

Received: 2010.12.03
Accepted: 2011.02.18
Published: 2011.03.21

Molekularne i cytogenetyczne czynniki prognostyczne w ostrej białaczce szpikowej (OBS)*

Molecular and cytogenetic prognostic factors in acute myeloid leukemia (AML)

Szymon Zmorzyński, Agata A. Filip, Dorota Koczkodaj, Małgorzata Michalak

Zakład Genetyki Nowotworów Katedry Genetyki Medycznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

Streszczenie

Ostre białaczki szpikowe (OBS) stanowią niejednorodną grupę chorób, zróżnicowaną pod względem przebiegu, odpowiedzi na terapię oraz zmian cytogenetycznych i molekularnych. Zmiany te mają znaczenie prognostyczne. Korzystnie rokują chorzy z t(8;21), inv(16)/t(16;16) i t(15;17). Chorzy z prawidłowym kariotypem i aberracjami: +6, +8, -Y, t(9;11) i del(12p) należą do grupy rokowania pośredniego. W przypadku chorych ze złożonym kariotypem lub zmianami typu: inv(3)/t(3;3), t(6;9), -5, -7, del(5q), del(7q), rearanżacje 11q23 – rokowanie jest niekorzystne. Do niekorzystnych molekularnych czynników prognostycznych zalicza się: amplifikację *C-MYC*, amplifikacje i rearanżacje *MLL*, *FLT3-ITD*, mutację *WT1*, nadekspresję *BAALC*, *ERG* i *MNI*. Mutacje genów *CEBPA* i *NPM1* uznaje się za korzystne czynniki prognostyczne. Istotne rokowniczo w OBS są także zmiany ekspresji niektórych miRNA.

Heterogenność OBS uzasadnia potrzebę prowadzenia badań cytogenetycznych i molekularnych w celu określenia zmian m.in. u chorych z prawidłowym kariotypem w klasycznym badaniu cytogenetycznym. Techniki macierzowe umożliwiają analizę genomowego DNA oraz profilowanie ekspresji genów w poszukiwaniu sygnatur prognostycznych i predykcyjnych.

Słowa kluczowe:

ostra białaczka szpikowa • zmiany genetyczne • czynniki prognostyczne • mikromacierze CGH • mikroRNA

Summary

Acute myeloid leukemia (AML) constitutes a group of diseases that are very heterogeneous with regard to clinical course, response to therapy as well as cytogenetic aberrations and gene mutations. Such lesions are of prognostic value. Patients with t(8;21), inv(16)/t(16;16) or t(15;17) have a favorable prognosis. Patients with normal karyotype and aberrations +6, +8 -Y, t(9;11) and del(12p) are classified in the group of intermediate prognosis. In the case of patients with complex karyotype or with the aberrations inv(3)/t(3;3), t(6;9), -5, -7, del(5q), del(7q) and 11q23 rearrangements, the prognosis is poor. Unfavorable molecular factors include *C-MYC* amplification, *MLL* amplification and rearrangement, *FLT3-ITD*, *WT1* mutation and overexpression of *BAALC*, *ERG* or *MNI*. The changes in miRNA expression may also be important for AML prognosis. That is why the cases with normal karyotype (CN-AML) and cases with complex aberrations remain to be better characterized at the genetic level. Array technology enables the analysis of genomic DNA and gene expression. This approach may be used in the search for new prognostic and predictive markers in AML.

Key words:

acute myeloid leukemia • genetic lesions • prognostic factors • array CGH • microRNA

* Praca zrealizowana w ramach projektu NN402187035.

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=935753>**Word count:** 3857**Tables:** 1**Figures:** –**References:** 70**Adres autora:** mgr Szymon Zmorzyński, Zakład Genetyki Nowotworów Katedry Genetyki Medycznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, ul. Radziwiłłowska 11, 20-080 Lublin; e-mail: s.zmorzynski@gmail.com

WPROWADZENIE

Ostra białaczka szpikowa (OBS, acute myeloid leukemia – AML) jest chorobą klonalną, w której dochodzi do nadmiernej proliferacji i kumulacji niedojrzałych morfologicznie oraz czynnościowo komórek blastycznych [12]. Komórki te wywodzą się z prekursorowej, transformowanej nowotworowo macierzystej komórki hematopoetycznej szpiku [12,15], z wyłączeniem linii limfoidalnej. OBS stanowi 75–80% przypadków ostrych białaczek u dorosłych, natomiast u dzieci występuje w około 15% wszystkich przypadków [2]. W Europie częstość występowania i częstość zgonów z powodu OBS są oceniane odpowiednio na 5–8 i 4–6/100000/rok [17]. Roczna liczba zachorowań zwiększa się wraz z wiekiem do 10/100000/rok u osób powyżej 60 roku życia. Białaczki występują częściej u mężczyzn niż u kobiet (3:2) [27].

Ostrą białaczkę szpikową dzieli się na pierwotną i wtórną, w zależności od tego czy rozwinęła się jako schorzenie pierwotne (*de novo* OBS), czy też była poprzedzona zespołem mielodysplastycznym (MDS) lub rozwinęła się w następstwie radio- lub chemioterapii nowotworów narządowych [2].

Stosowany przez wiele lat podział ostrej białaczki szpikowej według klasyfikacji francusko-amerykańsko-brytyjskiej (French-American-British – FAB) dostarczał głównie informacji na temat morfologii komórek białaczkowych. Później został wzbogacony o badania cytochemiczne, które pozwoliły na bardziej precyzyjne określenie podtypu białaczki [13]. Klasyfikacja Światowej Organizacji Zdrowia (World Health Organization – WHO) łączy w sobie elementy klasyfikacji FAB oraz wyodrębnia różne pod względem biologicznym podtypy, które zostały sklasyfikowane w oparciu o cechy morfologiczne oraz zmiany cytogenetyczne i molekularne (tab. 1) [13].

Wiele czynników wpływa na prawdopodobieństwo uzyskania całkowitej remisji i prawdopodobieństwo długiego przeżycia z OBS: ogólny stan zdrowia, potencjalna zdolność przeżycia intensywnej chemioterapii oraz wiek chorego w chwili rozpoznania [30].

Chemioterapia indukująca remisję u dorosłych chorych na OBS pozwala na uzyskanie całkowitej remisji hematologicznej w około 60% przypadków. Umożliwia to kontynuację leczenia, w tym przeszczepienie szpiku kostnego. Transplantacja macierzystych komórek hematopoetycznych szpiku kostnego (bone marrow transplantation – BMT) lub krwi obwodowej (peripheral blood stem cell transplantation – PBSCT) – autologiczna lub alogeniczna – pozwala na uzyskanie długoletniego przeżycia, odpowiednio u 50 i 70% chorych [2].

