



Središnja medicinska knjižnica

Ries, Sunčica (2014) *Morfološke i citogenetičke promjene, razina ekspresije WT1 te duplikacija gena FLT3 u novootkrivenim akutnim mijeloičnim leukemijama sa znacima mijelodisplazije [Morphologic and cytogenetic alterations, level of WT1 expression, and duplication of FLT3 gene in de novo acute myeloid leukaemia with myelodysplasia-related changes].* Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.

<http://medlib.mef.hr/2103>

University of Zagreb Medical School Repository

<http://medlib.mef.hr/>

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Sunčica Ries

Morfološke i citogenetičke promjene, razina ekspresije *WT1* te duplikacija gena *FLT3* u novootkrivenim akutnim mijeloičnim leukemijama sa znacima mijelodisplazije

DISERTACIJA

Zagreb, 2014.

Disertacija je izrađena u Kliničkoj jedinici za specijalnu i molekularnu hematologiju Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku; Kliničkoj jedinici za citogenetiku i FISH dijagnostiku hemato-onkoloških bolesti Klinike za pedijatriju te na Zavodu za patologiju i citologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb.

Voditelj rada: prof.dr.sc. Renata Zadro

Najljepše zahvaljujem mentoru prof.dr.sc. Renati Zadro na savjetima i vodstvu pri izradi rada.

Zahvaljujem svojim kolegama i prijateljima koji su nesebično pomogli u nastanku ovog rada: Koraljki, Ivani, Sanji, Mirni, Margareti, Tajani, Nadiri, Goranu i Igoru.

SADRŽAJ

POPIS OZNAKA I KRATICA

1. UVOD	1
1.1. Obilježja akutnih leukemija	1
1.1.1. Povijest	1
1.1.2. Definicija i klasifikacije	1
1.1.2.1. Podjela akutnih mijeloičnih leukemija	2
1.1.2.2. Podjela akutnih mijeloičnih leukemija prema SZO	2
1.1.2.3. Podjela akutnih mijeloičnih leukemija s promjenama povezanim s mijelodisplazijom	3
1.1.3. Morfološka dijagnoza akutnih mijeloičnih leukemija	3
1.1.3.1. Morfološka dijagnoza akutnih mijeloičnih leukemija s promjenama povezanim s mijelodisplazijom	4
1.2. Citogenetičke promjene kod akutnih mijeloičnih leukemija	4
1.2.1. Citogenetičke promjene kod akutnih mijeloičnih leukemija s promjenama povezanim s mijelodisplazijom	5
1.3. Molekularne promjene kod akutnih mijeloičnih leukemija	5
1.3.1. Molekularne promjene kod akutnih mijeloičnih leukemija s promjenama povezanim s mijelodisplazijom	6
1.4. Gen <i>FLT3</i>	6
1.5. Gen Wilmsovog tumora (<i>WT1</i>)	8
2. TEMELJNE PRETPOSTAVKE RADA I HIPOTEZA	10
2.1. Temeljne pretpostavke rada	10
2.2. Hipoteza	10
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	11
4. ISPITANICI, MATERIJALI I METODE RADA	12
4.1. Ispitanici	12
4.1.2. Klinički i laboratorijski parametri	12
4.2. Materijali i metode rada	12
4.2.1. Morfološka (citološka) analiza uzoraka	12
4.2.2. Citokemijsko određivanje mijeloperoksidaza pozitivnih blasta	17
4.2.3. Citogenetička analiza uzoraka	18
4.2.3.1. Klasična citogenetika	18

4.2.3.2. Fluorescencijska <i>in situ</i> hibridizacija	18
4.2.4. Molekularne analize uzoraka	19
4.2.4.1. Metoda izolacije RNA i postupaka reverzne transkripcije	19
4.2.4.2. Analiza ekspresije <i>WT1</i> gena	20
4.2.4.3. Dokazivanje mutacije <i>FLT3-ITD</i>	22
4.3. Statistička obrada podataka	24
5. REZULTATI	25
5.1. Značajke ispitanika	25
5.2. Morfološki kriterij bodovanja displastičnih promjena na stanicama u bolesnika s novootkrivenim AML sa znacima mijelodisplazije	26
5.3. Promjene kariotipa u bolesnika s novootkrivenim AML sa znacima mijelodisplazije	30
5.3.1. Povezanost izražaja morfoloških promjena na stanicama sa citogenetičkim promjenama	32
5.4. Razina ekspresije <i>WT1</i> gena	33
5.4.1. Analiza povezanosti izražaja morfoloških promjena na stanicama s ekspresijom <i>WT1</i> gena	33
5.5. Učestalost mutacije <i>FLT3-ITD</i>	34
5.5.1. Analiza povezanosti izražaja morfoloških promjena na stanicama s mutacijom <i>FLT3-ITD</i>	35
5.6. Analiza povezanosti ekspresije <i>WT1</i> gena s citogenetičkim promjenama	36
5.7. Analiza povezanosti mutacije <i>FLT3-ITD</i> s citogenetičkim promjenama	37
5.8. Analiza povezanosti mutacije <i>FLT3-ITD</i> s ekspresijom <i>WT1</i> gena	38
6. RASPRAVA	39
6.1. Osvrt na kriterije odabira bolesnika i njihove biološke značajke	39
6.2. Osvrt na kriterij bodovanja morfoloških promjena stanica u novootkrivenim akutnim leukemijama sa znacima mijelodisplazije	40

6.3.	Povezanost morfoloških promjena na stanicama sa citogenetičkim promjenama	41
6.4.	Povezanost ekspresije WT1 gena s morfološkim i citogenetičkim promjenama	42
6.5.	Povezanost <i>FLT3</i> -ITD mutacije s morfološkim i citogenetičkim promjenama	43
6.6.	Povezanost mutacije <i>FLT3</i> -ITD s ekspresijom <i>WT1</i> gena	44
7.	ZAKLJUČCI	45
8.	SAŽETAK	46
9.	SUMMARY	47
10.	LITERATURA	48
11.	ŽIVOTOPIS	58

Popis oznaka i kratica

ABL	abelson kinaza, kontrolni gen za lančane reakcije polimerazom
AKT	engl. serine/threonine-specific protein kinase
ALL	akutne limfoblastične leukemije
AML	akutne mijeloične leukemije
AML-MRC	engl. acute myeloid leukaemia with myelodysplasia-related changes
<i>CBFB</i>	gen engl. core-binding factor, beta subunit
CBL	engl. E3 ubiquitin-protein ligase CBL
CD	engl. cluster of differentiation
cDNA	engl. complementary DNA
DNA	engl. deoxyribonucleic acid
ELN	engl. European LeukemiaNet
FAB	francusko-američko-britanska klasifikacija akutnih leukemija
FISH	fluorescencijska <i>in situ</i> hibridizacija
FL	ligand za FLT3
<i>FLK-2</i>	gen engl. fetal liver kinase 2
<i>FLT3</i>	gen engl. fms-like tyrosine kinase 3
GAB1	engl. GRB2-associated-binding protein 1
GAB2	engl. GRB2-associated-binding protein 2
GTG	Giemsa-Tripsin-Giemsa
I-FISH	FISH na interfaznim jezgrama
ISCN	engl. international system for human cytogenetics
ITD	engl. internal tandem duplications, unutarnja tandemska duplikacija
L1-L3	podtipovi akutnih limfoblastičnih leukemija
MAPK	engl. mitogen-activated protein kinases
MGG	May-Grünwald Giemsa
<i>MLL</i>	gen engl. myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, <i>Drosophila</i>)
<i>MLLT3</i>	gen. engl. myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, <i>Drosophila</i>); translocated to, 3
MPO	mijeloperoksidaza
mRNA	engl. messenger ribonucleic acid
<i>MYH11</i>	gen engl. myosin, heavy chain 11, smooth muscle

M0-M7	podtipovi akutnih mijeloičnih leukemija
<i>NPM1</i>	gen engl. nucleophosmin
PCR	engl. polymerase chain reaction
P13K	engl. phosphatidylinositide 3-kinases
<i>PML</i>	gen engl.promyelocytic leukemia
RAEB-t	engl. refractory anemia with excess blasts in transformation
<i>RARA</i>	gen. engl. retinoic acid receptor alpha
RAS	engl. rat sarcoma signaling
RNA-ze	enzimi koji cijepaju RNA
<i>RUNX1</i>	gen engl. runt-related transcription factor 1
<i>RUNX1T1</i>	gen engl. runt-related transcription factor 1; translocated to, 1 (cyclin D-related)
SHIP	engl. signaling inositol polyphosphate-5-phosphatase
STAT5	engl. signal transducer and activator of transcription
<i>STK-1</i>	engl. stem cell tyrosine kinase 1
SZO	Svjetska zdravstvena organizacija
TLD	engl. trilineage dysplasia
wt	engl. wild type
<i>WT1</i>	gen Wilmsovog tumora

1. UVOD

1.1. Obilježja akutnih mijeloičnih leukemija

1.1.1. Povijest

Njemački patolog Rudolf Virchow je sredinom devetnaestog stoljeća opisao bolest s abnormalno povećanim brojem bijelih krvnih stanica i prvi je nazvao "leukämie" (grčki: bijela krv). Virchow je zaključio da je za razliku od leukocitoze, leukemija zasebni patološki entitet i svojim je istraživanjima postavio temelje za današnje razumijevanje bolesti.^{1,2} Do svojih zaključaka došao je četiri godine prije britanskog patologa John Hughes Bennetta koji je opisao i objavio slučajeve pacijenata koji su preminuli povećanih slezena, s promijenjenom bojom i gustoćom krvi. Opisano stanje nazvao je "leucocythemia".³ Prema Gunzu⁴ francuski liječnik Alfred Armand Louis Marie Velpeau je 1827. godine prvi objavio opis pacijenta s kliničkom slikom leukemije.

Razvoj tehnike bojenja krvnog razmaza omogućio je razlikovanje normalnih od abnormalnih bijelih krvnih stanica.⁵ Friedrich Mosler je 1876. godine prvi opisao tehniku punkcije koštane srži⁶, a 1900. godine Otto Naegeli opisuje mijeloblaste i limfoblaste.⁷ Poslije toga otkrića dolazi do podjele leukemija na akutnu mijeloičnu i akutnu limfoblastičnu leukemiju.^{5,8}

Razvojem medicinske znanosti u dvadesetom stoljeću mijenjaju se saznanja o dijagnostici, epidemiologiji i terapiji akutnih leukemija, što dovodi do promjena klasifikacija akutnih leukemija. Osamdesetih godina prošlog stoljeća podjela akutnih leukemija koju je predložila grupa od sedam francuskih, američkih i britanskih hematologa i citopatologa temeljila se na konvencionalnim morfološkim i citokemijskim metodama. Tako je nastala francusko-američko-britanska (FAB) klasifikacija akutnih leukemija, koja je dijelila akutne mijeloične leukemije (AML) na sedam podtipova (M0-M7) i akutne limfoblastične leukemije (ALL) na tri podtipa (L1-L3).^{9,10}

1.1.2. Definicija i klasifikacije

Akutne mijeloične leukemije su zloćudne klonalne bolesti krvotvorne matične stanice. Poremećaji koji nastaju u genomu matične stanice rezultiraju njezinom zloćudnom pretvorbom, nekontroliranom proliferacijom, što rezultira stvaranjem klona leukemijskih

stanica. Leukemijske stanice nemaju sposobnost normalnog sazrijevanja, a zloćudni klon potiskuje zdrave stanice u koštanoj srži.¹¹ Akutne mijeloične leukemije razlikuju se po citomorfološkim, imunofenotipskim, molekularnim karakteristikama i kliničkom tijeku bolesti.¹²

1.1.2.1. Podjela akutnih mijeloičnih leukemija

Grupa francuskih, američkih i britanskih hematologa i citopatologa je 1976. godine predložila, a 1985. godine dopunila FAB podjelu akutnih leukemija.^{9,10} FAB klasifikacija obuhvaća morfološku raznolikost AML koje se dijele na sedam podtipova (M0-M7). Postoje poteškoće u postavljanju citomorfološke dijagnoze između pojedinih podtipova AML (AML-M2 vs. AML-M4 ili AML-M4 vs. AML-M5). AML-M3 i AML-M4eo imaju karakteristične morfološke slike koje se povezuju s određenim citogenetičkim promjenama poput t(15;17) i/ili inv (16) ili t(16;16).¹³ Ostali podtipovi ne pokazuju jaku poveznost morfologije i citogenetičkih promjena. Razvojem citogenetičkih i molekularnih metoda te usavršavanjem imunofenotipizacije znatno se poboljšalo razumijevanje biologije AML. Stoga je Svjetska zdravstvena organizacija (SZO) uvela multidisciplinarnan pristup dijagnozi i podjeli akutnih leukemija koji se razlikuje od FAB klasifikacije akutnih leukemija.¹⁴

1.1.2.2. Podjela akutnih mijeloičnih leukemija prema SZO

Akutne mijeloične leukemije prema podjeli Svjetske zdravstvene organizacije iz 2008. godine¹⁴ svrstavaju se u nekoliko glavnih skupina:

1. AML s karakterističnim genetičkim promjenama
2. AML s promjenama povezanim s mijelodisplazijom
3. AML povezane s terapijom
4. AML koje nisu drugdje uvrštene
5. mijeloidni sarkom
6. mijeloidne proliferacije povezane s Downovim sindromom
7. blastična plazmacitoidna neoplazma dendritičkih stanica

Prema toj podjeli, entitet refraktorne anemije s viškom blasta u transformaciji, engl. refractory anemia with excess blasts in transformation (RAEB-t) iz FAB klasifikacije, svrstan

je u novu skupinu akutnih mijeloičnih leukemija s promjenama povezanim s mijelodisplazijom kao novoprepoznati podtip.^{14,15,16}

1.1.2.3. Podjela akutnih mijeloičnih leukemija s promjenama povezanim s mijelodisplazijom

Akutne mijeloične leukemije s promjenama povezanim s mijelodisplazijom prema SZO obuhvaćaju:

1. AML nastale iz prethodne mijelodisplazije ili mijelodisplazije/mijeloproliferacije
2. AML s citogenetičkim promjenama karakterističnim za mijelodisplazije
3. AML s višelinijskom displazijom (novootkrivene AML sa znacima mijelodisplazije)

Novootkrivene AML sa znacima mijelodisplazije koje imaju samo morfološke promjene na stanicama i normalan nalaz citogenetike nisu još dovoljno istražene.¹⁶

1.1.3. Morfološka dijagnoza akutnih mijeloičnih leukemija

Citomorfološka analiza je već godinama prvi korak u postavljanju dijagnoze akutnih leukemija. Prema FAB klasifikaciji koja je korištena posljednja tri desetljeća, citomorfološki kriterij za postavljanje dijagnoze akutne leukemije bio je minimalno 30% blasta na ukupan broj svih stanica s jezgrom u koštanoj srži dok se tip akutne leukemije određivao, kao i danas, pomoću citomorfoloških i citokemijskih značajki leukemijskih stanica.¹⁰

SZO je 2001. godine promijenila osnovni kriterij za dijagnozu akutne leukemije, od tada je za postavljanje citomorfološke dijagnoze AML potrebno zadovoljiti kriterij od minimalno 20% mijeloblasta i/ili monoblasta/promonocita i/ili megakarioblasta u koštanoj srži.¹⁷ Morfološka dijagnoza akutne eritroidne leukemije nešto je zahtjevnija jer postoje dva podtipa: a) eritroidna/mijeloična leukemija gdje eritroidni prekursori čine 50% i više stanica koštane srži, a broj mijeloblasta iznosi 20% na ne-eritroidnu lozu i b) čista eritroidna leukemija gdje nezrele stanice eritroidne loze čine 80% svih stanica s jezgrom u koštanoj srži.¹⁸ U akutnim mijeloičnim leukemijama s karakterističnim genetičkim promjenama udio blasta može biti i manji od 20%.^{14,15}

Današnjim multidisciplinarnim pristupom postavljanju dijagnoze, AML je određena nalazima morfoloških, imunoloških, citogenetičkih i molekularnih analiza te ima tipičnu sliku i prognozu. Citomorfološka i citokemijska analiza koštane srži i dalje ostaje osnovna metoda za postavljanje dijagnoze akutne mijeloične leukemije, posebno skupine AML koje nisu drugačije klasificirane.

