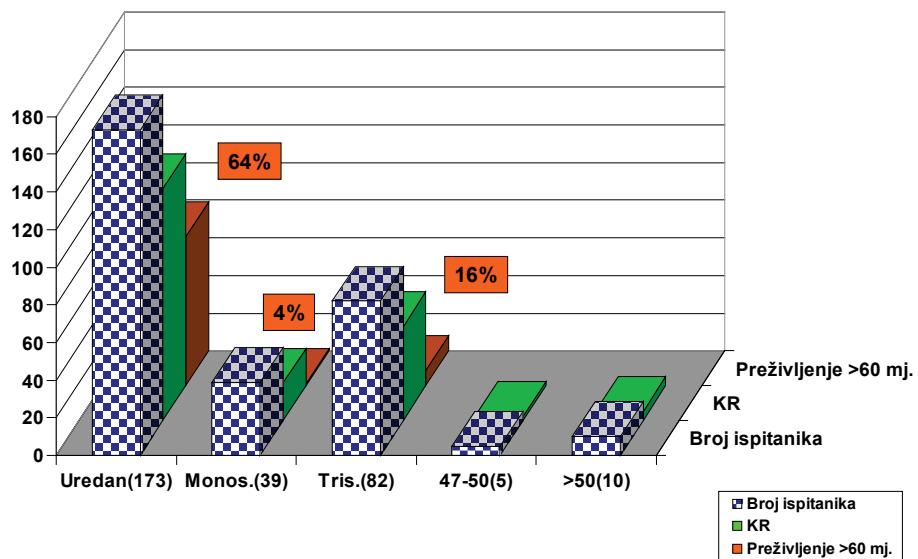
Tablica 11. Karakteristike ispitanika s numeričkim promjenama

Promjena	\sum 536	DOB medijan	Blasti % medijan	$L \times 10^9/L$ medijan	$L > 30$	KR
\sum Uredan kariotip	173 32%	47	50	19,4	46 27%	123 71%
Monosomija	39 7%	47	47	20	7 18%	18 46%
Trisomija	82 15%	47	54	20,5	34 41%	50 61%
Hiperdiploidija 47-50	5 1%	45	53	19,2	3 60%	2 40%
Hiperdiploidija $50 >$	10 2%	45	54	42,5	6 60%	3 30%



Slika 6. Karakteristike ispitanika s numeričkim promjenama

Preživljenje duže od 60 mj. imali su ispitanici s urednim nalazom kariotipa 64% (110/173), zatim ispitanici s trisomijama 16% (13/82) i s monosomijama 4% (2/39) slika 7.



Slika 7. Preživljenje ispitanika s numeričkim promjenama

Tablica 12. prikazuje učestalost najčešćih monosomija u naših ispitanika (monosomija 8, 13, 21, 22) u različitim podtipovima AML. Spomenute monosomije njih 25/39 čine 64% svih nađenih monosomija u naših ispitanika s AML. Od ukupno svih nađenih monosomija (N=39), monosomija 13 čini 31% (12/39) tj. 3% (12/363) ukupne patologije u AML. Monosomija 13 nađena je najviše u AML-M1, a nije nađena u M2, M3, M4 i M7. Monosomija 8 nađena je u 10/39 (26%) svih monosomija tj. 3% (10/363) ukupne patologije u ispitanika s AML. Monosomija 8 najviše je nađena u ispitanika s AML-M1.

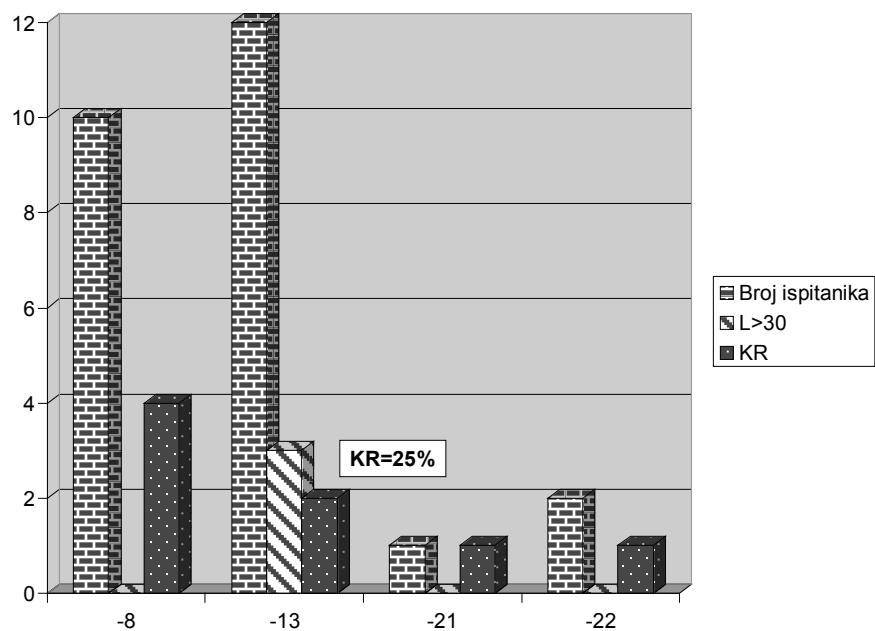
Tablica 12. Učestalost monosomija 8, 13, 21, 22 u podtipovima AML

Promjena	M0	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	Σ
\sum Česte momo.	4	10	1	0	2	4	4	0	25
-8	2	4	0	0	0	2	2	0	10
-13	2	6	0	0	0	2	2	0	12
-21	0	0	1	0	0	0	0	0	1
-22	0	0	0	0	2	0	0	0	2

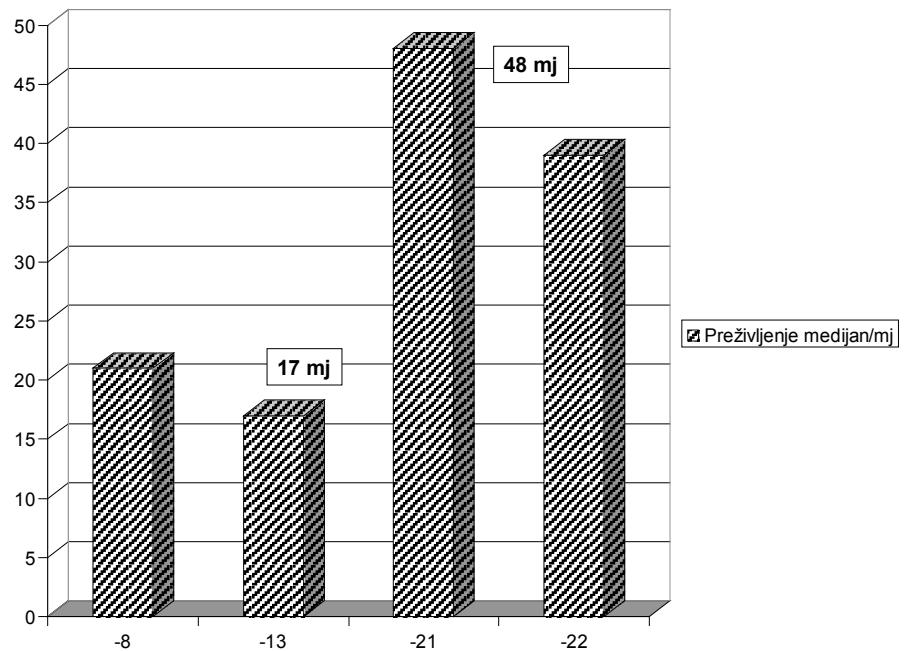
Karakteristike ispitanika s nalazom najčešćih monosomija u kariotipu prikazuje tablica 13, (slika 8.). Ispitanici sa monosomijom 8 postižu KR u 35% slučajeva, ispitanici s monosomijom 13 u 17%, a s monosomijom 22 u 50% slučajeva.

Tablica 13. Karakteristike ispitanika s nalazom najčešćih monosomija u kariotipu

Promjena	\sum (25)	DOB medijan	BL % medijan	$L \times 10^9/L$ medijan	$L > 30$
-8	10	48	52	31	0
-13	12	42	48	19	7
-21	1	38	49	11	0
-22	2	21	39	15	0



Slika 8. Karakteristike ispitanika s nalazom najčešćih monosomija u kariotipu



Slika 9. Preživljenje ispitanika s nalazom najčešćih monosomija u kariotipu

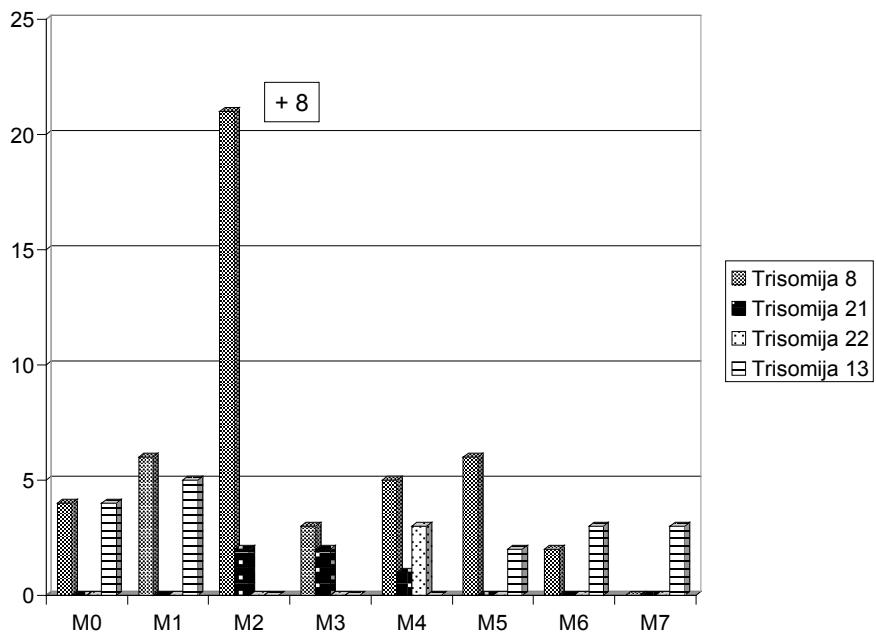
Najbolje preživljjenje imali su ispitanici s monosomijom 21, (medijan=48 mj.), a najlošije ispitanici s monosomijom 13 (medijan=17 mj.) slika 9.

Tablica 14 (slika 10.) prikazuje učestalost najčešćih trisomija (+8,+21,+22 i +13) u različitim podtipovima AML. Spomenute trisomije njih 72/82 čine 88% svih trisomija u ispitanika s AML. Od ukupno svih trisomija (N=82), trisomija 8 čini 57% (47/82), a trisomija 13, 21% (17/82). Trisomija 8 nađena je u svim podtipovima AML, osim u AML-M7. Najviše ispitanika imalo je trisomiju 8 u AML-M2, 21/47, (45%).

Trisomija 13 druga je po učestalosti trisomija 17/82, (21%) i najčešće je nađena u AML-M1, 5/82 (6%), a nije nađena u AML-M2, M3 i M4.

