Korelacija ekspresije SATB1 i Ki-67 s kromosomskim aberacijama u bolesnika s akutnom mijeloičnom leukemijom i mijelodisplastičnim sindromom

Dilber, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:171:422246

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET
UNIVERSITAS STUDIORUM SPALATENSIS
FACULTAS MEDICA

Repository / Repozitorij:

MEFST Repository

zir.nsk.hr

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU

MEDICINSKI FAKULTET

Ana Dilber

KORELACIJA EKSPRESIJE SATB1 I Ki-67 S KROMOSOMSKIM ABERACIJAMA U BOLESNIKA S AKUTNOM MIJELOIČNOM LEUKEMIJOM I MIJELODISPLASTIČNIM SINDROMOM

Diplomski rad

Akademska godina: 2020./2021.

Mentor:

Doc. dr. sc. Bernarda Lozić, prim. dr. med.

Split, srpanj 2021.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

MEDICINSKI FAKULTET

Ana Dilber

KORELACIJA EKSPRESIJE SATB1 I Ki-67 S KROMOSOMSKIM ABERACIJAMA U BOLESNIKA S AKUTNOM MIJELOIČNOM LEUKEMIJOM I MIJELODISPLASTIČNIM SINDROMOM

Diplomski rad

Akademska godina: 2020./2021.

Mentor:

Doc. dr. sc. Bernarda Lozić, prim. dr. med.

Split, srpanj 2021.

SADRŽAJ

1. UVOD 1
   1.1. Akutna mijeloična leukemija 2
      1.1.1.AML s balansiranim translokacijama ili fuzijom gena 4
      1.1.2.AML s kromosomskim aneuploidijama 5
      1.1.3.AML s normalnim kariotipom 7
   1.2.Mijelodisplastični sindrom 9
      1.2.1 Citogenetičke aberacije u mijelodisplastičnom sindromu 9
      1.2.2. Kompleksni kariotip u mijelodisplastičnom sindromu 10
   1.3.Specijalni AT - sekvencom bogati vezujući protein 1 (SATB1) 11
   1.4.Proliferacijski indeks Ki-67 13
2. CILJ ISTRAŽIVANJA 14
   2.1. Ciljevi istraživanja 15
   2.2. Hipoteza 15
3. ISPITANICI I METODE 16
   3.1. Ispitanici 17
   3.2. Materijali i metode rada 17
      3.2.1. Citogenetičke analize uzoraka 17
   3.3. Imunofluorescencija 18
      3.3.1. Protokol za imunofluorescenciju 18
      3.3.2. Imunofluorescencijska analiza 19
   3.4.Statistička analiza podataka 20
   3.5. Etička načela 20
4. REZULTATI 21
5. RASPRAVA 35
6. ZAKLJUČCI 40
7. POPIS CITIRANE LITERATURE 42
8. SAŽETAK 49
9. SUMMARY 51

Zahvaljujem se svojoj mentorici doc. dr. sc. Bernardi Lozić na svim savjetima i pomoći prilikom izrade diplomskog rada, na trudu, strpljenju i vremenu, a posebno hvala na ukazanom povjerenju i pruženoj prilici.

Zahvaljujem se svojim roditeljima i braći na beskrajnoj podršci, pomoći, razumijevanju i ljubavi. Zahvaljujem mojem suprugu i kćeri jer su mi oslonac, utočište, snaga i ljubav u svim trenucima.

Hvala prijateljima na svim lijepim trenucima tijekom ovih šest godina.

Zahvaljujem Mireli, Mariji i Nives na pomoći pri izradi diplomskog rada.

POPIS KRATICA

AML – akutna mijeloična leukemija (engl. *Acute myeloid leukemia*)

SZO – Svjetska zdravstvena organizacija

ELN – Europska Leukemia Net (engl. *European Leukemia Net*)

MDS – mijelodisplastični sindrom (engl. *Myelodisplastic syndrome*)

IPSS – Internacionalni prognostički sustav bodovanja (engl. *International prognostic scoring system*)

IPSS-R – Revidirani internacionalni prognostički sustav bodovanja (engl. *International prognostic scoring system revised*)

CML – kronična mijeloična leukemija (engl. *Chronic myeloid leukemia*)

ALL – akutna limfocitna leukemija (engl. *Acute lymphocytic leukemia*)

SATB1 – specijalni AT sekvencom bogati vezujući protein 1 (engl. *Special AT-rich binding protein 1*)

URE – uzvodni regulatorni element (engl. *Upstream regulatory element*)

FISH – Fluorescentna in situ hibridizacija (engl. *Fluorescence in situ hybridization*)

ISCN – Međunarodni sustav za humanu citogenomsku klasifikaciju (engl. *International System for human cytogenomic nomenclature*)

IRS – imunoreaktivni sustav bodovanja (engl. *immunoreactive score*)

SI – intenzitet bojanja (engl. *staining intensity*)

PP – postotak pozitivnih stanica (engl. *percentage of positive cells*)

PI – indeks proliferacije (engl. *proliferative index*)

1. UVOD

1.1. Akutna mijeloična leukemija

Leukemije su maligne bolesti hematopoetskog sustava podrijetlom iz koštane srži, a nastaju abnormalnom klonalnom ekspanzijom bijelih krvnih stanica (1). Akutna mijeloična leukemija (AML od engl. *Acute Myeloid Leukemia*) je okarakterizirana klonalnom ekspanzijom nediferenciranih mijeloidnih prekursorskih stanica što rezultira poremećenom hematopoezom i zatajenjem koštane srži (2). Incidencija akutnih leukemija je 4/100 000 godišnje, a AML čini 70% svih slučajeva. Incidencija raste s porastom dobi, a najučestalija je u osoba iznad 70 godina. Bolest se češće javlja u muškaraca (3).

Prema klasifikaciji Svjetske zdravstvene organizacije (SZO) iz 2016. godine akutne mijeloične leukemije razlikuju se po kliničkim, citogenetičkim, imunofenotipskim, molekularnim i morfološkim karakteristikama. Sve navedene karakteristike nužne su za točnu dijagnozu i specifičnu klasifikaciju AML-a. Ovakav pristup zahtijeva koordinaciju između hematologa, patologa, referentnih laboratorija, citogenetičara i molekularnih patologa. Ovakva suradnja omogućuje preciznu klasifikaciju AML-a koja uključuje prognostički značaj, a time i možebitni novi pristup liječenju (4).

Prema SZO iz 2016. godine AML su podijeljene u 6 skupina (Tablica 1.). U prvoj skupini je AML s ponavljajućim citogenetičkim promjenama u kojoj je inkorporirano osam kategorija povezanih sa specifičnim balansiranim citogenetičkim promjenama. U drugoj skupini su AML s promjenama povezanim s mijelodisplazijom. Treća skupina su AML povezane s prethodnom primjenom citotoksične terapije. Četvrtu skupinu čine neklasificirane AML, a petu predstavlja mijeloidni sarkom. Posljednju, odnosno šestu skupinu, čine mijeloidne proliferacije povezane s Downovim sindromom (4). Glavna razlika između SZO klasifikacije i drugih stratifikacijskih modela, kao što je ELN (engl. *European Leukemia Net*), je kategorizacija prema displastičnoj morfologiji koja je uz ranije navedene karakteristike važna u dijagnozi AML povezane s mijelodisplazijom. Displastične morfološke promjene u više od 50% stanica nazivaju se multilinijska displazija i prediktor su lošije prognoze (4,5).

Tablica 1. Klasifikacija akutnih mijeloičnih leukemija prema SZO iz 2016. godine. (Preuzeto i prilagođeno prema referenciji (4))

1. AML s ponavljajućim citogenetskim promjenama
AML s t(8;21)(q22;q22.1); *RUNX1-RUNX1T1*
AML s inv(16)(p13.1q22) ili t(16;16)(p13.1;q22); *CBFB-MYH11*
APL s *PML-RARA*
AML s t(9;11)(p21.3;q23.3); *KMT2A-MLLT3*
AML s t(6;9)(p23;q34.1); *DEK-NUP214*
AML s inv(3)(q21.3q26.2) ili t(3;3)(q21.3;q26.2); *GATA2* , *MECOM*
AML (megakarioblastična) s t(1;22)(p13.3;q13.3); *RBM15-MKL1*
Trenutni entitet: AML s *BCR-ABL1*
AML s mutacijom *NPM1*
AML s bialelnim mutacijama *CEBPA*
Trenutni entitet: AML s mutacijom *RUNX1*
2. AML s promjenama povezanih s mijelodisplazijom
3. AML vezana uz terapiju
4. AML koja nije drugačije klasificirana
AML s minimalnom diferencijacijom
AML bez sazrijevanja
AML sa sazrijevanjem
Akutna mijelomonocitna leukemija
Akutna monoblastična/monocitna leukemija
Čista eritroidna leukemija
Akutna megakarioblastična leukemija
Akuna bazofilna leukemija
Akutna panmijeloza s mijelofibrozom
5. Mijeloidni sarkom
6. Mijeloidne proliferacije vezane uz Downov sindrom
Prolazna abnormalna mijelopoeza
Akutna mijeloična leukemija povezana s Downov sindrom

Incidencija AML-a raste s dobi. Studije na normalnim hematopoetskim stanicama u zdravih pojedinaca pokazuju da postoji porast stečenih mutacija s dobi, odnosno u desetogodišnjem periodu nastaje jedna mutacija (6). Stoga incidencija stečenih mutacija u koštanoj srži raste s dobi, kao i vjerojatnost stjecanja mutacije gena koja će procesom klonalne selekcije postati prekursor u razvoju malignih hematopoetskih stanica (7).

Citogenetička analiza može identificirati kromosomske promjene u većine pacijenata (55%) s AML, a u preostalih se nalazi uredan kariotip. Analiza kariotipa je ključna za terapijski pristup i procjenu prognoze bolesti (8). Ovisno o zahvaćenosti pojedinih kromosoma i tipu aberacije bolest može imati povoljnu, intermedijarnu i nepovoljnu prognozu (5).

Razvoj biomedicine i mogućnost sekvenciranja cijelog ljudskog genoma dovodi do spoznaje da je AML kompleksna, dinamična bolest u čiji su nastanak uključeni brojni geni, a nerijetko uključuje više od jedne mutacije gena (9). Zapažanje da se citogenetičke abnormalnosti ne preklapaju i da postoji jasna povezanost između citogenetičkih promjena i kliničke prezentacije, terapijskog odgovora, stope relapsa bolesti i prosječnog preživljenja dovelo je do razvoja molekularnih klasifikacija i bolje stratifikacije rizika (2,4). Prve analize genoma u AML bolesnika pokazale su tri obrasca genomske nestabilnosti:

a) AML s balansiranim translokacijama ili fuzijom gena;
b) AML s kromosomskim aneuploidijama;
c) AML s normalnim kariotipom u kojem dominiraju mutacije gena (7).

1.1.1. AML s balansiranim translokacijama ili fuzijom gena

AML s pridruženim balansiranim translokacijama u većini slučajeva pokazuje povoljan tijek bolesti. Uz balansirane translokacije rijetko se nalaze ostale mutacije gena, a one koje se najčešće nalaze su mutacije signalnih gena: *NRAS, FLT3, KIT,* tirozin ili serin-treonin kinaze te tirozinske fosfataze (9). AML s pridruženim balansiranim translokacijama najčešće se javlja u mlađoj životnoj dobi uz jednostavniji genom i manji broj stečenih mutacija (7). Trenutno ima najmanje osam različitih molekularnih podtipova koji su svrstani prema SZO klasifikaciji kao zasebni kliničko-patološki entiteti, a uključuju: *PML-RARA* definiran kao t(15;17)(q22;q21), *RUNX1-RUNX1T1* definiran kao t(8;21)(q22;q22.1); *CBFB-MYH11* definiran kao inv(16)(p13.1q22) ili t(16;16)(p13.1;q22), *MLLT3-KMT2A*, definiran kao t(9;11)(p21.3;q23.3),