1.1.3.1. Morfološka dijagnoza akutnih mijeloičnih leukemija s promjenama povezanim s mijelodisplazijom

Novootkrivene AML sa znacima mijelodisplazije su podgrupa AML s promjenama povezanim s mijelodisplazijom, čija se dijagnoza postavlja na osnovu citomorfoloških kriterija. To su akutne leukemije s minimalno 20% blasta u koštanoj srži i/ili perifernoj krvi i morfološkim znacima displazije na dvije ili više staničnih loza u koštanoj srži. Displastične promjene moraju biti prisutne na minimalno 50% stanica pojedine loze.¹⁶ Disgranulocitopoezu karakterizira hipogranuliranost, pseudo Pelger-Huët anomalija i bizarno lobulirane jezgre; diseritrocitopoezu megaloplastoidni oblici, eritroblasti s dvije i više jezgara, pupanje jezgara i fragmenti jezgara; distrombocitopoezu obilježavaju mikromegakariociti, megakariociti s jednom velikom jezgrom (hipolobulirani) te megakariociti brojnijih odvojenih jezgara.^{19,20}

1.2. Citogenetičke promjene kod akutnih mijeloičnih leukemija

Kariotip AML koji je utvrđen kod postavljanja dijagnoze važan je za praćenje i prognozu bolesti. Citogenetičke promjene se nalaze u oko 50% odraslih bolesnika s AML, dok ostali imaju uredan kariotip. Promjene mogu zahvatiti samo jedan ili više kromosoma, a s obzirom na prognostičko značenje klasificirane su kao povoljne, intermedijarne i nepovoljne.^{21,22,23}

AML s balansiranom translokacijom $t(8;21)(q22;q22);RUNX1-RUNX1T1$ ^{24,25} koja pokazuje sazrijevanje u neutrofilnoj lozi, akutna promijelocitna leukemija s $t(15;17)(q22;q12);PML-RARA$ ²⁶ u kojoj se nalaze abnormalni promijelociti i AML s $inv(16)(p13.1q22)$ ili $t(16;16)(p13.1;q22);CBFB-MYH11$ koja pokazuje znakove monocitne i granulocitne diferencijacije te povećan broj eozinofila u koštanoj srži imaju dobru prognozu.^{27,28} AML s $t(9;11)(p22;q23);MLL3-MLL$ pokazuje značajke monocitne loze i umjerenu prognozu, a AML s $t(6;9)(p23;q34)$ s ili bez monocitnih karakteristika i bazofilijom imaju lošiju prognozu.²⁹

Osim balansiranih translokacija kod bolesnika s AML nalaze se i druge citogenetičke promjene (trisomije, delecije i kompleksni kariotipovi). Bolesnici s urednim kariotipom ili jednom kromosomskom promjenom kao što je +8, +11 i -Y pripadaju grupi intermedijarnog rizika, dok se bolesnici s kompleksnim kariotipom smatraju grupom visokog rizika.³⁰

1.2.1. Citogenetičke promjene kod akutnih mijeloidnih leukemija s promjenama povezanim s mijelodisplazijom

AML s promjenama povezanim s mijelodisplazijom mogu imati kromosomske promjene jednake promjenama u mijelodisplaziji i to su najčešće nebalansirane promjene - 7/del(7q) i -5/del(5q) koje su povezane s lošijom prognozom. Mogu se naći kompleksni kariotipovi koji obuhvaćaju više od tri promjene, kao i monosomije ili trisomije. Balansirane translokacije nisu česte. Dio AML sa znacima mijelodisplazije ima normalan kariotip.^{16,19} Smatra se da su AML s promjenama povezanim s mijelodisplazijom grupa visoko rizičnih leukemija, koje se pretežno javljaju u starijoj dobi i obično su povezane citogenetičkim promjenama koje imaju lošu prognozu. Pojedine studije pokazuju drugačije rezultate. Grupa njemačkih autora pokazala je da se AML sa višelinijском displazijom javljaju češće u bolesnika mlađih od šezdeset godina.³¹ Japanski autori su istraživali citogenetičke promjene u AML s trilinijskom displazijom (TLD) i pokazali su citogenetičku raznolikost tih leukemija. Prema njihovim rezultatima prognostički dobri kariotipovi su izuzetno rijetki, a najčešći su normalni kariotipovi koji pripadaju grupi intermedijarnog rizika.³² Oni nisu našli specifični kariotip za AML/TLD i smatraju da trilinijska displazija predstavlja biološki entitet AML koji se još ne može dokazati rutinskom citogenetičkom analizom.

1.3. Molekularne promjene kod akutnih mijeloidnih leukemija

Intezivnim razvojem molekularne biologije u posljednjih dvadesetak godina i uvođenjem brojnih novih molekularnih metoda u rutinsku dijagnostiku znatno se poboljšalo razumijevanje hematoloških bolesti. Molekularna dijagnostika je danas neizostavna u praćenju minimalne ostatne bolesti i procjeni uspješnosti terapije. Molekularnim analizama koštane srži bolesnika s AML dokazane su različite mutacije i promjene u ekspresiji gena kod bolesnika s urednim kariotipom, koje se smatraju važnim prognostičkim pokazateljem. Leukemogeneza je složen proces. Istraživanja su pokazala da nije dovoljna jedna mutacija za razvoj leukemijskog fenotipa. Dvije grupe mutacija sudjeluju u razvoju leukemijskog klona. Jedna grupa uključuje mutacije koje aktiviraju puteve prijenosa signala i dovode do pojačane proliferacije i preživljenja leukemijskih stanica. Druga grupa obuhvaća mutacije gena koji uključuju transkripcijske faktore ili komponente transkripcijskih koaktivacijskih kompleksa, što dovodi do poremećene mijeloidne diferencijacije.^{33,34}

1.3.1. Molekularne promjene kod akutnih mijeloidnih leukemija s promjenama povezanim s mijelodisplazijom

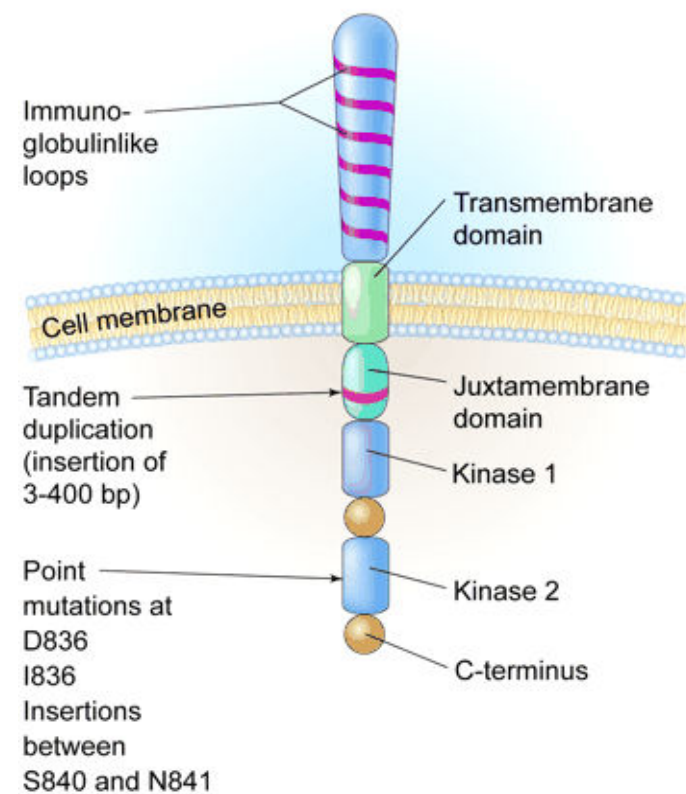
Molekularne promjene koje se mogu javiti kod AML s promjenama povezanim s mijelodisplazijom nisu još dovoljno istražene. Posebno su zanimljive promjene u bolesnika koji imaju normalan kariotip i višelinijsku displaziju. Ti bolesnici mogu imati promjene vezane uz gen nukleofosmin (*NPM1*) kojeg povezuju sa staničnim rastom i diferencijacijom ili mutacije gena engl. *fms-like tyrosine kinase 3 (FLT3)* koji ima značajnu ulogu u proliferaciji i preživljenju krvotvornih matičnih stanica.^{35,36} Gen *WT1* je također povezan s proliferacijom i sazrijevanjem krvotvornih matičnih stanica, njegova ekspresija povezuje se *FLT3*-ITD mutacijom.¹⁴

1.4. Gen *FLT3*

Gen engl. *fms-like tyrosine kinase 3 (FLT3)* poznat je još pod nazivom engl. *fetal liver kinase 2 (FLK-2)* i engl. *stem cell tyrosine kinase 1 (STK-1)*.³⁶ Nalazi se na kromosomu 13 i kodira protein klase III receptora tirozin kinaze. Danas je *FLT3* opće prihvaćen naziv za citokinski receptor koji je normalno izražen na krvotvornim matičnim stanicama. Sazrijevanjem stanica njegova ekspresija se gubi. Ligand za *FLT3* (*FL*) je tip 1 transmembranski protein koji je izražen na stanicama strome u koštanoj srži. Vežanje receptora i liganda rezultira dimerizacijom receptora, autofosforilacijom i naknadnom fosforilacijom citoplazmatskih proteina koji su uključeni u nizvodne signalne puteve, na taj način regulirajući proliferaciju i diferencijaciju nezrelih krvotvornih stanica.

Mutacije *FLT3* gena javljaju se u 1/3 bolesnika s AML i mogu se podijeliti u dva glavna tipa. Prvi i najčešći tip su unutarnje tandemske duplikacije (engl. *internal tandem duplications*, ITD) koje nastaju u jukstamembranskom dijelu *FLT3* i prvi put su ih opisali Nakao i sur. 1996 godine.³⁷ Dužina duplicirane DNA varira između 3 i više od 400 parova baza i razlikuje se između pojedinih slučajeva AML (slika 1). Mutacija ITD dovodi do gubitka autoinhibitorne funkcije u jukstamembranskom dijelu *FLT3*, zbog čega dolazi do konstitutivne aktivacije receptorske tirozin kinaze neovisne o ligandu. Drugi tip su točkaste mutacije na položaju 835 gdje se nalazi aminokiselina aspartat, unutar druge kinazne domene, koje također uzrokuju aktivaciju receptora.^{38,39} Aktivacija receptora uslijed mutacije dovodi do fosforilacije brojnih citoplazmatskih proteina kao što su GAB1, GAB2, CBL, SHIP, AKT,

STAT5a i aktivaciju RAS/MAPK, PI3K/AKT i STAT5 signalnih puteva.³⁶ Kod jedne trećine bolesnika sa *FLT3*-ITD mutacijom, divlji tip alela nije moguće dokazati.

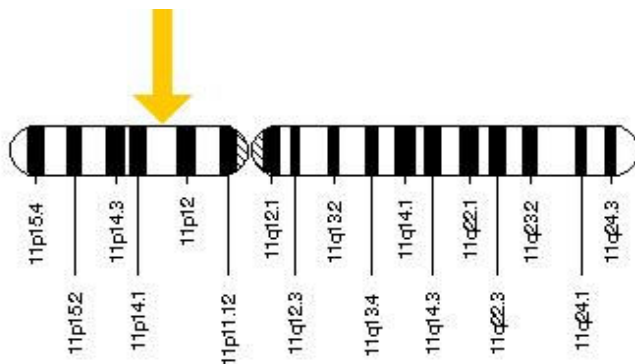


Slika 1. Shematski prikaz receptorske kinaze FLT3, strelice označuju mjesta najčešćih mutacija. Shema preuzeta iz Litzow MR. More flitting about FLT3. Blood 2005;106:3331.

FLT3-ITD mutacija u AML je neovisan prognostički faktor za procjenu kompletne remisije, rizika od relapsa bolesti i ukupnog preživljenja, posebno kod bolesnika s citogenetički normalnim kariotipom. *FLT3*-ITD pozitivni bolesnici imaju statistički značajno kraće preživljenje bez znakova bolesti. Istraživanja dužine duplikacije pokazala su da bolesnici s duplikacijom slijeda veličine 40 i više nukleotida imaju kraće ukupno preživljenje u odnosu na bolesnike s duplikacijom manjom od 40 nukleotida ili bez *FLT3*-ITD duplikacije.^{40,41} Osim što je prognostički čimbenik, *FLT3*-ITD je potencijalna meta za terapiju. Potaknuti učinkom imatiniba na liječenje kronične mijeloične leukemije, sve je više kliničkih studija koje istražuju učinak inhibitora FLT3 tirozin-kinazne aktivnosti i mogućnosti njihove primjene u bolesnika s AML i *FLT3*-ITD mutacijom.³⁸

1.5. Gen Wilmsovog tumora (*WT1*)

Gen Wilmsovog tumora (*WT1*) je jedan od prvih kloniranih tumor-supresorskih gena, koji je povezan s nastankom dječjeg tumora bubrega (Wilmsovim tumorom) kao i sa sindromima koji uključuju Wilmsov tumor. Gen *WT1* se nalazi na kromosomu 11p13 i kodira protein koji je transkripcijski faktor (slika 2). Transkripcijski faktor može aktivirati ili suprimirati gensku transkripciju što ovisi o tipu stanice, proteinskoj izoformi WT1 i ciljnom genu. Prema današnjim saznanjima gen *WT1* se može ponašati dvojako, kao tumor-supresorski gen i kao onkogen. Promjena funkcije proteina WT1 uzrokovana mutacijama gena *WT1* pospješuje proliferaciju stanica ili koči sazrijevanje stanica.⁴²



Slika 2. Smještaj gena *WT1* na kratkom (p) kraku kromosoma 11 na poziciji trinaest (preuzeto sa www.Genetic Home Reference)

Ekspresija gena *WT1* prisutna je u normalnim stanicama urogenitalnog i krvotvornog sustava i ona je niža što je stupanj diferencijacije stanica viši. Ekspresija je prisutna kod nezrelih CD34+ stanica hematopoeze, dok kod zrelih leukocita nestaje. U zdravim stanicama periferne krvi i koštane srži ekspresija gena *WT1* je niska.

Pojačana ekspresija gena *WT1* nađena je u većini akutnih leukemija, mijelodisplastičnom sindromu i blastičnoj krizi kronične mijeloične leukemije.⁴³⁻⁴⁵ Opisane su četiri glavne izoforme proteina WT1 koje se međusobno razlikuju po svojoj ekspresiji i djelovanju na ciljne gene. Pretpostavlja se da određene izoforme imaju ulogu u patogenezi relapsa u AML.⁴⁶ Otkriće prekomjerne ekspresije gena *WT1* u bolesnika s AML potencijalni

je molekularni biljeg minimalne ostatne bolesti i ranog otkrivanja povrata bolesti⁴⁷, dok se prognostički značaj prekomjerne ekspresije još istražuje.

Pojačana ekspresija WT1 proteina u bolesnika s akutnim leukemijama sve je češće predmet istraživanja u području imunološkog liječenja. Kitawaki T. i sur.⁴⁸ ispitivali su primjenu autolognih dendritičkih stanica pulsiranih s apoptotičnim leukemijskim stanicama na klinički ishod u starijih bolesnika s AML. Bolesnici uključeni u studiju pokazali su imunološki odgovor i, između ostalog, razvoj WT1 specifičnih citotoksičnih T limfocita.

Za utvrđivanje razine ekspresije gena *WT1* korišteni su brojni testovi koji su se međusobno razlikovali, što je otežavalo interpretaciju rezultata.^{49,50} Stoga je grupa stručnjaka, članova europske udruge za leukemije engl. *European LeukemiaNet* (ELN) standardizirala postojeće testove.⁵¹ Za razliku od eksona 1 i 2, eksoni 7 i 9 u genu *WT1* su više podložni mutacijama što potencijalno može dovesti do lažno negativnih rezultata prilikom molekularnih analiza ekspresije gena *WT1*. Stoga je ELN grupa predložila standardizirani test analize genske ekspresije gena *WT1* kojim se obuhvaća analiza eksona 1 i 2. Odabrani test pokazao se optimalnim za dokazivanje prisustva minimalne ostatne bolesti.⁵¹

2. TEMELJNE PRETPOSTAVKE RADA I HIPOTEZA

2.1. Temeljne pretpostavke rada

AML sa znacima mijelodisplazije pripadaju grupi visoko rizičnih leukemija. Morfološke promjene na stanicama u AML sa znacima mijelodisplazije nisu neovisan prognostički faktor, već ih je potrebno promatrati uz citogenetičke i molekularne promjene. Višelinijsku displaziju treba uzeti u obzir kao mogući pokazatelj citogenetičkih promjena visokog rizika. Prisustvo *FLT3*-ITD mutacije u bolesnika s AML povezano je s nepovoljnim tijekom bolesti, stoga se može pretpostaviti da će i bolesnici koji imaju novootkrivenu AML sa znacima mijelodisplazije imati mutaciju *FLT3*-ITD. Niska razina ekspresije *WT1* prisutna je u normalnoj koštanoj srži, pojačana ekspresija prisutna je u većini AML i može korelirati s prisustvom *FLT3*-ITD mutacije. S obzirom na pojačanu ekspresiju *WT1* gena u AML željeli smo istražiti ekspresiju *WT1* u novootkrivenim AML sa znacima mijelodisplazije i moguću povezanost *FLT3*-ITD mutacijom i citogenetičkim abnormalnostima. Istraživanja na uzorcima bolesnika koja povezuju morfološke (displastične promjene na stanicama), citogenetičke (kariotipovi) i molekularne (*FLT3*-ITD i *WT1*) karakteristike bolesnika doprinijele bi boljem razumjevanju novootkrivenih AML sa znacima mijelodisplazije i utjecale na odluku kliničara o načinu liječenja bolesnika.