Tablica 14. Učestalost trisomija 8, 21,22 i 13 u podtipovima AML

Promjena	M0	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	Σ
Σ trisomija	8	14	28	6	13	8	4	1	82
+ 8	4	6	21	3	5	6	2	0	47 57%
+ 21	0	0	2	2	1	0	0	0	5 6%
+ 22	0	0	0	0	3	0	0	0	3 4%
+ 13	4	5	0	0	0	2	3	3	17 21%
Σ trisomija	8	12	23	5	9	8	4	3	72

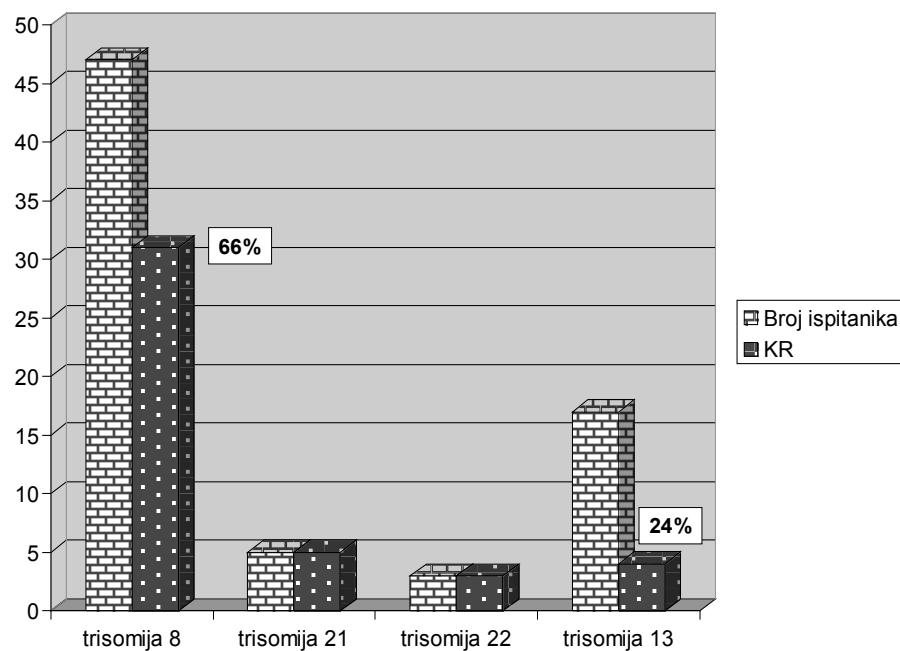


Slika 10. Učestalost trisomija 8, 21,22 i 13 u podtipovima AML

Karakteristike ispitanika s nalazom trisomija u kariotipu prikazuje tablica 15, (slika 11.). Najviše postignutih KR imali su ispitanici s trisomijom 22, 100%, a oni ispitanici u kojih je nađena trisomija 13 u nalazu kariotipa postizali su KR u 24%. Ispitanici s trisomijom 8 postižu KR u 31/47 (66%).

Tablica 15. Karakteristike ispitanika s nalazom trisomije 8, 21, 22 i 13 u kariotipu

Promjena	Σ (82)	DOB medijan	BL % medijan	$L \times 10^9/L$ medijan	$L > 30$
+8	47 13%	48	48	19	9 18%
+21	5 2%	45	43	10,7	1 17%
+22	3 1%	29	62	12,8	0
+13	17 5%	58	62	31	9 53%



Slika 11. Karakteristike ispitanika s nalazom trisomije 8, 21, 22 i 13 u kariotipu

Tablica 16, prikazuje osnovne karakteristike ispitanika s najčešćim monosomijama i trisomijama (8, 21, 22 i 13). Ispitanici u kojih su nađene monosomije spomenutih kromosoma imaju lošije preživljjenje od ispitanika s trisomijama istih kromosoma.

Tablica 16. Karakteristike ispitanika s monosomijama i trisomijama
(8,21,22 i 13)

Promjena FAB	Σ	DOB medijan	BL % medijan	$L \times 10^9/L$ medijan	$L > 30$	KR	Preživljenje > 60 mj	P
-8 M5	3	48	52	31	0	3 100	0 31mj	
+8 M2	49 13%	48	48	19	9 18%	31 63%	19 39%	0.01
-21 M2	1	38	49	11	0	1 100%	0 41mj	
+21 M2	6 2%	45,5	43	10,7	1 17%	5 83%	3 47%	0.01
-22 M4	2	21	39	15	0	1 50%	0 39mj	
+22 M4	3 1%	29	62	12,8	0	3 100%	2 67%	0.01
-13 M1	8	42	48	19	3 38%	6 75%	0 17mj	
+13 M1	17 5%	58	62	31	9 53%	4 24%	3 18%	0.02

4.2. Strukturne promjene u ispitanika s AML

Strukturne promjene nađene su u 300/536 (56%) ispitanika s AML i čine 83% 300/363 ukupne patologije u ispitanika. Tablica 17. prikazuje učestalost strukturnih promjena u citomorfološkim podtipovima AML.

Specifične, poznate nam promjene kao što su t(8;21)(q22;q22)/AML1/ETO, t(15;17)(q22;q11-21)/PML/RAR α , inv(16q)(p13q22), t(16;16)/CBF β , 11q23/MLL, t(9;11), t(6;9) i promjene lokusa 3q26 nađene su u 206/536 (38%) ispitanika i čine 56% sveukupno nađene patologije.

Translokacija t(8;21)(q22;q22)/AML1/ETO nađena je u 39/536 (7%) ili 11% ukupne patologije ispitanika s AML. Strukturna promjena t(8;21)(q22;q22)/AML1/ETO nađena je u 37/39 (95%) u AML-M2, 1/39 (3%) u M1 i u 1/39 (3%) u M4.

Translokacija t(15;17)(q22;q11-21)/PML/RAR α nađena je samo u ispitanika s AML-M3. Od ukupnog broja ispitanika (N=536) 54 njih (10%) imalo je translokaciju t(15;17)(q22;q11-21)/PML/RAR α . Translokacija t(15;17) čini 15% ukupne patologije u AML.

Inverzija kromosoma 16, inv(16q)(p13q22), t(16;16)/CBF β nađena je u 25/536 (5%) ispitanika s AML. Strukturna promjena inv(16q)(p13q22)/CBF β u 24/25

(96%) nađena je u AML-M4 i 1/25 (4%) u M3 gdje je bila udružena s drugom strukturnom promjenom.

Strukturne promjene lokusa 11q23/MLL nađene su u 46/536 (9%) ispitanika, a t(9;11)(q34;q23)/AF9/MLL u 11/536 (2%). Promjena 11q23 najčešće je nađena u AML-M5b.

Strukturne promjene kromosoma 3 i to najčešće lokusa 3q26 nađene su ukupno u 20/536 (4%) tj. u 6% ukupne patologije AML. Učestalost promjene bila je najveća u AML-M1, a promjena nije nađena u AML-M3, M6.

Kompleksne promjene i druge strukturne promjene nađene su u 18% ispitanika i čine 27% ukupne patologije.

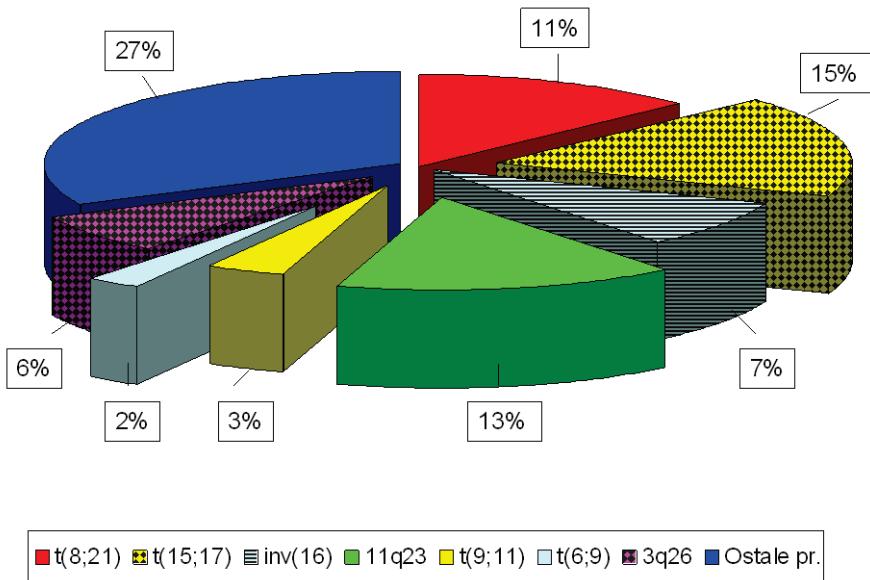
Kompleksne promjene kariotipa nađene su samo u AML-M0, M1 i M5 i kao takve čine 7% ukupne patologije u ispitanika s AML.

Tablica 17. Učestalost strukturnih promjena u ispitanika s AML

Promjena	M0	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	Σ /536/363/300
Σ Uredan kariotip	13	25	72	15	23	15	4	6	173 32%
8;21	0	1	37	0	1	0	0	0	39 7% 11% 13%
15;17	0	0	0	54	0	0	0	0	54 10% 15% 18%
Inv(16)	0	0	0	1	24	0	0	0	25 5% 7% 8%
11q23	1	7	6	0	9	22	0	1	46 9% 13% 15%
9;11	0	0	1	0	0	9	1	0	11 2% 3% 4%
6;9	0	2	3	0	2	1	0	0	8 1% 2% 3%
Pr.3	2	6	5	0	4	2	0	1	20 4% 6% 7%
Druge strukt. pr.	6	15	23	3	12	4	5	5	73 14% 20% 24%
Kompleks.pr.	11	8	0	0	0	5	0	0	24 4% 7% 8%
Σ	20	39	75	58	52	43	6	7	300 56% 83%

Strukturne promjene kromosoma 5 i 7 (translokacije i/ili delecije 5q31/5q34, 7q31) nađene su kao sastavni dio kompleksnih nalaza u kariotipu ispitanika s AML.

Od ukupnog broja nađenih specifičnih citogenetskih promjena strukturne promjene lokusa 11q23 čine 28% (57/203) i najčešće su specifične strukturne promjene ($P<0.03$). Od ostalih nađenih specifičnih promjena slijedi t(15;17), 54/203 (27%) i t(8;21), 39/203 (19%). Spomenute specifične promjene u ispitanika s AML prikazuje slika 12 .



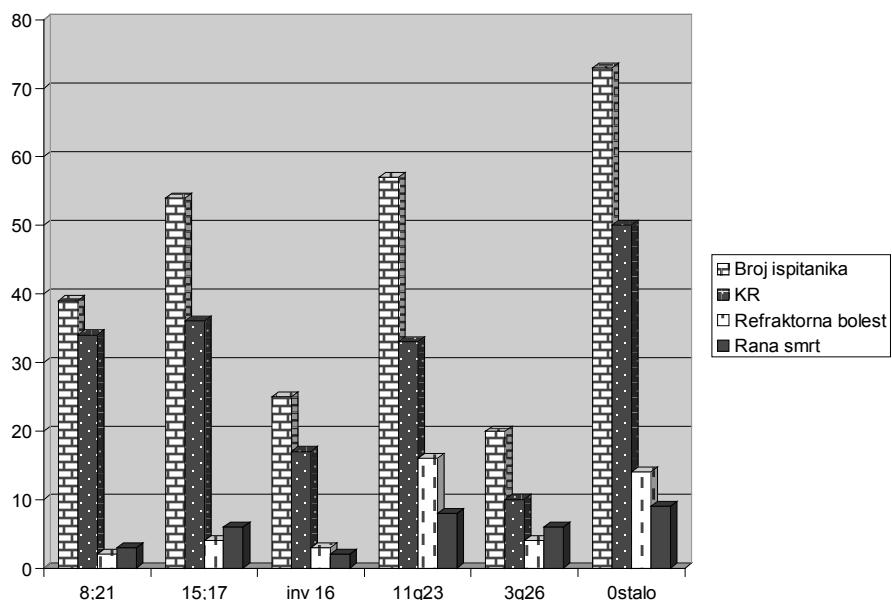
Slika 12. Učestalost specifičnih strukturnih promjena u ukupnoj patologiji ispitanika s AML (N=363)

Tablica 18. prikazuje karakteristike ispitanika u kojih su nađene strukturne promjene u kariotipu. Ispitanici s promjenama t(8;21), t(15;17), inv(16)/t(16;16), t(9;11) i t(6;9) bili su mlađi od 45 godina pri dijagnozi bolesti za razliku od ispitanika s strukturnim promjenama kromosoma 3 (3q26), drugim strukturnim i kompleksnim promjenama gdje su ispitanici bili stariji od 45 godina ($P<0.001$). Medijan leukocita bio je najveći u ispitanika s promjenom lokusa 11q23 i u tih ispitanika 27/46, (59%) imalo je broj $L > 30 \times 10^9 / L$ ($P<0.01$). Ispitanici u kojih je nađena specifična promjena t(8;21) postigli su KR u 87% slučajeva, a t(15;17) u 67% a ispitanici s inv (16) u 69% slučajeva. Najmanje KR nađeno je u ispitanika s promjenama kromosoma 3q26 (50%) i 11q23 promjenom (54%).

Tablica 18. Karakteristike ispitanika s strukturnim promjenama

Promjena	\sum 536	DOB medijan	BL medijan	$L \times 10^9/L$ medijan	$L > 30$	KR
\sum Uredan kariotip	173	47	50	19,4	63 36%	123 71%
8;21	39	44	41	18	8 21%	34 87%
15;17	54	45	38	9,5	5 9%	36 67%
Inv 16	25	39	38	21	11 44%	17 69%
11q23	46	45	48	35,5	27 59%	25 54%
9;11	11	39	51	22	4 36%	8 62%
6;9	8	42	42	29,5	4 50%	5 59%
Pr. 3	20	51	42	19,5	12 40%	10 50%
Druge str.pr.	73	49	50	19	36 49%	50 68%

Na slici 13. prikazan je ishod liječenja uvodnom terapijom ispitanika s AML prema promjeni u kariotipu prilikom postavljanja dijagnoze.