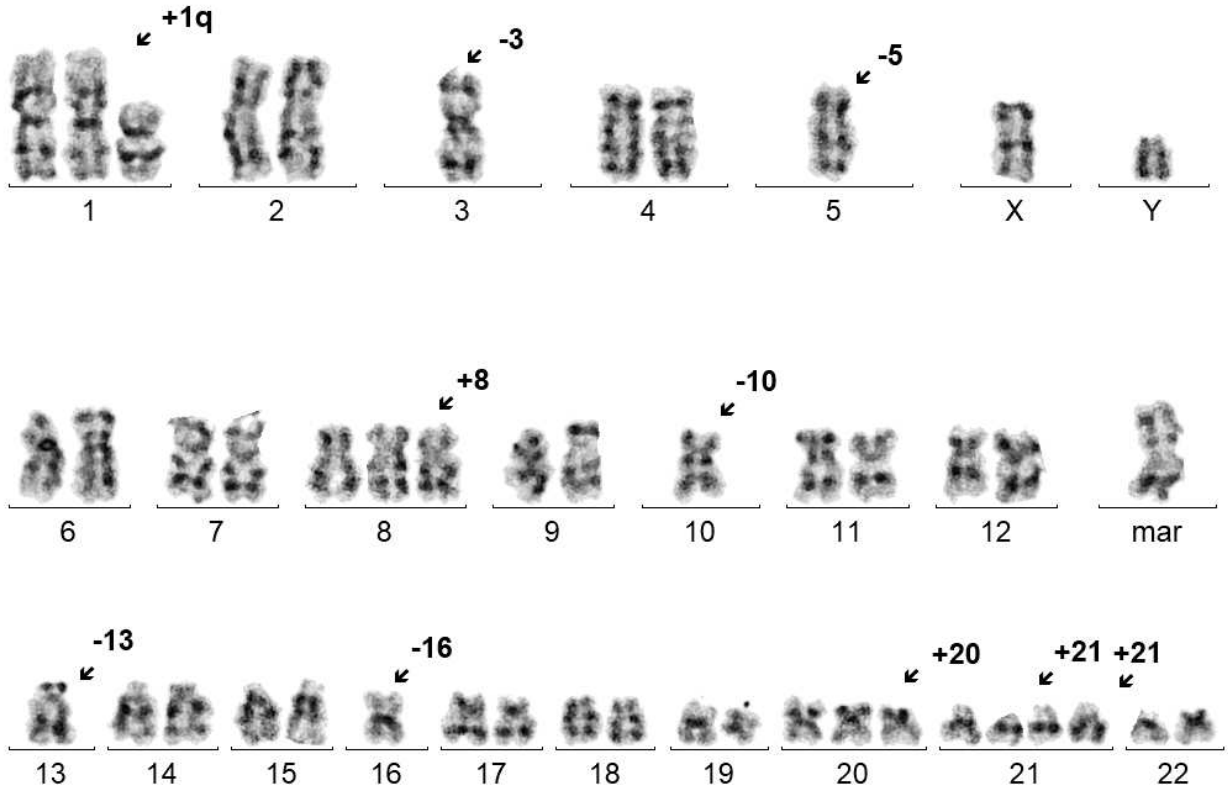
DEK-NUP214 definiran kao t(6;9)(p23;q34.1), *GATA2*, *MECOM* definiran kao inv(3)(q21.3q26.2)/t(3;3) (q21.3;q26.2) i *RBM15-MKL1*, definiran kao t(1;22)(p13.3;q13.3) (10). Pridružene balansirane translokacije nalaze se u oko 1 do 10% slučajeva akutne mijeloične leukemije (10,11).

1.1.2. AML s kromosomskim aneuploidijama

AML s pridruženim kromosomskim aneuploidijama predstavlja heterogenu skupinu bolesnika. U ovoj skupini se češće nalaze citogenetičke promjene u smislu kompleksnog kariotipa koji se definira nalazom tri ili više kromosomskih promjena. Najučestalije kromosomske aberacije su: -5/5q, -7/7q, -17/17p i -12/12p (7). Oko 50% pacijenata u ovoj skupini imaju mutaciju *TP53*. Kompleksni kariotip češće se javlja u muškaraca (55%), a medijan dobi je 45 godina (3).

1.1.2.1. Kompleksni kariotip u de novo AML

Kompleksni kariotip definira se nalazom tri ili više kromosomskih promjena, ima loš prognostički značaj, a nalazi se u 10 do 12% bolesnika s AML-om. Njegova incidencija raste s dobi te je dva puta učestaliji u sekundarnim, s terapijom povezanim AML-om kao i AML-om povezanim s MDS-om, u usporedbi s *de novo* AML-om. Nebalansirane kromosomske promjene su najučestalije, a u većini slučajeva uključuju gubitak dijela kromosoma. Najčešća kromosomska aberacija je delecija dugog kraka kromosoma 5 (5q-) koja se nalazi u otprilike 80% bolesnika s kompleksnim kariotipom. Delecije 7q i 17q sljedeće su po učestalosti, a nalaze se u otprilike polovine slučajeva s AML-om. Aberacije kromosoma 5q, 7q i 17q često se nalaze zajedno, a otprilike 85% bolesnika s AML-om nositelji su jedne od ovih aberacija. Mrózek i sur. bolesnike s prethodno spomenutim kromosomskim aberacijama svrstavaju u skupinu tipičnog kompleksnog kariotipa, dok ostale abnormalnosti odgovaraju atipičnom kompleksnom kariotipu te pokazuju da se u bolesnika s tipičnim kariotipom nalazi veći broj kromosomskih promjena. Atipični kompleksni kariotip češće se javlja u ranijoj životnoj dobi, bolesnici imaju veći broj leukocita kao i veći broj blasta u perifernoj krvi i koštanoj srži, a u konačnici i bolju stopu preživljenja (12).



Slika 1. Kariotip bolesnika s akutnom mijeloičnom leukemijom. Primjer kompleksnog kariotipa (47-51,XY,+(1)(q),-3,del(5)(q),+8,-10,-13,-16,+20,+21,+22,+mar1[cp18]/46,XY[2])
(Izvor:arhiva Citogenetskog laboratorija, KBC Split)

1.1.3. AML s normalnim kariotipom

Bolesnici s AML-om u kojih nalazimo normalan kariotip pripadaju grupi s povoljnom ili intermedijarnom prognozom bolesti (7), a čine najveću citogenetičku podskupinu, odnosno 40 do 49% bolesnika s AML-om (13). Najvažnije mutacije gena koje se najčešće nalaze u citogenetički normalnoj AML su *FLT3-ITD* i *BAALC*. Navedene mutacije nepovoljno utječu na progresiju bolesti, odgovor na kemoterapiju i stopu relapsa u bolesnika s AML-om, dok su izolirane mutacije *NPM1* i *CEBPA* pokazatelji boljeg ishoda (13).

Iako većina bolesnika pokazuje dobar odgovor na indukcijsku kemoterapiju učestala je refraktorna bolest, a relaps predstavlja najznačajniji uzrok neuspješnog liječenja (2). Unatoč razvoju terapijskih strategija za limfoidne maligne bolesti, terapijske mogućnosti za mijeloidne maligne bolesti još uvijek nisu dovoljno razvijene zbog manjeg razumijevanja genetičke osnove i patofiziologije AML-a (14). Otkrića kromosomskih i epigenetičkih promjena koje se nalaze u osnovi bolesti vode ka poboljšanju stratifikacije rizika i razvoju efikasnijih terapijskih pristupa (15).

Tablica 2. Stratifikacija rizika prema ELN 2017 ovisno o genetskim biljezima (Preuzeto i prilagođeno prema referenciji (16))

Kategorija rizika	**Genetski poremećaj**
Povoljni	t(8;21)(q22;q22.1); *RUNX1-RUNX1T1*
	inv(16)(p13.1q22) ili t(16;16)(p13.1;q22); *CBFB-MYH11*
	Mutacija *NPM1* bez *FLT3-ITD* ili s *FLT3-ITD*low
	Bialelna mutacija *CEBPA*
Intermedijarni	Mutacija *NPM1* i *FLT3-ITD*high
	Wild type NPM1 bez *FLT3-ITD* ili s *FLT3-ITD*low (bez genetskih lezija nepovoljnog rizika)
	t(9;11)(p21.3;q23.3); *MLLT3-KMT2A*
	Citogenetske promjene koje nisu klasificirane kao povoljne ili nepovoljne
Nepovoljni	t(6;9)(p23;q34.1); *DEK-NUP214*
	t(v;11q23.3.); *KMT2A* rearanžman
	t(9;22)(q34.1;q11.2); *BCR-ABL1*
	inv(3)(q21.3q26.2) ili t(3;3)(q21.3;q26.2); *GATA2*, *MECOM(EVI1)*
	-5 ili del(5q); -7; -17/abn(17p)
	Kompleksni kariotip, monosomalni kariotip
	Wild type NPM1 i *FLT3-ITD*high
	Mutacija *RUNX1*
	Mutacija *ASXL1*
	Mutacija *TP53*

1.2. Mijelodisplastični sindrom

Mijelodisplastični sindrom (MDS) predstavlja heterogenu skupinu mijeloidnih klonalnih bolesti matične hematopoetske stanice karakteriziranih displastičnom i neučinkovitom hematopoezom i rizikom transformacije u AML. Bolest se učestalo prezentira citopenijom jedne ili više loza u perifernoj krvi, makrocitozom, anizocitozom i poikilocitozom (17).

Dijagnoza se postavlja na temelju rezultata analize punktata koštane srži prema morfološkim, citogenetskim i imunofenotipskim karakteristikama stanica hematopoeze. Zbog heterogenosti ovog sindroma postoji i velika razlika u prirodnom tijeku bolesti. Pojedini bolesnici umiru unutar nekoliko mjeseci i stoga im treba omogućiti što ranije agresivno liječenje, uključujući i transplantaciju alogeničnih matičnih stanica, dok drugi žive desetljećima s dijagnozom MDS-a i potrebno je samo kliničko praćenje (17). Osnovni klinički pristup MDS-u za dobivanje adekvatne prognostičke informacije jest stratifikacija bolesnika u rizične skupine prema sustavima bodovanja, a najčešće se koriste Internacionalni prognostički sustav bodovanja (IPSS od engl. *International Prognostic Scoring System*) (18), odnosno revidirani Internacionalni prognostički sustav bodovanja (IPSS-R od engl. *Revised International Prognostic Scoring System*) koji uključuju citogenetički nalaz, broj blasta u koštanoj srži i stupanj citopenije (19).

1.2.1 Citogenetičke aberacije u mijelodisplastičnom sindromu

Kromosomske aberacije nalaze se u oko 50% bolesnika s *de novo* MDS-om i u oko 80% bolesnika sa sekundarnim MDS-om, povezanih s prethodnom primjenom citotoksične terapije. Dok su balansirane kromosomske aberacije učestale u AML i kroničnoj mijeloičnoj leukemiji (CML od engl. *Chronic Myeloid Leukemia*), u MDS-u su rijetke, a učestalije su nebalansirane promjene genoma (delecije i duplikacije pojedinih kromosoma ili njihovih dijelova). Kromosomske promjene uključuju delecije: 3q, 5q, 7q, 11q, 12p i 20q, monosomije: 5 i 7, trisomije: 8 i 19, izokromosom 17q te gubitak Y kromosoma (20).

Najučestalije su intersticijske delecije dugog kraka kromosoma 5 (del(5q) ili 5q-) sa ili bez dodatnih kariotipskih aberacija u *de novo* nastalom MDS-u. MDS s izoliranom delecijom 5q- predstavlja poseban patološki entitet definiran, prema SZO iz 2016. godine, kao displazija u jednoj do tri loze, nalazom <1% blasta u perifernoj krvi i <5% blasta u koštanoj srži te prisutnosti delecije 5q same ili s jednom dodatnom kromosomskom aberacijom, a da ne uključuje

monosomiju ili deleciju 7q (4,21). Nalazi se u 10 do 15% pacijenata s MDS-om i ima povoljan prognostički značaj (20,22).

Monosomija 7 i delecija 7q nalaze se u 10% *de novo* MDS-a i 50% MDS-a povezanih s prethodnom primjenom citotoksične terapije. Prisustvo ove promjene uvijek je povezano s lošom prognozom. Izoliranu trisomiju kromosoma 8 nalazimo u 5 do 7% bolesnika s MDS-om te ima intermedijarni prognostički značaj (23).

Najučestalije kromosomske aberacije navedene u Tablici 3. važne su za klasifikaciju i procjenu rizika progresije MDS-a u AML.

Tablica 3. IPSS citogenetičke rizične skupine (Preuzeto i prilagođeno prema referenciji (18))

Prognostička skupina	**Citogenetičke abnormalnosti**
Povoljna	Normalan, -Y, del(11q) , del(5q), del(20q)
Intermedijarna	Ostale abnormalnosti
Nepovoljna	Kompleksan (≥3 abnormalnosti), abnormalnosti kromosoma 7

1.2.2. Kompleksni kariotip u mijelodisplastičnom sindromu

Ne postoji jasna definicija kompleksnog kariotipa za različite hematološke maligne bolesti. Kompleksni kariotip definiran je nalazom tri ili više kromosomskih promjena, ali neki autori smatraju da je nužan nalaz pet ili više kromosomskih promjena (24). Haase i sur. u svojem istraživanju pokazali su da se s porastom broja kromosomskih aberacija u kompleksnom kariotipu smanjuje stopa preživljenja u bolesnika s MDS-om (20). Prema posljednjim istraživanjima otprilike 30% slučajeva *de novo* MDS-a povezana su s kompleksnim kariotipom u vrijeme inicijalne citogenetičke evaluacije (25). U MDS-u povezanim s terapijom učestalije su kromosomske aberacije, u usporedbi s *de novo* MDS-om, a među najučestalijima su: -7 (14%), -5q (28%), -5 (11%), der(21q), +8, -7q, der (12q), t(1;7), -12, der(17q), der(3q), der(3q) i -18 (26). Anomalije kromosoma 7 i kompleksni kariotip spadaju u grupu visokog rizika od progresije u AML, ali i ostale leukemije, uključujući akutnu limfocitnu leukemiju (ALL od engl. acute lymphocytic leukemia) (27). Svaka kromosmska aberacija nosi različit prognostički značaj pa je tako del(5q) povezana s povoljnom, del 7(q)/-5/-7 povezane su s nepovoljnom, a +8 s

intermedijarnom prognozom (28). Međutim, što je veći broj neovisnih kromosomskih aberacija to je prognoza bolesti lošija. Del 5q, kao jedina kromosomska aberacija, ima povoljnu prognozu, ali del 5q unutar kompleksnog kariotipa ima nepovoljnu prognozu (29).