Zaawansowany wiek związany jest z gorszym rokowaniem i zmniejsza szanse przeżycia terapii indukcyjnej [23]. W starszych grupach wiekowych zwiększa się odsetek chorych wykazujących oporność na leczenie. Wiek może także warunkować wynik leczenia z tego powodu, że OBS u starszych osób charakteryzuje się odmienną biologią [57]. Komórki białaczkowe u takich chorych częściej wykazują ekspresję antygenu CD34 i genu *MDR1* (multidrug resistance 1), kodującego jedno z białek oporności wielolekowej (P-glycoprotein 1 – PGP1). Odpowiada ono za aktywne wypompowywanie cytostatyków z komórki, co zmniejsza efektywność terapii. Tolerancję intensywnego leczenia cytostatycznego osłabiają dodatkowo schorzenia współistniejące. Przy ustalaniu strategii leczenia brane są pod uwagę m.in. wyniki badań cytogenetycznych u chorych z OBS [23].

Udoskonalenie technik cytogenetycznych i wprowadzenie badań molekularnych spowodowało wzrost znaczenia tych metod przede wszystkim w diagnostyce, określeniu rokowania oraz monitorowaniu choroby resztkowej u chorych na OBS. Analiza cytogenetyczna i molekularna są metodami komplementarnymi, rutynowo wykorzystywanymi w klinicznej praktyce hematologicznej. Identyfikacja aberracji chromosomowych i mutacji punktowych na początku choroby ma decydujące znaczenie dla właściwego rozpoznania OBS wg klasyfikacji WHO, oraz dla podjęcia właściwego leczenia [13]. Istotne są zwłaszcza badania obejmujące:

- mutacje czynnika aktywującego transkrypcję genów kodujących receptory hematopoetycznych czynników wzrostu (core binding factor – CBF),
- rearanżacje genów kodujących receptory kwasu retinowego,
- rearanżacje genów kodujących koaktywatory transkrypcji (np. *CREBBP*, *MYST3*) [4,27].

Tylko dobrze potwierdzone klinicznie zmiany są uwzględniane w klasyfikacji WHO (tab. 1) [27].

CYTOGENETYCZNE CZYNNIKI PROGNOSTYCZNE

Proces onkogenezy jest nierozdzielnie związany ze zmianami genomu. Niektóre z nich pojawiają się już na etapie inicjacji nowotworu, mając znaczenie dla jego patogenez, inne rozwijają się jako zmiany wtórne. Zmiany genomu mogą obejmować duże obszary (aberracje chromosomowe) lub dotyczyć pojedynczych genów (mutacje punktowe). Najczęściej prowadzi one do upośledzenia bądź wypadnięcia funkcji genów (zmiany poziomu ekspresji genów i struktury/funkcji kodowanych przez nie białek) lub – zwłaszcza w wyniku przegrupowań – do utworzenia tzw. genów fuzyjnych, których produkty nie występują w prawidłowych komórkach [18].

Tabela 1. Podział ostrych białaczek szpikowych według WHO z 2008 roku [65]

L.p.	Klasyfikacja WHO
1. Ostre białaczki z powtarzającymi się zmianami cytogenetycznymi:	
1.1.	OBS z t(8;21)(q22;q22), (<i>RUNX1-RUNX1T1</i>)
1.2.	OBS z nieprawidłową eozynofilią w szpiku, inv(16)(p13q22) lub t(16;16)(p13.1;q22), (<i>CBFB-MYH11</i>)
1.3.	Ostra białaczka promielocytowa, t(15;17)(q22;q21), (<i>PML-RARA</i>) i warianty
1.4.	OBS z nieprawidłowościami 11q23 (<i>MLL</i>), t(9;11)(p22;q23), (<i>MLLT3-MLL</i>)
1.5.	OBS z t(6;9)(p23;q34), (<i>DEK-NUP214</i>)
1.6.	OBS z inv(3)(q21q26.2)/t(3;3)(q21;q26.2), (<i>RPN1-EVI1</i>)
1.7.	OBS megakarioblastyczna z t(1;22)(p13;q13), (<i>RBM15-1MKL1</i>)
1.8.	OBS z mutacją <i>NPM1</i>
1.9.	OBS z mutacją <i>CEBPA</i>
2. Ostre białaczki szpikowe z wieloliniową dysplazją:	
2.1.	OBS z poprzedzającym zespołem mielodysplastycznym lub mielodysplastyczno-mieloproliferacyjnym
2.2.	OBS bez poprzedzającego zespołu mielodysplastycznego
3. Ostre białaczki szpikowe i zespoły mielodysplastyczne spowodowane uprzednim leczeniem:	
3.1.	OBS po leczeniu związkami alkilującymi
3.2.	OBS po leczeniu inhibitorami topoizomerazy II
3.3.	Inne typy
4. Ostre białaczki szpikowe niesklasyfikowane:	
4.1.	OBS minimalnie zróżnicowana (wg FAB M0)
4.2.	OBS bez cech dojrzewania (wg FAB M1)
4.3.	OBS z cechami dojrzewania (wg FAB M2)
4.4.	OBS mielomonocytowa (wg FAB M4)
4.5.	Ostra białaczka monoblastyczna i monocytowa (wg FAB M5)
4.6.	Ostra białaczka erytroblastyczna (wg FAB M6)
4.7.	Ostra białaczka megakariocytowa (wg FAB M7)
4.8.	Ostra białaczka bazofilowa
4.9.	Ostra panmieloza ze zwłóknieniem (mielofibroza)
5. Mięsak szpikowy (mięsak mieloidalny)	
6. OBS związane z zespołem Downa	

Niektóre zmiany genomu są charakterystyczne dla określonych nowotworów. Ich analiza ma nie tylko wartość diagnostyczną, rokowniczą i predykcyjną. Przyczynia się także do rozwoju badań w zakresie terapii celowanej, ukierunkowanej na swoistą biologiczną odmienną komórki nowotworowej [26].

Aberracje chromosomowe obecne w komórkach szpiku lub krwi w chwili rozpoznania są istotnymi niezależnymi czynnikami, uwzględnianymi w rokowaniu i ustalaniu strategii leczenia OBS [18,49]. Klonalne aberracje występują u 60–70% chorych na OBS [5]. Dotychczas opisano ponad 200 strukturalnych i liczbowych zaburzeń, m.in. translokacje zrównoważone i niezrównoważone, wzajemne i niewzajemne, insercje, delecje, izochromosomy oraz

izolowane trisomie lub monosomie [25]. Częstość występowania tych zmian jest różna, niektóre opisano tylko w pojedynczych przypadkach. Istnieje korelacja między rodzajem występujących aberracji chromosomowych a wiekiem chorych, np. t(8;21), inv(16) i t(15;17) częściej stwierdza się w młodszej grupie wiekowej [13]. Niektóre aberracje strukturalne są związane z określonym podtypem cytomorfologicznym białaczki wg FAB, np. translokacje t(8;21) z podtypem M2; t(15;17), t(11;17), t(5;17) z podtypem M3; inv/del(16) z wariantem eozynofilowym OBS M4 (OBS M4eo). Inne aberracje, np. +8, -7/del(7q) lub del(5q), występują w różnych typach OBS (często wtórnych), a także w MDS i nie mają związku z określonym typem morfologicznym [67].

Chorzy z t(8;21)(q22;q22) lub inv(16)(p13q22)/t(16;16)(p13;q22), prowadzącymi do rearanżacji odpowiednio *CBFA* lub *CBFB* (białaczki CBF) oraz chorzy z t(15;17)(q22;q21) są zaliczani do grupy tzw. korzystnego ryzyka cytogenetycznego [4]. Chorzy z t(15;17) mają bardzo dobrą prognozę, co związane jest z dostępnością leczenia celowanego preparatem ATRA, a chorzy z t(8;21) i inv(16)/t(16;16) – dobrą [68].