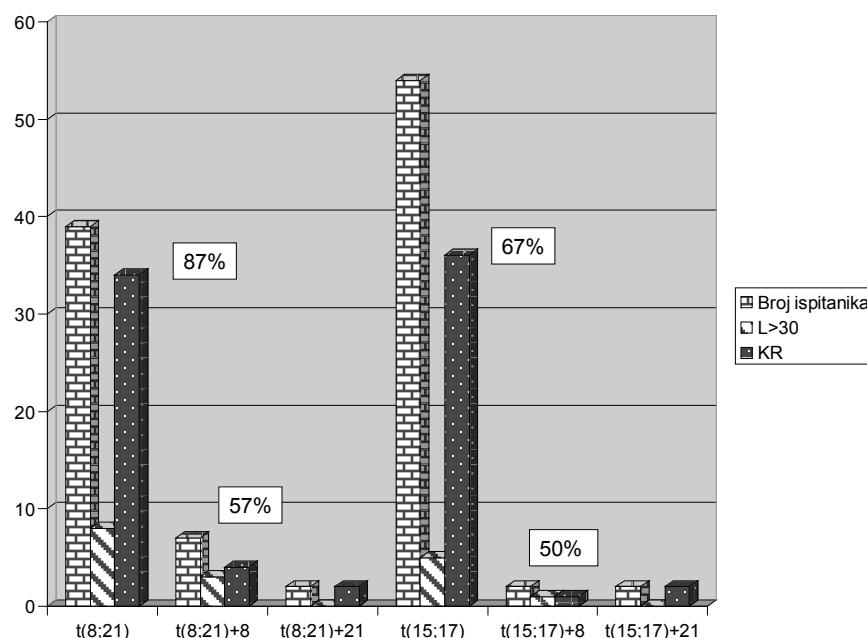
Slika 13. Ishod uvodne terapije u ispitanika s AML

Tablica 19. i slika 14. prikazuje specifične strukturne promjene u kombinaciji s najčešćim trisomijama u ispitanika s AML. Trisomija osmog kromosoma u kombinaciji s specifičnom promjenom t(8;21) i t(15;17) utjeće na rezultat uvodne terapije (postizanje KR), za razliku od drugih spomenutih trisomija koje ne mijenjaju rezultat uvodne terapije (KR).

Tablica 19. Specifične strukturne promjene u kombinaciji s najčešćim trisomijama u ispitanika s AML.

Promjena	Σ	DOB medijan	BL medijan	$L \times 10^9/L$ medijan	$L > 30$	KR	P
8;21	39 11%	47	41	18	8	34 87%	
8;21 +8*	7 2%	48	32	18	3	4 57%	.01
8;21 +21*	2 1%	49	48,5	14,7	0	2 100%	N.S
Σ	48						
15;17	54 15%	45,5	38	9,55	5	36 67%	
15;17 +8*	2 1%	39,5	37	8,1	1	1 50%	.01
15;17 +21*	2 1%	44,5	73,5	4,6	0	2 100%	N.S

*Strukturalna promjena i trisomija u istom klonu



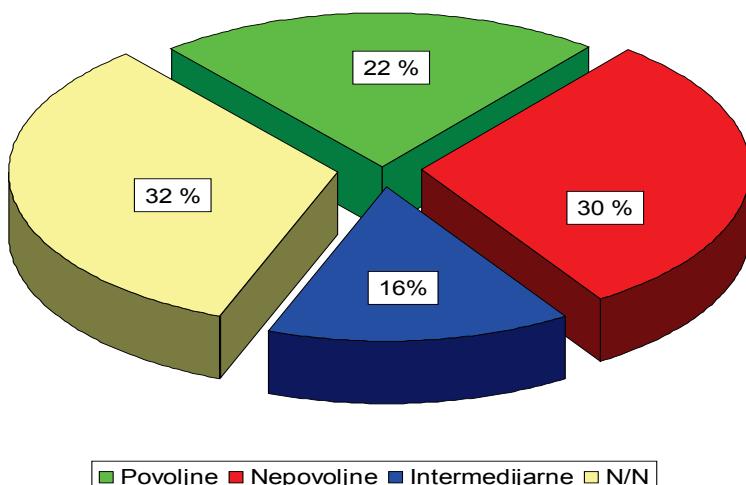
Slika 14. Specifične strukturne promjene i trisomije

4.3. Prognostičke skupine u ispitanika s AML

Promjene u kariotipu ispitanika s AML podjeljene su u tri prognostičke skupine, povoljna, nepovoljna i intermedijarna (strana 17). Od ukupno 536 ispitanika povoljan citogenetski nalaz nađen je u 118/536 (22%) slučajeva. Intermedijarni tip citogenetske promjene (uredan nalaz, druge neklasificirane promjene u kariotipu) utvrđen je 260/536 (49%) ispitanika, dok je u 158/536 (29%) ispitanika utvrđena nepovoljna citogenska promjena (promjene lokusa 3q26, 11q23, +8, t(6;9), t(9;11), kompleksni nalazi u kariotipu) tablica 20, slika 15.

Tablica 20. Učestalost prognostičkih skupina u AML

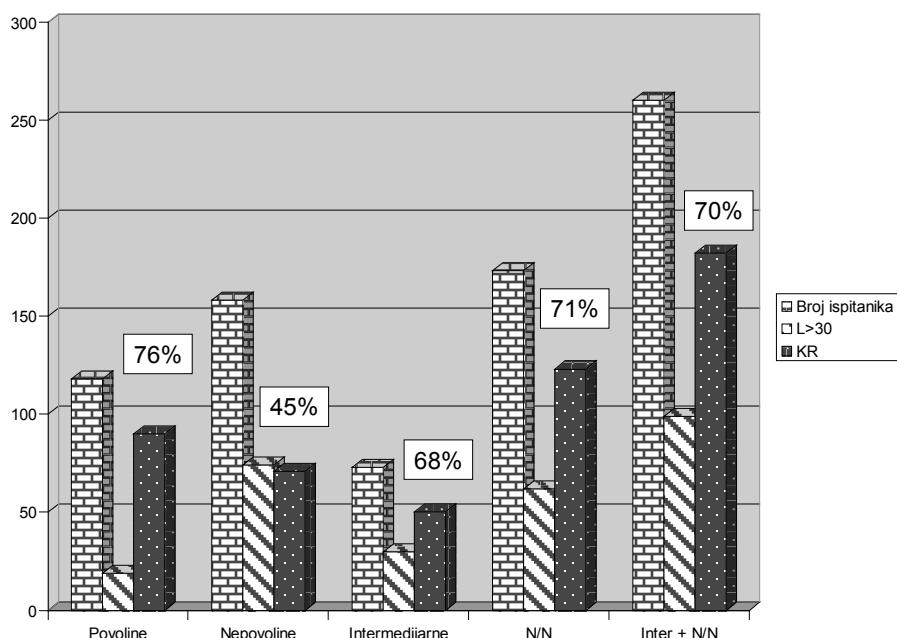
Promjena grupe	Σ	DOB medijan	BL medijan	$Lx10^9/L$ medijan	$L>30$	KR
Povoljne	118 22%	44,5	38	12,5	19 16%	90 76%
Nepovoljne	158 30%	47	48,5	27,5	74 47%	71 45%
Intermedijarne	87 16%	46	50	19	36 41%	59 68%
Uredan nalaz	173 32%	47	50	19,4	62 27%	123 71%
Σ	536					
Povoljne	118	44,5	38	12,5	19 16%	90 76%
Nepovoljne	158	47	48,5	27,5	74 47%	71 45%
Intermedijarne + Uredni	260 49%	46	50	19,2	99 38%	182 70%



Slika 15. Učestalost prognostičkih skupina u AML

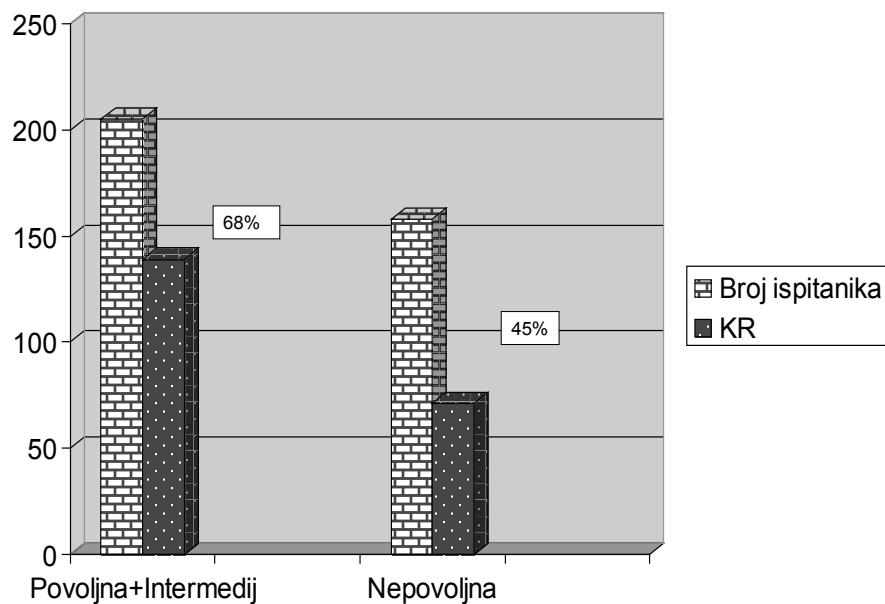
4.3.1. Vjerojatnost postizanja KR u ispitanika s AML

Slika 16. prikazuje vjerojatnost postizanja kompletne remisije prema prognostičkim skupinama. Vjerojatnost postizanja kompletne remisije bolesti za ispitanike s povoljnim odnosno intermedijarnim promjenama kariotipa iznosi 76% i 70%. Ispitanici s nepovoljnim promjenama u kariotipu imaju vjerojatnost postizanja KR 45% ($p<0.03$). Između povoljne i intermedijarne skupine ne postoji statistički značajna razlika u vjerojatnosti postizanja KR.



Slika 16. Vjerojatnost postizanja KR u ispitanika s AML prema prognostičkim skupinama

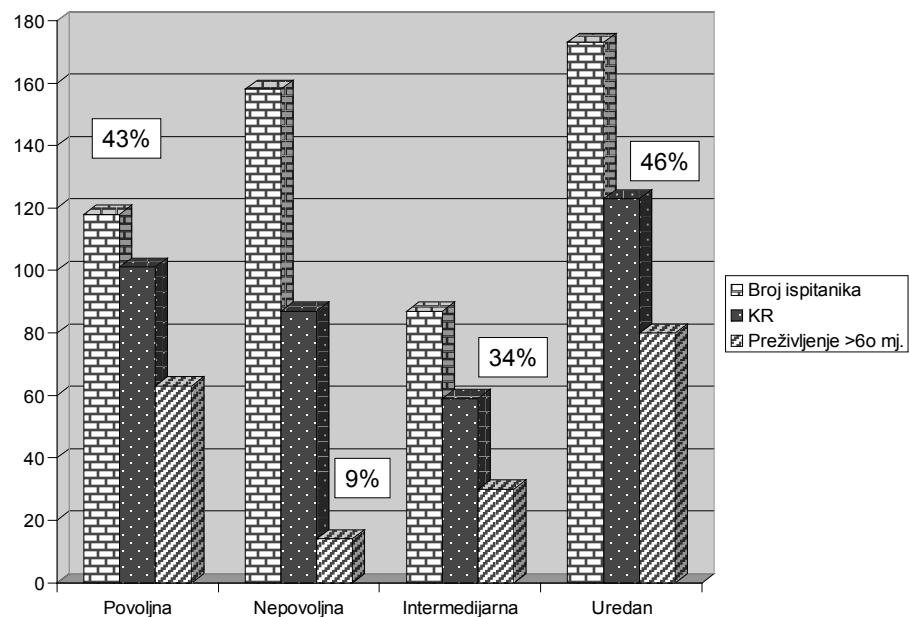
Slika 17. prikazuje vjerojatnost postizanja kompletne remisije između ispitanika s nepovoljnom promjenom u kariotipu i ostalih ispitanika (ispitanici s povoljnim i intermedijarnim promjenama u kariotipu). Postoji statistički značajna razlika u vjerojatnosti postizanja KR između ove dvije skupine ($p<0.03$).