1.3. Specijalni AT - sekvencom bogati vezujući protein 1 (SATB1)

AT sekvencom bogati vezujući protein 1 (SATB1 od engl. *special AT-rich sequence–binding protein 1*) je kromatin remodelirajući protein koji veže nuklearni matriks i DNA u jedinstvenu nuklearnu strukturu (14), a kodiran je istoimenim genom koji se nalazi na kratkom kraku kromosoma 3, lokusu p24.3 (15). SATB1 je nužan u razvoju timocita i aktivaciji pomagačkih T stanica tipa 2 (Th2 od engl. *T-helper cells 2*), a bez njegove aktivnosti razvoj timocita je blokiran na stadiju CD4+CD8+ te se Th2 stanice ne mogu aktivirati i producirati citokine (15). Dosadašnja istraživanja pokazala su da se gen *SATB1* dominantno eksprimira u timusu, a nalazi se i u slezeni, limfnim čvorovima te koštanoj srži (14). SATB1 protein ima važnu ulogu u obnavljanju matičnih hematopoetskih stanica, diferencijaciji limfoidnih stanica, epidermalnoj diferencijaciji i moždanoj funkciji (14,30,31). SATB1 regulira ekspresiju više od 1000 gena, od kojih su brojni uključeni u karcinogenezu poput: *ERRB2, ABL1, MMP-2, CDH1, VEGFB* i *TGFβ1* (31). Poremećena ekspresija gena *SATB1* stoga je povezana s raznim vrstama solidnih tumora, uključujući karcinom nazofarinksa, larinksa, želudca, dojke, gušterače, prostate, jetre i pluća (32). Visoka ekspresija *SATB1* obično je u korelaciji s visokim metastatskim potencijalom i lošim prognostičkim ishodom (33,34). Uloga SATB1 ostaje kontroverzna i čini se da je specifična za određenu vrstu karcinoma. Posebno su visoke razine ekspresije SATB1 povezane s lošom prognozom karcinoma debelog crijeva (35), dok je nedostatak SATB1 povezan s lošom prognozom kod karcinoma pluća skvamoznih stanica (36).

Suprotno opažanjima kod solidnih tumora, čini se da povećana ekspresija SATB1 ima povoljan učinak i suzbija napredovanje leukemije i limfoma. U prijašnjim istraživanjima pokazano je da nedostatak SATB1 uzrokuje ozbiljnu imunodeficijenciju i višestruke poremećaje u razvoju T-stanične loze (31,37,38). Ranija istraživanja pokazala su sniženu ekspresiju gena *SATB1* u T staničnim leukemijama (39).

Dosadašnja istraživanja ukazala su na povezanost SATB1 i transkripcijskog faktora PU.1 u nastanku akutne mijeloične leukemije (40). Transkripcijski faktor PU.1 bitan je za razvoj mijeloidne loze, a u slučaju da mu se naruši funkcija dovodi do blokiranja razvoja mijeloidnih i B stanica, kao i do oštećenja funkcije hematopoetskih matičnih stanica, uključujući blok diferencijacije prema zajedničkim mijeloidnim i limfoidnim prekursorima (41). PU.1 ima više uloga tijekom normalne hematopoeze, djeluje kao transkripcijski regulator ciljnih gena te kao inhibitor drugih transkripcijskih regulatora, često kroz protein - protein interakcije (42).

Transkripcijska kontrola ekspresije gena *PU.1* posredovana je distalno uzvodnim regulatornim elementom (URE od engl. *upstream regulatory element*) koji je evolucijski visoko očuvan u svim vrstama, uključujući miševe i ljude. Miševi kojima nedostaje URE imaju 80% smanjenu ekspresiju PU.1 u koštanoj srži i razvijaju akutnu mijeloičnu leukemiju (AML) s učestalim kromosomskim aberacijama (43). U ljudi, URE, koji sadrži distalni pojačivač gena *PU.1*, lociran je na kratkom kraku kromosoma 11, a sekvenciranjem istog u bolesnika s AML-om pronađen je konstitucijski SNP. Homozigoti za navedeni SNP učestaliji su 2,4 puta u AML bolesnika s kompleksnim kariotipom u odnosu na grupu AML bolesnika s normalnim kariotipom. U istoj studiji pokazano je da protein SATB1 vezanjem na URE posredno utječe na dugoročnu transkripcijsku regulaciju PU.1, a njegovo vezanje je značajno reducirano zbog SNP-a što potvrđuje hipotezu navedenog istraživanja da SATB1 ima ulogu pozitivnog regulatora PU.1 ekspresije u mijeloidnim stanicama. Podatci iste studije pokazuju da SATB1 može djelovati kao transkripcijski aktivator u mijeloidnim stanicama te može biti i pozitivni i negativni regulator transkripcije, ovisno o staničnom kontekstu i ciljnom genu (40).

Dosadašnja istraživanja pokazala su sniženu ekspresiju SATB1 u bolesnika s AML-om pri dijagnozi, a nakon ulaska u remisiju ekspresija gena se povećala (14). Ista studija je pokazala da snižena ekspresija gena *SATB1* regulira rast leukemijskih stanica aktivacijom NF-κB signalnog puta (14). Studije na miševima pokazuju da snižena ekspresija Satb1 utječe na diobu matičnih hematopoetskih stanica i aktivira ih pa se većina stanica nalazi u G1 fazi (44).

1.4. Proliferacijski indeks Ki-67

Ki-67 je veliki nuklearni nehistonski protein, kodiran genom lokaliziranim na 10q25. Izražava se na kraju G1, S i G2 faze da bi se postigla maksimalna ekspresija u mitozi. Nije izražen u G0, što znači da je njegova ekspresija apsolutni uvjet za proliferaciju. Činjenica da je protein Ki-67 prisutan tijekom svih aktivnih faza staničnog ciklusa (G1, S, G2 i mitoza), a odsutan u odmarajućim stanicama (G0), čini ga izvrsnim biljegom za proliferaciju (45). Ovi parametri staničnog ciklusa različito su izraženi u svakoj od vrsta akutnih leukemija (46).

Ekspresija Ki-67 proteina ovisi o stupnju staničnog ciklusa u kojem je stanica imuno obojena. Ki-67 je važan za prognostičku procjenu mnogih solidnih tumora i limfoma. Iako se tijekom prošlih desetljeća proučavala upotreba proliferativnih i (anti)apoptotičkih markera kao objektivnih parametara u dijagnostičkom procesu mijeloidnih malignih bolesti, oni nisu inkorporirani kao biomarkeri u kliničku dijagnozu. Nedavni razvoj u multiparametarskoj protočnoj citometriji omogućuje kvantificiranje proliferativnih i (anti)apoptotičkih pokazatelja u mijeloidnim stanicama tijekom njihovih različitih faza sazrijevanja kao izdvojenih linija hematopoetskih stanica (47). U normalnoj koštanoj srži tri glavne stanične linije hematopoeze pokazuju stopu proliferacije u skladu s njihovim životnim vijekom i fiziološkim zahtjevima. Nezrele stanične populacije pokazuju visok postotak ekspresije Ki-67 koji se smanjuje uzastopnim fazama sazrijevanja (48). Istraživanje Alexandrakis i sur., na 54 uzorka koštane srži bolesnika s MDS-om, pokazalo je da je proliferativna frakcija Ki-67 mijeloidnih stanica značajno veća u visokorizičnoj skupini MDS-a u usporedbi s niskorizičnom skupinom (49).

Povezanost SATB1 i mijeloidnih malignih bolesti do sada je nedovoljno istražena kao i njegova uloga u nastanku i progresiji istih. Isto tako Ki-67 kao proliferativni marker koji se rabi za prognostičku procjenu mnogih solidnih tumora i limfoma nije inkorporiran kao biomarker u dijagnozu mijeloidnih malignih bolesti. Stoga ćemo u ovom istraživanju ispitati na nestimuliranim kultiviranim stanicama koštane srži, imunofluorescencijom, metodom dvostrukog bojanja, istovremenu ekspresiju SATB1 i Ki-67 u bolesnika s AML-om i MDS-om u kojih je prethodno određen kariotip iz iste suspenzije stanica.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

2.1. Ciljevi istraživanja

1. Istražiti ekspresiju proteina SATB1 i Ki-67 iz arhiviranih uzoraka fiksiranih stanica suspenzija koštane srži u bolesnika s AML-om i MDS-om i u kontrolnoj skupini.
2. Utvrditi moguće korelacije ekspresije SATB1 s kliničko-patološkim podatcima bolesnika s AML-om i MDS-om.
3. Utvrditi postoji li razlika u ekspresiji SATB1 i Ki-67 između ispitivane i kontrolne skupine.
4. Utvrditi moguće korelacije ekspresije proteina SATB1 i Ki-67 s citogenetičko-prognostičkim skupinama.

2.2. Hipoteza

Ekspresija SATB1 bit će niska, a ekspresija Ki-67 visoka u bolesnika s kariotipskim aberacijama.

3. ISPITANICI I METODE

3.1. Ispitanici

U istraživanje je uključeno 53 bolesnika iznad 18 godina. U obzir su uzeti bolesnici s dijagnozom novootkrivene AML i MDS u ispitivanoj skupini. Dijagnoza leukemije bazirana je na kriterijima SZO iz 2016. godine. Kontrolnu skupinu ispitanika činili su bolesnici koji su podvrgnuti biopsiji koštane srži u dijagnostičke svrhe, a u kojih su nalazi citologije, imunofenotipizacije i citogenetike bili normalni, odnosno isključena im je maligna bolest hematopoetskog sustava. Svi bolesnici obrađeni su u Citogenetičkom laboratoriju pri Zavodu za hematologiju, onkologiju, kliničku imunologiju i genetiku, Klinike za dječje bolesti, Kliničkog bolničkog centra Split, u razdoblju od lipnja 2018. do svibnja 2021. Iz medicinske dokumentacije uzeti su podatci o spolu, dobi, broju leukocita, eritrocita, trombocita, koncentraciji hemoglobina i laktat dehidrogenaze u vrijeme inicijalne dijagnoze.

3.2. Materijali i metode rada

3.2.1. Citogenetičke analize uzoraka

Analize su se vršile na uzorcima nestimulirane jednodnevne kulture stanica koštane srži. Kulture stanica su se uspostavljale na dan prijema uzoraka koštane srži pri dijagnozi bolesti, odnosno prije liječenja. Svi uzorci stanica koštane srži rutinski su kultivirani u 24-satnoj kulturi prema standardnim protokolima koji se koriste u citogenetici hematoloških bolesti (36). Analize su izvedene u Citogenetičkom laboratoriju Klinike za dječje bolesti, Kliničkog bolničkog centra Split. Promjene kariotipa (genoma) objektivizirane su konvencionalnom metodom GTG-pruganja (Gimza-Tripsin-Gimza) i molekularnom metodom fluorescentne in situ hibridizacije na interfaznim jezgrama (FISH od engl. *Fluorescence In Situ Hybridization*). Za interpretaciju kariotipa korišten je Međunarodni sustav za humanu citogenomsku klasifikaciju, ISCN 2016 (engl. *International System for human cytogenomic nomenclature*). Za vizualizaciju GTG-pruganja i FISH-a koristio se svjetlosni odnosno fluorescentni mikroskop s pripadajućim filterima. U analizi su se koristila dva programa za analizu slike i signala, za GTG-pruganje Ikaros program te za FISH program Isis.

3.2.1.1. Konvencionalna citogenetika

Metode konvencionalne citogenetike koriste isključivo metafaze za opis promjena kariotipa, što zahtijeva metafaze zadovoljavajuće kvalitete i zadovoljavajućeg mitotskog indeksa, odnosno broja. Kad se tijekom dijagnoze identificira klonalna abnormalnost, za interpretaciju kariotipa gdje je to moguće mora se analizirati najmanje deset metafaza. Za zaključenje nalaza normalnog kariotipa potrebno je analizirati minimalno 20 metafaza. Metoda GTG-pruganja kromosoma pruža analizu cijelog genoma otkrivajući i numeričke i strukturne abnormalnosti te omogućava identifikaciju klonalne evolucije i prisutnost više neovisnih klonova. Na taj način dobije se uvid u morfologiju i kompleksnost promjena kariotipa što predstavlja bazu daljnje obrade (50).