Translokacja t(8;21)(q22;q22) występuje u 8–12% chorych na OBS i u 20–40% chorych z podtypem M2 wg FAB [24]. W wyniku t(8;21)(q22;q22) powstaje gen fuzyjny *RUNX1 (AML1, CBFA2) – RUNX1T1 (ETO, CBFA2T1)* [33]. Obecność antygeny CD56 w OBS z t(8;21) jest uważana za czynnik pogarszający rokowanie [13].

Inwersja chromosomu 16 [inv(16)] występuje z podobną częstością u dorosłych i starszych dzieci. Wśród dorosłych dotyczy przede wszystkim młodszej grupy wiekowej [28]. Zaburzenie to koreluje z wysoką leukocytozą w chwili rozpoznania oraz hepatosplenomegalią. W wyniku inv(16) powstaje gen fuzyjny *CBFB-MYH11*, którego transkrypt jest wykrywany metodą RT-PCR w około 10–12% przypadków pierwotnej OBS i u ponad 40% chorych na OBS M4eo [13]. Niewielkie zmiany w kariotypie w przypadku inv(16) powodują, że trudno jest wykryć tę aberrację klasycznymi metodami cytogenetycznymi [46].

Translokacja t(15;17)(q22;q21) występuje u chorych z ostrą białaczką promielocytową M3 wg klasyfikacji FAB. Ten podtyp OBS występuje przede wszystkim u młodych dorosłych i osób w średnim wieku. Rzadko wykrywa się t(15;17) u dzieci poniżej 12 miesiąca życia [43]. Następstwem translokacji jest powstanie genu fuzyjnego *PML-RARA*, który stwierdza się w 5–15% wszystkich przypadków OBS [13]. Białko PML-RARA hamuje apoptozę, zwiększa proliferację komórek oraz powoduje zaburzenia mechanizmu naprawy DNA [50]. Obecność antygeny CD56 na powierzchni komórek białaczkowych u chorych z t(15;17) jest stwierdzana rzadko, jednak jego występowanie jest zawsze związane z gorszym przebiegiem klinicznym choroby [28].

U 40–49% chorych na OBS obecne są niewielkie zmiany strukturalne chromosomów, niewykrywalne w standardowym badaniu cytogenetycznym, czego następstwem jest prawidłowy wynik badania. Rozpoznanie prawidłowego kariotypu można postawić dopiero po dokładnej analizie, co najmniej 20 metafaz komórek szpiku [58]. Chorzy z takim prawidłowym kariotypem (cytogenetycznie normalni AML – CN-AML) stanowią największy odsetek OBS i są klasyfikowani do grupy pośredniego ryzyka, razem z nosicielami t(9;11) i trisomii chromosomu 8 (+8) [42].

Do grupy pośredniego ryzyka cytogenetycznego klasyfikowani są również chorzy z trisomią chromosomu 6 (+6). Aberracja ta, jako izolowane zaburzenie cytogenetyczne, jest charakterystyczna dla podtypu M1 OBS wg FAB. Obecność dodatkowego chromosomu 6 stwierdza się także u chorych z MDS [13].

Kolejnym zaburzeniem kojarzonym z pośrednim ryzykiem u chorych na OBS jest utrata chromosomu Y. Odsetek komórek z delecją chromosomu Y wzrasta z wiekiem, trudno

więc czasem rozstrzygnąć, czy aberracja ta jest konsekwencją naturalnego procesu starzenia się organizmu, czy też jest związana z obecnością klonu nowotworowego. Jednak utrata chromosomu Y w większości metafaz (75–100%) wskazuje na jej związek z procesem białaczkowym nawet u starszych mężczyzn. Utratę chromosomu Y obserwuje się również u chorych z przewlekłymi nowotworami mieloproliferacyjnymi, MDS, natomiast rzadko u osób z chorobami limfoproliferacyjnymi [13].

Delecja krótkiego ramienia chromosomu 12 [del(12p)] stwierdzana jest nie tylko w OBS (najczęściej wtórnych), ale także w innych nowotworach układu krwiotwórczego. Jako izolowaną zmianę del(12p) obserwuje się u 1–2% chorych na OBS. Często również towarzyszy ona aberracjom chromosomów 5 i 7 [4]. Region chromosomu 12, w którym doszło do złamania, może determinować różnice w przebiegu klinicznym choroby. Utrata mniejszego fragmentu 12p wiąże się z łagodniejszym przebiegiem klinicznym OBS. Delecji większego fragmentu 12p towarzyszą często dodatkowe zaburzenia chromosomowe, wtedy rokowanie jest gorsze [13].

Chorzy z aberracjami chromosomu 3, angażującymi regiony 3q21 i 3q26 [inv(3)(q21q26)/t(3;3)(q21;q26)], rearanżacjami regionu 11q23, translokacją t(6;9)(p23;q34), utratą chromosomów 5 i 7 lub delecjami w ich obrębie [del(5q), del(7q)], są zaliczani do grupy tzw. niekorzystnego ryzyka cytogenetycznego [13,27]. Podobnie niekorzystne rokowanie dotyczy chorych ze złożonym kariotypem, czyli z obecnością trzech lub więcej aberracji [68].

Aberracje chromosomu 3 [inv(3)(q21q26)/t(3;3)(q21;q26)] mogą wystąpić we wszystkich podtypach OBS u starszych chorych. Często współistnieją ze zmianami strukturalnymi lub liczbowymi chromosomów 5 i 7 [–5/del(5q), –7/del(7q)] lub są jedną ze zmian u chorych ze złożonym kariotypem. Zmiany 3q21q26 są niekorzystnym czynnikiem prognostycznym i predykcyjnym – chorzy z tą aberracją wykazują wielolekową oporność [13].

Translokacje 11q23 stwierdza się w pierwotnej i wtórnej OBS, a także w ostrych białaczkach limfoblastycznych. Wśród OBS z tą zmianą najczęściej rozpoznaje się podtypy M5a (50%) oraz M4 (20%) wg FAB. Komórki białaczkowe chorych z aberracjami 11q23 charakteryzuje, oprócz ekspresji antygenów typowych dla linii mieloidalnej, także ekspresja antygenów monocytoidalnych (CD11b, CD14, CD36, CD64) [13]. Aberracje 11q23 występują u około 6% chorych z OBS i dotyczą głównie dwóch grup: dzieci w wieku niemowlęcym i chorych uprzednio leczonych lekami alkilującymi, inhibitorami topoizomazy II lub radioterapią [13,29]. W regionie 11q23 znajduje się *locus* genu *MLL*, który w wyniku translokacji może ulegać fuzji z innymi genami, co – podobnie jak jego amplifikacja – jest czynnikiem niekorzystnego rokowania [6].