2.2. Hipoteza

U novootkrivenim akutnim mijeloičnim leukemijama sa znacima mijelodisplazije citomorfološke promjene su izraženije u bolesnika koji imaju nepovoljne promjene kariotipa, mutaciju *FLT3*-ITD i pojačanu ekspresiju *WT1*.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

U novootkrivenim AML sa znacima mijelodisplazije:

1. Postaviti kriterij bodovanja morfoloških promjena stanica granulocitopoeze, eritrocitopoeze i trombocitopoeze.
2. Usporediti morfološke promjene stanica sa citogenetičkim promjenama.
3. Odrediti razinu ekspresije *WT1* gena.
4. Odrediti učestalost *FLT3*-ITD mutacije.
5. Usporediti razinu ekspresije *WT1* gena i učestalost *FLT3*-ITD mutacije s morfološkim promjenama stanica.
6. Usporediti razinu ekspresije *WT1* gena i učestalost *FLT3*-ITD mutacije s citogenetičkim promjenama.

4. ISPITANICI, MATERIJALI I METODE RADA

4.1. Ispitanici

U istraživanje je uključeno 54 bolesnika s dijagnozom novootkivene AML sa znacima mijelodisplazije u dobi od 18 do 85 godina. Osnovni odabir bolesnika napravljen je prema morfološkoj dijagnozi postavljenoj prema kriterijima SZO iz 2008. godine.¹⁶ Svi su klinički obrađeni u Zavodu za hematologiju Klinike za unutarnje bolesti Kliničkog bolničkog centra Zagreb, u razdoblju od 2000. do 2010. godine. U istraživanje su uključeni samo bolesnici s novootkrivenim AML sa znacima mijelodisplazije (isključeni su bolesnici s AML nastalom iz prethodne mijelodisplazije/mijeloproliferacije te bolesnici s AML povezanom s terapijom). Svi bolesnici su potpisali suglasnost za medicinske intervencije Kliničkog bolničkog centra Zagreb. Istraživanje je odobrilo etičko povjerenstvo Kliničkog bolničkog centra Zagreb i etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

4.1.2. Klinički i laboratorijski parametri

Klinički i laboratorijski parametri obuhvaćeni istraživanjem su: dob, spol, broj leukocita i trombocita, vrijednost hematokrita, koncentracija hemoglobina, citološka analiza razmaza punktata koštane srži i periferne krvi, mijelogram i udio mijeloperoksidaza pozitivnih blasta u koštanoj srži.

4.2. Materijali i metode rada

4.2.1. Morfološka (citološka) analiza uzoraka

Svim bolesnicima je kod postavljanja dijagnoze učinjena punkcija prsne kosti ili prednjeg gornjeg grebena zdjelične kosti. Koštana srž dobivena aspiracijom stavljena je na predmetna stakalca i razmazama metodom staklom preko stakla. Zatim je fiksirana sušenjem na zraku te bojena standardnim bojenjem po May-Grünwald Giemsi (MGG). Pomoću svjetlosnog mikroskopa na svim je uzorcima napravljen mijelogram koji pokazuje kvalitativne i kvantitativne odnose stanica s jezgrom u razmazima koštane srži. Citomorfološki je analizirana svaka stanična loza u koštanoj srži i bodovale su se morfološke

promjene. Kategorizacija displastičnih promjena provedena je prema kriterijima SZO iz 2008. godine¹⁶ i one moraju biti vidljive na minimalno 50% stanica dvije ili tri stanične loze.

Za ovo istraživanje osmišljen je kriterij bodovanja displastičnih promjena na zrelim stanicama granulocitopoeze, eritrocitopoeze i trombocitopoeze. Displastične promjene na staničnim lozama prikazane su semikvantitativno. Svakoj morfološkoj promjeni unutar stanične loze pridružen je jedan bod.

Disgranulocitopoeza (slika 3,4,5): hipogranuliranost - 1 bod,

pseudo Pelger-Huët-ova anomalija - 1 bod ,

bizarno segmentirane jezgre - 1 bod

Diseritrocitopoeza (slika 6) : megaloblastoidni oblici - 1 bod

eritroblasti s dvije i više jezgara - 1 bod

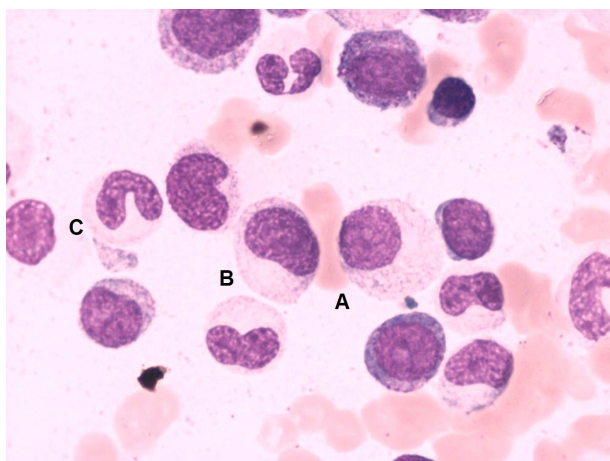
pupanje i fragmenti jezgara - 1 bod

Distrombocitopoeza (slika 7,8,9): mikromegakariociti - 1 bod

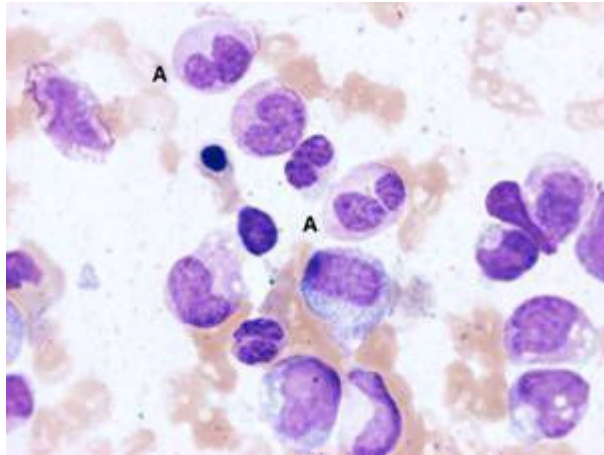
megakariociti s jednom velikom jezgrom - 1 bod

megakariociti brojnijih odvojenih jezgara - 1 bod

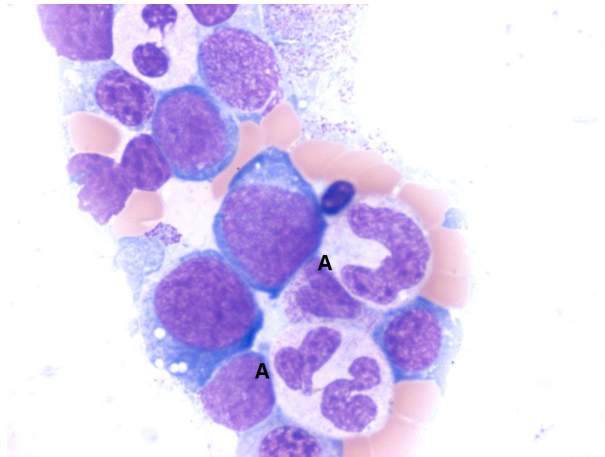
Morfološke promjene na stanicama granulocitopoeze, eritrocitopoeze i trombocitopoeze mogu dobiti najviše tri boda po lozi, stoga je zbroj bodova pojedinog bolesnika od 2 do 9. Prema jačini morfoloških promjena bolesnici su grupirani u dvije skupine: skupina sa slabije izraženim morfološkim promjenama (zbroj ≤ 4) i jače izraženim morfološkim promjenama (zbroj > 4).



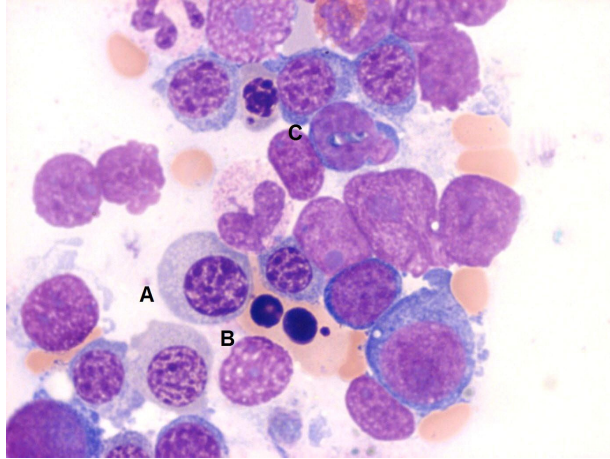
Slika 3. Citološki razmaz aspirata koštane srži-hipogranulirani mijelocit (A), metamijelocit (B) i nesegmentirani granulocit (C) (MGG, 1000x)



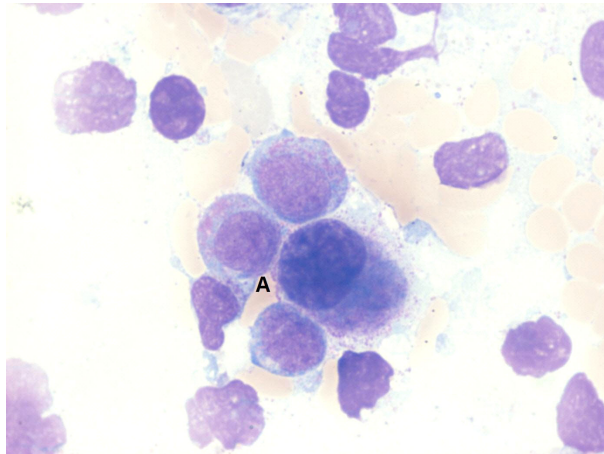
Slika 4. Citološki razmaz aspirata koštane srži-pseudo Pelger-Huětova anomalija (A) u granulocitima (MGG, 1000x)



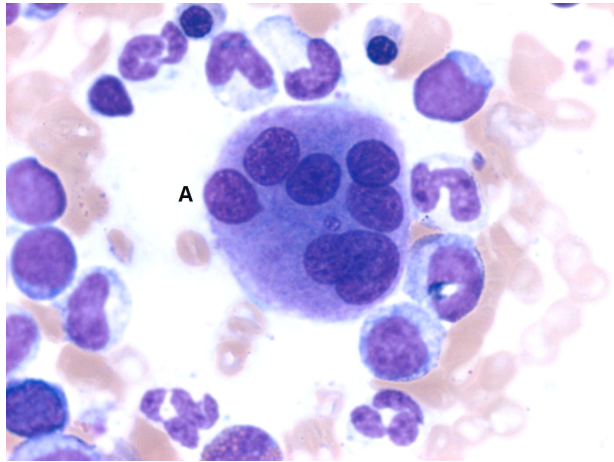
Slika 5. Citološki razmaz aspirata koštane srži-bizarno segmentirane jezgre granulocita (A) (MGG, 1000x)



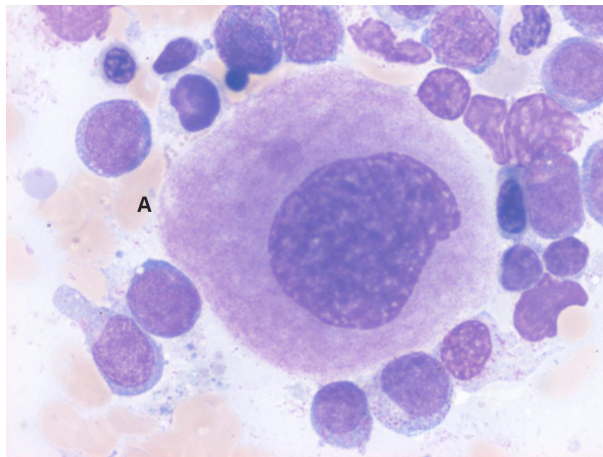
Slika 6. Citološki razmaz aspirata koštane srži-megaloblastoidni eritroblast (A), eritroblast s dvije jezgre (B), pupanje jezgara (C) (MGG, 1000x)



Slika 7. Citološki razmaz aspirata koštane srži-mikromegakariocit (A) (MGG, 1000x)



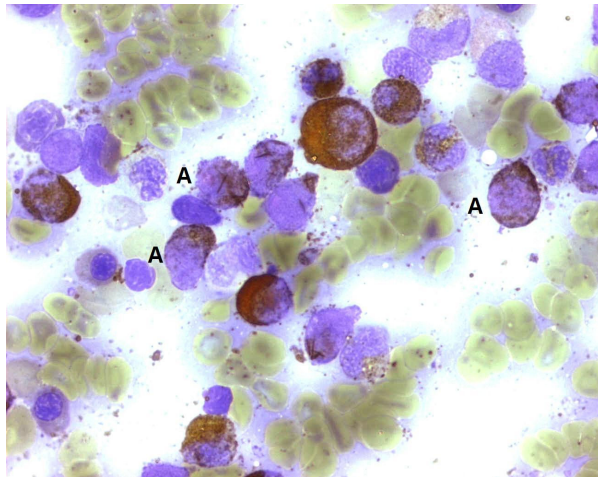
Slika 8. Citološki razmaz aspirata koštane srži-megakariocit s odvojenim jezgrama (A)
(MGG, 1000x)



Slika 9. Citološki razmaz aspirata koštane srži-mononuklearni megakariocit (A)
(MGG, 1000x)

4.2.2. Citokemijsko određivanje mijeloperoksidaza pozitivnih blasta

Mijeloperoksidaza se nalazi u lizosomima stanica granulocitopoeze, gdje iz vodikovog peroksida oslobađa kisik, koji oksidira određeni supstrat u obojeni kemijski spoj. Razmazi su se nakon sušenja na zraku fiksirani u formol alkoholu (45 ml 96% alkohola + 5 ml formalina) 5 minuta. Zatim su isprani tekućom vodom i inkubirani 5 minuta u peroksidaza reagensu (etilni alkohol 96% 30 ml, destilirana voda 20 ml, vodikov peroksid 3% 0,1 ml, benzidin 50 mg). Nakon ispiranja tekućom vodom i inkubacije 10 minuta u 10% otopini Giemse, razmazi su isprani destiliranom vodom i osušeni na zraku. Pod svjetlosnim mikroskopom brojenjem se utvrdio broj mijeloperoksidaza (MPO) pozitivnih blasta na 100 blasta u razmazu (slika 10).



Slika 10. MPO pozitivni blasti u razmazu punktata koštane srži (A) (1000x)

4.2.3. Citogenetička analiza uzoraka

Bolesnicima su uzorci koštane srži i periferne krvi uzeti kod postavljanja dijagnoze bolesti. U epruvetu s heparin-litijem stavljeno je 2-3 ml koštane srži i istodobno u drugu epruvetu 5-10 ml periferne krvi. Uzorci su odmah nakon punkcije dostavljeni u citogenetički laboratorij kako bi se sačuvale stanice. Analize su napravljene u Kliničkoj jedinici za citogenetiku i FISH dijagnostiku hemato-onkoloških bolesti Kliničkog bolničkog centra Zagreb. U citogenetičkom laboratoriju napravljene su stanične kulture prema protokolima koji se koriste u citogenetici hematoloških bolesti.^{52,53,54}

Promjene kariotipa (genoma) analizirane su dvjema metodama: klasičnom metodom GTG-pruganja (*Giemsa-Tripsin-Giemsa*)⁵⁵ i metodom fluorescencijske *in situ* hibridizacije (engl. *Fluorescence In Situ Hybridization*, FISH).⁵⁶ Metodom FISH ispitane su slijedeće komosomske promjene: -7/del(7q), -5/del(5q), +8 i MLL(11q23). Za interpretaciju promjena kariotipa korišten je Međunarodni sustav za klasifikaciju, ISCN 2009 (engl. *International System for Human Cytogenetics*). Za vizualizaciju GTG-pruganja i FISH-a koristio se svjetlosno-fluorescentni mikroskop sa pripadajućim filterima (BX 50, Olympus i AXIOPLAN 2, Carl Zeiss Jena GmbH, Njemačka). U analizi su se koristila dva programa za analizu slike i signala, za GTG-pruganje program Ikaros (Automatic Karyotyping System, MetaSystems, Njemačka) te za FISH program Isis (FISH Imaging, MetaSystems, Njemačka).