3.2.1.2. Fluorescentna in situ hibridizacija

Fluorescentna in situ hibridizacija molekularna je metoda kojom se identificiraju i vizualiziraju specifični sljedovi DNA i mRNA molekule. Metodom je moguće dokazati promjene dijelova gena ili pojedinih gena te specifične kromosomske regije pojedinih kromosoma. FISH analiza je komplementarna metoda konvencionalnoj tehnici GTG-pruganja kromosoma prvenstveno pri otkrivanju kriptički balansiranih preuređenja kao i za razjašnjenje nalaza kariotipa dobivenog tehnikom GTG-pruganja. FISH se koristi označenim DNA probama usmjerenim prema određenim dijelovima kromosoma (50). Za svaku probu kod normalnog nalaza analizirano je otprilike 100 interfaznih jezgara, a kod patološkog nalaza po 200 interfaznih jezgara koristeći specifične LSI probe (Vysis; Abbott Molecular, Des Plaines, IL).

3.3. Imunofluorescencija

3.3.1. Protokol za imunofluorescenciju

Suspenzije arhiviranih stanica koštane srži nanesene su na predmetna stakalca i tako su napravljeni nativni preparati. Preparati su najprije obojani primarnim protutijelima i to, monoklonskim protutijelom za Ki67 (rabbit X Ki67; sc-122, USA, razrjeđenje 1:50) te poliklonskim protutijelom za SATB1 (goat polyclonal SATB1; sc-5990, Santa Cruz, USA, razrjeđenje 1:500), a potom inkubirani 24 sata u tamnoj komori. Nakon toga preparati su bojani sekundarnim protutijelima. Za prikazivanje Ki67 koristio se Rhodamine red (CRVENO, 1:400, ab, Abcam, UK), a za prikazivanje SATB1 Alexa Fluor 488 (ZELENO, 1:400, ab150105,

Abcam, UK). Nakon stavljanja sekundarnih protutijela, slijedila je inkubacija od jednog sata u tamnoj komori. Kada je inkubacija završila rezovi su isprani PBS-om i potom 1 do 2 minute obojani 4'6'-diamidino-2-fenilindolom (DAPI) da bi se prikazale stanične jezgre. Zatim su preparati nakratko isprani u destiliranoj vodi i posušeni te su preko njih stavljena pokrovna stakalca.

3.3.2. Imunofluorescencijska analiza

Analiza se provela na fluorescentnom mikroskopu (Olympus BX61, Tokio, Japan) opremljenim digitalnim fotoaparatom DP71 (Olympus, Tokio, Japan). Izvorne slike dobivene su NIS-Elements softverom, a potom obrađene u AdobePhotoshop® CS6. Slike su superponirane (merge) prema slijedu Ki-67/crveni, SATB1/zeleni i DAPI/plavi u ImageJ softveru.

3.3.2.1. Imunofluorescencijska analiza SATB1

Obrazac bojanja, intenzitet bojanja i postotak stanica koje eksprimiraju SATB1 bili su procijenjeni na 53 uzorka suspenzija stanica koštanih srži. Obrasci bojanja su evaluirani koristeći imunoreaktivni sustav bodovanja (IRS od engl. *immunoreactive score*). Prema ovom sustavu, IRS je jednak umnošku intenziteta bojanja (SI od engl. *staining intensity*) i postotka pozitivnih stanica (PP od engl. *percentage of positive cells*). SI je definiran kao 0, negativan; 1, blago; 2, umjereno; i 3, snažno pozitivan. PP je definiran kao 0, nema pozitivnih stanica; 1, <10% pozitivnih stanica; 2, 10-50% pozitivnih stanica; 3, 50-80% pozitivnih stanica; i 4, >80% pozitivnih stanica. IRS je bio definiran kao 0-1, negativan; 2-3, blago; 4-8, umjereno; i 9-12, snažno pozitivan (51). Intenzitet bojanja SATB1 je definiran kao negativan ili pozitivan, ukoliko je IRS ispod 1, odnosno iznad 1. Izbrojano je 100 stanica na nasumično odabranim vidnim poljima pri povećanju 40x. Sve analize uzoraka pregledale su tri osobe.

3.3.2.2. Imunofluorescencijska analiza Ki-67

Bodovanje za Ki-67 definirano je postotkom obojenih jezgara u ukupnom broju jezgara analiziranog uzorka, ne uzimajući u obzir intenzitet bojanja. Izbrojano je 100 stanica na nasumično odabranim vidnim poljima pri povećanju 40x za svaki od uzoraka suspenzija koštane srži. Ekspresija proliferacijskog indeksa Ki-67 stoga je kategorizirana u 5 skupina prema rasponima: 0-20%, 21-40%, 41-60%, 61-80% i 81-100%. Uzorci s ekspresijom Ki-67 ≥40%

smatrali su se visokim proliferativnim indeksom (PI od engl. *proliferative index*), a ekspresija <40% niskim PI (52).

3.4.Statistička analiza podataka

Statistička analiza provedena je pomoću GraphPad Prism for Windows (verzija 9.1.0, GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Kontinuirane varijable prikazane su kao medijan i raspon, a razlike u njima testirane su *t testom*. Kategorijske varijable prikazane su kao postotci, a razlike među njima *hi kvadratnim testom za trend* ili *Fisherovim egzaktnim testom*. Rezultati su se interpretirali na razini značajnosti $P \leq 0,05$.

3.5. Etička načela

Tijekom i nakon istraživanja štite se prava i osobni podaci ispitanika u skladu sa Zakonom o zaštiti prava bolesnika (NN 169/04, 37/08) i Zakonom o zaštiti osobnih podataka (NN 103/03-106/12), a istraživanje je usklađeno s odredbama Kodeksa liječničke etike i deontologije (NN 55/08, 139/15) te pravilima Helsinške deklaracije (1964. - 2013.). Pristupnica i njezina mentorica uputili su zamolbu Etičkom povjerenstvu KBC-a Split za odobrenje provedbe naslovnog istraživanja koje je studiju odobrilo rješenjem br. 2181-147/01/06/M.S.-21-02.

4. REZULTATI

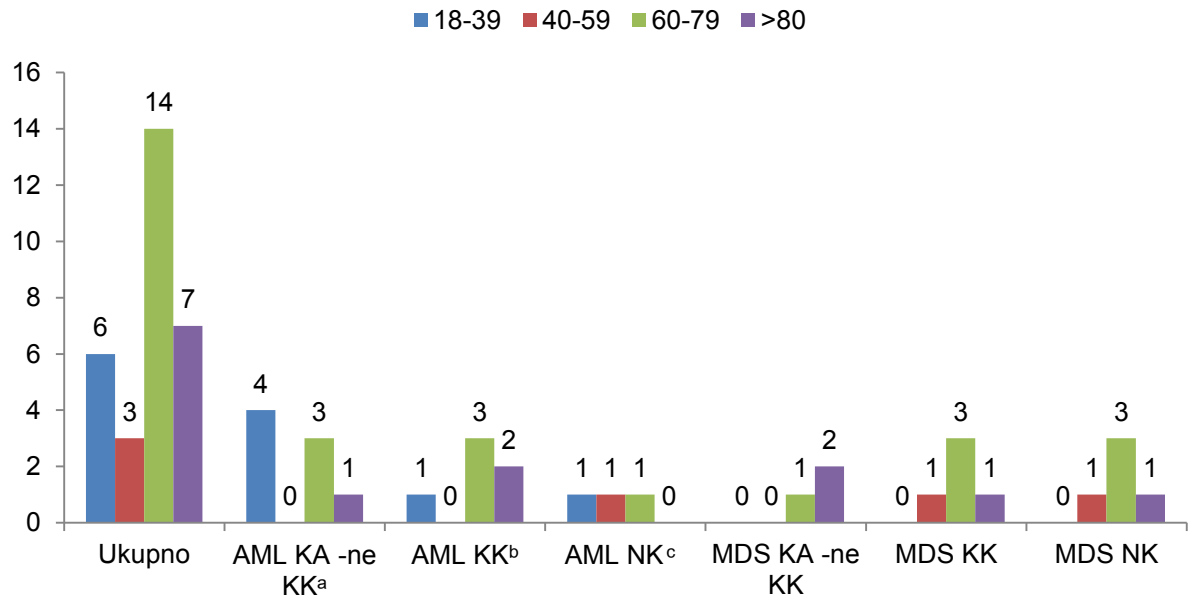
U istraživanje je uključeno 53 bolesnika, od toga 30 bolesnika s AML-om i MDS-om te 23 bolesnika u kontrolnoj skupini. Raspodjela ispitanika po skupinama i raspodjela po spolu prikazane su u Tablici 4.

Tablica 4. Prikaz bolesnika prema broju i spolu u ispitivanoj i kontrolnoj skupini

Karakteristika skupine	AML/MDS	Kontrolna	Ukupno
Broj ispitanika (No)(%)	30(57%)	23(43%)	53
Spol M/Ž[a] (No)(%)	19(63%)/11	14(61%)/9	33(62%)/20

[a] M – muški spol; Ž – ženski spol

Najviše bolesnika, 14/30, nalazi se u dobnoj skupini od 60 do 79 godina. U toj skupini najučestalije su i kromosomske aberacije i kompleksni kariotip, a nalaze se u 10/30 bolesnika s MDS-om i AML-om. Raspodjela ispitanika prema dobi i tipu bolesti prikazana je na Slici 2.



Slika 2. Distribucija ispitivane skupine prema dobi i tipu bolesti ovisno o citogenetičkom nalazu

[a] kariotipske aberacije bez kompleksnog kariotipa

[b] kompleksni kariotip

[c] normalni kariotip

U ispitivanoj skupini 74% bolesnika imalo je kromosomske aberacije u kariotipu (22/30). Od toga, u 11 bolesnika pronađen je kompleksni kariotip, a preostalih 11 imali su kromosomske aberacije bez kompleksnog kariotipa. U skupini bolesnika s kompleksnim kariotipom dominirao je muški spol (8/11), dok su u preostaloj skupini s kromosomskim aberacijama bez kompleksnog kariotipa dominirale bolesnice ženskog spola (7/11). U skupini bolesnika s normalnim kariotipom (8/30) prevladava muški spol (7/8). Karakteristike ispitivane skupine s obzirom na citogenetički nalaz prikazane su u Tablici 5. i na Slici 3.

Tablica 5. Karakteristike ispitivane skupine s obzirom na citogenetički nalaz

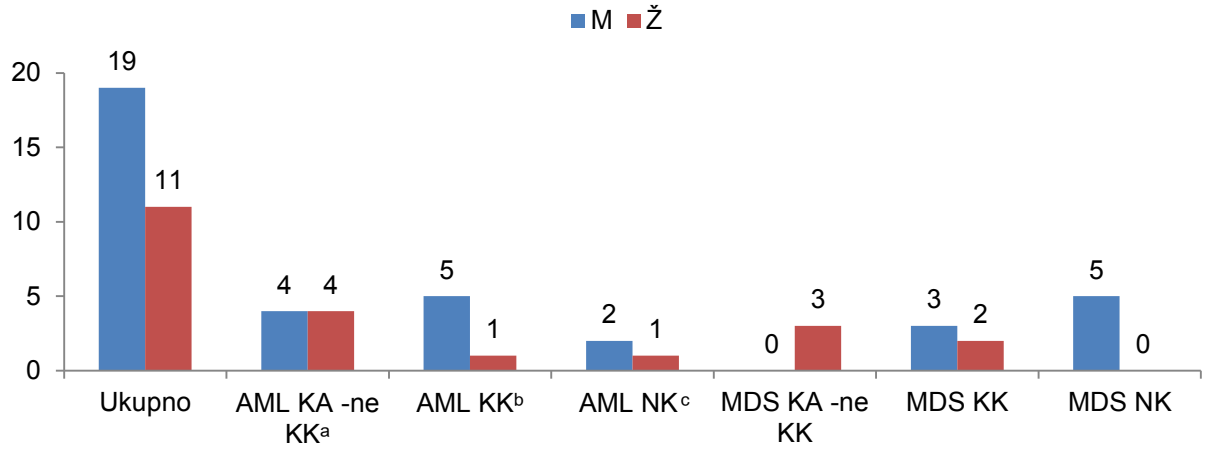
Karakteristike skupine	KA –ne KK[b]	KK[c]	NK[d]	Ukupno (No)
Broj (No)(%)	11(37%)	11(37%)	8(26%)	30
Spol M/Ž[a] (No)(%)	4(36%)/7	8(73%)/3	7(88%)/1	19(63%)/11

[a] muški spol; ženski spol

[b] kariotipske aberacije bez kompleksnog kariotipa

[c] kompleksni kariotip

[d] normalni kariotip



Slika 3. Distribucija ispitivane skupine prema spolu i tipu bolesti ovisno o citogenetičkom nalazu

[a] kariotipske aberacije bez kompleksnog kariotipa

[b] kompleksni kariotip

[c] normalni kariotip

Od 30 bolesnika s AML-om i MDS-om u 22 ispitanika pronađene su kariotipske aberacije, a s obzirom na citogenetički rizičnu skupinu, 13 bolesnika pripadalo je nepovoljnoj citogenetičko-prognostičkoj skupini i to 11 s kompleksnim kariotipom i 2 bolesnika s kromosomskom aberacijom -7/7q. Deset bolesnika je u povoljnoj, a sedam u intermedijarnoj prognostičkoj skupini.