Czynnikiem niepomyślnego rokowania jest także translokacja t(6;9)(p23;q34). Stwierdzana jest u około 1% chorych na OBS (najczęściej w podtypie M2 wg FAB), często w przypadkach OBS wtórnych do MDS. Aberracja ta może występować w każdej grupie wiekowej [13]. Zazwyczaj jest zmianą izolowaną, chociaż mogą jej towarzyszyć trisomie chromosomów 8 i 21 [13].

Złożony kariotyp stwierdza się u około 10% chorych z rozpoznaniem pierwotnej OBS, częściej w starszej grupie wiekowej [5]. Z obecnością złożonego kariotypu u chorych na OBS jest związany niekorzystny przebieg kliniczny; niski odsetek uzyskiwanych całkowitych remisji niezależnie od rodzaju zastosowanego leczenia i krótki czas przeżycia. Rokowanie dodatkowo pogarsza współistnienie aberracji określanych jako niekorzystne, np. $-5/\text{del}(5q)$ lub $-7/\text{del}(7q)$ [5,13].

MOLEKULARNE CZYNNIKI PROGNOZYSTYCZNE

Przyczyny transformacji białaczkowej i rozwoju choroby są złożone. Należy uwzględnić czynniki zewnętrzne, mogące powodować mutacje genów oraz czynniki osobnicze, takie jak osłabienie komórkowych mechanizmów kontroli proliferacji i układów kontroli immunologicznej.

Mutacje punktowe mogą prowadzić do transformacji nowotworowej komórki macierzystej szpiku i komórek progenitorowych. Transformowana komórka nabywa zdolności do proliferacji niezależnej od działania tkankowych i ogólnoustrojowych mechanizmów regulatorowych. Klony komórek niezróżnicowanych, charakteryzujących się nieograniczoną zdolnością proliferacji i unikania apoptozy powstają w wyniku niestabilności genomu. Do transformacji białaczkowej potrzebne jest jednoczasowe zaistnienie dwóch lub więcej zmian genetycznych [31]. Często obserwowane w OBS mutacje genów kodujących kinazy tyrozynowe i białka sygnalizacyjne z nimi związane prowadzą do pobudzenia proliferacji. Z kolei mutacje genów kodujących czynniki transkrypcyjne powodują zahamowanie procesów różnicowania i dojrzewania. Izolowana mutacja w obrębie genów kinaz tyrozynowych może więc powodować rozwój zespołu mieloproliferacyjnego, a mutacje genów kodujących czynniki transkrypcyjne są przyczyną mielodysplazji. Dopiero jednoczesne pobudzenie proliferacji i zahamowanie dojrzewania komórek blastycznych prowadzi do rozwoju ostrej białaczki [31,35].

U 50–60% chorych na OBS stwierdza się obecność mutacji w obrębie genów receptorów kinaz tyrozynowych. Nieprawidłowe funkcjonowanie ich produktów białkowych powoduje zmianę aktywności składowych głównych szlaków sygnałowych decydujących o życiu i śmierci komórki, m.in. MAPK (mitogen activated protein kinase), mTOR (mammalian target of rapamycin), STAT (signal transducer and activator of transcription) i NF-kappa B (nuclear factor B) [31].

Aberracje strukturalne i liczbowe typowe dla niektórych białaczek obejmują regiony chromosomów, w których umiejscowione są onkogeny. Geny te odgrywają znaczącą rolę w sterowaniu proliferacją komórek, ich różnicowaniem i dojrzewaniem. Kodują między innymi błonowe receptory kwasu retinowego, cytokin regulujących hematopoezę oraz przekaźniki sygnału, np. geny kodujące kinazy tyrozynowe [26,65].

Zmianą obserwowaną często w nowotworach narządowych jest amplifikacja genów [54]. Amplifikacja to zwielfokrotnienie liczby kopii genu (lub fragmentu DNA) powyżej 5. Jeśli liczba kopii przewyższa 20 określana jest mianem amplifikacji wysokiego stopnia [48]. Amplifikacje stwierdzane są w niewielkim odsetku nowotworów hematologicznych [54].

Swoiste dla OBS jest zwielfokrotnienie regionu 11q23-q25. W *locus* 11q23 znajduje się gen *MLL*, którego produkt jest koaktywatorem transkrypcji genów istotnych dla hematopoezy. Zarówno amplifikacja *MLL*, jak też jego fuzje z innymi genami są niekorzystne prognostycznie. Amplifikacja regionu 11q23-q25 może dodatkowo skutkować zwielfokrotnieniem kopii innych genów w tej lokalizacji: *CCND1*, *ATM* i *EST1* [26]. Gorzej rokują także 5-10% chorych z prawidłowym kariotypem, u których metodami molekularnymi (RQ-PCR, sekwencjonowanie) stwierdza się tzw. częściowe duplikacje tandemowe genu *MLL* (partial tandem duplications – *MLL-PTD*) [1,26,51].

Niekorzystnym czynnikiem prognostycznym jest, rzadko obserwowana w przebiegu OBS (ok. 1%), amplifikacja genu *MYC* [26,53]. Przejawia się ona obecnością podwójnych małych chromosomów (double minutes – dmin, DMs), będących bezcentromerowymi cząstkami chromatinu, zawierającymi gen *MYC*, zwielfokrotniony poza swoim *locus* [26,51].

Poza zmianami wykrywanych na poziomie rozdzielczości mikroskopu, w różnych podtypach cytogenetycznych OBS zidentyfikowano wiele submikroskopowych zmian genetycznych [45]. Do mutacji, które są istotne dla planowania terapii chorych z OBS, zalicza się duplikację genu *FLT3* (*FLT3-ITD*), mutacje *WT1*, nadekspresję genów *BAALC*, *ERG* oraz *MNI*. Wymienione zmiany są niekorzystnymi czynnikami predykcijnymi. Z kolei mutacje genów *CEBPA* i *NPM1* uznaje się za czynniki korzystne [52]. Mutacje genowe zaliczane do grupy czynników korzystnych oraz mutacje należące do czynników niekorzystnych mogą występować jednocześnie [12]. Obecność mutacji genu *KIT*, który koduje kinazę tyrozynową, jest pogarszającym rokowanie markerem molekularnym u pacjentów z korzystnie rokującymi białaczkami CBF [44]. Mutacja w genie *KIT* występuje u 23% chorych z t(8;21) i często współistnieje z mutacją *FLT3* [41].