4.2.3.1. Klasična citogenetika

Tehnike klasične citogenetike koriste isključivo metafaze za opis promjena kariotipa, što zahtjeva metafaze zadovoljavajuće kvalitete i zadovoljavajućeg mitotskog indeksa, tj. broja. Za identifikaciju promjena u kariotipu (maligni klon) analizirano je 20-25 metafaza po svakom uzorku koštane srži i/ili periferne krvi. Metodom GTG-pruganja dobio se uvid u morfologiju i kompleksnost promjena kariotipa.⁵⁵

4.2.3.2. Fluorescencijska *in situ* hibridizacija

Fluorescencijska *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 FISH na interfaznim jezgrama (I-FISH) koristila se za pretraživanje

poznatih, specifičnih promjena genoma u određenim tipovima AML.^{57,58} Uz obavezno pretraživanje specifičnih promjena, 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 je rutinska metoda u dijagnosticiranju promjena kariotipa u AML. Za svaki nalaz potrebno je analizirati 300 interfaznih jezgara, uključujući pozitivne i negativne kontrole za svaku pojedinu probu.

4.2.4. Molekularne analize uzoraka

Molekularne analize učinjene su pomoću lančane reakcije polimerazom (engl. *Polymerase chain reaction*, PCR) na uzorcima aspirata stanica koštane srži rutinski uzetih bolesnicima prilikom postavljanja dijagnoze. Analize su izvedene u Kliničkoj jedinici za specijalnu i molekularnu hematologiju Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku, Kliničkog bolničkog centra Zagreb.

4.2.4.1. Metoda izolacije RNA i postupaka reverzne transkripcije

Ukupnu staničnu RNA izolirali smo iz aspirata stanica koštane srži koristeći ručnu metodu izolacije RNA usvojenu iz rada Chomczynski i Sacchi.⁵⁹ Ova metoda se zasniva na lizi stanica, denaturaciji proteina i inhibiciji ribonukleaza (RNA-za) uz ekstrakciju RNA. U tu svrhu koriste se reagensi guanidin izotiocijanat koji snažno denaturira proteine i inhibira RNA-ze te vodena otopina fenola i kloroforma za denaturaciju proteina i ekstrakciju RNA. Miješanjem fenola i kloroforma RNA prelazi u vodenu fazu koja se nakon centrifugiranja izdvaja u novu mikroeprevetu. Iz vodene faze RNA se taloži pomoću alkohola. Istaložena i osušena RNA otapa se u vodi bez RNA-za (voda tretirana dietilpirokarbonatom) te zamrzava na -70°C do daljnje upotrebe.

Prijepis RNA u komplementarnu DNA (cDNA) napravljen je pomoću komercijalno dostupnog seta za prepisivanje High capacity cDNA reverse transcription kit, Applied Biosystems, SAD. Prepisivanje (reverzna transkripcija) uključuje upotrebu 10 μL vodene otopine RNA (ukupno 2 μg RNA) i smjese za reverznu transkripciju sačinjene od 2 μL pufera za transkripciju, 0,8 μL smjese nukleotida, 2 μL specifičnih početnica, 1 μL enzima Multiscribe reverzne transkriptaze te 1 μL enzima inhibitora RNA-za. Reakcija reverzne transkripcije započinje temperaturom 25°C na 10 minuta, potom se temperatura podiže na 37°

C tijekom 120 minuta nakon čega slijedi 5 minuta na 85° C. Reakcija završava spuštanjem temperature na 4° C te se nastala cDNA može pohraniti na toj temperaturi kroz kraće vrijeme.

4.2.4.2. Analiza ekspresije *WT1* gena

Analiza ekspresije *WT1* i *ABL* gena izvedena je pomoću komercijalnog seta WT1 ProfileQuant® Kit, Ipsogen, Francuska (kataloški broj PQPP-02-CE) koji sadrži specifične početnice i specifične fluorescentno obilježene sonde te standarde za oba gena zajedno sa setom FastStart DNA MasterPLUS HybProbe, Roche, Njemačka (kataloški broj 03515575001) koji sadrži enzim, nukleotide, pufer i odgovarajuću koncentraciju magnezija. (tablica 1).

Tablica 1. Prikaz pripreme smjese za PCR za *WT1* i *ABL* gen.

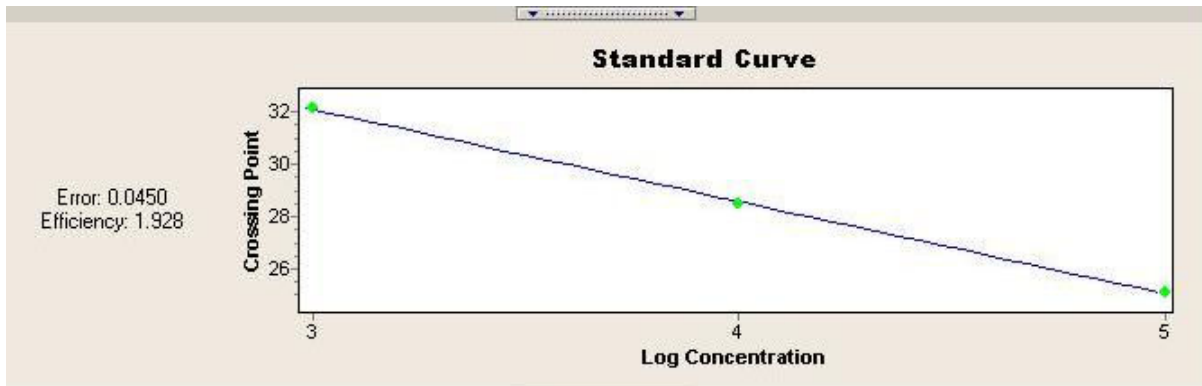
Smjesa za PCR za <i>WT1</i> gen		Smjesa za PCR za <i>ABL</i> gen	
FastStart DNA Master PLUS HybProbe	4 µL	FastStart DNA Master PLUS HybProbe	4 µL
Primer&probe <i>WT1</i>	0.8 µL	Primer&probe <i>ABL</i>	0.8 µL
Dest. H ₂ O	10.2 µL	Dest. H ₂ O	10.2 µL
UKUPNO	15 µL	UKUPNO	15 µL

Analiza je izvedena prema uputama proizvođača lančanom reakcijom polimerazom u stvarnom vremenu (engl. *Real-time polymerase chain reaction*) tehnologijom TaqMan332 na analizatoru LightCycler v2.0 (LightCycler, Roche, Njemačka).

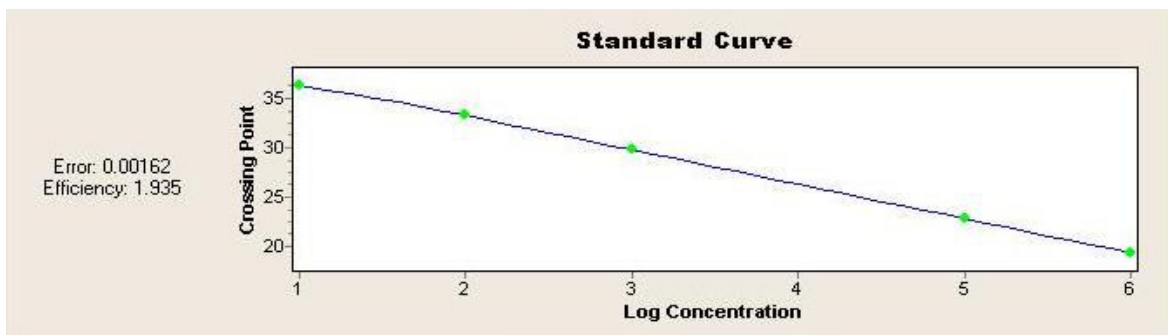
Za umnažanje cDNA pomoću lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu korištene su hidrolizirajuće fluorescentne sonde specifične za *WT1* odnosno *ABL* gen te je sa svakim ciklusom umnažanja izmjerena fluorescencija proporcionalna količini nastalog produkta. Program za umnažanje *WT1* i *ABL* gena na instrumentu LightCycler započet je sa zagrijavanjem PCR reakcijske smjese te 5µL uzorka cDNA na 95° C tijekom 10 minuta. Nakon toga uslijedilo je 45 ciklusa umnažanja pri temperaturi od 95° C tijekom 10 sekundi, a potom hlađenje na 60° C tijekom 1 minute. PCR reakcija završena je spuštanjem temperature na 45° C tijekom 1 minute.

Kako bi se dobio točan broj prijepisa kućepaziteljskog gena *ABL* u uzorku, napravljena je standardna krivulja za koju su korištena 3 različita standarda s točno određenim brojem prijepisa gena (1000, 10000 i 100 000 prijepisa gena *ABL*). Za točan broj prijepisa

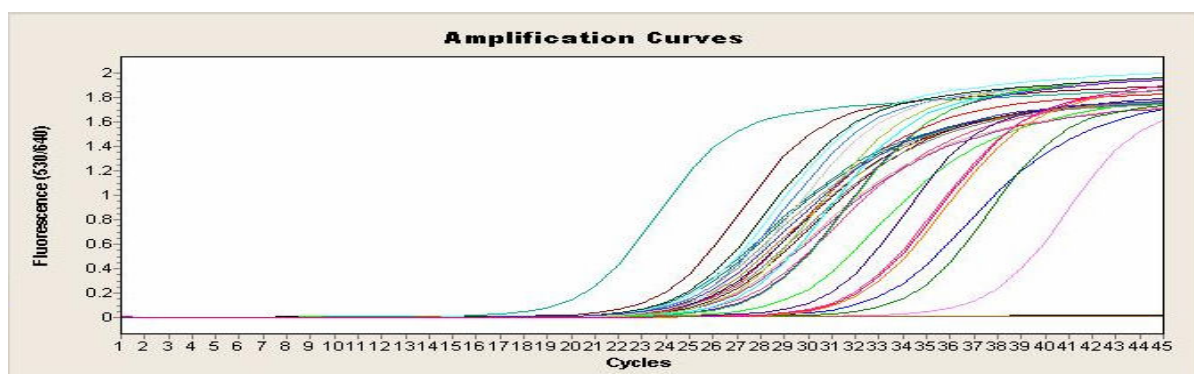
WT1 gena u uzorku napravljena je standardna krivulja s 5 različitih standarda s točno određenim brojem prijepisa gena (10, 100, 1000, 100 000 i 1 000 000 prijepisa *WT1* gena). Svi uzorci analizirani su u triplikatu za broj prijepisa *WT1* i *ABL* gena i izračunat je omjer broja prijepisa na način $WT1/10^4 ABL$. Cilloni i sur. u svojem su istraživanju odredili gornju granicu ekspresije *WT1*, koja u stanicama koštane srži zdravih davatelja iznosi 250 kopija $WT1/10^4 ABL$.⁵¹ (slika 11, 12, 13).



Slika 11. Standardna krivulja napravljena pomoću 3 standarda za *ABL* gen. Vrijednosti standarda izražene su kao logaritam izmjenog broja kopija gena.



Slika 12. Standardna krivulja napravljena pomoću 5 standarda za *WT1* gen. Vrijednosti standarda izražene su kao logaritam izmjenog broja kopija gena.



Slika 13. Reakcijske krivulje umnažanja uzoraka i standarda metodom lančane polimeraze u stvarnom vremenu.

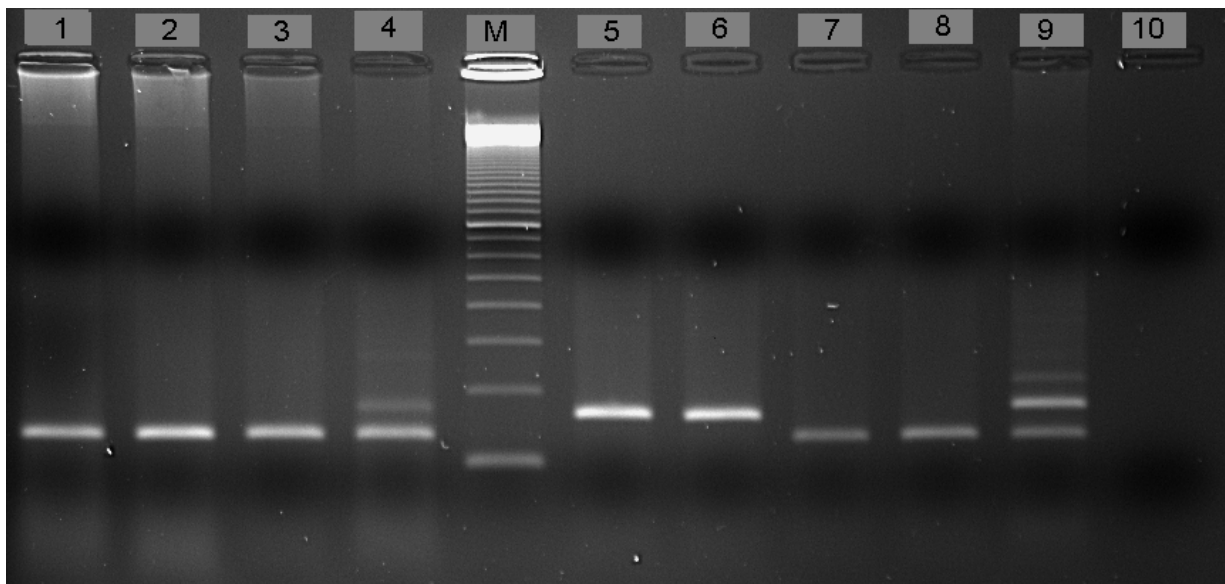
4.2.4.3. Dokazivanje mutacije *FLT3*-ITD

U svim uzorcima analizirano je postojanje ITD duplikacije u genu za *FLT3* pomoću PCR reakcije prema Nakao i sur.³⁷ Umnažanje je izvedeno u instrumentu GeneAmp 2700 (Applied Biosystems, SAD). Za umnažanje su korištene početnice sekvenci *FLT3* F 5'- CAA TTT AGG TAT GAA AGC C -3' i *FLT3* R 5'- CAA ACT CTA AAT TTT CTC T -3'. (tablica 2). U PCR smjesu izrađenu prema protokolu na kraju je kao uzorak dodano 5 μ L prethodno pripravljene cDNA. Program umnažanja sastojao se od 10 minuta na 95° C (aktivacija AmpliTaq Gold DNA polimeraze), 35 PCR ciklusa (30 sekundi na 94° C, 30 sekundi na 55 ° C, 1 minutu na 72° C), 10 minuta na 72° C i pohrana na 4° C.

Tablica 2. Prikaz pripreme smjese za PCR analizu *FLT3*-ITD mutacije.

PCR smjesa za <i>FLT3</i>-ITD	
10 x PCR pufer II	5 μ L
25 mM MgCl ₂	10 μ L
Nukleotidi	4x1 μ L
Primer <i>FLT3</i> F (1:10)	1,5 μ L
Primer <i>FLT3</i> R (1:10)	1,5 μ L
AmpliTaQ GOLD DNA polimeraza	0,25 μ L
Dest.H ₂ O	22,75 μ L
UKUPNO	45 μL

Umnoženi ulomci razdvojeni su elektroforezom (1 sat na 80 V u 1xTBE puferu) na 2%-tnom agaroznom gelu uz upotrebu etidij bromida kako bi se razdvojeni ulomci vidjeli pod ultraljubičastim svjetlom. Uz uzorke, na gel se nanio i molekularni biljeg sa ljestvicom po 100 parova baza. Nakon elektroforetskog razdvajanja, umnoženi produkti su vizualizirani fotografiranjem gela pod ultraljubičastim svjetlom. Ukoliko je uzorak imao samo kontrolnu vrpca (136 pb), smatralo se da predstavlja divlji tip gena bez prisustva mutacije (engl. *wild type*; wt). Ukoliko u uzorku nije postojala kontrolna vrpca, a postojao je ulomak veći od 136 pb smatralo se da ona ukazuje na prisustvo ITD duplikacije, ali ne i wt (-/ITD). U slučaju da je bila prisutna kontrolna vrpca od 136 pb i ulomak ili ulomci veći od 136 pb smatralo se da ju u takvom uzorku bila prisutna ITD duplikacija (wt/ITD). (slika 14).



Slika 14. Primjer PCR analize *FLT3*-ITD (reprezentativna elektroforeza na agarozu gelu); stupci 1, 2 i 3 – wt; stupac 4 wt/ITD; stupac M-biljeg molekularne mase za određivanje veličine ulomaka - ljestvica po 100 parova baza; stupci 5 i 6 -/ITD; stupci 7 i 8 wt; stupac 9 wt/ITD (pozitivna kontrola) i stupac 10 slijepa proba).

4.3. Statistička obrada podataka

U istraživanju su korištene deskriptivne statističke metode za prikaz sredine distribucije brojeanih podataka (aritmetička sredina i medijan) te standardna devijacija i raspon za prikaz varijabilnosti podataka. S obzirom na navedenu veličinu uzorka (N=54) razlike u distribuciji kategorijskih varijabli testirane su Fisherovim egzaktnim testom, a kvantitativnih Mann-Whitneyevim U testom. Rezultati su tumačeni uz najvišu prihvatljivu razinu značajnosti $p < 0,05$.