Tablica 6. Kliničke i citogenetske karakteristike 30 bolesnika s AML-om i MDS-om

No.	Spol/dob	Dijagnoza	Kariotip koštane srži	FISH	Prognostička skupina
1	Ž[a]/69	MDS	del[c](5)(q22q34)[5],-5[4]	-5q, -5	Intermedijarna
2	Ž/83	MDS	del(5)(q22q34)[5]	-5q	Povoljna
3	Ž/77	AML	-2,-4,-6,-7,der[d](7)(q),-8,-9,-10,-13,-14,-15,-17, -18, -19,der(19)(q),+21,+mar[e]1[cp20]	-7q, -19q, +12, -17	Nepovoljna
4	M[b]/77	MDS	-3,del(3)(q?),der(5)(q?),hsr[f](11)(q?),-13,-20 [cp20]	-5q, -11q, -13q, -13	Nepovoljna
5	M/87	AML	+(1)(q),-3,del(5)(q),+8,-10,-13,- 16, +20,+21,+22,+mar1[cp18]	-5q, +8, +21	Nepovoljna
6	Ž/71	MDS	+1,t[g](2;3)(q?;p10),t(3;5) (q10;p10),-5, der(17)[20]	-5q, +1, -17p	Nepovoljna
7	M/73	MDS	del(5)(q13→term), del(7)(q31→term),+i[h](8) (q10),-8,-13,+mar1[12]	-5q,-7q, +8	Nepovoljna
8	M/78	AML	del(5q),-7,+8,+Y, +mar1, +mar2,+mar3[cp10]	-5q, -7q, +8	Nepovoljna
9	M/61	AML	del(5)(q22q35),+del(5)(q22,q35),del(7)(q31), -10,-12, -13,-14,-15,-16, -17,-18,-19,+21,-22, +mar1, +mar2 [cp14]	-5q, -7q	Nepovoljna
10	M/37	AML	i(8)(q10),der(8),del(13q),t(8;16)(p11;p13)[20]	+8, -13q	Nepovoljna
11	M/18	AML	+8[20]	+8	Intermedijarna

12	M/26	AML	-7,t(11;17)(q23;25)[20]	t (11;17), -7	Nepovoljna
13	M/63	AML	47,XY[20]	+21	Intermedijarna
14	M/81	AML	del(12)(p11),der(19)(p) [15]	-12p13	Intermedijarna
15	M/57	MDS	-Y,+1q,+8,+9[20]	+1q, +8, +9	Nepovoljna
16	Ž/86	MDS	+8[10]	+8	Intermedijarna
17	Ž/81	MDS	del(5)(q22q35),t(6;14) (p25;q11),der(7),-7,-18, -20[cp14]	-5q,-7,-7q	Nepovoljna
18	Ž/18	AML	t(15;17)(q22;q12)[16]	t(15;17)	Povoljna
19	M/87	AML	del(7)(q21),+13, [13]	-7/7q, +13	Nepovoljna
20	Ž/69	AML	t(15;17)[15]	t(15;17)	Povoljna
21	Ž/66	AML	der(14)t(1;14)(q12;p12) [15],der(22)t(1;22)(q12;p11.2)[3]	-1q	Nepovoljna
22	Ž/35	AML	t(15;17)(q22;q21)[15]	t(15;17)	Povoljna
23	M/55	MDS	46,XY[20]	normalan nalaz	Povoljna
24	M/75	MDS	46,XY[15]	normalan nalaz	Povoljna
25	M/85	MDS	46,XY[20]	normalan nalaz	Povoljna
26	M/33	AML	46,XY[20]	normalan nalaz	Intermedijarna

27	M/69	MDS	46,XY[10]	normalan nalaz	Povoljna
28	M/56	AML	46,XY[20]	normalan nalaz	Povoljna
29	Ž/74	AML	46,XY[20]	normalan nalaz	Intermedijarna
30	M/60	MDS	46,XY[10]	normalan nalaz	Povoljna

[a] ženski spol

[b] muški spol

[c] delecija

[d] derivirani kromosom

[e] marker kromosom

[f] homogeno obojene regije

[g] translokacija

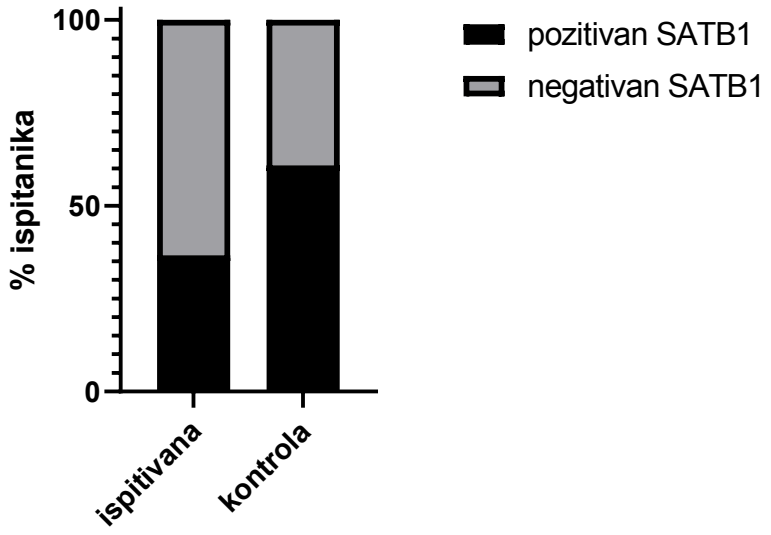
[h] izokromosom

Pozitivna reakcija na SATB1 pronađena je u 11/30 slučajeva AML/MDS i 14/23 slučajeva kontrole (*P*=0,101). Ekspresija SATB1 u ispitivanoj i kontrolnoj skupini prikazana je u Tablici 7. i na Slici 4.

Tablica 7. Ekspresija SATB1 u ispitivanoj i kontrolnoj skupini

Ispitanici	SATB1		
	Negativan (IRS<1)	Pozitivan (IRS>1)	*P*[*]
Kontrolna skupina (No)(%) N = 23	9 (39%)	14 (61%)	0,101
Ispitivana skupina (No)(%) N = 30	19 (63%)	11 (37%)	
Ukupno (No)(%) N = 53	28 (53%)	25 (47%)	

[*] Fisherov egzaktni test



Slika 4. Ekspresija SATB1 u ispitivanoj i kontrolnoj skupini

U skupini AML/MDS s normalnim kariotipom 6/8 bolesnika imalo je negativnu ekspresiju SATB1. U skupini bolesnika s kromosomskim aberacijama bez kompleksnog kariotipa 3/11 bolesnika imalo je negativnu ekspresiju SATB1. U skupini bolesnika s kompleksnim kariotipom 10/11 bolesnika imalo je negativnu ekspresiju na SATB1. *Hi kvadrat testom s trendom* utvrđeno je da je ekspresija SATB1 niža u različitim citogenetičkim skupinama, a najviše bolesnika negativnih na SATB1 bilo je u skupini s kompleksnim kariotipom, u usporedbi s kontrolnom skupinom (P=0,045). Podatci su prikazani u Tablici 8. i na Slici 5.

Tablica 8. Ekspresija SATB1 u kontrolnoj skupini i ispitivanoj skupini ovisno o citogenetičkom nalazu

Ispitanici	SATB1		
	Negativan (IRS<1)	Pozitivan (IRS>1)	*P*[*]
Kontrolna skupina (No)(%) N = 23	9 (39%)	14 (61%)	0,045
Ispitivana skupina (No)(%) N = 30	19 (63%)	11 (37%)	
AML/MDS NK[a]	6 (75%)	2 (25%)	
AML/MDS KA-ne KK[b]	3 (27%)	8 (73%)	
AML/MDS s KK[c]	10 (91%)	1 (9%)	

[*] hi kvadrat test za trend

[a] akutna mijeloična leukemija/mijelodisplastični sindrom s normalnim kariotipom

[b] akutna mijeloična leukemija/mijelodisplastični sindrom s kromosomskim aberacijama, nekompleksni kariotip

[c] akutna mijeloična leukemija/mijelodisplastični sindrom s kompleksnim kariotipom

Srednja vrijednost ekspresije Ki-67 u kontrolnoj skupini bila je 25,96%, a u ispitivanoj skupini 24,77%. U kontrolnoj skupini je 19/23 ispitanika imalo niski proliferacijski indeks (PI), a u ispitivanoj skupini je 26/30 ispitanika imalo niski PI. Samo 1/11 ispitanika u skupini AML/MDS s kromosomskim aberacijama bez kompleksnog kariotipa i 3/8 ispitanika u skupini AML/MDS s normalnim kariotipom imala su visoki proliferacijski indeks (*P*=0,149). Ekspresija Ki-67 u ispitivanoj i kontrolnoj skupini prikazana je u Tablici 9.

Tablica 9. Ekspresija Ki-67 u ispitivanoj i kontrolnoj skupini

Ispitanici	Srednja vrijednost Ki-67	Ki-67		
		Low PI (<40%)[d]	High PI (≥40%)[e]	*P*[*]
Kontrolna skupina (No)(%) N = 23	25,96	19 (83%)	4 (17%)	0,149
Ispitivana skupina (No)(%) N = 30	24,77	26 (63%)	4 (37%)	
AML/MDS NK[a]	35,63	5 (19%)	3 (75%)	
AML/MDS KA –ne KK[b]	25,45	10 (91%)	1 (9%)	
AML/MDS KK[c]	16,18	11 (100%)	0	