Slika 17. Vjerovatnost postizanja KR u ispitanika s AML prema prognostičkim skupinama

4.3.2. Vjerovatnost preživljjenja bez znakova bolesti u ispitanika s AML

Ispitanici koji imaju povoljnu promjenu u kariotipu imaju bolju prognozu bolesti i preživljjenje. Ispitanici s povoljnim promjenama u kariotipu imaju vjerovatnost preživljjenja dužu od 60 mj. u 43% slučajeva za razliku od ispitanika s nepovoljnom promjenom u kariotipu gdje je preživljjenje duže od 60 mj. u 9% ($P<0.05$). Na slici 18. prikazano je preživljjenje duže od 60 mj. prema podjeli promjena kariotipa u prognostičke skupine.



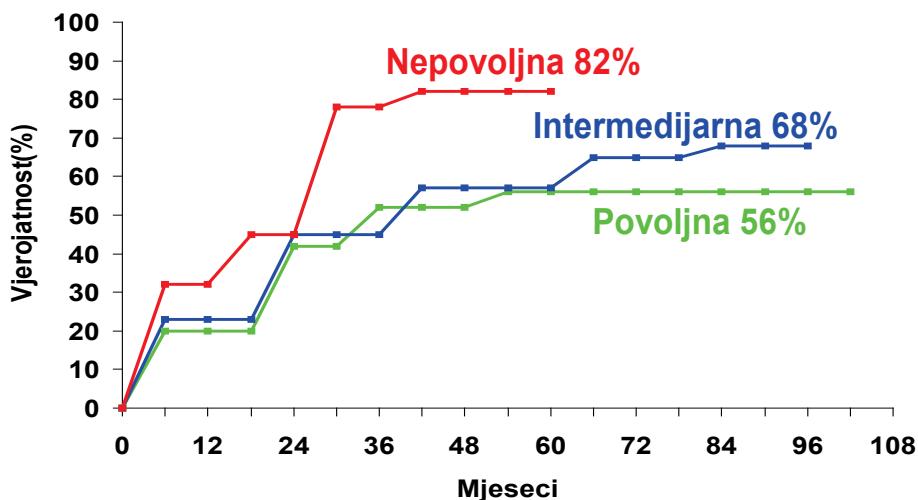
Slika 18. Prikaz preživljjenja ispitanika s AML prema prognostičkim skupinama

Ispitanici s nepovoljnim citogenetskim promjenama u kariotipu imaju statistički značajno lošije preživljjenje nego ostali ispitanici ($P<0.01$).

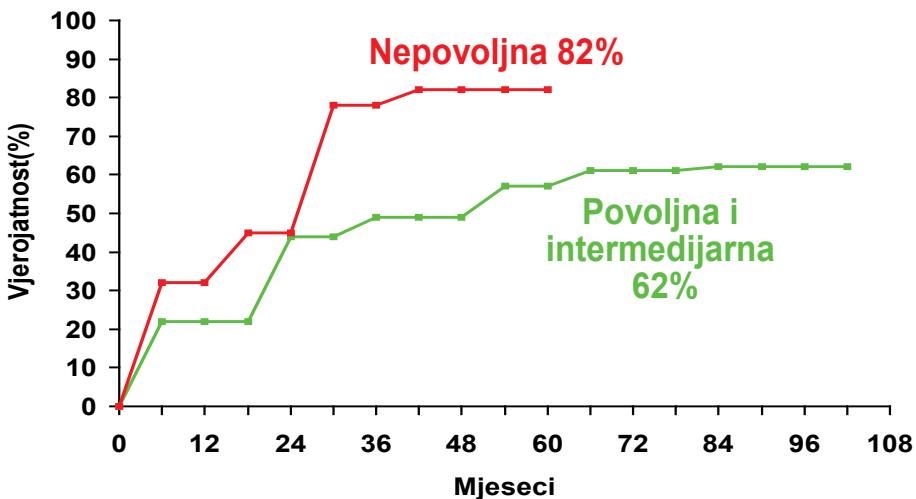
U ispitanika s AML nije nađena statistički značajna razlika u preživljjenju bez znakova bolesti što se tiče liječenja različitim uvodnim terapijskim protokolima. Ispitanici liječeni TKMS imaju duže preživljjenje bez znakova bolesti u odnosu na ispitanike koji nisu liječeni transplantacijom (57mj., 5%CI, 46,4-63,1) napram 32 mj. (95%CI, 14,6-58,7), $P=.009$.

4.3.3. Vjerojatnost relapsa u ispitanika s AML

Vjerojatnost relapsa bolesti za ispitanike s povoljnom i intermedijarnom promjenom kariotipa iznosi 56% i 68% slika 19. i 20. Ispitanici s nepovoljnom promjenom u kariotipu imaju značajno veću učestalost relapsa bolesti (82%) od ostalih ispitanika ($P < .05$)



Slika 19. Vjerojatnost relapsa ispitanika s AML prema prognostičkim skupinama ($P < 0.05$)



Slika 20. Vjerovatnost relapsa ispitanika s AML prema prognostičkim skupinama ($P<0.01$)

4.3.4. Rizični činitelji u ispitanika s AML

Tablica 21. prikazuje činitelje koji mogu utjecati na ishod uvodne terapije tj. na postizanje KR u ispitanika s AML.

Za postizanje KR osim promjena u kariotipu, važna je veličina tumorske mase ($L>30\times 10^9/L$), citomorfološka klasifikacija, dob(<45 god.). Slika 21, 22, 23 i 24 predviđaju činitelje koji imaju utjecaj na postizanje KR u ispitanika s AML.

Ispitanici koji su imali veliku tumorsku masu leukociti ($L > 30\times 10^9/L$) imali su manju učestalost postizanja kompletne remisije nego ostali ispitanici. Ispitanici s većim brojem leukocita imaju rizik 2.8 puta veći za neuspjeh uvodne terapije nego ispitanici s $L < 30\times 10^9/L$.

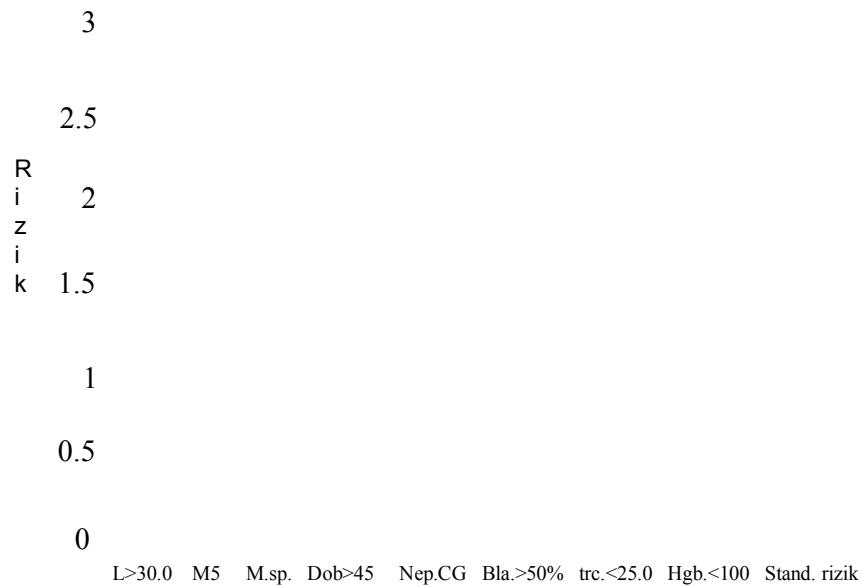
Također ispitanici koji su bili stariji od 45 godina imali su manju učestalost postizanja kompletne remisije nego mlađi ispitanici. U ispitanika starijih od 45 godina veća je učestalost rane smrti nego u mlađih od 45 godina. Ispitanici stariji od 45 godina, s brojem leukocita $>30\times 10^9/L$, te prisustvom nepovoljne citogenetske promjene imaju veći rizik neuspjeha uvodne terapije od ostali. Starija životna dob značajan je rizični činitelj za neuspjeh liječenja. Ispitanici

stariji od 45 godina imaju 1.5 puta veći rizik neuspjeha uvodne terapije nego mlađi. Ispitanici s nepovoljnim citogenetskim nalazom imaju 2.5 puta veći rizik od neuspjeha uvodne terapije nego ostali ispitanici. Nepovoljni rizični čimbenici za neuspjeh liječenja (multivariatna analiza) su starija životna dob >45 , broj leukocita $>30 \times 10^9/L$, prisustvo nepovoljne citogenetske promjene. Zajednički rizični čimbenici za neuspjeh uvodne terapije i liječenja su broj leukocita u perifernoj krvi $>30.0 \times 10^9/L$, starija dob i prisustvo nepovoljne citogenetske promjene.

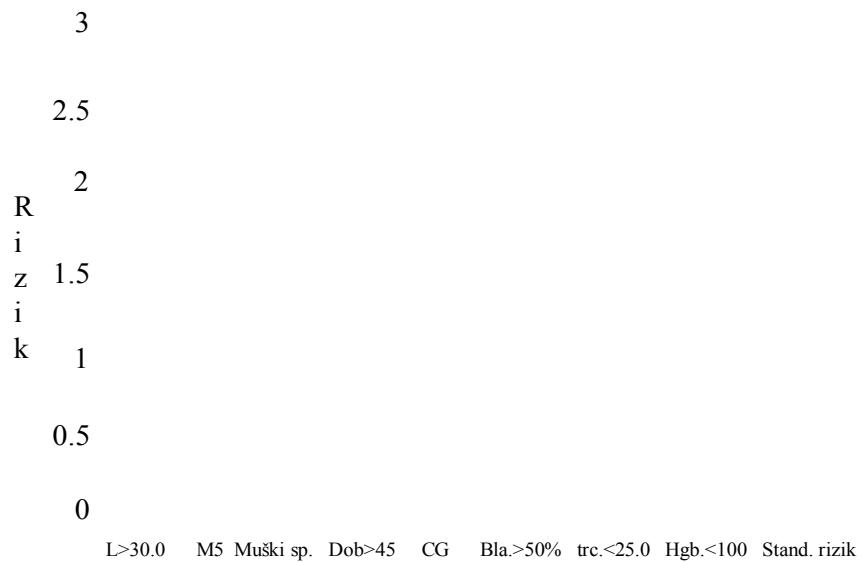
Tablica 21. Rizični činitelji koji mogu utjecati na postizanje KR

Činitelj	Kompletna remisija	Refraktorna bolest	Rana smrt	P
Broj leukocita				
< $30 \times 10^9/L$	78%	10%	12%	0.001
> $30 \times 10^9/L$	55%	26%	19%	
FAB klasifikacija				0.05
M1,M2,M3,M6	76%	12%	12%	
M4,M5	60%	22%	18%	
Spol				N.S.
muški	63%	21%	16%	
ženski	65%	21%	14%	
Dob*				0.001
< 45 godina	74%	17%	9%	
> 45 godina	52%	33%	15%	
Blasti u koštanoj srži*				N.S.
< 50%	68%	18%	14%	
> 50%	60%	24%	16%	
Broj trombocita*				N.S.
< $25 \times 10^9/L$	58%	23%	19%	
> $25 \times 10^9/L$	72%	17%	11%	
Hemoglobin*				N.S.
< 100 g/L	62%	22%	16%	
> 100 g/L	68%	18%	14%	

* pri dijagnozi



Slika 21. Rizični činitelji za neuspjeh uvodne terapije u AML
(univarijatna analiza)



Slika 22. Rizični činitelji za neuspjeh uvodne terapije u AML
(multivarijatna analiza)

Slika 23. Rizični činitelji za neuspjeh liječenja u AML
(univarijatna analiza)

Slika 24. Rizični činitelji za neuspjeh liječenja u AML
(multivarijatna analiza)

5. RASPRAVA

Citogenetske promjene u bolesnika s AML opisane su prvi put u kasnim 50-tim godinama (76). Prema prvim istraživanjima pokazalo se da oko 50% bolesnika s AML imaju klonalne kromosomske promjene u kariotipu. Prvi izvještaj *International Workshop on Chromosomes in Leukaemia* iz 1978. godine u 660 bolesnika s novootkrivenom AML pokazao je da se citogenetske promjene nalaze u oko 50% bolesnika (77). Novije studije pokazale su kako upotrebo preciznijih i specifičnijih tehnika, prije svega molekularnih tehnika (FISH, PCR, RT-PCR) promjene u kariotipu odnosno u genomu mogu se naći u daleko većem broju bolesnika s AML i do >80% (27). Prema nekim istraživačima svi bolesnici s AML imaju neku od citogenetskih promjena u kariotipu (78,79). Do danas objavljeni rezultati studija ukazuju da oko 2/3 bolesnika s AML mogu imati klonalnu kromosomsку promjenu u vrijeme postavljanja dijagnoze (80). Jedan od razlog zašto se dio promjena ne otkrije pri samoj diagnozi AML je činjenica da se radi o tkz. kriptičnim ili prikrivenim promjenama koje su na razini gena. Upravo zbog te činjenice svi naši ispitanici bili su podvrnuti obaveznom pretraživanju na poznate specifične promjene koje se nalaze u određenom tipu/podtipu AML.