W grupie ryzyka pośredniego, do której należą chorzy z prawidłowym kariotypem, znaczenie ma badanie genu *FLT3* (*locus* 13q12), kodującego kinazę tyrozynową receptora klasy III (fms-like tyrosine kinase 3 – *FLT3*) [40,59]. Receptor ten występuje na powierzchni wczesnych komórek progenitorowych hematopoezy i związany jest z proliferacją oraz regulacją apoptozy [20]. Poprzez swój ligand (*FLT3L*) odgrywa istotną rolę w proliferacji i różnicowaniu progenitorowych komórek hematopoetycznych, a także w patogenezie OBS. Mutacje genu *FLT3* występują u 30–35% chorych na OBS [58]. Jedną z nich jest *FLT3*-length mutation (*FLT3-LM*), która jest heterogenna i może mieć postać insercji, delecji i tzw. wewnątrz-tandemowej duplikacji (internal tandem duplication – *ITD*) [32]. *FLT3-ITD* występuje u 30% chorych z grupy pośredniego ryzyka i niekorzystnie wpływa na rokowanie, wiążąc się z częstymi nawrotami OBS [56]. Wśród pozostałych 70% chorych z pośrednim stopniem ryzyka, u których brak tandemowej duplikacji *FLT3-ITD*, zdecydowanie korzystniejsze rokowanie mają chorzy z obecnością mutacji *NPM1* [36] i *CEBPA* [44], które są uznawane w klasyfikacji WHO za odrębne postacie OBS [27]. *FLT3-ITD* występuje najczęściej u chorych na OBS z prawidłowym kariotypem lub z t(15;17), pogarszając prognozę w tych podtypach. Mutacje *FLT3-LM* rzadko są wykrywane w OBS ze złożonymi zmianami

w kariotypie. We wszystkich grupach cytogenetycznych obecność *FLT3*-LM, w tym *FLT3*-ITD, jest niekorzystnym czynnikiem prognostycznym [10].

Zmiany w ekspresji genów: *FLT3* i *KIT* należy traktować jako pomocnicze wskaźniki ryzyka przy planowaniu leczenia chorych z grup ryzyka pośredniego i korzystnego, określonego cytogenetycznie [44].

Białko kodowane przez gen *NPM1* (*locus* 5q34) kontroluje integralność DNA oraz hamuje proliferację [16]. Mutacje *NPM1* wykrywane są u prawie 35% chorych na pierwotną OBS. Najczęstszym typem mutacji *NPM1* jest duplikacja obejmująca 4 pary zasad w eksonie 12 [45]. OBS z prawidłowym kariotypem i mutacją *NPM1* występuje znacznie częściej u kobiet. Ten rodzaj białaczki charakteryzuje się wysoką leukocytozą, trombocytozą oraz niską ekspresją antygenu CD34 lub jej brakiem [63]. Mutacje *NPM1* mają korzystny wpływ na uzyskanie całkowitej remisji, czas jej trwania i całkowity czas przeżycia [10].

Gen *CEBPA* (*CCAAT/enhancer binding protein α*), zlokalizowany w 19q13.1, koduje białko, które należy do rodziny bZIP (basic region leucine zipper). Białko to ma właściwości czynnika transkrypcyjnego, odgrywającego istotną rolę w granulocytopenie [40]. Mutacje *CEBPA* obserwuje się u 5–10% chorych na OBS, głównie u osób z prawidłowym kariotypem (podtyp M1 i M2 wg FAB) [1,10]. Występują one w jednym lub obu allelach genu (odpowiednio *CEBPAsm* i *CEBPA^{dm}*) [62]. Mutacje pojedynczego allela skutkują zmianami N- lub C-końca produktu białkowego, w przypadku mutacji biallelicznych zazwyczaj jedna z nich obejmuje domenę C-, a druga N-końcową [62]. U chorych ze zmutowanym genem *CEBPA* obserwuje się znacznie dłuższy czas trwania remisji i całkowitego przeżycia w porównaniu do chorych z genem dzikim (wild-type – wt). W analizie wieloczynnikowej wykazano, że najpomyślniejszą prognozę mają chorzy z mutacją *CEBPA^{dm}* [1,62]. Komórki białaczkowe tej grupy chorych charakteryzuje unikalny profil ekspresji genów, wyraźnie odróżniający je od przypadków *CEBPAsm* i *CEBPA^{wt}* [62]. Mutacje pojedynczego allela *CEBPA* w OBS częściej towarzyszą mutacje genu *NPM1* lub/i *FLT3*-ITD, co nie pozostaje bez wpływu na rokowanie [62].

Gen *BAALC* (brain and acute leukemia, cytoplasmic) jest umiejscowiony w regionie 8q22.3. Szczególnie silną ekspresję tego genu wykazują komórki prekursorowe hematopoezy. Zwiększona ekspresja *BAALC* w krążących blastach OBS jest niezależnym niekorzystnym czynnikiem rokowniczym u chorych na OBS poniżej 60 roku życia, z prawidłowym kariotypem, bez *FLT3*-ITD i mutacji *CEBPA* [3].

Inne geny, których zmiany o negatywnym znaczeniu prognostycznym wykazano w cytogenetycznych typach zarówno dobrze, jak i źle rokujących, a których badanie może mieć wartość w OBS z prawidłowym kariotypem, to: *EVII*, *C-KIT*, *NRAS*, *KRAS* i *BCRP* [10].

Na rokowanie u pacjentów z OBS ma także wpływ zmienność ekspresji mikroRNA (miRNA), cząsteczek o długości 19–25 nukleotydów, regulujących ekspresję genów na poziomie potranskrypcyjnym [9,20]. Zaburzenia ekspresji miRNA odgrywają zasadniczą rolę w rozwoju OBS [34]. Na podstawie obecności lub braku określonych rodzajów

miRNA można różnicować OBS i ostrą białaczkę limfoblastyczną [34]. Li i wsp. udowodnili, że *miR-126/126** wykazują nadekspresję u chorych z t(8;21) i inv(16), podczas gdy *miR-224*, *miR-368* i *miR-382* – u chorych z t(15;17) [34]. Zwiększona ekspresja *miR-10a*, *miR-10b* i *miR-196a* jest związana z mutacjami w genie *NPM1* [11,19]. U chorych z prawidłowym kariotypem ekspresja *miR-181a* i *miR-181b* jest niższa w stadiach M4 i M5 niż M1 i M2 wg FAB [38].

ZASTOSOWANIE MIKROMACIERZY W OZNACZANIU MARKERÓW MOLEKULARNYCH I CYTOGENETYCZNYCH

Poszukiwanie markerów molekularnych o diagnostycznym i rokowniczym znaczeniu w OBS prowadzone jest z wykorzystaniem najnowszych metod: ekspresyjnych mikromacierzy DNA, mikromacierzy mikroRNA, mikromacierzy CGH oraz mikromacierzy SNP. Mikromacierze łączą w sobie zalety metod cytogenetycznych oraz metod molekularnych (FISH, RT-PCR) [61].

Ostrą białaczkę szpikową można różnicować z ostrą białaczką limfoblastyczną na podstawie oznaczenia ekspresji określonych genów (gene expression profiling – GEP) [21]. Profilowanie ekspresji genów pozwala także rozróżnić korzystne prognostycznie podtypy OBS [inv(16)/t(16;16), t(8;21) i t(15;17)] od pozostałych. Do tego celu wykorzystuje się technologię ekspresyjnych mikromacierzy DNA, umożliwiającą analizę ekspresji tysięcy genów z dużą dokładnością podczas jednego badania [38,69].

Profilowanie ekspresji genów chorych z aberracjami chromosomowymi lub molekularnymi o znanym znaczeniu rokowniczym [np. CBF-AML: t(8;21) lub inv(16)/t(16;16)], pozwoliło stwierdzić związek nadekspresji genów odpowiedzialnych za proces proliferacji oraz zmniejszenia ekspresji genów proapoptotycznych z gorszym rokowaniem [8].