Podaci su obrađeni statističkim programom SPSS (version 14.0, SPSS, Chicago, SAD).

5. REZULTATI

5.1. Značajke ispitanika

U ovo istraživanje uključeno je 54 bolesnika s novootkrivenom akutnom leukemijom sa znacima mijelodisplazije, 24 žene i 30 muškaraca. Medijan dobi bolesnika je 55 godina. Kliničke značajke navedene su u tablici 3.

Tablica 3. Kliničke značajke bolesnika s novootkrivenom AML sa znacima mijelodisplazije

Značajke	Min	Max	Aritmetička sredina	Standardna devijacija	Medijan
udio blasta (0-1)	0,20	0,81	0,35	±0,15	0,30
MPO+ blasti (0-1)	0,02	0,90	0,33	±0,31	0,20
Leukociti x 10 ⁹ / L	0,7	127,8	21,3	±26,3	4,8
Trombociti x 10 ⁹ / L	8	1307	115	±189	64
Hemoglobin g/L	54	108	86,60	±12,11	87
Hematokrit L/L	0,169	0,351	0,257	±0,04	0,265
Dob	18	85	54	±17,00	55

5.2. Morfološki kriterij bodovanja displastičnih promjena stanica u bolesnika s novootkrivenim AML sa znacima mijelodisplazije

Za ovo istraživanje osmišljeno je i uvedeno bodovanje morfoloških (displastičnih) promjena na zrelim stanicama granulocitopoeze, eritrocitopoeze i trombocitopoeze. Svako displastičnoj promjeni stanica pridružen je jedan bod. Kriterij bodovanja korišten u ovom radu prikazan je u tablicama 4a, 4b. i 4c.

Tablica 4a. Displastične promjene stanica granulocitopoeze

Displastična promjena	Bodovi
hipogranularnost	1
pseudo Pelger-Huët	1
bizarno segmentirane jezgre granulocita	1
Ukupno	3

Tablica 4b. Displastične promjene stanica eritrocitopoeze

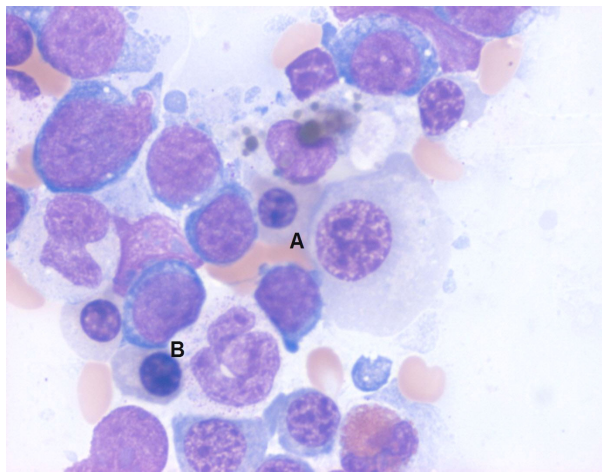
Displastična promjena	Bodovi
megaloblastoidni oblici eritroblasta	1
eritroblasti s ≥ 2 jezgara	1
pupanje i fragmenti jezgara	1
Ukupno	3

Tablica 4c. Displastične promjene stanica trombocitopoeze

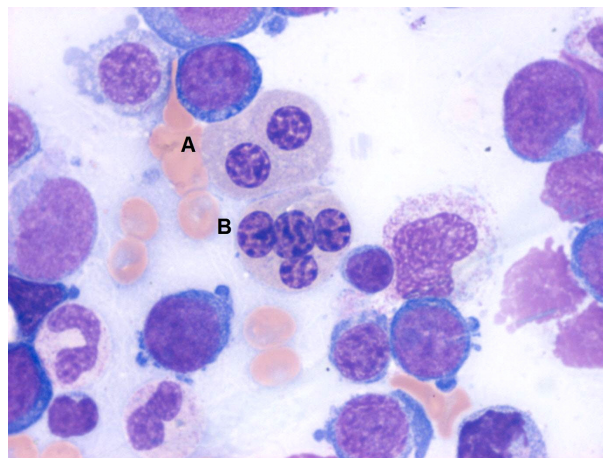
Displastična promjena	Bodovi
mikromegakariociti	1
mononuklearni megakariociti	1
megakariociti odvojenih jezgara	1
Ukupno	3

U ovom istraživanju bolesnici su grupirani s obzirom na broj bodovanih morfoloških promjena u dvije grupe: $s \leq 4$ boda i > 4 boda. Bolesnici sa slabije izraženim morfološkim promjenama čine 81% svih bolesnika i imaju ≤ 4 boda. Svega 19% bolesnika ima > 4 boda i pripada skupini s jače izraženim morfološkim promjenama.

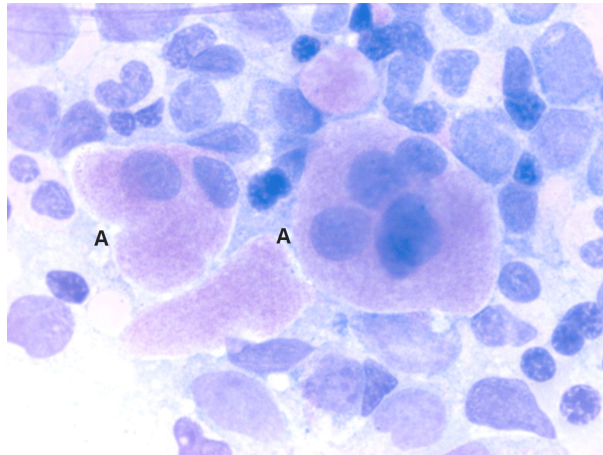
Displastične promjene na dvije stanične loze ima 70% bolesnika, dok displastične promjene na tri stanične loze ima 30% bolesnika. Bolesnici s promjenama na dvije stanične loze imaju raspon bodova od 2 do 4, dok bolesnici s promjenama na tri stanične loze imaju raspon bodova od 3-7. Maksimalan broj bodova (9 bodova), tj. sve tri morfološke promjene na sve tri loze, nema niti jedan bolesnik. Prikazi koštane srži bolesnika s AML sa znacima mijelodiplazije (slike 15a,15b,16a,16b,17a,17b).



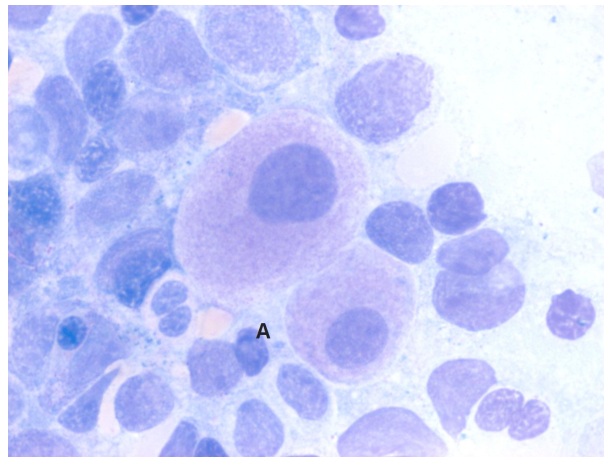
Slika 15a. Koštana srž bolesnika 1-diseritrocitopoeza (megaloblastodni polikromatofilni eritroblast (A)) i disgranulocitopoeza (granulocit s bizarnom jezgrom (B))



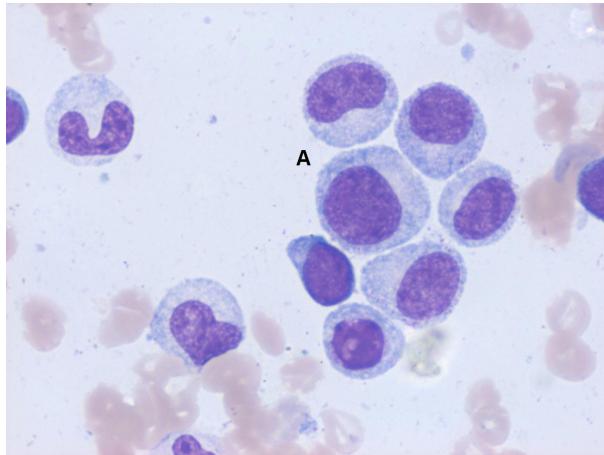
Slika 15b. Koštana srž bolesnika 1-diseritrocitopoeza (eritroblasti s dvije (A) i više jezgara (B))



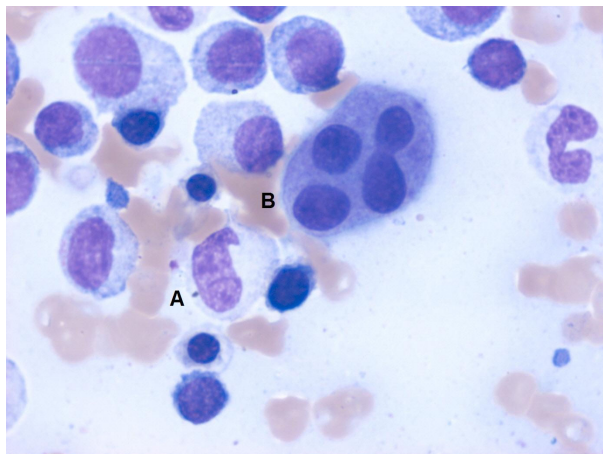
Slika 16a. Koštana srž bolesnika 2-distrombocitopoeza (megakariociti odvojenih jezgara (A))



Slika 16b. Koštana srž bolesnika 2-distrombocitopoeza (mononuklearni megakariociti (A))



Slika 17a. Koštana srž bolesnika 3-disgranulocitopoeza (hipogranulirani prijelazni oblici granulocitopoeze (A))



Slika 17b. Koštana srž bolesnika 3-disgranulocitopoeza (hipogranulirani prijelazni oblici granulocitopoeze (A)) i distrombocitopoeza (megakariocit odvojenih jezgara (B))

5.3. Promjene kariotipa u bolesnika s novootkrivenim AML sa znacima mijelodisplazije

Klasična citogenetička analiza učinjena je u 52/54 bolesnika. Analiza nije uspjela u uzorcima dva bolesnika. Uredan kariotip ima 27 bolesnika (52%), a 25 (48%) bolesnika ima citogenetičke promjene.

S obzirom na prognostički značaj analiziranih kariotipova, 38 bolesnika (73%) ima tzv. intermedijarne promjene, dok 14 bolesnika (27%) ima nepovoljne promjene kariotipa (tablica 5).

Analiza promjena metodom FISH učinjena je također u 52/54 bolesnika, kod dva bolesnika analiza nije uspjela. Svim bolesnicima analizirane su komosomske promjene del(7q)/-7, del(5q)/-5, +8 i MLL(11q23).

Tablica 5. Usporedba izražaja morfoloških promjena stanica s promjenama kariotipa

	Morfološke promjene			Klasična citogenetika	FISH
	disg*	dise*	dist*		
bolesnik 1	2	2	2	46,xy	
bolesnik 2		2	2	46,xx,add(9p)	
bolesnik 3	2	3	2	46,xx	
bolesnik 4	1	1	1	47,xy,inv(16),+12/46,xy	
bolesnik 5		1	1	46,xx	
bolesnik 6	1		1	46,xx	
bolesnik 7		1	1	46,xy	
bolesnik 8	1		1	46,xy,add(11p15)/46, xy	
bolesnik 9	3	2	2	46,xx	
bolesnik 10		2	1	46,xx	
bolesnik 11	1	3	1	74-83, xy	
bolesnik 12		3	1	46,xy	
bolesnik 13	2	3	1	46,xx	
bolesnik 14	1		1	46,xy	
bolesnik 15	1	1		46,xx	
bolesnik 16	2		1	47,xx,+8	+8
bolesnik 17	1	3	1	46,xx	

	Morfološke promjene			Klasična citogenetika	FISH
	disg*	dise**	dist***		
bolesnik 18		1	1	46,xy	
bolesnik 19	1	2	2	46,xy	
bolesnik 20	1	1	1	47,xy,del(5q),-18,+mar1,+mar2	del(5q)
bolesnik 21		2	2	47,xx,+8	+8
bolesnik 22		1	1	46,xy,der(6q)/46x	
bolesnik 23	1		2	46,xx	
bolesnik 24	1	1	1	45,xy, der(11q41-ter),-16	
bolesnik 25	1	1		47,xx,+17	
bolesnik 26	1		1	48,xy,+10,+22	
bolesnik 27		1	1	46,xy	
bolesnik 28		3	1	46,xy	
bolesnik 29		1	1	46,xy	
bolesnik 30		1	1	46,xx ,del(5q)	del(5q)
bolesnik 31		1	1	46,xx ,del(5q)	del(5q)
bolesnik 32		2	1	46,xx ,del(5q),del(7p)	del(5q)
bolesnik 33		1	2	46,xy	
bolesnik 34	1		1	46,xy,der(12q)/46,xy	
bolesnik 35	1		1	47,xx,+8	+8
bolesnik 36	1	2		46,xx	
bolesnik 37		1	3	46,xy	
bolesnik 38	1	1	2	45,xx,-16	
bolesnik 39	1	1	1	46,xy	
bolesnik 40	1		1	62-64,xy /46,xy	
bolesnik 41	1	2	2	47,xx,+14	
bolesnik 42	1	1	2	46,xx	
bolesnik 43	1	1	1	46,xx ,del(5q)	del(5q)
bolesnik 44		1	2	46,xy,del(5q),del(7q),del(20q)	del(5q), del(7q)
bolesnik 45		1	1	46,xy,add(6p),der(10q3.5)	
bolesnik 46		2	2	46,xy,del(5q),del(7q),-18,+10	del(5q), del(7q)
bolesnik 47		1	1	45,xy,-7	-7
bolesnik 48	1	2	1	46,xy	
bolesnik 49		2	1	46,xx	
bolesnik 50	1	2	2	46,xy	
bolesnik 51		2	2	45,xy,inv(3q21-q26), -7	-7
bolesnik 52	2	2	2	46,xx	

*disg-disgranulocitopoeza; **dise-diseritrocitopoeza; ***dist-distrombocitopoeza

5.3.1. Povezanost izražaja morfoloških promjena na stanicama sa citogenetičkim promjenama

Analiza povezanosti učinjena je između grupa bolesnika sa slabije izraženim morfološkim promjenama (broj bodova ≤ 4) i jače izraženim morfološkim promjenama (broj bodova >4) u odnosu na prognostičko značenje citogenetičke promjene. Također je analizirana povezanost između grupa bolesnika s displastičnim promjenama na stanicama dvije stanične loze i tri stanične loze u odnosu na citogenetičke promjene.

Nije nađena povezanost između istraživanih promjena (tablica 6 i 7).

Tablica 6. Analiza povezanosti izražaja morfoloških promjena stanica sa citogenetičkim promjenama

Morfološke promjene (broj bodova)	Citogenetičke promjene		Ukupno
	Intermedijarne	Nepovoljne	
≤ 4	29	13	42
> 4	9	1	10
Ukupno	38	14	52

$p = 0,254$ (Fisherov egzaktni test)

Tablica 7. Analiza povezanosti displazije na dvije stanične loze i tri stanične loze s citogenetičkim promjenama

Displazijom zahvaćene loze	Citogenetičke promjene		Ukupno
	Intermedijarne	Nepovoljne	
Dvije loze	26	10	36
Tri loze	12	4	16
Ukupno	38	14	52

$p = 1,00$ (Fisherov egzaktni test)

5.4. Razine ekspresije *WT1* gena

Molekularne analize ekspresije *WT1* gena izvedene su na uzorcima stanica koštane srži 48/54 bolesnika. U 6 bolesnika količina izolirane RNA nije bila dovoljna za analizu genske ekspresije. Svi uzorci analizirani su u triplikatu za broj prijepisa *WT1* i *ABL* gena i izračunat je omjer broja prijepisa na način $WT1/10^4 ABL$.

Ustanovljeno je da je *WT1* pojačano eksprimiran u 40 (84%) bolesnika. Pojačana ekspresija *WT1* znači da takvi bolesnici imaju više od 250 kopija $WT1/10^4 ABL$. Samo 8 (16%) bolesnika ima manje od 250 kopija $WT1/10^4 ABL$ (tablica 8). Raspon broja kopija je od 12,9 $WT1/10^4 ABL$ do 12493,5 $WT1/10^4 ABL$ sa srednjom vrijednošću 3212,2 $WT1/10^4 ABL$.