U našem retrospektivnom istraživanju citogenetske promjene nađene su u 68% ispitanika s AML što je sukladno do sada objavljenim studijama (81,82).

U tablici 4. prikazane su priznate, primarne kromosomske promjene u bolesnika s AML. Iako se primarne kromosomske promjene nalaze u više od 80% bolesnika s AML, one mogu biti udružene sa sekundarnim promjenama. U više od 60% bolesnika s AML primarne kromosomske promjene su jedina promjena, dok je u ostalih bolesnika primarna kariotipska promjena udružena s jednom ili više promjena (83). U bolesnika s AML-M3 80% bolesnika ima samo jednu citogenetsku promjenu, dok u bolesnika s AML-M6 samo 25% ima jednu citogenetsku promjenu (84).

U naših ispitanika višestruke citogenetske promjene nađene su u 39%, dok je u ostalih nađena samo jedna citogenetska promjena što je sukladno s navodima iz literature.

Numeričke promjene, prije svega monosomije i trisomije česti su nalaz u bolesnika s AML posebice monosomija 8 i 13 te trisomija 8 i trisomija 13 (85).

Oko 15-20% bolesnika s AML imaju neku od trisomija ili monosomiju (86).

U našem istraživanju 44% ispitanika imalo je numeričke promjene. Monosomije i trisomije nađene su u 121/536 ili 22% ispitanika i činile su 33% (121/363) sveukupno nađene patologije. Od svih nađenih monosomija, monosomija 13 nađena je u 12/25 tj. u 48%, a monosomija 8 u 10/25 ili u 40% ispitanika. Za razliku od monosomija u ispitanika kod kojih je nađena trisomija na prvom mjestu po učestalosti bila je trisomija 8 i to u 47/82 (57%), a trisomija 13 nađena je u 17/82 (21%) ispitanika. Monosomije i trisomije spomenutih kromosoma (kr.8 i kr.13) česte su u ispitanika s AML ali nisu specifične promjene i ne vežu se uz neki određeni podtip AML. Naprotiv ove numeričke promjene nađene su u svim podtipovima AML što je sukladno i literaturnim podacima (27). Ono što je potrebno istaknuti su podaci o njihovoј važnosti pri odgovoru na uvodnu terapiju tj. na postizanje KR i prognozu bolesti. Ispitanici u kojih je nađena monosomija 13 postižu KR u 25% slučajeva, a s trisomijom 13 u 24% slučajeva. Preživljjenje s monosomijom 13 u naših ispitanika je 17 mjeseci, a s trisomijom 13 samo 6% ispitanika živi duže od 60 mjeseci (87). Trisomija 8 česta je numerička promjena kariotipa u bolesnika s AML (80). Učestalost ove kromosomske promjene po literaturi iznosi > 7% svih promjena kariotipa (79). U našem istraživanju od ukupno 536 ispitanika trisomiju 8 imalo je 47/536 (9%) ili 13% od sveukupne patologije ispitanika (47/363). Trisomija 8 nije specifična za pojedini podtip AML (27). To je utvrđeno i u našem istraživanju, jer se trisomija 8 našla u gotovo u svih naših ispitanika s AML. Postizanje KR i preživljjenje u ispitanika koji imaju monosomiju 8 ili trisomiju 8 u nalazu kariotipa se razlikuje. Monosomija 8 koja je nađena u naših ispitanika imala je lošiju prognozu od trisomije 8. Navode potvrđuju i istraživanja koja daju važnost promjenama kao što su monosomije ili trisomije spomenutih parova kromosoma (57). Po literaturnim podacima kompletna remisija postiže se u oko 40% bolesnika sa trisomijom 8 (88). Naši ispitanici s trisomijom 8 postizali su KR u 66% slučajeva. Petogodišnje preživljjenje ispitanika koji su u kariotipu imali nalaz trisomije 8 bio je 39% (19/47).

Strukturne promjene u kariotipu ispitanika s AML opisuju se u >40% (55), a u našem istraživanju one su nađene u 56% ispitanika.

Translokacija t(8;21)(q22;q22) nalazi se uglavnom u bolesnika s AML-M2 podtipom, ali se može naći i u drugim podtipovima posebno u AML-M1 ili AML-M4 (89). Prema dosadašnjim istraživanjima smatra se kako je učestalost ove translokacije u svih bolesnika s AML u prosjeku oko 15% (64). Ova translokacija nađena je u 11% (39/363) naših ispitanika s AML (64,90). Prema rezultatima dosadašnjih studija (istraživanja) bolesnici s translokacijom t(8;21)(q22;q22) imaju najbolji odgovor na uvodnu terapiju (91,92). U oko 85% bolesnika postigne se kompletna remisija bolesti (93,94,95). U našem istraživanju kompletna remisija bolesti postignuta je u 34/39 (87%) ispitanika s translokacijom t(8;21)(q22;q22).

Translokacija t(15;17)(q22;q11-12) nalazi se u preko 90% bolesnika s akutnom promijelocitnom leukemijom (AML-M3) (27). U većine tih bolesnika ova promjena je jedina citogenetska promjena (96,97). U našem istraživanju translokacija t(15;17) nađena je u 54/363 ili u 15% nađene patologije. To je promjena koja je nađena isključivo u ispitanika s AML-M3. Translokacija t(15;17) rijetko se nalazi u drugih tipova leukemija (98,99) što je pokazalo i naše istraživanje (100). Ispitanici u kojih je nađena t(15;17)(q22;q11-12) postižu KR u 67% (36/54) slučajeva (101).

Povezanost strukturne promjene dugog kraka kromosoma 16 tj. inv(16)(p13;q22) i infiltracije koštane srži sa eozinofilima opisana je 1983 godine (102). U tih bolesnika radilo se o akutnoj mijelomonocitnoj leukemiji (AML-M4). Prema dosadašnjim rezultatima inv(16)(p13;q22) najčešća je kromosomska promjena u bolesnika s AML-M4. Oko 40% bolesnika s akutnom mijelomonocitnom leukemijom ima tu citogenetsku promjenu (103). Od ukupnog broja strukturalnih promjena u bolesnika s AML na inverziju ili deleciju dugog kraka kromosoma 16 otpada oko 5% slučajeva po literaturi (27). U našem istraživanju inv(16) nađena je u 25/363 tj. u 7% ispitanika. Bolesnici s inv(16) također imaju veliki postotak remisije nakon uvodne terapije. Oko 75% bolesnika postigne kompletну remisiju bolesti. U našem istraživanju ispitanici s inv(16) postignu remisiju bolesti u 17/25 (69%) slučajeva (104).

Strukturne promjene dugok kraka kromosom 11 tj. lukusa 11q23 (balansirane i nebalansirane) nalaze se često u bolesnika s akutnom monocitnom leukemijom (105,106). Prema dosadašnjim rezultatima najveća učestalost ove promjene nalazi se u bolesnika s AML-M5a i iznosi oko 35%. U našem istraživanju 57/363 ispitanika imalo je promjenu lokusa 11q ili točnije 16% ukupno nađene patologije. Učestalost strukturne promjene lokusa 11q23 bila je najveća u AML-M5a i to 55% od ukupne patologije lokusa 11q. Od nađenih strukturalnih promjena lokusa 11q32, 74% bile su balansirane promjene tj. translokacije (t(9;11)(p23;q23), t(10;11)(p12;q23), t(11;19)(q23;p13)) (ref.atlas). Preostali dio patologije lokusa 11q23 pripadao je delecijama i amplifikacijama. Kompletna remisija u naših ispitanika s promjenom lokusa 11q23 postiže se u >50% što ovisi o kojoj se strukturalnoj promjeni radi (partner kromosom).

Translokacija t(6;9)(p23;q34) u našem istraživanju nađena je u 8 ispitanika, dva s AML-M1, tri s AML-M2, 2 s AML-M4 i jedan ispitanik s AML-M5. Ova balansirana strukturalna promjena čini 2% (8/363) nađene patologije u naših ispitanika. Ukoliko se radi pretraživanje na spomenutu strukturalnu promjenu njena incidencija je oko 1-2% patologije u bolesnika s AML (107). U naših ispitanika KR postignuta je u 59% (5/8) slučajeva. Po literurnim podacima različite studije opisuju i različitost u postizanju KR od 40-65% (108).

Strukturne promjene koje zahvačaju lokus 3q26 tj. t(3;3)(q21;q26), inv(3)(q21;q26), ins(3)(q26;q21q26) nađene su u 6% (20/363) ispitanika. Strukturne promjene lokusa 3q26 nisu specifične za određeni podtip AML (109). Dosadašnja istraživanja i spoznaje pokazale su da se neke promjene kariotipa (genoma) mogu pridružiti pojedinim podtipovima AML i da imaju određenu prognostičku i kliničku vrijednost (110). Čak i prije otkrivanja tehnika pruganja bila je poznata vrijednost citogenetskog nalaza. Bolesnici koji su imali normalan (uredan) nalaz u kariotipu (N/N) imali su bolje preživljjenje nego li bolesnici s mozaikom ili normalnim i patološkim nalazom (N/A) te značajno bolje preživljjenje od bolesnika koji su imali samo patološki nalaz kariotipa (A/A) (111).

U istraživanjima se pokazalo također da je nalaz normalnog kariotipa vrlo važan za postizanje kompletne remisije te preživljjenje bolesnika (112). Upravo poradi

važnosti samih promjena koje se nalaze u AML najnovija podjela Svjetske zdravstvene organizacije (*eng. WHO, World Health Organization*) uključuje sve one kliničke, biološke i laboratorijske pokazatelje koji određuju i prognozu akutne leukemije. Upravo tim spoznajama vodili smo se u našem istraživanju. Vrijednost i važnost obavezognog pretraživanja na poznate nam specifične promjene kariotipa u ispitanika s AML pokazao se izuzetno koristan jer dio promjena (kriptične promjene prije svega) bilo bi teško detektirati morfološkim metodama GTG- pruganja. Pretraživanje u naših ispitanika bilo je obavezno za sve poznate, specifične promjene u AML.

U naših ispitanika uredan nalaz kariotipa nađen je u 32% (173/536), povoljan u 22%, nepovoljan u 30% i intermedijaran u 16%. Ukupno preživljenje ispitanika koji su imali uredan nalaz kariotipa (N/N) bolje je od preživljivanja ispitanika u kojih je nađen samo patološki nalaz (A/A). Petogodišnje preživljenje bez znakova bolesti u ispitanika s urednim nalazom bilo je 43%, dok preživljenje ispitanika koji su pripadali skupini s nepovoljnom citogenetskom promjenom bilo 9%. Drugim riječima, ispitanici koji imaju povoljan citogenetski nalaz imaju bolje preživljenje i veći postotak remisije od ispitanika s nepovoljnom promjenom.