Bullinger i wsp. określili sygnaturę (profil) ekspresji genów istotną dla prognozy OBS u chorych z prawidłowym kariotypem [7]. Zweryfikowana przez Radmachersa na dużej grupie chorych sygnatura Bullingera wykazała ponad 60% trafność przewidywania rokowania, mimo zastosowania odmiennej platformy macierzowej [47]. Natomiast przeprowadzona przez grupę badaczy niemieckich analiza nadzorowana wyników GEP panelu 66 genów związanych z czasem przeżycia, udowodniła znaczenie ekspresji genów jako niezależnego czynnika prognostycznego u chorych z CN-AML, bez względu na rodzaj terapii i miejsce pochodzenia (Europa, Ameryka) [39].

Do oznaczenia ekspresji poszczególnych typów miRNA wykorzystuje się mikromacierze mikroRNA. Metoda ta różni się od mikromacierzy DNA tym, że jako sondy wykorzystywane są krótkie nukleotydy, komplementarne z badanym mikroRNA. Za pomocą tej techniki udało się określić zwiększoną ekspresję poszczególnych *miRNA*, m.in. u chorych z t(8;21), inv(16) oraz t(15;17) [38].

Profil ekspresji miRNA ma związek z rokowaniem u chorych na OBS. Nadekspresja *miR-199a* i *miR-191* koreluje z krótszym czasem przeżycia i krótszym czasem wolnym od nawrotu choroby (event free survival – EFS) we wszystkich grupach cytogenetycznych [11]. Niekorzystnym czynnikiem prognostycznym dla wszystkich chorych jest także

nadekspresja *miR-20a*, *miR-25* i *miR-199b* [19]. Zwiększoną ekspresję *miR-let7b* i *miR-9* obserwuje się natomiast wyłącznie u chorych z grupy niekorzystnego i pośredniego ryzyka cytogenetycznego [11].

W grupie chorych z prawidłowym kariotypem i obecnością niekorzystnych molekularnych czynników prognostycznych (*FLT3-ITD*, wt-*NPM1* lub obie zmiany jednocześnie) Marcucci i wsp. określili sygnatury ekspresji miRNA związane z EFS. Najważniejszą z zaobserwowanych była odwrotna zależność między ekspresją *miR-181a*/*miR-181b* i ryzykiem wznowy [37]. Sygnatury te walidowano następnie na 55-osobowej grupie chorych z OBS z prawidłowym kariotypem, leczonych w ramach programu CALGB 9621. W analizie wieloczynnikowej wartości ekspresji wybranych miRNA okazały się niezależnym czynnikiem prognostycznym EFS [66].

Technika mikromacierzy CGH (array comparative genome hybridization – array CGH) jest metodą stosowaną w celu wykrywania w genomie delecji lub amplifikacji fragmentów DNA. Przede wszystkim jednak macierze CGH umożliwiają detekcję zmian liczby kopii (copy number variation – CNV) nawet w wielu tysiącach *loci* jednocześnie – ich liczba jest ograniczona wyłącznie liczbą sond, natomiast ich rozmiar decyduje o rozdzielczości z jaką wykrywane są aberracje chromosomowe (w zależności od rodzaju macierzy 10–300 kpz). Dodatkowo analiza metodą mikromacierzy CGH nie wymaga dysponowania komórkami zdolnymi do podziału. Dysproporcje w intensywności fluorescencji w próbie badanej w stosunku do DNA referencyjnego świadczą o zaburzeniach w liczbie kopii analizowanych fragmentów genomu [70]. Technika mikromacierzy CGH znajduje zastosowanie w licznych badaniach naukowych dotyczących m.in. OBS [60]. Na przykład Tyybäkinoja i wsp. zidentyfikowali tą metodą amplifikację w regionie 11q23-q25, której nie można było uwidocznić metodami cytogenetyki klasycznej [64].

Badania zastosowania aCGH w diagnostyce i ustalaniu rokowania nowotworów mieloproliferacyjnych są znacznie mniej zaawansowane niż w przypadku guzów litych [60]. U chorych z OBS ze złożonymi zmianami kariotypu Rucker i wsp. zidentyfikowali tą metodą niezależne amplifikacje dwóch regionów długiego ramienia chromosomu 11. Pierwsza z nich (11q23.3) obejmuje m.in. *loci* genów *MLL* i *DDX6*, natomiast druga (11q23.3-q24.1) *loci* *ETS1* i *FLII* [55]. Amplifikacja *MLL* jest niekorzystnym czynnikiem prognostycznym, wiąże się z krótszym czasem przeżycia i – często – z delecją genu *TP53*. Natomiast geny rodziny *ETS* biorą udział w regulacji procesów hematopozy,

prolifracji, różnicowania i apoptozy, co pośrednio przekłada się na znaczenie ich amplifikacji w progresji OBS [55].

Dużą rozdzielczością w ocenie zmian liczby kopii DNA i obecności obszarów objętych utratą heterozygotyczności (loss of heterozygosity – LOH) cechuje się technika macierzy SNP (single nucleotide polymorphism). Analiza polimorfizmu pojedynczych nukleotydów umożliwia także identyfikację tzw. diploidalnego LOH, czyli zmiany liczby kopii DNA bez ilościowych zmian DNA. Zjawisko takie, będące następstwem disomii jednorodzicielskiej (uniparental disomy – UPD) obserwowane jest w 20% przypadków OBS z prawidłowym kariotypem [60]. Analizując zmiany genomu w OBS Gorletta i wsp. zaproponowali podział LOH ze względu na zasięg. LOH krańcowe (terminal LOH), będące najczęściej wynikiem UPD, obejmuje duże obszary genomu (30–90 Mpz), natomiast LOH interstycjalne (10% przypadków OBS z prawidłowym kariotypem) dotyczy regionów 2–8 Mpz, utraconych w wyniku mikrodelecji [22]. LOH często obejmuje regiony, w których znajdują się geny istotne dla etiopatogenezy OBS: *CEBPA*, *FLT3* czy *RUNX1* [60]. Badania zmian liczby kopii DNA oraz LOH w OBS trwają, przyjmuje się jednak, że w większości przypadków ich obecność jest niekorzystnym czynnikiem prognostycznym [14].