[*] hi kvadrat test za trend

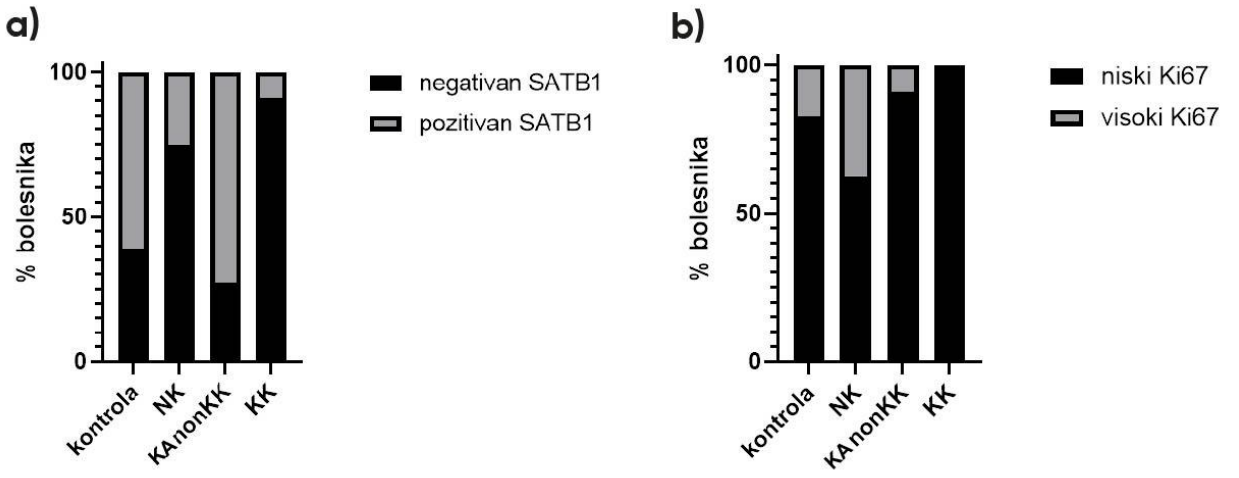
[a] normalni kariotip

[b] kromosomske aberacije, nekompleksni kariotip

[c] kompleksni kariotip

[d] niski proliferacijski indeks

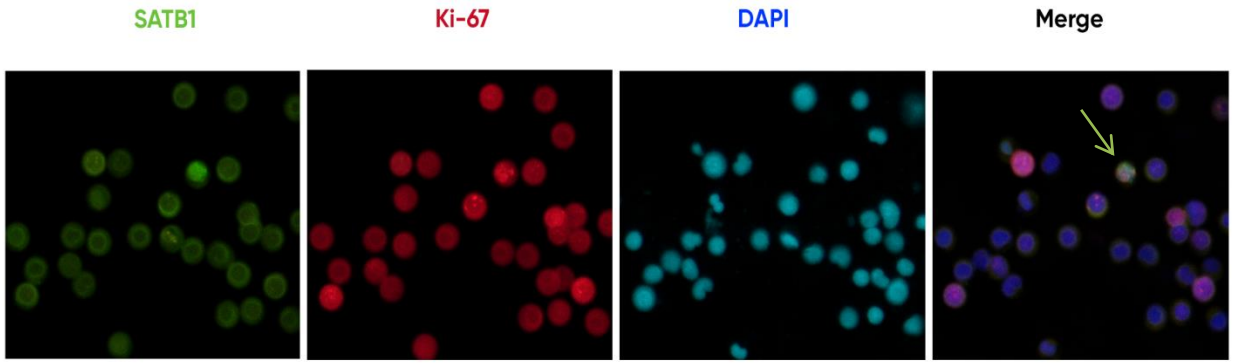
[e] visoki proliferacijski indeks



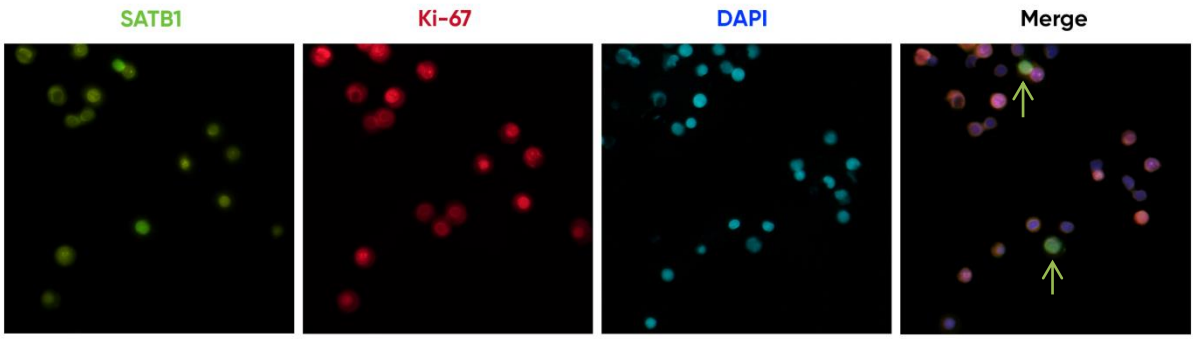
NK – normalni kariotip; KA non KK – kariotipske aberacije bez kompleksnog kariotipa; KK – kompleksni kariotip

Slika 5. Prikaz ekspresije SATB1 (a) i Ki-67 (b) u ispitivanoj i kontrolnoj skupini ovisno o citogenetičkom nalazu

Na Slikama 6. i 7. prikazane su stanice koštane srži dobivene imunofluorescentnim mikroskopom. Stanice su obojane SATB1 (zeleno) i Ki-67 (crveno) kao i 4'6'-diamidino-2-fenilindolom za prikaz staničnih jezgara (DAPI, plavo).



Slika 6. Imunofluorescencija metodom dvostrukog bojanja. Prikaz pozitivne ekspresije SATB1 i Ki-67 u istoj stanici označen je strelicom.



Slika 7. Imunofluorescencija metodom dvostrukog bojanja. Strelicom su prikazane stanice s pozitivnom ekspresijom SATB1.

U nepovoljnoj prognostičkoj skupini 10/13 bolesnika negativno je na SATB1, a u svih tih ispitanika (13/13) nalazi se niski proliferacijski indeks Ki-67. Polovina bolesnika (5/10) povoljne prognostičke skupine negativno je na SATB1, a u istoj skupini niski proliferacijski indeks Ki-67 nalazi se u 8/10 bolesnika (Tablica 10. i Slika 8).

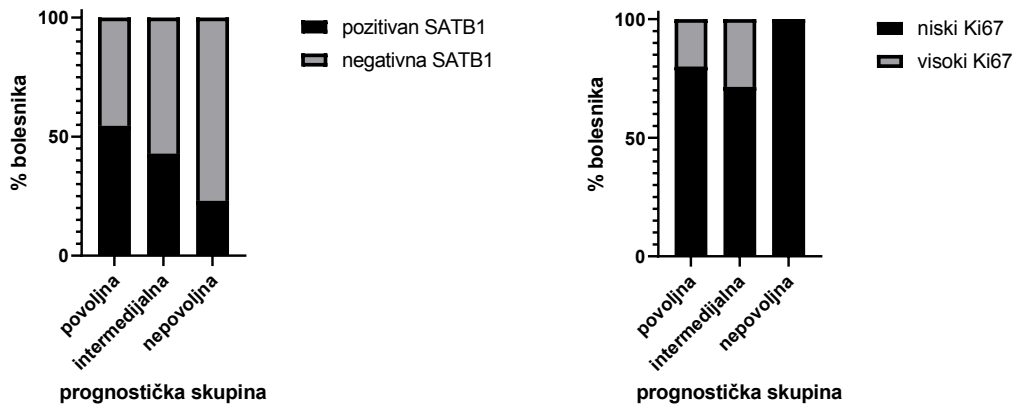
Tablica 10. Ekspresija SATB1 i Ki-67 u ispitivanoj skupini ovisno o citogenetičkoj prognostičkoj skupini

Prognostička skupina	SATB1			Ki-67		
	Pozitivan	Negativan	*P*[*]	Low PI[a]	High PI[b]	*P*[*]
Povoljna	5 (50%)	5 (50%)	0,113	8 (80%)	2 (20%)	0,138
Intermedijarna	3 (43%)	4 (57%)		5 (71%)	2 (29%)	
Nepovoljna	3 (23%)	10 (77%)		13 (100%)	0	

[*] hi kvadrat test za trend

[a] niski proliferacijski indeks

[b] visoki proliferacijski indeks



Slika 8. Ekspresija SATB1 i Ki-67 ovisno o prognostičkoj skupini

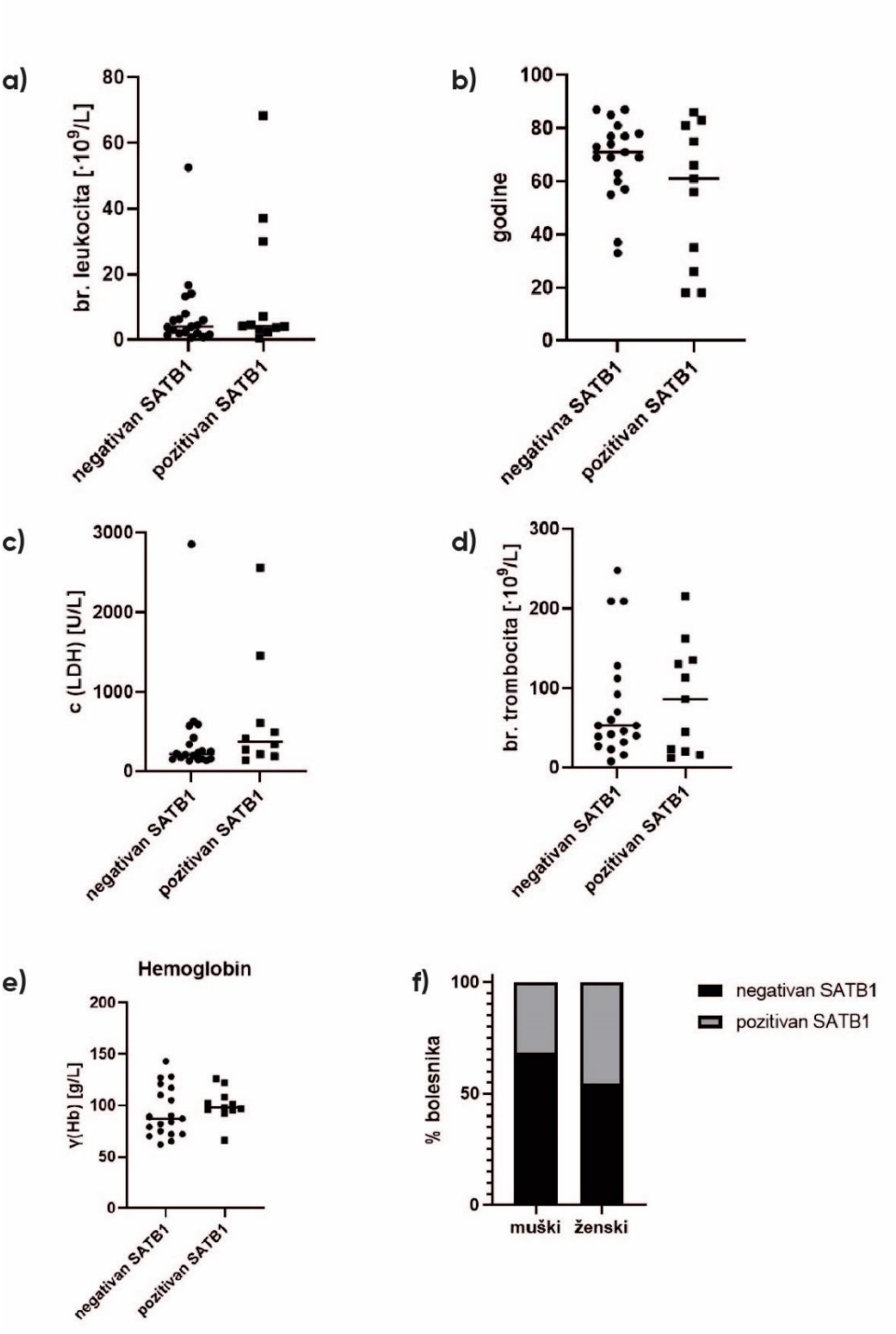
U Tablici 11. i na Slici 9. prikazane su kliničke karakteristike u ispitivanoj skupini bolesnika ovisno o statusu SATB1. Srednja vrijednosti dobi u bolesnika negativnih na SATB1 je 68,53 godina, a u bolesnika pozitivnih na SATB1 55 godina (*P*=0,082). Većina bolesnika (13/19) s negativnom ekspresijom SATB1 bili su muškarci (*P*=0,695). Srednja vrijednost leukocita u bolesnika s negativnom ekspresijom SATB1 je $7,83x10^9$/L, a u bolesnika s pozitivnom ekspresijom SATB1 $15,01x10^9$/L (*P*=0,243). Srednja vrijednost trombocita u skupini bolesnika negativnih na SATB1 bila je $79,32x10^9$/L, dok je u skupini pozitivnih bila $87x10^9$/L (*P*=0,775). Srednja vrijednost hemoglobina u bolesnika negativnih na SATB1 bila je 93,58 g/L, a u bolesnika pozitivnih na SATB1 100,27 g/L (*P*=0,421). Srednja vrijednost LDH-a u skupini negativnih bolesnika bila je 413,3 U/I, a u skupini pozitivnih 669,8 U/I (*P*=0,334).

Tablica 11. Kliničke karakteristike ispitivane skupine ovisno o statusu SATB1

Karakteristika	SATB1		
	negativan	pozitivan	*P**
Dob (godine)			
Srednja vrijednost	68,53	55	0,082
Raspon	33-87	18-86	
Spol			
Muški	13	6	0,695†
Ženski	6	5	
Leukociti, $x10^9$/L			
Srednja vrijednost	7,83	15,01	0,243
Raspon	0,7-52,5	0,5-68,3	
Trombociti, $x10^9$/L			
Srednja vrijednost	79,32	87	0,775
Raspon	8-248	12-215	
Hemoglobin, g/L			
Srednja vrijednost	93,58	100,27	0,421
Raspon	62-143	66-126	
LDH, U/L			
Srednja vrijednost	413,3	669,8	0,334
Raspon	131-2856	142-2562	

* t test

† Fisherov egzaktni test



Slika 9. Kliničke karakteristike ispitivane skupine ovisno o statusu SATB1. Prikaz broja leukocita (a), dobi (b), laktat dehidrogenaze (c), broja trombocita (d), hemoglobina (e) i spola (f) u bolesnika s AML-om i MDS-om, s negativnom odnosno pozitivnom ekspresijom SATB1.

5. RASPRAVA

SATB1 je kromatin remodelirajući protein koji veže nuklearni matriks i DNA u jedinstvenu nuklearnu strukturu i regulira ekspresiju više od 1000 gena, od kojih su brojni uključeni u karcinogenezu poput: *ERRB2, ABL1, MMP-2, CDH1, VEGFB i TGFβ1* (31). Poremećena ekspresija gena *SATB1* povezuje se s raznim vrstama solidnih tumora, tako da visoka ekspresija SATB1 obično korelira s visokim metastatskim potencijalom kao i lošim prognostičkim ishodom, a specifična je za određenu vrstu karcinoma (14,33–35). Suprotno opažanjima kod solidnih tumora, povećana ekspresija SATB1 ima povoljan učinak i suzbija napredovanje leukemije i limfoma. Poznata je i njegova uloga u diferencijaciji hematopoetskih stanica pa nedostatak SATB1 uzrokuje ozbiljnu imunodeficijenciju i višestruke poremećaje u razvoju T-stanične loze (31,37,38).

Ki-67 je veliki nuklearni nehistonski protein prisutan tijekom svih aktivnih faza staničnog ciklusa (G1, S, G2 i mitoza) te važan proliferativni marker za prognostičku procjenu mnogih solidnih tumora i limfoma (45), međutim nije inkorporiran kao biomarker u kliničkoj dijagnozi mijeloidnih malignih bolesti (47). Na nestimuliranim kultiviranim stanicama koštane srži metodom imunofluorescencije s dvostrukim bojanjem ispitali smo istovremenu ekspresiju SATB1 i Ki-67 u skupini bolesnika s mijeloidnim poremećajima pri dijagnozi AML-a i MDS-a, u kojih je prethodno određen kariotip iz istog uzorka.