Prema dosadašnjim rezultatima bolesnici s povoljnom citogenetskom promjenom koji su liječeni citostatskom terapijom postigli su remisiju u oko 80% slučajeva (113,114,115). U našem istraživanju kompletna remisija u tih ispitanika postignuta je u 76% (90/118) bolesnika. Bolesnici s nepovoljnim kariotipom postižu remisiju bolesti u oko 20-40% slučajeva (113). U našem istraživanju kompletna remisija postignuta je u 45% (71/158) ispitanika, dok je preko 50% bolesnika imalo rezistentnu bolest. Učestalost rane smrti zbog krvarenja, infekcije ili drugih uzroka prije mogućnosti objektivizacije kompletne remisije bolesti bila je podjednaka u svim ispitivanim skupinama. Vjerojatnost postizanja remisije u bolesnika s intermedijarnim tipom citogenetske promjene iznosi 68% (59/87), a 71% s urednim nalazom kariotipa. Obzirom da ne postoji statistički značajna razlika u vjerojatnosti postizanja kompletne remisije između ove dvije skupine bolesnika, one zajedno mogu činiti istu rizičnu skupinu (intermedijarna + uredan nalaz). U usporedbi s bolesnicima koji su imali nepovoljnu citogenetsku

promjenu ovi bolesnici imaju statistički veću vjerojatnost postizanja remisije. Veliki je popis istraživanja koja potvrđuju dobivene podatke (113,114,116,117). Vjerojatnost preživljjenja bez znakova bolesti bolesnika s AML, osim drugim činiteljima uvjetovana je i prisustvom citogenetskih promjena pri dijagnozi (80). Petogodišnje preživljenje bez znakova bolesti u bolesnika koji nemaju jednu od nepovoljnih citogenetskih promjena iznosi oko 45% (114). To potvrđuje i naše istraživanje u kojem su bolesnici s povoljnom ili intermediarnom citogenetskom promjenom imali bolje preživljenje nego bolesnici s nepovoljnim tipom citogenetske promjene.

Vjerojatnost relapsa bolesti manja je u bolesnika koji pri dijagnozi nisu imali citogenetske promjene ili u bolesnika koji su imali translokaciju t(8;21)(q22;q22), t(15;17)(q22;q11-12), inv(16) (110,113). U našem istraživanju relaps bolesti utvrđen je u oko 80% bolesnika koji su imali nepovoljnu citogenetsku promjenu. Osim promjena u kariotipu na postizanje kompletne remisije bolesti mogu utjecati različiti čimbenici (dob, FAB razdioba, krvarenja, DIK, broj leukocita, postotak blasta u koštanoj srži i perifernoj krvi, itd.) (113,114,115). U našem istraživanju činitelji koji utječu na postizanje kompletne remisije bolesti su: broj leukocita u perifernoj krvi, morfologija AML, dob i prisustvo citogenetskih promjena. Multivariatna analiza pokazala je da bolesnici imaju veći rizik od neuspjeha uvodne terapije ako su starije dobi (>45 god.), imaju broj leukocita u perifernoj krvi pri dijagnozi $>30.0 \times 10^9/L$ i jednu ili više nepovoljnih citogenetskih promjena. Osim na uspjeh uvodne terapije različiti činitelji mogu utjecati na ishod liječenja bolesnika (114,116). Najčešće se navode: broj leukocita i morfološka razdioba, postojanje citogenetskih promjena, postotak blasta u koštanoj srži, organomegalija, krvarenje, infekcije itd. U našem istraživanju na uspjeh liječenja utječu broj leukocita u perifernoj krvi pri dijagnozi, morfološka razdioba, dob, prisustvo citogenetske promjene, postotak blasta u koštanoj srži. Multivariatnom analizom utvrđeno je kako veći rizik od neuspjeha liječenja imaju: stariji bolesnici (>45 god), bolesnici s AML-M1 i AML-M5, bolesnici koji su imali veći broj leukocita odnosno manji broj trombocita u perifernoj krvi pri dijagnozi i bolesnici koji su imali jednu ili više

nepovoljnih citogenetskih promjena. Svi navedeni činitelji neovisni su jedan o drugome.

U zaključku se može kazati da bolesnici koji imaju nepovoljnu citogenetsku promjenu pri dijagnozi imaju lošiji klinički tijek i konačan ishod liječenja nego bolesnici koji imaju uredan nalaz ili povoljniju citogenetsku promjenu.

6. ZAKLJUČCI

- Učestalost nađenih citogenetskih promjena u ispitanika s AML iznosila je 68%, dok je 32% ispitanika imalo uredan citogenetski nalaz (kariotip).
- Numeričke promjene nisu specifične promjene kariotipa ali su prognostički važan pokazatelj u ispitanika s AML.
- Ispitanici u kojih su nađene monosomije imali su značajno lošiju prognozu (KR, preživljenje) od istih dokazanih trisomija.
- Povoljne citogenetske promjene utvrđene su u 22% ispitanika, a nepovoljne u 30% ispitanika.
- Ispitanici s povoljnim odnosno intermedijskim tipom citogenetske promjene pri dijagnozi imaju veću vjerojatnost postizanja remisije nego ispitanici s nepovoljnim citogenetskim promjenama.
- Ispitanici s nepovoljnim citogenetskim promjenama imaju manju vjerojatnost preživljivanja bez znakova bolesti te veću vjerojatnost relapsa bolesti.
- Rizični činitelji za neuspjeh uvodne terapije su postojanje nepovoljnih citogenetskih promjena u kariotipu, leukociti u perifernoj krvi $>30.0 \times 10^9/L$ i životna dob > 45 godina.
- Rizični činitelji za neuspjeh liječenja (relaps bolesti ili smrt bolesnika) su:
 1. postojanje nepovoljnih citogenetskih promjena u kariotipu ispitanika s AML,
 2. leukociti u perifernoj krvi pri dijagnozi $>30.0 \times 10^9/L$,
 3. starija životna dob,
 4. trombociti u perifernoj krvi pri dijagnozi $<25 \times 10^9/L$,
 5. podtip AML po FAB razdiobi AML-M1 i AML-M5.

7. SAŽETAK

U istraživanje je uključeno 536 bolesnika s novootkrivenom akutnom mijeloičnom leukemijom. Medjan dobi iznosi je 36 godine u rasponu od 16-60 godina. Akutna mijeloična leukemija M2 podtipa dijagnosticirana je u 31% slučajeva, dok je AML-M6 dijagnosticirana u 3% slučajeva. Akutna promijelocitna leukemija dijagnosticirana je u 76/536 (14%). Akutna mijeloična leukemija M4 podtipa dijagnosticirana je u 75/536 (14%), dok je AML-M5 dijagnosticirana u 62/536 (12%) bolesnika. Eritroleukemija (AML-M6) dijagnosticirana je u 18/536 (3%) bolesnika. Medjan leukocita pri dijagnozi iznosi je $19 \times 10^9/L$, raspona od $0.8-323 \times 10^9/L$. Za analizu kromosoma primjenjene su standardne metode pruganja. Prema nalazu citogenetske analize bolesnici su razdijeljeni u tri prognostičke skupine. Bolesnici s translokacijom t(8;21), inverzijom inv(16), translokacijom t(15;17) nalaze se u tzv. povoljnoj skupini. Bolesnici s urednim nalazom bez kromosomskih promjena u kariotipu odnosno bolesnici sa citogenetskim promjenama nepoznate prognoze čine posebnu skupinu intermedijarne prognoze. Bolesnici u kojih je nađena trisomija 8, ili promjene kromosoma 5, 7, promjene lokusa 11q23, 3q26 nalaze se u nepovoljnoj skupini. Citogenetske promjene nađene su u 363 (68%) bolesnika. Povoljan citogenetski nalaz nađen je u 118 (22%) bolesnika. Intermedijarni tip citogenetske promjene utvrđen je u 260 (49%) bolesnika, dok je u 158 (30%) bolesnika utvrđena nepovoljna citogenska promjena. Kompletna remisija postignuta je u 76% bolesnika dobre citogenetske prognoze, u 70% bolesnika intermedijarne citogenetske prognoze, te u samo 45% bolesnika nepovoljne citogenetske prognoze ($p=0.001$). Vjeratnost petogodišnjeg preživljjenja bez znakova bolesti u bolesnika s povoljnom, intermedijarnom i nepovoljnom citogenetskom promjenom iznosi 43%, 34% i 9% ($p=0.05$). Vjeratnost relapsa bolesti iznosi 82% za bolesnike s nepovoljnom citogenetskom promjenom, 68% za bolesnike s intermedijarnom citogenetskom promjenom i 56% za bolesnike s povoljnim citogenetskim nalazom ($p=0.05$).

8. SUMMARY

The Value of chromosomal findings in treatment of acute myeloid leukemia

Sanja Davidović-Mrsić

2011

In our investigation 536 patients with de novo acute leukemia were included into prospective study. Median age was 36 years, ranged 16-60. The majority of patients have AML-M2 (31%) or AML-M6 subtype (3%) according to French-American-British classification. 14% patients have AML-M3 subtype. AML-M4 was observed in 75/536 (14%) and AML-M5 in 62/536 (12%) patients. In 3% patients AML-M6 was documented. Median WBC at diagnosis was $19 \times 10^9/l$, ranged $0.3-323 \times 10^9/l$. For chromosome analysis standard banding was done. According to the cytogenetic finding patients were classified in three prognostic groups. Patients with translocations t(8;21) or t(15;17), inversion inv(16) were classified as a good prognostic group, while patients with trisomy 8, patients with chromosome 3, 11q23 abnormalities and patients with changes of chromosome 5 and 7 were classified as a poor prognostic group. Other patients were classified as an intermediate prognostic group. Cytogenetic abnormalities were found in 363 (68%) patients. 22% patients were classified as a good prognostic group and 158 (30%) as a poor prognosis group. Complete remission was obtained in 76% of patients with good karyotype, in 70% patients with intermediate karyotype and only 45% in poor prognostic group ($P=0.001$). Five year probability of disease free survival for patients with good, intermediate and poor karyotype is 43%, 34% and 9% respectively ($P=0.05$). Probability of relapse for patients with poor karyotype is 82%, for intermediate karyotype 68% and for patients with good karyotype is 56% ($P=0.05$).

9. LITERATURA

1. Lichtman MA, Henderson ES. Acute myelogenous leukemia. In: Williams WJ, Beutler E, Erslev AJ, Lichtman MA, editors. Hematology 4th ed. New York: McGraw-Hill, 1990; 251.
2. Friedrich N. Ein neuer Fall von Leukaemia. Arch Pathol Anat 1857;12-37.
3. Epstein W. Ueber die acute Leukaemie. Dtsch Arch Klin Med 1889; 44-343.
4. Henderson ES, Lister TA, Greaves MF. History of leukemia. In: Henderson ES, Lister TA, Greaves MF, eds. Leukemia. Philadelphia: WB Saunders, 2002;1-7.
5. Virchow RLK. Wiesses Blut. N Notiz Geb Natur u Heilk 1845;36.
6. Virchow R. Wiesses Blut und Milztumoren. II. Med Z 1847;16.
7. Friedreich N. Ein neue Fall von Leukamie. Virchows Arch Pathol Anat 1857;12.
8. Bennett JM, Catovski D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick HR & Sultan C. Proposed revised criteria for classification of acute myeloid leukemia: A report from French-American-British co-operative group. Ann Intern Med 1985;103-620.
9. Bennett JM, Catovski D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick HR & Sultan C. Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukemia (AML-M0). Brit J Haematol 1991; 78-325.
10. Linet MS & Devesa S. Descriptive epidemiology of the leukemias. In: Henderson ES & Lister TA, editors. Leukemia 5th ed. Philadelphia, London, Toronto, Montreal, Sydney, Tokyo: W.B. Saunders Company, 1990;207.
11. Linet MS, Devesa SS. Epidemiology of leukemia: overview and patterns of occurrence. In: Henderson ES, Lister TA, Greaves MF, eds. Leukemia. Philadelphia: WB Saunders, 2002;131–151.
12. Deschler B, Lubbert M. Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology. Cancer 2006;107:2099–2107.
13. Pombo de Oliveira MS, Awad el Sed FGR, Foroni L, et al. Lymphoblastic leukemia in Siamese twins: evidence for identity. Lancet 1986; 2:969.