5.4.1. Analiza povezanosti izražaja morfoloških promjena na stanicama s ekspresijom *WT1* gena

U grupi bolesnika s jačim morfološkim promjenama (broj bodova >4) svi bolesnici imaju pojačanu ekspresiju *WT1* gena. Ovim istraživanjem nije dokazana povezanost jačine morfoloških promjena s razinom ekspresije *WT1* gena. Nađena je povezanost displastičnih promjena na tri stanične loze s razinom ekspresije >250 kopija $WT1/10^4 ABL$ (tablica 8,9). Nije bilo razlike u broju kopija *WT1* gena između skupine bolesnika sa slabijim i jačim morfološkim promjenama (medijan 2404,75, raspon 12,87-12493,5 naprema medijan 3860,02, raspon 377,841-8816,79; $p=0,636$; izračunato Mann-Whitneyevim U testom).

Tablica 8. Analiza povezanosti izraženosti morfoloških promjena na stanicama s ekspresijom *WT1* gena

Morfološke promjene (broj bodova)	Ekspresija <i>WT1</i>		Ukupno
	≤ 250 kopija $WT1/10^4 ABL$	>250 kopija $WT1/10^4 ABL$	
≤ 4	8	30	38
> 4	0	10	10
Ukupno	8	40	48

$p = 0,177$ (Fisherov egzaktni test)

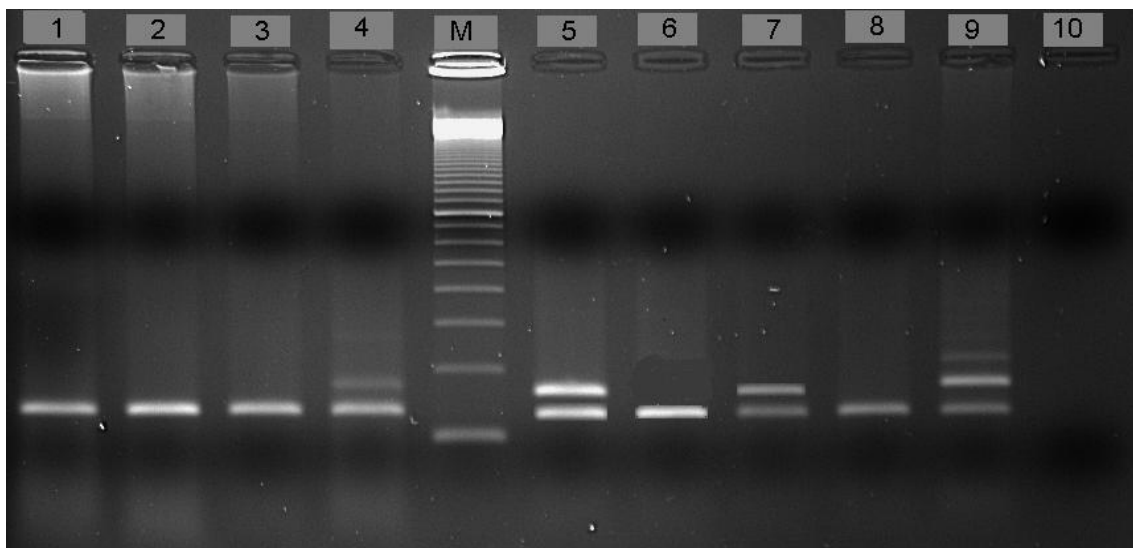
Tablica 9. Analiza povezanosti displazije na dvije stanične loze i tri stanične loze s ekspresijom *WT1* gena

Displazijom zahvaćene loze	Ekspresija <i>WT1</i>		Ukupno
	≤ 250 kopija <i>WT1/10⁴ ABL</i>	>250 kopija <i>WT1/10⁴ ABL</i>	
Dvije loze	8	24	32
Tri loze	0	16	16
Ukupno	8	40	48

p = 0,039 (Fisherov egzaktni test)

5.5. Učestalost mutacije *FLT3-ITD*

Učestalost *FLT3-ITD* mutacije analizirali smo na uzorcima 52/54 bolesnika. Kod 2 bolesnika nije bilo dovoljno uzorka za analizu mutacije. *FLT3-ITD* mutacija dokazana je u 7 bolesnika. (slika 18).



Slika 18. Rezultati PCR analize uzoraka bolesnika s mutacijom *FLT3-ITD* i bez mutacije (wt) (reprezentativna elektroforeza na agaroznom gelu); stupci 1, 2 i 3-wt; stupac 4 wt/ITD; stupac M-biljeg molekularne mase za određivanje veličine ulomaka- ljestvica po 100 parova

baza; stupac 5 wt/ITD; stupac 6 wt; stupac 7 wt/ITD, stupac 8 wt; stupac 9 wt/ITD (pozitivna kontrola) i stupac 10 slijepa proba.

5.5.1. Analiza povezanosti izražaja morfoloških promjena na stanicama s mutacijom *FLT3-ITD*

U grupi bolesnika sa slabije izraženim morfološkim promjenama (broj bodova ≤ 4) pet bolesnika ima *FLT3-ITD* mutaciju, a u grupi s jače izraženim morfološkim promjenama (broj bodova > 4) samo dva bolesnika.

Mutacija je dokazana u 7/52 (13%) bolesnika. Ovim istraživanjem nije dokazana povezanost jačine morfoloških promjena s *FLT3-ITD* mutacijom, kao ni povezanost displastičnih promjena na dvije stanične loze i displastičnih promjena na tri stanične loze s *FLT3-ITD* mutacijom (tablice 10,11).

Tablica 10. Analiza povezanosti jačine izražaja morfoloških promjena na stanicama s mutacijom *FLT3-ITD*

Morfološke promjene (broj bodova)	Mutacija <i>FLT3-ITD</i>		Ukupno
	ITD*	wt**	
≤ 4	5	37	42
> 4	2	8	10
Ukupno	7	45	52

* ITD (engl. *internal tandem duplication*)

** wt (engl. *wild type*)

p = 0,608 (Fisherov egzaktni test)

Tablica 11. Analiza povezanosti displazije na dvije stanične loze i tri stanične loze s *FLT3*-ITD mutacijom

Displazijom zahvaćene loze	Mutacija <i>FLT3</i> -ITD		Ukupno
	ITD*	wt**	
Dvije loze	5	31	36
Tri loze	2	14	16
Ukupno	7	45	52

* ITD (engl. *internal tandem duplication*)

** wt (engl. *wild type*)

p = 1,000 (Fisherov egzaktni test)

5.6. Analiza povezanosti ekspresije *WT1* gena s citogenetičkim promjenama

Od ukupno 54 bolesnika, 47 bolesnika ima analiziranu i ekspresiju *WT1* gena i kariotip (tablica 12). Ovim istraživanjem nije utvrđena povezanost ekspresije *WT1* gena i citogenetičkih promjena.

Tablica 12. Analiza povezanosti ekspresije *WT1* gena s citogenetičkim promjenama

Citogenetičke promjene	Ekspresija <i>WT1</i>		Ukupno
	< 250 kopija <i>WT1/10⁴ABL</i>	≥250kopija <i>WT1/10⁴ABL</i>	
Intermedijarne	6	30	36
Nepovoljne	2	9	11
Ukupno	8	39	47

p = 1,000 (Fisherov egzaktni test)

5.7. Analiza povezanosti mutacije *FLT3*-ITD s citogenetičkim promjenama

Mutaciju *FLT3*-ITD gena i kariotip ima analizirano 50 bolesnika od ukupno 54. (tablica 13). Ovim istraživanjem nije utvrđena povezanost citogenetičkih promjena s mutacijom *FLT3*-ITD.

Tablica 13. Analiza povezanosti mutacije *FLT3*-ITD s citogenetičkim promjenama

Citogenetičke promjene	Mutacija <i>FLT3</i> -ITD		Ukupno
	ITD*	wt**	
Intermedijarne	7	31	38
Nepovoljne	0	12	12
Ukupno	7	43	50

* ITD (engl. *internal tandem duplication*)

** wt (engl. *wild type*)

p = 0,174 (Fisherov egzaktni test)

5.8. Analiza povezanosti mutacije *FLT3-ITD* s ekspresijom *WT1*

Mutacija *FLT3-ITD* gena analizirana je u 52/54, a ekspresija *WT1* u 48/54 bolesnika. Analiziranu *FLT3-ITD* mutaciju i ekspresiju *WT1* ima 48 bolesnika. Svi bolesnici koji imaju dokazanu *FLT3-ITD* imaju i pojačanu ekspresiju *WT1*, ali bez statističke značajnosti (tablica 14). Nije bilo razlike u broju kopija *WT1* između bolesnika s i bez *FLT3-ITD* mutacija (medijan 3963,13, raspon 1803,29-5811,142 naprema medijan 237,6, raspon 12,87-12493,5; $p=0,178$; izračunato Mann-Whitneyevim U testom).

Tablica 14. Analiza povezanosti mutacije *FLT3-ITD* s ekspresijom *WT1*

<i>FLT3-ITD</i> mutacija	Ekspresija <i>WT1</i>		Ukupno
	< 250 kopija <i>WT1/10⁴ABL</i>	≥250kopija <i>WT1/10⁴ABL</i>	
ITD*	0	7	7
wt**	8	33	41
Ukupno	8	40	48

* ITD (engl. *internal tandem duplication*)

** wt (engl. *wild type*)

$p=0,583$ (Fisherov egzaktni test)

6. RASPRAVA

6.1. Osvrt na kriterije odabira bolesnika i njihove biološke značajke

SZO je u grupu akutnih mijeloičnih leukemija s promjenama povezanim s mijelodisplazijom uvrstila AML nastale iz prethodne mijelodisplazije ili mijelodisplazije/mijeloproliferacije, zatim AML sa citogenetičkim promjenama karakterističnim za mijelodisplazije i grupu novootkrivenih AML sa morfološkim znacima višelinijske displazije.^{16,60,61} AML s promjenama povezanim s mijelodisplazijom (sve tri podgrupe) prema podacima iz literature čine 24-35% svih akutnih mijeloičnih leukemija.^{16,19} U literaturi se ne nalaze podaci koliki je udio novootkrivenih AML sa znacima mijelodisplazije (višelinijском displazijom) unutar cijele grupe akutnih mijeloičnih leukemija s promjenama povezanim s mijelodisplazijom.

U ovo istraživanje uključeno je 54 bolesnika koji su kod postavljanja dijagnoze imali citomorfološke kriterije za akutnu mijeloičnu leukemiju sa znacima mijelodisplazije. Niti jedan bolesnik nije imao anamnestičke podatke o prethodno prisutnoj mijelodisplastičnoj ili mijeloproliferativnoj neoplazmi, niti je liječen citotoksičnom kemoterapijom ili radijacijom zbog druge zloćudne ili nezloćudne bolesti. Ovo istraživanje obuhvatilo je desetogodišnji period u kojem je relativno mali broj bolesnika zadovoljio prethodno postavljene kriterije za dijagnozu novootkivene AML sa znacima mijelodisplazije. Prema SZO, AML s promjenama povezanim s mijelodisplazijom pretežno se javljaju u starijih bolesnika.¹⁶ U ovom istraživanju prosječna dob bolesnika je 54 godine, 59% bolesnika je mlađe od šezdeset godina. Wandt i sur.³¹ su na uzorku od 1766 bolesnika pokazali da AML s višelinijском displazijom nisu češće u starijoj dobi. SZO ne navodi podatke o zastupljenosti spolova u grupi AML sa znacima mijelodisplazije. Omjer oboljelih muškaraca u odnosu na žene u ovoj istraživanoj skupini je 1,5:1.

Pomicanjem granice broja blasta entitet refraktorne anemije s viškom blasta u transformaciji se gubi, odnosno postaje dio skupine akutnih mijeloičnih leukemija s promjenama povezanim s mijelodisplazijom.^{62,63} S obzirom na udio blasta u koštanoj srži, omjer bolesnika s 20-30% blasta i više od 30% blasta u ovom istraživanju je 1:1. Polovica bolesnika u ovom istraživanju zadovoljava kriterije nekadašnje RAEB-t, stoga je vrlo interesantno pitanje koje su postavili eminentni stručnjaci Gale i Bennet: "Jesu li mijelodisplastični sindrom i akutna leukemija jedna bolest?"⁶⁴ Arber i sur. su pokazali da nema razlike u preživljenju između grupe bolesnika koji imaju AML s manjim brojem blasta

(20-30%) i onih s većim brojem blasta (>30%). Smatraju da se AML s višelinijском displazijom ponašaju na sličan način bez obzira jesu se razvile iz prethodne mijelodisplazije ili su nastale *de novo*.³⁰

6.2. Osvrt na kriterij bodovanja morfoloških promjena stanica u novootkrivenim akutnim leukemijama sa znacima mijelodisplazije

Citomorfolologija potpomognuta citokemijskim reakcijama i danas je temelj svake dijagnoze akutne leukemije. Dijagnoza jedne velike grupe akutnih leukemija unutar klasifikacije SZO, a to su akutne leukemije koje nisu drugdje uvrštene, postavlja se na osnovu morfolologije.¹⁴ Danas važeća klasifikacija SZO je mješavina bioloških i morfoloških obilježja akutnih leukemija. Kontrolirana klinička i morfološka istraživanja su potrebna, jer se pomoću njih utvrđuje klinička značajnost različitih kategorija akutnih leukemija unutar SZO klasifikacije. Prijašnjih godina u svijetu je napravljeno više studija koje su pokušale ocijeniti važnost displastičnih promjena na staničnim lozama u AML^{65,66,67} Goasguen i sur.⁶⁸ su pokazali da je prisustvo disgranulocitopoeze povezano sa smanjenom mogućnošću postizanja kompletne remisije u bolesnika s AML. Tamura i sur.⁶⁹ povezuju višelinijску displaziju s kraćim periodom bez znakova bolesti. Svi ovi autori su analizirali displastične promjene na zrelim hematopoetskim stanicama u akutnim mijeloidnim leukemijama dok je još bila važeća FAB klasifikacija unutar koje nije postojala grupa AML sa znacima mijelodisplazije.

Uvođenje kategorije AML s promjenama povezanim s mijelodisplazijom u SZO klasifikaciju akutnih leukemija izazvalo je poteškoće u postavljanju citomorfološke dijagnoze unutar te grupe leukemija. Stoga je ekspertna grupa SZO predložila da citomorfološki potvrđena višelinijска displazija bude glavna karakteristika na osnovu koje se daje dijagnoza AML sa znacima mijelodisplazije u bolesnika koji je prezentiraju kao novootkivena akutna leukemija.^{15,60}

Za ovo istraživanje osmišljen je i uspostavljen kriterij bodovanja morfoloških (displastičnih) promjena na stanicama granulocitopoeze, eritrocitopoeze i trombocitopoeze. Bodovanjem se pokušalo kvalitativne displastične promjene na stanicama brojčano prikazati i zbrojem bodova preciznije utvrditi jačinu morfoloških promjena na stanicama s ciljem unapređivanja citomorfološke dijagnostike novootkrivenih AML sa znacima mijelodisplazije.

6.3. Povezanost morfoloških promjena na stanicama sa citogenetičkim promjenama

Morfološke karakteristike mogu u visokom postotku predvidjeti citogenetičke abnormalnosti kao što je to pokazano u slučajevima akutne promijelocitne leukemije i akutne mijelomonocitne leukemije sa abnormalnim eozinofilima.^{70,71} U mnogim slučajevima akutnih leukemija nije vidljiva povezanost između morfoloških karakteristika i citogenetičkih promjena. Prema dosadašnjim saznanjima citogenetičke promjene smatraju se najjačim prognostičnim faktorom za predviđanje kompletne remisije i preživljenja u bolesnika s akutnom leukemijom.⁷² Prema SZO višelinijsku displaziju treba uzeti u obzir kao mogući pokazatelj citogenetičkih promjena visokog rizika. AML s promjenama povezanim s mijelodisplazijom u više različitih studija povezuju s nepovoljnim citogenetičkim promjenama (abnormalnostima kromosoma 7 i kompleksnim kariotipovima).^{19,31}

U ovom istraživanju svega 27% bolesnika ima nepovoljne citogenetičke promjene, što se ne uklapa u podatke SZO. Nepovezanost displastičnih promjena na zrelim stanicama hematopoeze s citogenetičkim nepovoljnim promjenama nije iznenađujuća. Većina autora koja je analizirala i dokazala povezanost višelinijске displazije s citogenetički nepovoljnim promjenama u svoje je istraživanje uključila bolesnike s AML koje su se razvile iz prethodne mijelodisplazije i/ili mijeloproliferacije kao i bolesnike s novootkrivenom AML sa znacima mijelodisplazije (višelinijskom displazijom).³¹ Miesner i sur.²⁰ su pokazali da je višelinijška displazija povezana s citogenetičkim abnormalnostima vezanim uz mijelodisplaziju, kao i s prethodno dijagnosticiranom mijelodisplazijom/mijeloproliferacijom. Oni su također usporedili bolesnike s AML sa znacima mijelodisplazije kod kojih je dijagnoza postavljena isključivo na osnovu morfoloških kriterija s AML koje nisu drugačije klasificirane. Pokazali su da nema značajne razlike u biološkom profilu i kliničkom ishodu između tih grupa. Na temelju svojih rezultata predložili su da u grupu AML s promjenama povezanim s mijelodisplazijom uđu samo AML koji su se razvile iz prethodne mijelodisplazije /mijeloproliferacije i AML koje imaju citogenetičke promjene povezane s mijelodisplazijom.²⁰

U našem istraživanju nije nađena povezanost između bolesnika s jače izraženim displastičnim promjenama (broj bodova >4) i nepovoljnim kariotipovima. Bodovanje displastičnih promjena koje je osmišljeno za ovo istraživanje nije se pokazalo dobrim prediktorom citogenetičkih abnormalnosti. Rezultati bi možda bili drugačiji da su u studiju uključeni i bolesnici koji su imali prethodno dijagnosticiranu mijelodisplaziju i/ili mijeloproliferaciju.