U ovom istraživanju pronađene su slične ekspresije SATB1 (P=0,101) i Ki-67 (P=0,149) u ispitivanoj i kontrolnoj skupini, vjerojatno zbog ograničenog broja slučajeva u studiji. Međutim, u studiji smo pokazali niže ekspresije SATB1 ovisno o citogenetičkom nalazu (P=0,045) u usporedbi s kontrolnom skupinom, a najveća razlika pokazala se u skupini bolesnika s kompleksnim kariotipom. Luo i sur. u svojem istraživanju pokazali su sniženu ekspresiju SATB1 u 52 bolesnika s AML-om pri dijagnozi, a u 29 bolesnika iz iste skupine koji su ušli u remisiju ekspresija gena se povećala te su tako ukazali da je SATB1 mogući pokazatelj boljeg odgovora na liječenje. U istoj studiji na animalnom modelu nađeno je da snižena ekspresija SATB1 utječe na proliferaciju leukemijskih stanica aktivacijom NF-κB signalnog puta (14). Ranija istraživanja pokazala su sniženu ekspresiju gena *SATB1* u T staničnim leukemijama (39).

U našoj skupini ispitanika, 91% bolesnika iz skupine AML/MDS s kompleksnim kariotipom ima negativnu ekspresiju na SATB1 što podržava istraživanje Steidl i sur. koji su pronašli da su AML bolesnici s kompleksnim kariotipom većinom homozigoti za SNP u distalnom pojačivaču URE, u odnosu na bolesnike s normalnim kariotipom (40). Iako nismo

istražili SNP, naše istraživanje podržava da je nedostatak SATB1 te gubitak njegove funkcije mogući prediktor kompleksnog kariotipa u kojem brojnim kromosomskim aneuploidijama posljedično nastaje njegova poremećena transkripcija. Dosadašnja istraživanja pokazala su povezanost SATB1 i transkripcijskog faktora PU.1. SATB1 ima ulogu pozitivnog regulatora PU.1 ekspresije u mijeloidnim stanicama, a regulacija ekspresije PU.1 odvija se pomoću SATB1 vezanjem na distalni pojačivač URE. Stoga, nedostatak SATB1 ili mutacije u URE regiji dovode do narušene ekspresije PU.1 jer gubi vezno mjesto (40). Na animalnom modelu Rosenbauer i sur. pokazali su da miševi, s AML-om i učestalim kromosomskim aberacijama, kojima nedostaje URE imaju 80% smanjenu ekspresiju PU.1 u koštanoj srži (43). Torkildsen i sur. u svojem istraživanju pokazali su na primjeru bolesnika s AML-om da kromosomsko preuređenje lokusa (3p24) za gen *SATB1* ili njegova disrupcija, a koja je nastala kao posljedica kromosomske translokacije t(3;5)(p24;q14), dovodi do poremećene regulacije transkripcije proteina SATB1, a time i gubitka njegove funkcije što može biti važan čimbenik u leukemogenezi (15). Gagat i sur. pokazali su da je gubitak SATB1 indikator loše prognoze u hematološkim malignim bolestima (53).

S obzirom na citogenetički rizičnu skupinu, 13 bolesnika pripadalo je nepovoljnoj citogenetičkoj prognostičkoj skupini, i to 11 s kompleksnim kariotipom i 2 bolesnika s kromosomskom aberacijom -7/7q. Iako smo očekivali da će u nepovoljnoj citogenetičko-prognostičkoj skupini, prema ELN 2017 i IPSS (5,18), svi bolesnici imati negativnu ekspresiju na SATB1, ipak njih 10/13 imalo je negativnu ekspresiju. U visokorizičnim i niskorizičnim skupinama bolesnika gotovo jednak broj ispitanika imao je negativnu, odnosno pozitivnu ekspresiju SATB1 (P=0,113).

Prema literaturi poznato je da incidencija AML i MDS raste s porastom dobi, a najučestalija je u osoba iznad 70 godina te je učestalija u muškaraca (3,54), što se podudara s rezultatima ovog istraživanja. Akutna mijeloična leukemija s kompleksnim kariotipom poseban je biološki entitet okarakteriziran naglim rastom incidencije sa starijom dobi (55). U našoj studiji imali smo 11 bolesnika s kompleksnim kariotipom, a od toga 5 bolesnika s AML-om i 4 bolesnika s MDS-om u populaciji iznad 60 godina, što je također sukladno dosadašnjim studijama (12,55). Najučestalije kromosomske aberacije su delecije -5/5q-, -7/7q- i +8 u AML i MDS skupini, a bolesnici s MDS-om zbog takvog kariotipa imaju visoki rizik progresije u AML. U ovom istraživanju dobivena je srednja vrijednost dobi u ispitivanoj skupini bolesnika s

negativnom ekspresijom na SATB1 68,53 godina, dok je srednja vrijednost dobi u bolesnika s pozitivnom ekspresijom bila 55 godina (*P*=0,082). Luo i sur. pokazali su da je srednja vrijednost dobi u skupini *de novo* AML bolesnika s niskom ekspresijom SATB1 50,5 godina, a u bolesnika s visokom ekspresijom 51 godina (*P*=0,839) (14). Treba istaknuti da u navedenoj studiji nisu prikazani citogenetički nalazi kariotipa.

Istraživanje Alexandrakis i sur., na 54 uzorka koštane srži bolesnika s MDS-om, pokazalo je da je proliferativna frakcija Ki-67 mijeloidnih stanica značajno veća u visokorizičnoj skupini MDS-a u usporedbi s nisko-rizičnom skupinom MDS-a i u usporedbi s kontrolnom skupinom (49). Druga studija nije pronašla razliku u ekspresiji Ki-67 mRNA između AML, ALL i normalnih kontrola (56).

U ovoj studiji ispitivana je ekspresija Ki-67 u skupini bolesnika s AML-om i MDS-om i kontrolnoj skupini. Pronašli smo gotovo podjednaku srednju vrijednost ekspresije Ki-67 u kontrolnoj (25,96%) i ispitivanoj skupini (24,77%). Kontrolnu skupinu činili su bolesnici koji su podvrgnuti biopsiji koštane srži zbog sumnje na hematološku malignu bolest zbog poremećaja jedne od tri stanične loze periferne krvi, a u kojih je ista isključena nalazima citologije, imunofenotipizacije i citogenetike. U drugim istraživanjima kontrolnu skupine čine zdravi donori koštane srži (14,47,48). Uzorci koštane srži ispitivane i kontrolne skupine kultivirani su na isti način sa svrhom dobivanja što većeg mitotoskog indeksa radi analize kariotipa pa i očekujemo da se stanice nalaze u svim fazama staničnog ciklusa. Iz suspenzije arhiviranih stanica nestimulirane jednodnevne kulture koštane srži napravljeni su citološki preparati metodom dvostrukog bojanja. Poznato je da u normalnoj koštanoj srži nezrele stanične populacije pokazuju visok postotak ekspresije Ki-67 koji se smanjuje uzastopnim fazama sazrijevanja (48). Isto istraživanje pokazalo je da su nezreli eritroblasti 100% pozitivni na Ki-67, dok su mijeloblasti i monoblasti pokazali niži indeks proliferacije približno 50%, što može ukazivati na to da su ove stanice u stanju mirovanja ili pripadaju neproliferativnoj fazi (G0/rana G1) (48). Nedavni razvoj u multiparametarskoj protočnoj citometriji omogućuje kvantificiranje proliferativnih i (anti)apoptotičkih pokazatelja u mijeloidnim stanicama tijekom njihovih različitih faza sazrijevanja kao izdvojenih linija hematopoetskih stanica (47).

Bitno je naglasiti da istraživanje ima i svoje nedostatke. Naime, istraživanje je retrospektivno i ne daje jasnu sliku o promatranim parametrima u sadašnjosti. Ispitanici uključeni

u istraživanje čine heterogenu skupinu (bolesnici s *de novo* AML i *de novo* MDS) i malen uzorak za promatranje što ograničava usporedbe s drugim studijama.

6. ZAKLJUČCI

1. Ova studija je po prvi put ispitivala istovremenu ekspresiju SATB1 i Ki-67 u bolesnika s AML-om i MDS-om na nestimuliranim kultiviranim stanicama koštane srži. Kromatin remodelirajući protein, SATB1, ima nedostatnu ekspresiju u specifičnom biološkom entitetu mijeloidnih poremećaja ovisno o citogenetičkom nalazu, a najniža ekspresija pokazala se u bolesnika muškog spola i starije životne dobi te s kompleksnim kariotipom. Pronašli smo gotovo podjednaku srednju vrijednost ekspresije Ki-67 u kontrolnoj (25,96%) i ispitivanoj skupini (24,77%).
2. U ovom istraživanju dobivena je srednja vrijednost dobi u ispitivanoj skupini bolesnika s negativnom ekspresijom na SATB1 68,53 godina, dok je srednja vrijednost dobi u bolesnika s pozitivnom ekspresijom bila 55 godina. Srednje vrijednosti leukocita, trombocita, hemoglobina i LDH bile su gotovo podjednake u bolesnika s negativnom, odnosno pozitivnom ekspresijom SATB1.
3. Ekspresija SATB1 je niža u različitim citogenetičkim skupinama, a najviše bolesnika negativnih na SATB1 bilo je u skupini s kompleksnim kariotipom u usporedbi s kontrolnom skupinom.
4. U visokorizičnim i niskorizičnim skupinama bolesnika gotovo jednak broj ispitanika imao je negativnu, odnosno pozitivnu ekspresiju SATB1.

7. POPIS CITIRANE LITERATURE

1. Mitchell K, Steidl U. Targeting immunophenotypic markers on leukemic stem cells: how lessons from current approaches and advances in the leukemia stem cell (LSC) model can inform better strategies for treating acute myeloid leukemia (AML). Cold Spring Harb Perspect Med. 2020;10(1):a036251.

2. Döhner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD. Acute myeloid leukemia. N Engl J Med. 2015;373(12):1136-52.

3. Johansson B, Harrison CJ. Acute myeloid leukemia. U: Heim S, Mitelman F, urednici. Cancer cytogenetics: chromosomal and molecular genetic aberrations of tumor cells. Četvrto izdanje. Wiley-Blackwell; 2015.str. 62-125.

4. Arber DA. The 2016 WHO classification of acute myeloid leukemia: what the practicing clinician needs to know. Semin Hematol. 2019;56(2):90-5.

5. Herold T, Rothenberg-Thurley M, Grunwald V V., Janke H, Goerlich D, Sauerland MC, et al. Validation and refinement of the revised 2017 European LeukemiaNet genetic risk stratification of acute myeloid leukemia. Leukemia. 2020;34:3161-72.

6. Welch JS, Ley TJ, Link DC, Miller CA, Larson DE, Koboldt DC, et al. The origin and evolution of mutations in acute myeloid leukemia. Cell. 2012;150(2):264-78.

7. Moarii M, Papaemmanuil E. Classification and risk assessment in AML: integrating cytogenetics and molecular profiling. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2017;2017(1):37-44.

8. Meyer SC, Levine RL. Translational implications of somatic genomics in acute myeloid leukaemia. Lancet Oncol. 2014;15(9):e382-94.

9. Cancer Genome Atlas Research Network. Ley TJ, Miller C, Ding L, Raphael BJ, Mungall AJ, et al. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. N Engl J Med. 2013;368(22):2059–74.

10. Bullinger L, Döhner K, Dohner H. Genomics of acute myeloid leukemia diagnosis and pathways. Journal of Clinical Oncology. 2017;35(9):934-46.

11. Lagunas-Rangel FA, Chávez-Valencia V, Gómez-Guijosa MÁ, Cortes-Penagos C. Acute myeloid leukemia—genetic alterations and their clinical prognosis. Int J Hematol Oncol Stem Cell Res. 2017;11(4):328-39.

12. Mrózek K, Eisfeld AK, Kohlschmidt J, Carroll AJ, Walker CJ, Nicolet D, et al. Complex karyotype in de novo acute myeloid leukemia: typical and atypical subtypes differ molecularly and clinically. Leukemia. 2019;33(7):1620-34.

13. 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.

14. Luo X, Xu L, Wu X, Tan H, Liu L. Decreased SATB1 expression promotes AML cell proliferation through NF-κB activation. Cancer Cell Int. 2019;19:134.

15. Torkildsen S, Brunetti M, Gorunova L, Spetalen S, Beiske K, Heim S, et al. Rearrangement of the chromatin organizer special AT-rich binding protein 1 gene, SATB1, resulting from a t(3;5)(p24;q14) chromosomal translocation in acute myeloid leukemia. Anticancer Res. 2017;37(2):693–98.