14. Snyder Al, Li FP, Henderson E, et al. Possible inherited leukemogenic factors in familial acute myelogenous leukemia. *Lancet* 1970; 1:730.
15. Miller RW. Relation between cancer and congenital defects: an epidemiologic evaluation. *JNCI* 1968;40:1079.
16. Cuzick J. Radiation-induced myelomatosis. *N. Engl J. Med* 1981; 304:204.
17. United Nations Scientific Committee on the Effect on Atomic Radiation. Sources, effects and risk of ionising radiation: 1988 report to the General Assembly, with annexes. New York: United Nations, 1988.
18. Rosner F & Gruenwald HW. Chemicals and leukemia. In: Henderson ES & Lister TA, editors. *Leukemia* 5th ed. Philadelphia, London, Toronto, Montreal, Sydney, Tokyo: W.B. Saunders Company, 1990;271.
19. Coleman CN. Secondary malignancy after treatment of Hodgkin's disease: an evolving picture. *J. Clin Oncol* 1986;4:821.
20. Wong-Staal F & Gallo RC. The family of human T-lymphotropic leukemia viruses: HTLV-1 as the cause of adult T-cell leukemia and HTLV-III as the cause of acquired immunodeficiency syndrome. *Blood* 1985;65:253.
21. Gallo RC & Wong-Staal F. Retroviruses as etiologic agents of some animal and human leukemias and lymphomas and as tools for elucidating the molecular mechanism of leukemogenesis. *Blood* 2983;60:545.
22. Fialkow PJ, Singer JW, Raskind WH, et al. Clonal development, stem-cell differentiation, and clinical remissions in acute nonlymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 1987;317:468.
23. Fearon ER, Burkoe PJ, Schiffer CA, et al. Differentiation of leukemia cells to polymorphonuclear leukocytes in patients with acute nonlymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 1986; 315:15.
24. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al., eds. *Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*. Lyon, France: IARC Press, 2001.
25. Ries LAG, Melbert D, Krapcho M, et al. SEER cancer statistics review, 1975–2004, National Cancer Institute. Bethesda, MD. http://seer.cancer.gov/csr/1975_2004, based on November 2006 SEER data submission, posted to the SEER Web site, 2007. 2006.

26. Kinlen LJ. Leukemia. In: Doll R, Fraumeni JF, Muir CS, eds. Trends in cancer incidence and mortality: cancer surveys 1994. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994;475–491.
27. Fourth International Workshop on Chromosomes in Leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 1984;11:249.
28. Second MIC Cooperative Study Group (1988) Morphologic, immunologic and cytogenetic (MIC) working classification of the acute myeloid leukaemias. Second MIC Cooperative Study Group. *British Journal of Haematology*, 68, 487–494.
29. Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* 2002;100:2292–2302.
30. Bennett, J.M., Catovsky, D., Daniel, M.T., Flandrin, G., Galton, D.A., Gralnick, H.R. & Sultan, C. (1976) Proposals for the classification of the acute leukaemias. French–American–British (FAB) co-operative group. *British Journal of Haematology*, 33, 451–458.
31. Yunis JJ, Bloomfield CD, Ensrud K. All patients with acute nonlymphocytic leukemia may have a chromosomal defect. *N Engl J Med* 1981;305:135–139.
32. ISCN (1995) Guidelines for Cancer Cytogenetics, Supplement to An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. (ed. by F.Mitelman). S. Karger, Basel.
33. ISCN (2005) An international system for human cytogenetic nomenclature. Basel, Switzerland: S Karger, 2004.
34. Yuan, Y., Zhou, L., Miyamoto, T., Iwasaki, H., Harakawa, N., Hetherington, C.J., Burel, S.A., Lagasse, E., Weissman, I.L., Akashi, K. & Zhang, D.E. (2001) AML1-ETO expression is directly involved in the development of acute myeloid leukemia in the presence of additional mutations. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 98, 10398–10403. Short Report
35. Arthur, D.C., Berger, R., Golomb, H.M., Swansbury, G.J., Reeves, B.R., Van den Alimena, G.B.H., Bloomfield, C.D., de la Chapelle, A. & Dewald,

- G.W. (1989) The clinical significance of karyotype in acute myelogenous leukemia. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 40, 203–216.
36. Berger R, Bernheim A, Ochoa-Noguera ME, Daniel MT, Valensi F, Sigaux F, Flandrin G, Boiron M: Prognostic significance of chromosomal abnormalities in acute nonlymphocytic leukemia: A study of 343 patients. *Cancer Genet Cytogenet* 1987;28:293.
 37. Samuels BL, Larson RA, Le Beau MM, Daly KM, Bitter MA, Vardiman JW, Baker CM, Rowley JD, Golomb HM: Specific chromosomal abnormalities in acute nonlymphocytic leukemia correlate with drug susceptibility in vivo. *Leukemia* 1988;2:79.
 38. Mrozek K, Heinonen K, de la Chapelle A, Bloomfield CD. Clinical significance of cytogenetics in acute myeloid leukemia. *Semin Oncol*. 1997;24:17-31.
 39. Misawa S, Hogge DE, Oguma N, Wiernik PH & Testa JR. Detection of clonal karyotypic abnormalities in most patients with acute nonlymphocytic leukemia examined using short-term culture techniques. *Cancer Genet Cytogenet* 1986; 22:239.
 40. Yunis JJ. Recurrent chromosomal defects are found in most patients with acute nonlymphocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 1984;11:125.
 41. Arthur D.C., Berger, R., Golomb, H.M., Swansbury, G.J., Reeves, B. R. Alimena, G., Van Den Berghe, H., Bloomfield, C.D., de la Chapelle, A., Dewald, G.W., Garson, O.M., Hagemeijer, A., Kaneko, Y., Mitelman, F., Pierre, R.V., Ruutu, T., Sakurai, M., Lawler, S.D. & Rowley, J.D.(1989) The clinical significance of karyotype in acute myelogenousleukemia. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 40, 203–216.
 42. Berger, R., Le Conait, M., Derre, J., Vecchione, D. & Jonveaux, P.(1991) Cytogenetic studies in acute promyelocytic leukaemia:a survey of secondary chromosomal abnormalities. *Genes,Chromosomes and Cancer*, 3, 332–337.
 43. Arthur DC, Berger R, Golomb HM, Swansbury GJ, Reeves BR, Alimena G, van den Berghe H, Bloomfield CD, de la Chapelle A, Dewald GW, Garson OM, Hagemeijer A, Kaneko Y, Mitelman F, Pierre RV, Ruutu T,

- Sakurai M, Lawler SD, Rowley JD: The clinical significance of karyotype in acute myelogenous leukemia. Sixth International Workshop on Chromosomes in Leukemia (1987). *Cancer Genet Cytogenet* 1989; 40:203.
44. Fenaux P, Preudhomme C, Lai JL, Morel P, Beuscart R, Bauters F: Cytogenetics and their prognostic significance in acute myeloid leukaemia: A report on 283 cases. *Br J Haematol* 1989;73:61.
 45. Marosi C, Koeller U, Koller-Weber E, Schwarzinger I, Schneider B, Jaeger U, Vahls P, Nowotny H, Pirc-Danoewinata H, Steger G, Kreiner G, Wagner B, Lechner K, Lutz D, Bettelheim P, Haas OA: Prognostic impact of karyotype and immunologic phenotype in 125 adult patients with de novo AML. *Cancer Genet Cytogenet* 1992;61:14.
 46. Fourth International Workshop on Chromosomes in Leukemia, 1982: Translocation (8;21)(q22;q22) in acute nonlymphocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 1984; 1:284.
 47. Groupe Francais de Cytogenetique Hematologique: Acute myelogenous leukemia with an 8;21 translocation. A report on 148 cases from the Groupe Francais de Cytogenetique Hematologique. *Cancer Genet Cytogenet* 1990;44: 169.
 48. Grignani F, Fragioli M, Alcalay M, Longo L, Pandolfi PP, Donti E, Biondi A, Lo Coco F, Grigani & Pelicci PG. Acute promyelocytic leukemia: from genetics to treatment. *Blood* 1994; 83:10.
 49. Nemet D, Grahovac B, Labar B, et al. Molecular monitoring of minimal residual disease in acute promyelocytic leukaemia by polymerase chain reaction assay for the PML/RAR α (retinoic acid receptor- α) fusion transcript in patients treated with all-trans retinoic acid followed by chemotherapy. *Haematologica* 1995;80:238.
 50. Grimwade D, Walker H, Oliver F, et al. The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. *Blood*. 1998;92:2322-2333.
 51. Frohling S, Skulin S, Liebisch C, et al. Comparison of cytogenetic and molecular cytogenetic detection of chromosome abnormalities in 240

- consecutive adult patients with acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol.* 2002;20:2480-2485.
52. Caligiuri, M. A., Schichman, S. A., Strout, M. P., Mrozek, K., Baer, M. R., Frankel, S. R., Barcos, M., Herzog, G. P., Croce, C. M., and Bloomfield, C. D. Molecular rearrangement of the ALL-i gene in acute myeloid leukemia without cytogenetic evidence of 11q23 chromosomal translocations. *Cancer Res.*, 1994;54: 370-373.
53. Poirel, H., Rack, K., Delabesse, E., Redford-Weiss, I., Troussard, X., Debert, C., LebOeuf, D., Bastard, C., Picard, F., Veil-Buzyn, A., Flandrin, G., Bernard, O., and Macintyre, E. Incidence and characterization of MU gene (11q23) rearrangements in acute myeloid leukemia M1 and M5. *Blood*, 1996; 87: 2496-2505.
54. Yu, M., Honoki, K., Andersen, J., Paietta, E., Nam, D. K., and Yunis, J. J. MU tandem duplication and multiple splicing in adult acute myeloid leukemia with normal karyotype. *Leukemia (Baltimore)*, 1996;10: 774-780.
55. Swansbury GJ, Lawler SD, Alimena G, Arthur D, Berger R, van den Berghe H, Bloomfield CD, de la Chapelle A, Dewald G, Garson OM, Hagemeijer A, Mitelman F, Rowley JD, Sakurai M: Long-term survival in acute myelogenous leukemia: A second follow-up of the Fourth International Workshop on Chromosomes in Leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 1994;73:1.
56. Bernstein R, Pinto MR, Behr A & Mendelow B. Chromosome 3 abnormalities in acute nonlymphocytic leukemia (ANLL) with abnormal thrombopoiesis: Report of three patients with a "new" inversion anomaly and a further case of homologous translocation, *Blood* 1982;60:652.
57. Fenaux P, Preudhomme C, Lai JL, Morel P, Beuscart R, Bauters F: Cytogenetics and their prognostic significance in acute myeloid leukaemia: A report on 283 cases. *Br J Haematol* 1989;73:61.
58. Grimwade D, Walker H, Harrison G, et al. The predictive value of hierarchical cytogenetic classification in older adults with acute myeloid leukemia (AML): analysis of 1065 patients entered into the United

- Kingdom Medical Research Council AML11 trial. *Blood*. 2001;98:1312-1320.
59. Schoch C, Kern W, Schnittger S, Buchner T, Hiddemann W, Haferlach T. The influence of age on prognosis of de novo acute myeloid leukemia differs according to cytogenetic subgroups. *Haematologica*. 2004;89:1082-1090.
 60. Mrozek K, Heerema NA, Bloomfield CD. Cytogenetics in acute leukemia. *Blood Rev*. 2004;18:115-136.
 61. Slovak ML, Kopecky KJ, Cassileth PA, et al. Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group Study. *Blood*. 2000;96:4075-4083.
 62. Farag SS, Archer KJ, Mrozek K, et al. Pretreatment cytogenetics add to other prognostic factors predicting complete remission and long-term outcome in patients 60 years of age or older with acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B 8461. *Blood*. 2006;108:63-73.
 63. Frohling S, Kayser S, Mayer C, et al. Diagnostic value of fluorescence in situ hybridization for the detection of genomic aberrations in older patients with acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2005;90:194-199.
 64. Cheson BD, Bennett JM, Kopecky KJ, et al. Revised recommendations of the International Working Group for Diagnosis, Standardization of Response Criteria, Treatment Outcomes, and Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol*. 2003;21:4642-4649.
 65. Labar, B., Hauptman, E.(ur.).2007. Hematologija, 2.izdanje, Školska knjiga, Zagreb
 66. Knuutila S, Vuopio P, Elonen E, et al. Culture of bone marrow reveals more cells with chromosomal abnormalities than the direct method in patients with hematologic disorders. *Blood* 1981;58:369-375.
 67. Keinanen M, Knuutila S, Bloomfield CD, et al. The proportion of mitoses in different cell lineages changes during short-term culture of normal human bone marrow. *Blood* 1986;67:1240-1243.