PODSUMOWANIE

Mimo postępu w badaniach nad biologią białaczek, identyfikacji nowych czynników rokowniczych oraz wprowadzenia nowych schematów leczenia OBS wciąż pozostaje chorobą nieuleczalną. Intensywna chemioterapia i transplantacja szpiku pozwalają na uzyskanie całkowitej remisji, ale u znacznej części chorych dochodzi do nawrotu choroby i zgonu. U chorych powyżej 60. roku życia wyniki leczenia są znacznie gorsze. Rokowanie pogarsza obecność niekorzystnych aberracji chromosomowych, częstsze występowanie białaczek wtórnych rozwijających się z zespołów mielodysplastycznych, lekooporność oraz toksyczność leczenia. Brak możliwości całkowitego wyleczenia, a także wzrost zachorowalności wśród starszych chorych utrudniający radykalne leczenie implikuje potrzebę stosowania w terapii nowych leków, charakteryzujących się większą skutecznością i mniejszą toksycznością [31]. Wprowadzenie metod opartych na macierzach DNA/RNA może znacznie ułatwić zarówno poznanie nowych czynników prognostycznych i predykcyjnych w OBS, jak też badania w zakresie leczenia celowanego, ukierunkowanego na określony mechanizm promujący wzrost i przeżycie komórek nowotworowych.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Bacher U., Schnittger S., Haferlach T.: Molecular genetics in acute myeloid leukemia. *Curr. Opin. Oncol.*, 2010; 22: 646–655
- [2] Balana-Nowak A., Zdziwłowska E.: Cytometria przepływowa w diagnostyce immunofenotypowej ostrych białaczek. *Postępy Biol. Kom.*, 2008; 35(Supl. 24): 65–102
- [3] Baldus C.D., Tanner S.M., Ruppert A.S., Whitman S.P., Archer K.J., Marcucci G., Caligiuri M.A., Carroll A.J., Vardiman J.W., Powell B.L., Allen S.L., Moore J.O., Larson R.A., Koltz J.E., de la Chapelle A., Bloomfield C.D.: *BAALC* expression predicts clinical outcome of *de novo* acute myeloid leukemia patients with normal cytogenetics: a Cancer and Leukemia Group B Study. *Blood*, 2003; 102: 1613–1618
- [4] Bernasconi P., Boni M., Cavigliano P.M., Calatroni S., Giardini L., Rocca B., Caresana M.: Molecular genetics of acute myeloid leukemia. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2002; 963: 297–305
- [5] Betz B.L., Hess J.L.: Acute myeloid leukemia diagnosis in the 21st century. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 2010; 134: 1427–1433
- [6] Breems D.A., Van Putten W.L., De Greef G.E., Van Zelder-Bhola S.L., Gerssen-Schoorl K.B., Mellink C.H., Nieuwint A., Jotterand M., Hagemeijer A., Beverloo H.B., Löwenberg B.: Monosomal karyotype in acute myeloid leukemia: a better indicator of poor prognosis than a complex karyotype. *J. Clin. Oncol.*, 2008; 26: 4791–4797