16. Daver N, Schlenk RF, Russell NH, Levis MJ. Targeting FLT3 mutations in AML: review of current knowledge and evidence. Leukemia. 2019;33(2):299-312.

17. Buckstein R. Epidemiology, etiology, and clinical presentation of myelodysplastic syndromes. U: Nazha A, urednik. Diagnosis and management of myelodysplastic syndromes: a clinical guide. Springer Nature Switzerland AG; 2020.

18. Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, Fenaux P, Morel P, Sanz G, et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. Blood. 1997;89(6):2079-88.

19. Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, Sanz G, Garcia-Manero G, Solé F, et al. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. Blood. 2012;120(12):2454-65.

20. Haase D, Germing U, Schanz J, Pfeilstöcker M, Nösslinger T, Hildebrandt B, et al. New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: Evidence from a core dataset of 2124 patients. Blood. 2007;110(13):4385–95.

21. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al, urednici. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Četvrto izdanje. IARC: Lyon, France. 2017.

22. Venugopal S, Mascarenhas J, Steensma DP. Loss of 5q in myeloid malignancies – a gain in understanding of biological and clinical consequences. Blood Rev. 2021;46:100735.

23. Hosono N. Genetic abnormalities and pathophysiology of MDS. Int J Clin Oncol. 2019;24(8):885–92.

24. Göhring G, Michalova K, Beverloo HB, Betts D, Harbott J, Haas OA, et al. Complex karyotype newly defined: the strongest prognostic factor in advanced childhood myelodysplastic syndrome. Blood. 2010;116:3766–69.

25. Trost D, Hildebrandt B, Beier M, Müller N, Germing U, Royer-Pokora B. Molecular cytogenetic profiling of complex karyotypes in primary myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. Cancer Genet Cytogenet. 2006;165:51-63

26. Mitelman F, Heim S. How it all began: cancer cytogenetics before sequencing. U: Heim S, Mitelman F. Cancer cytogenetics: Četvrto izdanje. Wiley-Blackwell; 2015.str. 1-10

27. Sato N, Nakazato T, Kizaki M, Ikeda Y, Okamoto S. Transformation of myelodysplastic syndrome to acute lymphoblastic leukemia: a case report and review of the literature. Int J Hematol. 2004;79(2):147-51.

28. Musilová J, Michalová K, Zemanová Z, Neuwirthová R, Dohnalová A. Karyotype at diagnosis, subsequent leukemic transformation and survival in myelodysplastic syndrome. Leuk Res. 1995;19(5):303-8.

29. Shahjahani M, Hadad EH, Azizidoost S, Nezhad KC, Shahrabi S. Complex karyotype in myelodysplastic syndromes: diagnostic procedure and prognostic susceptibility. Oncol Rev. 2019;13(1):389.

30. Frömberg A, Engeland K, Aigner A. The special AT-rich sequence binding protein 1 (SATB1) and its role in solid tumors. Cancer Lett. 2018;417:96-111.

31. Kohwi-Shigematsu T, Poterlowicz K, Ordinario E, Han HJ, Botchkarev VA, Kohwi Y. Genome organizing function of SATB1 in tumor progression. Semin Cancer Biol. 2013;23(2):72-9.

32. Wang S, Zeng J, Xiao R, Xu G, Liu G, Xiong D, et al. Poor prognosis and SATB1 overexpression in solid tumors: a meta-analysis. Cancer Manag Res. 2018;10:1471-78.

33. Naik R, Galande S. SATB family chromatin organizers as master regulators of tumor progression. Oncogene. 2019;34:1989-2004.

34. Ding M, Pan J, Guo Z, Liu Q, Yang C, Mao L. SATB1 is a novel molecular target for cancer therapy. Cancer Investigation. 2018;36(1):28-36.

35. Brocato J, Costa M. SATB1 and 2 in colorectal cancer. Carcinogenesis. 2015;36(2):186-91.

36. Selinger CI, Cooper WA, Al-Sohaily S, Mladenova DN, Pangon L, Kennedy CW, et al. Loss of special at-rich binding protein 1 expression is a marker of poor survival in lung cancer. J Thorac Oncol. 2011;6(7):1179-89.

37. Beyer M, Thabet Y, Müller RU, Sadlon T, Classen S, Lahl K, et al. Repression of the genome organizer SATB1 in regulatory T cells is required for suppressive function and inhibition of effector differentiation. Nat Immunol. 2011;12(9):898-907.

38. Kakugawa K, Kojo S, Tanaka H, Seo W, Endo TA, Kitagawa Y, et al. Essential roles of SATB1 in specifying T lymphocyte subsets. Cell Rep. 2017;19(6):1176-88.

39. Luo X, Xu L, Liu D, Wang Y, Wu X, Tan H. Downregulation of SATB1 increase the invasiveness of Jurkat cell via activation of the WNT/β-catenin signaling pathway in vitro. Tumour Biol. 2016;37(6):7413-9.

40. Steidl U, Steidl C, Ebralidze A, Chapuy B, Han HJ, Will B, et al. A distal single nucleotide polymorphism alters long-range regulation of the PU.1 gene in acute myeloid leukemia. J

Clin Invest. 2007;117(9):2611-20.

41. Nutt SL, Metcalf D, D'Amico A, Polli M, Wu L. Dynamic regulation of PU.1 expression in multipotent hematopoietic progenitors. J Exp Med. 2005;201(2):221-31.

42. Tenen DG. Disruption of differentiation in human cancer: AML shows the way. Nat Rev Cancer. 2003;3(2):89-101.

43. Rosenbauer F, Wagner K, Kutok JL, Iwasaki H, Le Beau MM, Okuno Y, et al. Acute myeloid leukemia induced by graded reduction of a lineage-specific transcription factor, PU.1. Nat Genet. 2004;36(6):624-30.

44. Will B, Vogler TO, Bartholdy B, Garrett-Bakelman F, Mayer J, Barreyro L, et al. Satb1 regulates the self-renewal of hematopoietic stem cells by promoting quiescence and repressing differentiation commitment. Nat Immunol. 2013;14(5):437-45.

45. Cattoretti G, Becker MHG, Key G, Duchrow M, Schlüuter C, Galle J, et al. Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. J Pathol. 1992;168(4):357-63.

46. Tsurusawa M, Aoyama M, Saeki K, Fujimoto T. Cell cycle kinetics in childhood acute leukemia studied with in vitro bromodeoxyuridine labeling, Ki67-reactivity, and flow cytometry. Leukemia. 1995;9(11):1921-5.

47. Mestrum SGC, Hopman AHN, Ramaekers FCS, Leers MPG. The potential of proliferative and apoptotic parameters in clinical flow cytometry of myeloid malignancies. Blood Adv. 2021;5(7):2040-52.

48. Nies KPH, Kraaijvanger R, Lindelauf KHK, Drent RJMR, Rutten RMJ, Ramaekers FCS, et al. Determination of the proliferative fractions in differentiating hematopoietic cell lineages of normal bone marrow. Cytom A. 2018;93(11):1097-1105.

49. Alexandrakis MG, Passam FH, Kyriakou DS, Dambaki C, Katrinakis G, Tsirakis G, et al. Expression of the proliferation-associated nuclear protein MIB-1 and its relationship with microvascular density in bone marrow biopsies of patients with myelodysplastic

syndromes. J Mol Histol. 2004;35:857-63.

50. Rack KA, van den Berg E, Haferlach C, Beverloo HB, Costa D, Espinet B, et al. European recommendations and quality assurance for cytogenomic analysis of haematological neoplasms. Leukemia. 2019;33(8):1851-67.

51. Fedchenko N, Reifenrath J. Different approaches for interpretation and reporting of immunohistochemistry analysis results in the bone tissue - a review. Diagn Pathol. 2014;9:221.

52. Allegra CJ, Paik S, Colangelo LH, Parr AL, Kirsch I, Kim G, et al. Prognostic value of thymidylate synthase, Ki-67, and p53 in patients with Dukes' B and C colon cancer: a National Cancer Institute-National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project collaborative study. J Clin Oncol. 2003;21(2):241-50.

53. Gagat M, Grzanka D, Krajewski A. Ambiguous role of SATB1 expression in malignant tumors. J Invest Dermatol. 2019;139(7):1608-10.

54. Ma X. Epidemiology of myelodysplastic syndromes. Am J Med. 2012;125:2-5.

55. Schoch C, Kern W, Kohlmann A, Hiddemann W, Schnittger S, Haferlach T. Acute myeloid leukemia with a complex aberrant karyotype is a distinct biological entity characterized by genomic imbalances and a specific gene expression profile. Genes Chromosomes Cancer. 2005;43(3):227-38.

56. Jaroslav P, Martina H, Jirí S, Hana K, Petr S, Tomás K, Julius M, Cedrik H. Expression of cyclins D1, D2, and D3 and Ki-67 in Leukemia. Leuk Lymphoma. 2005;46(11):1605-12.

8. SAŽETAK

Cilj istraživanja: Ciljevi istraživanja bili su odrediti ekspresiju proteina SATB1 i Ki-67 iz arhiviranih uzoraka fiksiranih stanica suspenzija koštane srži bolesnika s AML-om i MDS-om i utvrditi moguće korelacije njihove ekspresije s kontrolnom skupinom, kliničko-patološkim podatcima i citogenetičko-prognostičkim skupinama.

Ispitanici i metode: U ovo retrospektivno istraživanje bilo je uključeno 30 bolesnika iznad 18 godina, s dijagnozom AML-a i MDS-a u ispitivanoj skupini. Kontrolna skupina ispitanika uključivala je 23 bolesnika koji su podvrgnuti biopsiji koštane srži u dijagnostičke svrhe, a u kojih je isključena maligna bolest hematopoetskog sustava. Svi bolesnici obrađeni su pri Klinici za dječje bolesti KBC-a Split, u razdoblju od lipnja 2018. do svibnja 2021. Prikazani su podatci o citogenetičkom nalazu, spolu, dobi, broju leukocita, eritrocita, trombocita, koncentraciji hemoglobina i laktat dehidrogenaze u vrijeme inicijalne dijagnoze. Analiza uzoraka stanica koštane srži izvršila se imunofluorescencijom, metodom dvostrukog bojanja.

Rezultati: U ovom istraživanju pronađene su slične ekspresije SATB1 (P=0,101) i Ki-67 (P=0,149) u ispitivanoj i kontrolnoj skupini. U studiji smo pokazali niže ekspresije SATB1 ovisno o citogenetičkom nalazu u usporedbi s kontrolnom skupinom, a 91% bolesnika iz skupine AML/MDS s kompleksnim kariotipom ima negativnu ekpresiju na SATB1 (P=0,045). Srednja vrijednost dobi u ispitivanoj skupini bolesnika s negativnom ekspresijom na SATB1 bila je 68,53 godina, dok je srednja vrijednost dobi u bolesnika s pozitivnom ekspresijom bila 55 godina (P=0,082). Srednje vrijednosti ekspresije Ki-67 u kontrolnoj (25,96%) i ispitivanoj skupini (24,77%) bile su gotovo podjednake.

Zaključci: Kromatin remodelirajući protein, SATB1, ima nedostatnu ekspresiju u specifičnom biološkom entitetu mijeloidnih poremećaja ovisno o citogenetičkom nalazu, a najniža ekspresija se pokazala u bolesnika muškog spola, starije životne dobi i s kompleksnim kariotipom te može biti važan čimbenik u leukemogenezi.

9. SUMMARY

Diploma thesis title: Correlation of SATB1 and Ki-67 expression with chromosomal aberrations in patients with acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome

Objectives: The aim of the study was to determine expression of SATB1 and Ki-67 in archived bone marrow aspirate samples of patients with AML and MDS and the correlation of their expression with control group, clinical-pathological information and cytogenetic risk categories.

Materials and methods: This retrospective study included 30 patients above age of 18 with the diagnosis of AML and MDS. Control group consisted of 23 patients, without hematologic malignancy, who underwent bone marrow biopsy for diagnostic purposes. All patients were processed in Cytogenetics laboratory of the Clinic for Children's Diseases of the University Hospital of Split from June 2018. until May 2021. Data included cytogenetic findings, gender, age, blood cell count, hemoglobin concentration and lactate dehydrogenase levels at the diagnosis. Bone marrow specimen were analyzed using double immunofluorescence staining.

Results: This study showed similar expression of SATB1 (*P*=0,101) and Ki-67 (*P*=0,149) in examined and control group of patients. There was significantly lower SATB1 expression depending on cytogenetic findings (*P*=0,045), in comparison to control group, and 91% of patients with complex karyotype had negative SATB1 expression. Mean age of patients in examined group with negative SATB1 expression was 68,53 years, while the mean age of those with positive SATB1 expression was 55 years (*P* = 0,082). Mean values of Ki-67 were almost equal, 25,96% and 24,77% in control and examined group, respectively.

Conclusions: Chromatin-remodeling protein, SATB1, expression was inadequate in specific biologic entity of myeloid disorders depending on cytogenetic findings, and the lowest expression was found in males of older age, and complex karyotype, which suggest that it can play an important role in leukemogenesis.