Miyazaki i sur.³² su u svom istraživanju analizirali citogenetičke promjene u bolesnika s AML s višelinijском displazijom. Iz svoje studije isključili su one bolesnike koji su prije dijagnoze akutne leukemije imali mijelodisplaziju ili podatke o kemoterapiji, terapiji zračenjem ili izlaganje toksičnim reagensima. Pokazali su da su prognostički povoljni kariotipovi izuzetno rijetki, u njihovom istraživanju najčešći kariotip (45,6%) je bio uredan kariotip. Naši rezultati su slični, 52% bolesnika ima uredan kariotip. Bolesnici s urednim kariotipom se prema SZO svrstavaju u grupu intermedijarnog rizika. U svom istraživanju Miyazaki i sur.³² nisu našli specifične citogenetičke promjene koje se mogu povezati s AML s višelinijском displazijom što je u skladu s rezultatima našeg istraživanja. Citogenetičke promjene koje se povezuju s mijelodisplazijom u našem istraživanju dokazane su kod 12 (23%) bolesnika.^{73,74}

Dobiveni rezultati govore u prilog razmišljanja Miyazaki i sur.³² da se novootkrivene AML s višelinijском displazijom biološki razlikuju od leukemija koje nastaju iz prethodne mijelodisplazije i sekundarnih leukemija kod kojih se često citomorfološki vide displastične promjene. Može se pretpostaviti da bolesnici s novootkrivenom AML sa znacima mijelodisplazije imaju kriptične kromosomske promjene koje nisu vidljive klasičnim citogenetičkim analizama. Biološki značaj višelinijске displazije u AML sa znacima mijelodisplazije zahtijeva daljnja istraživanja na molekularnoj razini.

6.4. Povezanost ekspresije *WT1* gena s morfološkim i citogenetičkim promjenama

U normalnoj koštanoj srži vrlo niska ekspresija *WT1* gena prisutna je kod nezrelih CD34+ stanica hematopoeze, dok se kod zrelih leukocita ona gubi.⁴⁶ Istraživanja su pokazala da je *WT1* gen prekomjerno ekspimiran u mijelodisplaziji te većini akutnih mijeloidnih i limfoblastičnih leukemija, kao i u blastičnoj krizi kronične mijeloidne leukemije.^{40,75} Činjenica da je ekspimiran u većini hematoloških bolesti čini ga je potencijalnim molekularnim biljgom maligne hematopoeze. Za predviđanje tijeka bolesti u bolesnika s akutnom leukemijom važno je prije samog početka liječenja utvrditi kliničke, citogenetičke i molekularne karakteristike. Kod bolesnika koji imaju normalan kariotip pojačana ekspresije *WT1* gena može se iskoristiti kao molekularni biljeg minimalne ostatne bolesti.⁵¹

Većina ispitivanih bolesnika ima pojačanu ekspresiju *WT1* gena (83%) što je u skladu s literaturnim podacima.^{76,77} Iako dio bolesnika sa slabije izraženim morfološkim promjenama (17%) nema pojačanu ekspresiju *WT1* gena, a svi bolesnici s jače izraženim morfološkim promjenama imaju, povezanost jačine morfoloških promjena s jačinom ekspresije *WT1* gena

nismo dokazali. Međutim dokazali smo povezanost jačine ekspresije *WT1* gena s brojem loza zahvaćenih displazijom, bolesnici s trilinijskom displazijom imaju jaču ekspresiju *WT1* gena.

Cilloni i sur.⁷⁵ su pokazali da je povećana ekspresija *WT1* u mijelodisplazijama koje nemaju povećan broj blasta, a to su objasnili mogućnošću da na ekspresiju *WT1* gena može utjecati tip i broj citogenetičkih promjena kao i broj citopenija. Opažanje Cilloni i sur. o mogućem utjecaju broja citopenija na ekspresiju *WT1* gena možemo povezati s našim zapažanjem o povezanosti broja loza zahvaćenih displazijom s ekspresijom *WT1* gena. Schmidt i sur.⁷⁸ su utvrdili povezanost ekspresije *WT1* gena s citogenetički nepovoljnim promjenama, što mi nismo potvrdili u našem istraživanju. Ovi donekle proturječni podaci sugeriraju da je pojačana ekspresija *WT1* gena rezultat utjecaja više različitih faktora i da se ne može predvidjeti jačinom morfoloških promjena.

6.5. Povezanost *FLT3*-ITD mutacije s morfološkim i citogenetičkim promjenama

U bolesnika s AML, citogenetičke promjene su još uvijek najvažniji prognostički faktor. Kako se u oko 50% bolesnika s AML nalazi uredan kariotip, traženi su novi prognostički pokazatelji na razini gena. Jedna od najviše istraživanih molekularnih promjena u AML u posljednjih petnaestak godina je mutacija *FLT3*-ITD. Prisustvo *FLT3*-ITD mutacije u bolesnika s AML prema većini studija povezano je s nepovoljnim tijekom bolesti.^{79,80} S obzirom da se AML s promjenama povezanim s mijelodisplazijom svrstavaju u grupu akutnih leukemija loše prognoze, logično je pretpostaviti da će u bolesnika koji imaju novootkrivenu AML sa znacima mijelodisplazije biti povećana učestalost *FLT3*-ITD mutacije.

U ovom istraživanju je u samo 13% bolesnika dokazana *FLT3*-ITD mutacija. Premda se taj rezultat može smatrati neočekivanim, pregledom literature nailazi se na podatke koji odgovaraju rezultatima naše studije.³¹ U našem istraživanju nije nađena povezanost izražaja morfoloških promjena na stanicama s mutacijom *FLT3*-ITD. Također nije nađena povezanost displazijom zahvaćenih loza s mutacijom *FLT3*-ITD. Ovaj rezultat ne možemo usporediti s rezultatima drugih autora, jer prema dostupnim literaturnim podacima nitko nije bodovao jačinu morfoloških promjena u novootkrivenim AML sa znacima mijelodisplazije i analizirao njihovu povezanost s *FLT3*-ITD mutacijom.

McCormik i sur.⁸¹ su pokazali da u njihovoj grupi AML s promjenama povezanim s mijelodisplazijom prevladava "divlji" tip *FLT3*, povezan s različitim, često nepovoljnim kariotipovima.⁸¹ U našem istraživanju niti jedan bolesnik s citogenetički nepovoljnim

promjenama nema dokazanu *FLT3*-ITD mutaciju tj. svi bolesnici kod kojih je mutacija dokazana imaju intermedijarne citogenetičke promjene. U literaturi se ne nalazi dovoljno podataka o povezanosti *FLT3*-ITD mutacije s citogenetičkim promjenama u bolesnika s novootkrivenim AML sa znacima mijelodisplazije. Autori koji su pokazali povezanost mutacije s citogenetički nepovoljnim promjenama u svoje su istraživanje uključili sve podgrupe AML s promjenama povezanim s mijelodisplazijom, stoga njihovi rezultati nisu usporedivi s rezultatima našeg istraživanja.³¹ Bao i sur.⁷⁹ su u svom istraživanju pokazali da su bolesnici s *FLT3* mutacijom i oni bez mutacije podjednako zastupljeni u grupama s različitim citogenetičkim rizikom, što može značiti da su *FLT3* mutacije i citogenetičke promjene biološka obilježja neovisna jedna o drugima.

6.6. Povezanost mutacije *FLT3*-ITD s ekspresijom *WT1* gena

Pojedina istraživanja povezuju pojačanu ekspresiju *WT1* s *FLT3*-ITD mutacijom u bolesnika s AML.⁴³ U literaturi se ne nalaze podaci o povezanosti *FLT3*-ITD mutacije s ekspresijom *WT1* u bolesnika s novootkrivenim AML sa znacima mijelodisplazije. Premda svi bolesnici koji u našoj studiji imaju dokazanu *FLT3*-ITD mutaciju imaju i pojačanu ekspresiju *WT1* gena njihova povezanost nema statističku značajnost. Ovakav rezultat se može objasniti malim brojem bolesnika kod kojih smo dokazali prisutstvo *FLT3*-ITD mutacije.

Biološki značaj višelinijske displazije na zrelim stanicama hematopoeze u novootkrivenim AML nije razjašnjen. Naše istraživanje je pokazalo da novootkrivne AML sa znacima mijelodisplazije nemaju karakteristične strukturne citogenetičke promjene, stoga možemo pretpostaviti da su displastične promjene povezane s kriptičnim kromosomskim abnormalnostima. Mutacijski status i prisustvo višelinijske displazije zahtijevaju daljnja istraživanja, posebno u bolesnika koji imaju uredan kariotip. Na osnovu naše studije možemo pretpostaviti kao i Miesner i sur.²⁰ da se novootkrivene AML sa znacima mijelodisplazije razlikuju od AML s promjenama povezanim s mijelodisplazijom nastalim iz prethodne mijelodisplazije i/ ili mijeloproliferacije.

ZAKLJUČCI:

1. U ispitivanoj skupini dokazana je pojačana ekspresija *WT1* gena u 83%, odnosno učestalost *FLT3*-ITD mutacije u 13% bolesnika.
2. Povezanost morfoloških promjena stanica s razinom ekspresije *WT1* gena i prisutnošću *FLT3*-ITD mutacije nije dokazana.
3. Povezanost nepovoljnih citogenetičkih promjena s razinom ekspresije *WT1* gena i prisutnošću *FLT3*-ITD mutacije nije dokazana.
4. Dokazana je povezanost displastičnih promjena na tri stanične loze s pojačanom razinom ekspresije *WT1* gena.
5. Upotrebljeni sustav bodovanja displastičnih morfoloških promjena nije dobar prediktor citogenetičkih promjena u bolesnika s AML sa znacima mijelodisplazije.

8. SAŽETAK

AML sa znacima mijelodisplazije je akutna leukemija s minimalno 20% blasta u koštanoj srži i/ili perifernoj krvi i morfološkim znacima displazije na dvije ili više staničnih loza u koštanoj srži. Smatra se da su AML sa znacima mijelodisplazije grupa visoko rizičnih leukemija, koje se obično javljaju u starijoj dobi i povezane su sa citogenetičkim promjenama koje imaju lošu prognozu. Molekularne promjene u AML sa znacima mijelodisplazije nisu još dovoljno istražene. Mutacije *FLT3* gena javljaju se u 1/3 bolesnika s AML i otvoreno je pitanje mogu li one biti povezane s morfološkim promjenama u AML sa znacima mijelodisplazije. Prema današnjim saznanjima gen *WT1* se može ponašati dvojako, kao tumor-supresorski gen i kao onkogen. U zdravim stanicama krvi i koštane srži ekspresija *WT1* je niska. Pojačana ekspresija *WT1* nađena je u većini akutnih leukemija, mijelodisplastičnom sindromu i blastičnoj krizi kronične mijeloične leukemije. Značenje ekspresije *WT1* u bolesnika s AML još je uvijek predmet istraživanja.

Cilj ovog rada bio je postaviti kriterij bodovanja morfoloških promjena zrelih stanica u AML sa znacima mijelodisplazije, ispitati povezanost morfoloških promjena sa citogenetičkim promjenama, utvrditi učestalost *FLT3*-ITD mutacije i ispitati razinu ekspresije *WT1* gena u ovoj skupini bolesnika te utvrditi moguću povezanost razine ekspresije *WT1* gena i učestalosti *FLT3*-ITD s morfološkim i citogenetičkim promjenama.

U ovom istraživanju nije nađena povezanost između bolesnika s jače izraženim displastičnim promjenama (broj bodova >4) i nepovoljnim kariotipovima. Bodovanje displastičnih promjena koje je osmišljeno za ovo istraživanje nije se pokazalo dobrim prediktorom citogenetičkih abnormalnosti.

Pojačana ekspresija *WT1* gena nalazi se u 83% bolesnika, nije dokazana povezanost jačine morfoloških i citogenetičkih promjena s razinom ekspresije *WT1* gena. U bolesnika s displastičnim promjenama na sve tri loze dokazana je s pojačana ekspresija *WT1* gena. *FLT3*-ITD mutacija je nađena u svega 13% bolesnika. Nije dokazana povezanost jačine morfoloških promjena s *FLT3*-ITD mutacijom, kao ni povezanost *FLT3*-ITD mutacije s nepovoljnim citogenetičkim promjenama.

Ovim istraživanjem nije potvrđena hipoteza da su u novootkrivenim AML sa znacima mijelodisplazije citomorfološke promjene jače u bolesnika koji imaju nepovoljne promjene kariotipa, *FLT3*-ITD mutaciju i pojačanu ekspresiju *WT1* gena.

Ključne riječi: AML sa znacima mijelodisplazije, citogenetičke promjene, ekspresija *WT1* gena, mutacija *FLT3*-ITD

9. SUMMARY

Morphologic and cytogenetic alterations, level of *WT1* expression, and duplication of *FLT3* gene in *de novo* acute myeloid leukaemia with myelodysplasia-related changes **Sunčica Ries, 2013**

AML with myelodysplasia related-changes (AML-MRC) is considered as high-risk leukaemia. AML-MRC is associated with higher age and unfavorable cytogenetics. *FLT3* gene mutations occur in one third of patients with AML. It is unknown whether they are linked to AML-MRC. The *WT1* gene can act both as a tumor-suppressor gene and an oncogene.

The aim of this study was to set scoring criteria for dysgranulocytopenia, dyserythrocytopenia and dysmegakaryocytopenia, to compare morphologic alterations with cytogenetic abnormalities, to assess the expression of *WT1* and frequency of *FLT3*-ITD and relate them to morphologic alterations and cytogenetic abnormalities in patients with AML-MRC.

No association between severe dysplastic changes and unfavorable karyotypes was found. Scoring dysplastic changes has not been demonstrated to be a good predictor of cytogenetic abnormalities. Positive correlation between trilineage dysplasia and overexpression of *WT1* gene was found. No relationship was found between severe morphological alterations and *FLT3*-ITD mutation or between *FLT3*-ITD and unfavorable cytogenetics.

The hypothesis that morphologic alterations in *de novo* diagnosed AML with myelodysplasia related-changes are stronger in patients with unfavorable cytogenetics, *FLT3*-ITD mutation and overexpression of the *WT1* gene was not confirmed.

Key words: AML with myelodysplasia-related changes, cytogenetic alterations, *WT1* gene expression, *FLT3*-ITD mutation

10. LITERATURA:

1. Virchow R. Zur pathologischen Pysiologie des Blutes. II. Weisses Blut. Virchows Arch path Anat Physiol 1847;1:563-572.
2. Virchow R. Die Leukämie. U: Virchow R, ured. Gesammelte Abhandlungen zur wissenschaftlichen Medizin. Frankfurt: Meidinger; 1856; str. 190-211.
3. Bennett JH. Two cases of hypertrophy of the spleen and liver, in which death took place from suppuration of blood. Edinburgh Med Surg J 1845; 64:413.
4. Gunz FW. Leukemia in the past. U: Henderson ES, Lister TA, ured. Leukemia. Philadelphia: WB Saunders Company; 1990; str. 3–11.
5. Gaynon PS, Zomorodian TJ, Pinkel D. History of leukemia: historical perspectives. U: Pui CH, ured. Childhood Leukemias. 3. izd. New York: Cambridge University Press; 2012. str. 1-20.
6. Mosler F. Klinische Symptome und Therapie der medullären Leukämie. Berl Klin Wochenschr 1876;13:702.
7. Naegeli O. Über rotes Knochenmark und Myeloblasten. Deutsch Med Wochenschr 1900; 26(18):287.
8. Piller GJ. Leukaemia-a brief historical review from ancient times to 1950. Br J Haematol 2001;112:282-292.
9. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick HR i sur. Proposals for the classification of the acute leukaemias: French-American-British (FAB) cooperative group. Br J Haematol 1976;33:451-8.
10. Bennet JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick HR i sur. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia: a report of the French-American-British cooperative group. Ann Inter Med 1985;103:620-5.
11. Labar B, Hauptman E. i sur. Hematologija. 2. izd. Zagreb: Školska knjiga; 2007. str. 201-31.