68. Keinanen M, Knuutila S, Bloomfield CD, et al. Bone marrow cytogenetics: the lineage of dividing cells changes during the first few hours in culture. *Leukemia* 1987;1:32–37.
69. Yunis, J.J. (1976) High resolution of human chromosomes. *Science*, 191, 1268–1270.
70. Speicher MR, Gwyn Ballard S, Ward DC. Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nat Genet* 1996;12:368–375.
71. Schrock E, du Manoir S, Veldman T, et al. Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science* 1996;273:494–497.
72. Shi G, Weh HJ and Hossfeld DK. Identification of some marker chromosomes in acute leukaemia by fluorescence in situ hybridisation. *Hematol Oncol* 1993;11:81.
73. Kaplan GL & Meier P. Non-parametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 1998;53:457.
74. Benedetti J, Yuen K, Young L. Life tables and survivor functions. In: Dixon WJ, editor. *BMDP Statistical Software Manual, Volume 2*. Berkeley: University of California Press, 1990;739.
75. Cox R. Regression models and life tables. *J R Stat Soc* 1972;34:187.
76. Levan A. Chromosomal studies on some human tumors and tissues of normal origin, growth in vivo and in vitro at the Sloan Kettering Institute. *Cancer* 1956;9:648.
77. First International Workshop on Chromosomes in Leukaemia. Chromosomes in acute non-lymphoblastic leukemia. *Brit J Haematol* 1978;39:305.
78. Shi G, Weh HJ and Hossfeld DK. Identification of some marker chromosomes in acute leukaemia by fluorescence in situ hybridisation. *Hematol Oncol* 1993;11:81.
79. Heim S & Mittelman F. *Cancer cytogenetics*. New York: Alan R Liss, 1987.

80. Mitelman F. Catalog of Chromosome Aberrations in Cancer. Fifth edition. New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore: Wiley Liss, 1994.
81. Dastugue N, Payen C, Lafage-Pochitaloff M, Bernard P, Lerous D, Huguet-Rigal F, Stoppa A-M, Marit G, Molina L, Michallet M, Maraninchi D, Attal M, Reiffers J: Prognostic significance of karyotype in de novo adult myeloid leukemia. Leukemia 1995;9:1491.
82. Bloomfield CD, Shuma C, Regal L, Philip PP, Hossfeld DK, Hagemeijer AM, Garson OM, Peterson BA, Sakurai M, Alimena G, Berger R, Rowley JD, Ruutu T, Mitelman F, Dewald GW, Swansbury J: Long-term survival of patients with acute myeloid leukemia. A third follow-up of the Fourth International Workshop on Chromosomes in Leukemia. Cancer 1997;80:2191.
83. Hiorns LR, Swansbury GJ, Mehta J, Min T, Dainton MG, Treleaven J, Powles RL, Catovsky D: Additional chromosome abnormalities confer worse prognosis in acute promyelocytic leukaemia. Br J Haematol 1997;96:314.
84. Schoch C, Haase D, Haferlach T, Freund M, Link H, Lengfelder E, Löffler H, Buchner T, Fonatsch C: Incidence and implication of additional chromosome aberrations in acute promyelocytic leukaemia with translocation t(15;17)(q22;q21): A report on 50 patients. Br J Haematol 1996;94:493.
85. Langabeer SE, Grimwade D, Walker H, Rogers JR, Burnett AK, Goldstone AH, Linch DC: A study to determine whether trisomy 8, deleted 9q and trisomy 22 are markers of cryptic rearrangements of *PML/RAR α* , *AML1/ETO* and *CBFB/MYH11* respectively in acute myeloid leukaemia. Br J Haematol 1998;101:338.
86. UKCG (United Kingdom Cancer Cytogenetics Group). Primary, single, autosomal trisomies associated with haematological disorders. Leukemia Res 1992;16:841.

87. Mrozek K, Heinonen K, de la Chapelle A, Bloomfield CD. Clinical significance of cytogenetics in acute myeloid leukemia. *Semin Oncol.* 1997;24: 17-31.
88. Rodegheiro F, Avvisati G, Castman G et al. Early deaths and anti-hemorrhagic treatment in acute promyelocytic leukemia: a GIMEMA retrospective study in 268 consecutive cases. *Blood* 1990;75:2112.
89. Kwong YL, Ching LM, Liu HW et al. 8;21 translocation and multilineage involvement. *Am J Hematol* 1993;43:212.
90. GFCH (Groupe Francais de Cytogenetique Hematologique) Acute myelogenous leukemia with an 8;21 translocation. A report on 148 cases from Groupe Francais de Cytogenetique Hematologique. *Cancer Genet Cytogenet* 1990;44:169.
91. Fourth International Workshop on Chromosomes in Leukemia, 1982: Translocation (8;21)(q22;q22) in acute nonlymphocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 1984; 1:284.
92. Shimizu K, Ichikawa H, Miyoshi H, Ohki M, Kobayashi H, Maseki N, Kaneko Y: Molecular assignment of a translocation breakpoint in acute myeloid leukemia with t(8;21). *Genes Chromosomes Cancer* 1991;3: 163.
93. Fröhling S, Scholl C, Gilliland DG, Levine RL. Genetics of myeloid malignancies—pathogenetic and clinical implications. *J Clin Oncol.* 2005;23:6285-6295.
94. Mrózek K, Heerema NA, Bloomfield CD. Cytogenetics in acute leukemia. *Blood Rev.* 2004;18:115-136.
95. Estey E, Döhner H. Acute myeloid leukaemia. *Lancet*. 2006;368.
96. Grimwade D, Howe K, Langabeer S, Davies L, Oliver F, Walker H, Swirsky D, Wheatley K, Goldstone A, Burnett A, Solomon E: Establishing the presence of the t(15;17) in suspected acute promyelocytic leukaemia: Cytogenetic, molecular and PML immunofluorescence assessment of patients entered into the M.R.C. ATRA trial. *Br J Haematol* 1996;94:557.
97. Berger R, Le Coniat M, Derre J, et al. Cytogenetic studies in acute promyelocytic leukemia: A survey of secondary chromosomal abnormalities. *Genes Chrom Cancer* 1991;3:332.

98. Hanson CA, Abaya M, Sheldon S at al. Acute byphenotypic leukaemia: immunophenotypic and cytogenetic analysis. *Br J Haematol* 1993;84:49.
99. Hast R, Stenke L, Broendum-Nielsen K & Oest A. Acute myelomonocytic leukemia (M4) and t(15;17)(q24;q21). A diagnostic dilemma. *Cancer Genet Cytogenet*. 1993;70:79.
100. Grimwade D. Impact of cytogenetics on clinical outcome in AML. In: Karp JE, ed. *Acute Myelogenous Leukemia*. Totowa, New Jersey: Humana Press; 2007:177-192.
101. Rowe JM. Optimal induction and post-remission therapy for AML in first remission. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2009;396-405.
102. Arthur DC & Bloomfield CD. Partial deletion of the long arm of chromosome 16 and bone marrow eosinophilia in acute nonlymphocytic leukemia: A new translocation. *Blood* 1983;61:994.
103. Campbell LJ, Challis J, Fok T & Garson OM. Chromosome 16 abnormalities associated with myeloid malignancies. *Genes Chrom Cancer* 1991;3:55.
104. Le Beau MM, Larson RA, Bitter MA, Vardiman JW, Golomb HM, Rowley JD. Association of an inversion of chromosome 16 with abnormal marrow eosinophils in acute myelomonocytic leukemia. A unique cytogenetic-clinopathological association. *N Engl J Med*. 1983;309:630-636.
105. Poirel, H., Rack, K., Delabesse, E., Redford-Weiss, I., Troussard, X., Debert, C., LebOeuf, D., Bastard, C., Picard, F., Veil-Buzyn, A., Flandrin, G., Bernard, O., and Macintyre, E. Incidence and characterization of MU gene (11q23) rearrangements in acute myeloid leukemia M1 and M5. *Blood*, 1996;87: 2496:2505.
106. Cortes J, O'Brien S, Kantarjian H, Cork A, Stass S, Freireich EJ, Keating M, Pierce S & Estey E. Abnormalities in the long arm of chromosome 11 (11q) in patients with de novo and secondary acute myelogenous leukemias and myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 1994;8(12):2174-8.
107. Recio M, Bureo E, Conde E, et al. Leucemia aguda no linfóide (LANL) con diferenciación basofílica y t(6;9). *Sangre* 1991;36:509.

108. Cuneo A, Kerim S, Vandenberghe E, et al. Translocation t(6;9) occurring in acute myelofibrosis, myelodysplastic syndrome and acute onlymphocytic leukemia suggests multipotent stem cell involvement. *Cancer Genet Cytogenet* 1989;42:209.
109. Secker-Walker LM, Mehta A, Bain B: Abnormalities of 3q21 and 3q26 in myeloid malignancy: A United Kingdom Cancer Cytogenetic Group study. *Br J Haematol* 1995;91:490.
110. Buchner T & Heinecke A. The role of prognostic factors in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1996; 1 Suppl 10:S28.
111. Ghaddar HM. Pierce S. Reed P & Estey EH. Prognostic value of residual normal metaphases in acute myelogenous leukemia patients presenting with abnormal karyotype. *Leukemia* 1995; 9(5):779-82.
112. Dupriez B. Morel P. Demory JL. Lai JL. Simon M. Plantier I & Bauters F. Prognostic factors in agnogenic myeloid metaplasia: a report on 195 cases with a new scoring system. *Blood* 1996; 88(3):1013-8.
113. Dastugue N. Payen C. Lafage-Pochitaloff M. Bernard P. Leroux D. Huguet-Rigal F. Stoppa AM. Marit G. Molina L. Michallet M, et al. Prognostic significance of karyotype in de novo adult acute myeloid leukemia. The BGMT group. *Leukemia* 1995;9(9):1491-8.
114. Swansbury GJ. Lawler SD. Alimena G. Arthur D. Berger R. Van den Berghe H. Bloomfield CD. de la Chappelle A. Dewald G. Garson OM, et al. Long-term survival in acute myelogenous leukemia: a second follow-up of the Fourth International Workshop on Chromosomes in Leukemia. *Cancer Genetics & Cytogenetics* 1994;73(1):1-7.
115. Baer MR & Bloomfield CD. Cytogenetics and oncogenes in leukemia. *Current opinion in oncology* 1992;4:24
116. Heim S & Mitelman F. Cytogenetic analysis in the diagnosis of acute leukemia. *Cancer* 1992;70:1701
117. Slovak ML. Kopecky KJ. Wolman SR. Henslee-Downey JP. Appelbaum FR. Forman SJ & Blume KG. Cytogenetic correlation with disease status and treatment outcome in advanced stage leukemia post bone marrow

transplantation: a Southwest Oncology Group study (SWOG-8612). Leuk Res 1995;19(6):381-8.

10. ŽIVOTOPIS

Sanja Davidović-Mrsić

Rođena sam 11.06.1963 u Karlovcu, osnovnu i srednju školu završila sam u Zagrebu. Diplomirala sam na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu 1989. godine. Kao student bila sam demonstrator na Zavodu za anatomiju i na Zavodu za histologiju Medicinskog fakulteta u Zagrebu. 1987. primila sam nagradu rektora Sveučilišta u Zagrebu za najbolji studenski znanstveni rad.

Po završetku studija boravila sam u SAD, Medical College of Wisconsin, Milwaukee, USA. Nakon obaveznog staža u primarnoj praksi, volontira sam (4 godine) na KBC Zagreb u laboratoriju, kao stipendist slovenske vlade boravila sam u vodećim citogenetskim laboratorijima u svijetu, postala sam znanstveni novak na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Završila sam dva poslijediplomska studija - Poslijediplomski studij iz "Medicinske genetike" i Poslijediplomski studij iz "Onkologije". Godine 1996. započela osnivati Laboratorij za imunocitogenetiku pri Kliničkom Zavodu za Laboratorijsku dijagnostiku koji postaje dio Referentnog centra za kliničko-laboratorijsku dijagnostiku hematoloških bolesti Ministarstva zdrastva RH. Godine 1998. postajem magistar medicinskih znanosti, a 2002. polažem specijalistički ispit iz transfuzijske medicine. Godine 2004. Godine 2005. prijavljujem i branim temu doktorata –Značaj citogenetičkih promjena u akutnih leukemija. Sudjelujem u dodiplomskoj i poslijediplomskoj nastavi pri Medicinskom, Prirodoslovno matematičkom fakultetu i Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu u Zagrebu. Kao dopredsjednik Hrvatskog društva za humanu genetiku organizirala sam i održala veći broj tečajeva trajne edukacije iz područja kojim se bavim. Napisala sam i objavila zajedno sa suradnicima veći broj znanstvenih radova, priručnika, udžbenika te poglavlja u knjigama. Član sam većeg broja stručnih društava u zemlji i inozemstvu. Suradnik sam na više znanstvenih projekata. 2008. pokrećem zajedno s suradnicima u laboratoriju postupak za akreditaciju laboratorija pri Cytogenetic European Quality Assessment. Kabinet za imunocitogenetiku kojeg vodim jedini je takvog tipa u RH i koristi se kao centar za nastavu i edukaciju iz područja molekularne citogenetike.