12. Vardiman JW, Brunning RD, Arber DA, Le Beau MM, Porwit A, Tefferi A i sur. Introduction and overview of classification of the myeloid neoplasms. U: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW, ured. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. 4. izd. Lyon: IARC Press; 2008. str. 18-30.
13. Heim S, Mitelman F. Cytogenetic analysis in the diagnosis of acute leukemia. *Cancer* 1992; 70:1701-9.
14. Arber DA, Brunning RD, Le Beau MM, Falini B, Vardiman JW, Porwit A i sur. Acute myeloid leukaemia and related precursor neoplasms. U: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW, ured. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. 4. izd. Lyon: IARC Press; 2008. str. 110-23.
15. Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* 2002;100:2292-302.
16. Arber DA, Brunning RD, Orazi A, Bain BJ, Porwit A, Vardiman JW i sur. Acute myeloid leukaemia with myelodysplasia related changes. U: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW, ured. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. 4. izd. Lyon: IARC Press; 2008. str. 124-6.
17. Brunning RD, Matutes E, Harris N.L, Flandrin G, Vardiman J, Bennett J i sur. Acute myeloid leukaemia: Introduction. U: Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW, ured. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. 3. izd. Lyon: IARC Press; 2001. str. 76-107.
18. Park S, Picard F, Dreyfus F. Erythroleukemia: a need for a new definition. *Leukemia* 2002;16:1399-401.
19. Haferlach T, Schoch C, Löffler H, Gassman W, Kern W, Schnittger S i sur. Morphologic dysplasia in de novo acute myeloid leukemia (AML) is related to unfavorable cytogenetics but has no independent prognostic relevance under the conditions of intensive induction

therapy:results of a mutiparameter analysis from the German AML Cooperative Group studies. *J Clin Oncol* 2003;21:256-65.

20. Miesner M, Haferlach C, Bacher U, Weiss T, Maciejewski K, Klein HU i sur. Multilineage dysplasia (MLD) in acute myeloid leukemia (AML) correlates with MDS-related cytogenetic abnormalities and a prior history of MDS or MDS/MPN but has no independent prognostic relevance: a comparison of 408 cases classified as “AML not otherwise specified” (AML-NOS) or “AML with myelodysplasia-related changes” (AML-MRC). *Blood* 2010;116:2742-51.

21. Bienz M, Ludwig M, , Mueller BU, Leibundgut EO, Ratschiller D, Solenthaler M i sur. Risk assessment in patients with acute myeloid leukemia and a normal karyotype. *Clin Cancer Res* 2005;11(4):1416-24.

22. Grimwade D, Walker H, Harrison G, Oliver F, Chatters S, Harrison CJ i sur.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(5):1312-20.

23. Grimwade D, Hills RK, Moorman AV, Walker H, Chatters S, Goldstone AH i sur. Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood* 2010;116(3):354-65.

24. Reikvam H, Hatfield KJ, Kittang AO, Hovland R, Bruserud Ø. Acute myeloid leukemia with the t(8;21) translocation: clinical consequences and biological implications. *J Biomed Biotechnol* 2011; 2011: 1-23.

25. Klus M, Haferlach T, Schnittger S, Kern W, Hiddemann W, Schoch C. Cytogenetic profile in de novo acute myeloid leukemia with FAB subtypes M0, M1, and M2: a study based on 652 cases analyzed with morphology, cytogenetics, and fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 2004;155(1):47-56.

26. Cho SR, Park SJ, Kim HJ, Park IJ, Choi JR, Jung HJ i sur. Acute promyelocytic leukemia with complex translocation t(5;17;15)(q35;q21;q22): case report and review of the literature. *J Pediatr Hematol Oncol* 2011; 33(7):326-9.
27. Liu PP, Hajra A, Wijmenga C, Collins FS. Molecular pathogenesis of the chromosome 16 inversion in the M4Eo subtype of acute myeloid leukemia. *Blood* 1995;85(9):2289-302.
28. Clozel T, Renneville A, Venot M, Gardin C, Kelaidi C, Leroux G, i sur. Slow relapse in acute myeloid leukemia with inv(16) or t(16;16). *Haematologica* 2009;94(10):1466-8.
29. Oyarzo MP, Pei Lin, Glassman A, Bueso-Ramos CE, Luthra R, Medeiros LJ. Acute myeloid leukemia with t(6;9)(p23;q34) is associated with dysplasia and a high frequency of *flt3* gene mutations. *Am J Clin Pathol* 2004;122:348-58.
30. Arber DA, Stein AS, Carter NH, Ikle D, Forman SJ, Slovak ML. Prognostic impact of acute myeloid leukemia classification. Importance of detection of recurring cytogenetic abnormalities and multilineage dysplasia on survival. *Am J Clin Pathol* 2003;119:672-80.
31. Wandt H, Schäkel U, Kroschinsky F, Prange-Krex G, Mohr B, Thiede C i sur. MLD according to the WHO classification in AML has no correlation with age and no independent prognostic relevance as analyzed in 1766 patients. *Blood* 2008;111:1855-61.
32. Miyazaki Y, Kuriyama K, Miyawaki S, Ohtake S, Sakamaki H, Matsuo T i sur. Cytogenetic heterogeneity of acute myeloid leukaemia (AML) with trilineage dysplasia: Japan adult leukaemia study group-AML 92 study. *Br J Haematol* 2003;120:56-62.
33. Döhner K, Döhner H. Molecular characterization of acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2008;93(7):976-82.
34. Chen J, Odenike O, Rowley JD. Leukaemogenesis: more than mutant genes. *Nat Rev Cancer* 2010;10(1):23-36.

35. Shiseki M, Kitagawa Y, Wang YH, Yoshinaga K, Kondo T, Kuroiwa H i sur. Lack of nucleophosmin mutation in patients with myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia with chromosome 5 abnormalities. *Leukemia & Lymphoma* 2007;48:2141-4.
36. Small D. FLT3 mutations: biology and treatment. *Am Soc Hematol Educ Program* 2006; 178-84.
37. Nakao M, Yokota S, Iwai T, Kaneko H, Horiike S, Kashima K i sur. Internal tandem duplication of the *flt3* gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1996;10:1911-8.
38. Naoe T, Kiyoi H. Gene mutations of acute myeloid leukemia in the genome era. *Int J Hematol* 2013;97(2):165-74.
39. Gilliland GD, Griffin JD. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood* 2002;100:1532-42.
40. Mrózek K, Marcucci G, Paschka P, Whitman SP, Bloomfield CD. Clinical relevance of mutations and gene-expression changes in adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics: are we ready for a prognostically prioritized molecular classification? *Blood* 2007;109(2):431-48.
41. Stirewalt DL, Kopecky KJ, Meshinchi S, Engel JH, Pogossova-Agadjanyan EL, Linsley J, i sur. Size of FLT3 internal tandem duplication has prognostic significance in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2006;107:3724-6.
42. Hohenstein P, Hastie ND. The many facets of the Wilms' tumour gene, WT1. *Human Molecular Genetics* 2006;15:196-201.
43. Barragan E, Cervera J, Bolufer P, Ballester S, Martin G, Fernandez P i sur. Prognostic implications of Wilms' tumor gene (WT1) expression in patients with de novo acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2004;89:926-33.
44. King-Underwood L, Pritchard-Jones K. Wilms' tumor (WT1) gene mutations occur mainly in acute myeloid leukemia and may confer drug resistance. *Blood* 1998;91:2961-8.

45. Gaidzik VI, Schlenk RF, Moschny S, Becker A, Bullinger L, Corbacioglu A i sur. Prognostic impact of WT1 mutations in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a study of the German-Austrian AML study group. *Blood* 2009;113:4505-11.
46. Owen C, Fitzgibbon J, Paschka P. The clinical relevance of Wilms tumour 1 (WT1) gene mutations in acute leukaemia. *Hematol Oncol* 2010;28:13-9.
47. Pozzi S, Geroldi S, Tedone E, Luchetti S, Grasso R, Colombo N i sur. Leukaemia relapse after allogeneic transplants for acute myeloid leukaemia: predictive role of WT1 expression. *Br J Haematol* 2013;160(4):503-9.
48. Kitawaki T, Kadowaki N, Fukunaga k, Kasai Y, Maekawa T, Ohmori K. Cross-priming of CD8⁺ T cells in vivo by dendritic cells pulsed with autologous apoptotic leukemic cells in immunotherapy for elderly patients with acute myeloid leukemia. *Exp Hematol* 2011;39(4):424-33.
49. Osborne D, Frost L, Tobal K, Liu Yin JA. Elevated levels of WT1 transcripts in bone marrow harvests are associated with a high relapse risk in patients autografted for acute myeloid leukaemia. *Bone Marrow Transplant* 2005;36(1):67-70.
50. Van Dijk JP, Knops GH, Van De Locht LT, Menke AL, Jansen JH, Mensink EJ i sur. Abnormal WT1 expression in the CD34-negative compartment in myelodysplastic bone marrow. *Br J Haematol* 2002 S;118(4):1027-33.
51. Cilloni D, Renneville A, Hermitte F, Hills RK, Daly S, Jovanovic JV i sur. Real-time quantitative polymerase chain reaction detection of minimal residual disease by standardized WT1 assay to enhance risk stratification in acute myeloid leukemia: a European LeukemiaNet study. *J Clin Oncol* 2009; 27:5195-201.
52. Knuutila S, Vuopio P, Elonen E, Siimes M, Kovanen R, Borgström GH i sur. Culture of bone marrow reveals more cells with chromosomal abnormalities than the direct method in patients with hematologic disorders. *Blood* 1981;58:369-75.

53. Keinanen M, Knuutila S, Bloomfield CD, Elonen E, de la Chapelle A. The proportion of mitoses in different cell lineages changes during short-term culture of normal human bone marrow. *Blood* 1986;67:1240–3.
54. Keinanen M, Knuutila S, Bloomfield CD, Elonen E, de la Chapelle A. Bone marrow cytogenetics: the lineage of dividing cells changes during the first few hours in culture. *Leukemia* 1987;1:32–7.
55. Seabright M. A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet* 1971;2:971-2.
56. Gozzeti A, Le Beau MM. Fluorescence in situ hybridizations: Uses and limitations. *Seminars in Hematol* 2000;37:320-33.
57. Speicher MR, Gwyn Ballard S, Ward DC. Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nat Genet* 1996;12:368–75.
58. Shi G, Weh HJ, Hossfeld DK. Identification of some marker chromosomes in acute leukaemia by fluorescence in situ hybridisation. *Hematol Oncol* 1993;11:81.
59. Chomczynski P, Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc* 2006;1:581-5.
60. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A i sur. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 2009;114(5):937-51.
61. Weinberg O, Seetharam M, Ren L, Seo K, Ma L, Merker JD i sur. Clinical characterization of acute myeloid leukemia with myelodysplasia-related changes as defined by the 2008 WHO classification system. *Blood* 2009 26;113(9):1906-8.
62. Döhner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, Burnett AK i sur. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* 2010;115(3):453-74.

63. Maurillo L, Buccisano F, Del Principe MI, Sarlo C, Di Caprio L, Ditto C i sur. Treatment of acute myeloid leukemia with 20-30% bone marrow blasts. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2013;5(1): e2013032.
64. Gale RP, Bennet JM. Are myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia one disease? *Leuk Res* 2009;33(3):351-4.
65. Gahn B, Haase D, Unterhalt M, Drescher M, Schoch C, Fonatsch C i sur. De novo AML with dysplastic hematopoiesis: cytogenetic and prognostic significance. *Leukemia* 1996;10(6):946-51.
66. Estienne MH, Fenaux P, Preudhomme C, Lai JL, Zandecki M, Lepellev P i sur. Prognostic value of dysmyelopoietic features in de novo acute myeloid leukaemia: a report on 132 patients. *Clin Lab Haematol* 1990;12(1):57-65.
67. Kahl C, Florschütz A, Müller G, Jentsch-Ullrich K, Arland M, Leuner S i sur. Prognostic significance of dysplastic features of hematopoiesis in patients with de novo acute myelogenous leukemia. *Ann Hematol* 1997;75(3):91-4.
68. Goasguen JE, Matsuo T, Cox C, Bennett JM. Evaluation of the dysmyelopoiesis in 336 patients with de novo acute myeloid leukemia: major importance of dysgranulopoiesis for remission and survival. *Leukemia* 1992;6(6):520-5.
69. Tamura S, Takemoto Y, Wada H, Itoh T, Mori A, Saheki K i sur. Significance of trilineage myelodysplasia in de novo acute myeloid leukaemia during remission rather than at diagnosis. *Br J Haematol* 1998; 101(4):743-8.
70. Sučić M, Zadro R, Burazer B, Labar B, Nemet D, Mrić M i sur. Acute promyelocytic leukemia M3: cytomorphic, immunophenotypic, cytogenetic, and molecular variants. *J Hematother Stem Cell Res* 2002;11(6):941-50.

71. Delaunay J, Vey N, Leblanc T, Fenaux P, Rigal-Huguet F, Witz F i sur. Prognosis of inv(16)/t(16;16) acute myeloid leukemia (AML): a survey of 110 cases from the French AML Intergroup. *Blood* 2003;102(2):462-9.
72. Mrózek K, Heerema NA, Bloomfield CD. Cytogenetics in acute leukemia. *Blood Rev* 2004;18:115-36.
73. Haase D. Cytogenetic features in myelodysplastic syndromes. *Ann Hematol* 2008;87(7):515-26.
74. Kawankar N, Vundinti BR. Cytogenetic abnormalities in myelodysplastic syndrome: an overview. *Hematology* 2011;16(3):131-8.
75. Cilloni D, Gottardi E, Messa F, Fava M, Scaravaglio P, Bertini M, i sur. Significant correlation between the degree of WT1 expression and the International Prognostic Scoring System score in patients with myelodysplastic syndroms. *J Clin Oncol* 2003;21:1988-95.
76. Paschka P, Marcucci G, Ruppert AS, Whitman SP, Mrózek K, Maharry K i sur. Wilms' tumor 1 gene mutations independently predict poor outcome in adults with cytogenetically normal acute myeloid leukemia:a cancer and leukemia group B study. *J Clin Oncol* 2008;26(28):4595-602.
77. Lim CK, Goh YT, Hwang WY, Ho LP, Sun L. Studies of Wilms' tumor (*WT1*) gene expression in adult acute leukemias in Singapore. *Biomark Insights* 2007;2:293-8.
78. Schmid D, Heinze G, Linnerth B, Tišljár K, Kusec R, Geissler K, i sur. Prognostic significance of WT1 gene expression at diagnosis in adult de novo acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1997;11:639-43.
79. Bao L, Wang X, Ryder J, Ji M, Chen Y, Chen H i sur. Prospective study of 174 de novo acute myelogenous leukemias according to the WHO classification: subtypes, cytogenetic features and FLT3 mutations. *Eur J Haematol* 2006;77:35-45.
80. Gale RE, Green C, Allen C, Mead AJ, Burnett AK, Hills RK i sur. The impact of FLT3 internal tandem duplication mutant level, number, size, and interaction with NPM1 mutations

in a large cohort of young adult patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2008;111(5):2776-84.

81. McCormick SR, McCormick MJ, Grutkoski PS, Ducker GS, Banerji N, Higgins RR i sur. FLT3 mutations at diagnosis and relapse in acute myeloid leukemia. *Arch Pathol Lab Med* 2010;134:1143-5.

11. ŽIVOTOPIS

Rođena sam u 1964. godine u Karlovcu, gdje sam završila osnovnu i srednju školu. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisala sam 1983. godine i diplomirala 1989. godine. Državni ispit za doktora medicine položila sam 1990. godine. Poslijediplomski studij iz Medicinske citologije slušala sam školske godine 1989/90. Radila sam kao liječnik opće medicine u DZ "Medveščak" u razdoblju od 1990. do 1993. godine. Specijalizaciju iz medicinske citologije za KBC Zagreb dobila sam 1993. godine, specijalistički ispit položila sam 1998. godine. Radim kao specijalist citolog u Kliničkom zavodu za patologiju i citologiju, KBC-a Zagreb. Od 2001. godine do 2005. godine bila sam tajnica Hrvatskog društva za kliničku citologiju. Doktorski poslijediplomski studij "Biomedicina i zdravstvo" upisala sam 2001/2002 godine.

Sudjelujem u nastavi stručnog poslijediplomskog studija iz kliničke citologije i u izobrazbi citotehnologa. Bila sam dio tima koji se sudjelovao u EOTRC-ovom protokolu 06011 vezanom uz mijelodisplastični sindrom. Redovni sam član Hrvatske kooperativne grupe za hematološke bolesti. Autor i koautor sam više znanstvenih i stručnih radova, aktivno sudjelujem na domaćim i inozemnim kongresima te tečajevima trajne edukacije.