- [7] Bullinger L., Döhner K., Bair E., Fröhling S., Schlenk R.F., Tibshirani R., Döhner H., Pollack J.R.: Use of gene-expression profiling to identify prognostic subclasses in adult acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.*, 2004; 350: 1605–1616
- [8] Bullinger L., Rücker F.G., Kurz S., Du J., Scholl C., Sander S., Corbacioglu A., Lottaz C., Krauter J., Fröhling S., Ganser A., Schlenk R.F., Döhner K., Pollack J.R., Döhner H.: Gene-expression profiling identifies distinct subclasses of core binding factor acute myeloid leukemia. *Blood*, 2007; 110: 1291–1300
- [9] Calin G.A., Croce C.M.: MicroRNA signatures in human cancers. *Nat. Rev. Cancer*, 2006; 6: 857–866
- [10] Cioch M.: Kliniczne znaczenie zmian w ekspresji genów oraz ich mutacji u chorych na ostre białaczki szpikowe z prawidłowym kariotypem. *Acta Haematol. Pol.*, 2008; 39: 131–138
- [11] Dixon-McIver A., East P., Mein C.A., Cazier J.B., Molloy G., Chaplin T., Lister T.A., Young B.D., Debernardi S.: Distinctive patterns of microRNA expression associated with karyotype in acute myeloid leukaemia. *PLoS ONE*, 2008; 3: e2141
- [12] Döhner K., Schlenk R.F., Habdank M., Scholl C., Rücker F.G., Corbacioglu A., Bullinger L., Fröhling S., Döhner H.: Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: interaction with other gene mutations. *Blood*, 2005; 106: 3740–3746
- [13] Ejduk A., Majewski M., Warzocha K.: Znaczenie prognostyczne aberracji genetycznych w ostrej białaczce szpikowej. *Acta Haematol. Pol.*, 2006; 37: 5–24
- [14] Eklund E.A.: Genomic analysis of acute myeloid leukemia: potential for new prognostic indicators. *Curr. Opin. Hematol.*, 2010; 17: 75–78
- [15] Estey E., Döhner H.: Acute myeloid leukaemia. *Lancet*, 2006; 368: 1894–1907
- [16] Falini B., Mecucci C., Tiacci E., Alcalay M., Rosati R., Pasqualucci L., La Starza R., Diverio D., Colombo E., Santucci A., Bigerna B., Pacini R., Pucciarini A., Liso A., Vignetti M., Fazi P., Meani N., Pettrossi V., Saglio G., Mandelli F., Lo-Coco F., Pelicci P.G., Martelli M.F., GIMEMA Acute Leukemia Working Party: Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *N. Engl. J. Med.*, 2005; 352: 254–266
- [17] Fey M.F., Greil R., Jost L.M., ESMO Guidelines Task Force. ESMO Minimum Clinical Recommendations for the diagnosis, treatment and follow-up of acute myeloblastic leukemia (AML) in adult patients. *Ann. Oncol.*, 2005; 16(Suppl. 1): i48–i49
- [18] Fröhling S., Döhner H.: Chromosomal abnormalities in cancer. *N. Engl. J. Med.*, 2008; 359: 722–734
- [19] Garzon R., Garofalo M., Martelli M.P., Briesewitz R., Wang L., Fernandez-Cymering C., Volinia S., Liu C.G., Schnittger S., Haferlach T., Liso A., Diverio D., Mancini M., Meloni G., Foa R., Martelli M.F., Mecucci C., Croce C.M., Falini B.: Distinctive microRNA signature of acute myeloid leukemia bearing cytoplasmic mutated nucleophosmin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008; 105: 3945–3950
- [20] Garzon R., Liu S., Fabbri M., Liu Z., Heaphy C.E., Callegari E., Schwind S., Pang J., Yu J., Muthusamy N., Havelange V., Volinia S., Blum W., Rush L.J., Perrotti D., Andreeff M., Bloomfield C.D., Byrd J.C., Chan K., Wu L.C., Croce C.M., Marcucci G.: MicroRNA 29b induces global DNA hypomethylation and tumor suppressor gene re-expression in acute myeloid leukemia by targeting directly DNMT3A and 3B and indirectly DNMT1. *Blood*, 2009; 113: 6411–6418
- [21] Golub T.R., Slonim D.K., Tamayo P., Huard C., Gaasenbeek M., Mesirov J.P., Coller H., Loh M.L., Downing J.R., Caligiuri M.A., Bloomfield C.D., Lander E.S.: Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science*, 1999; 286: 531–537
- [22] Gorletta T.A., Gasparini P., D'Elia M.M., Trubia M., Pelicci P.G., Di Fiore P.P.: Frequent loss of heterozygosity without loss of genetic material in acute myeloid leukemia with a normal karyotype. *Genes Chromosomes Cancer*, 2005; 44: 334–337
- [23] Grimwade D., Hills R.K.: Independent prognostic factors for AML outcome. *Hematology*, 2009; 385–395
- [24] Guerrasio A., Pilatrin C., De Micheli D., Cilloni D., Serra A., Gottardi E., Parziale A., Marmont F., Diverio D., Divona M., Lo-Coco F., Saglio G.: Assessment of minimal residual disease (MRD) in CBFbeta/MYH11-positive acute myeloid leukemias by qualitative and quantitative RT-PCR amplification of fusion transcripts. *Leukemia*, 2002; 16: 1176–1181
- [25] Haus O.: Zmiany cytogenetyczne i molekularne w ostrych białaczkach szpikowych. *Diagn. Lab.*, 2001; 37: 221–252
- [26] Haus O., Duszeńko E., Jaśkowiec A., Skonieczka K.: Amplifikacja genów w nowotworach układu krwiotwórczego. *Acta Haematol. Pol.*, 2009; 40: 313–319
- [27] Hołowiecki J., Hołowiecka A.: Ostre białaczki szpikowe – 2009. *Acta Haematol. Pol.*, 2009; 2: 545–559
- [28] Hrušak O., Porwit-MacDonald A.: Antigen expression patterns reflecting genotype of acute leukemias. *Leukemia*, 2002; 16: 1233–1258
- [29] Huret J.L., Léonard C.: AML1 overexpression and/or mutations should be checked in trisomy 21 patients with megakaryocytic leukemia. *Leukemia*, 2003; 17: 1421
- [30] Jakóbczyk M., Szostek M., Salamanczuk Z., Skotnicki A.: Analiza wzrostu klonalnego w hodowlach *in vitro* w grupach cytogenetycznego ryzyka u pacjentów z ostrą białaczką szpikową. *Acta Haematol. Pol.*, 2002; 33: 461–474
- [31] Janus A., Smolewski P.: Inhibitory kinazy mTOR w leczeniu ostrej białaczki szpikowej. *Acta Haematol. Pol.*, 2007; 38: 203–211
- [32] Kiyoi H., Naoe T.: *FLT3* in human hematologic malignancies. *Leuk. Lymphoma*, 2002; 43: 1541–1547
- [33] Krauter J., Gorlich K., Ottmann O., Lubbert M., Döhner H., Heit W., Kanz L., Ganser A., Heil G.: Prognostic value of minimal residual disease quantification by real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction in patients with core binding factor leukemias. *J. Clin. Oncol.*, 2003; 21: 4413–4422
- [34] Li Z., Lu J., Sun M., Mi S., Zhang H., Luo R.T., Chen P., Wang Y., Yan M., Qian Z., Neilly M.B., Jin J., Zhang Y., Bohlander S.K., Zhang D., Larson R.A., Le Beau M.M., Thirman M.J., Golub T.R., Rowley J.D., Chen J.: Distinct microRNA expression profiles in acute myeloid leukemia with common translocations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008; 105: 15535–15540
- [35] Licht J.D., Sternberg D.W.: The molecular pathology of acute myeloid leukemia. *Hematology*, 2005: 137–142
- [36] Liso A., Castiglione F., Cappucco A., Stracci F., Schlenk R.F., Amadori S., Thiede C., Schnittger S., Valk P.J., Döhner K., Martelli M.F., Schaich M., Krauter J., Ganser A., Martelli M.P., Bolli N., Löwenberg B., Haferlach T., Ehninger G., Mandelli F., Döhner H., Michor F., Falini B.: A one-mutation mathematical model can explain the age incidence of acute myeloid leukemia with mutated nucleophosmin (NPM1). *Haematologica*, 2008; 93: 1219–1226
- [37] Marcucci G., Radmacher M.D., Maharry K., Mrózek K., Ruppert A.S., Paschka P., Vukosavljevic T., Whitman S.P., Baldus C.D., Langer C., Liu C.G., Carroll A.J., Powell B.L., Garzon R., Croce C.M., Kollitz J.E., Caligiuri M.A., Larson R.A., Bloomfield C.D.: MicroRNA expression in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.*, 2008; 358: 1919–1928
- [38] Marcucci G., Radmacher M.D., Mrózek K., Bloomfield C.D.: MicroRNA expression in acute myeloid leukemia. *Curr. Hematol. Malig. Rep.*, 2009; 4: 83–88
- [39] Metzeler K.H., Hummel M., Bloomfield C.D., Spiekermann K., Braess J., Sauerland M.C., Heinecke A., Radmacher M., Marcucci G., Whitman S.P., Maharry K., Paschka P., Larson R.A., Berdel W.E., Büchner T., Wörmann B., Mansmann U., Hiddemann W., Bohlander S.K., Buske C.: An 86-probe-set gene-expression signature predicts survival in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Blood*, 2008; 112: 4193–4201
- [40] Mrózek K., Baldus C.D., Marcucci G., Bloomfield C.D.: Acute myeloid leukemia prognostic factors: from cytogenetic to chip. *Hematology*, 2005; 1: 116–122
- [41] Mrózek K., Bloomfield C.D.: Clinical significance of the most common chromosome translocations in adult acute myeloid leukemia. *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.*, 2008; 39: 52–57
- [42] Mrózek K., Bloomfield C.D.: Chromosome aberrations, gene mutations and expression changes, and prognosis in adult acute myeloid leukemia. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program*, 2006; 169–177
- [43] Mrózek K., Heerema N.A., Bloomfield C.D.: Cytogenetics in acute leukemia. *Blood Rev.*, 2004; 18: 115–136
- [44] Mrózek K., Marcucci G., Paschka P., Bloomfield C.D.: Advances in molecular genetics and treatment of core-binding factor acute myeloid leukemia. *Curr. Opin. Oncol.*, 2008; 20: 711–718
- [45] Mrózek K., Marcucci G., Paschka P., Whitman S.P., Bloomfield C.D.: 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: 431–448

- [46] Mrózek K., Prior T.W., Edwards C., Marcucci G., Carroll A.J., Snyder P.J., Koduru P.R., Theil K.S., Pettenati M.J., Archer K.J., Caligiuri M.A., Vardiman J.W., Kolitz J.E., Larson R.A., Bloomfield C.D.: Comparison of cytogenetic and molecular genetic detection of t(8;21) and inv(16) in a prospective series of adults with de novo acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B Study. *J. Clin. Oncol.*, 2001; 19: 2482–2492
- [47] Mrózek K., Radmacher M.D., Bloomfield C.D., Marcucci G.: Molecular signatures in acute myeloid leukemia. *Curr. Opin. Hematol.*, 2009; 16: 64–69
- [48] Mylykangas S., Böhling T., Knuutila S.: Specificity, selection and significance of gene amplifications in cancer. *Semin. Cancer Biol.*, 2007; 17: 42–55
- [49] Nilsson P.G., Brandt L., Mitelman F.: Prognostic implications of chromosome analysis in acute nonlymphocytic leukemia. *Leukemia Res.*, 1977; 1: 31–34
- [50] Pandolfi P.P.: Oncogenes and tumor suppressors in the molecular pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. *Hum. Mol. Genet.*, 2001; 10: 769–775
- [51] Paphenhausen P.R., Griffin S., Tepperberg J.: Oncogene amplification in transforming myelodysplasia. *Exp. Mol. Pathol.*, 2005; 79: 168–175
- [52] Paschka P., Marcucci G., Ruppert A.S., Whitman S.P., Mrózek K., Maharry K., Langer C., Baldus C.D., Zhao W., Powell B.L., Baer M.R., Carroll A.J., Caligiuri M.A., Kolitz J.E., Larson R.A., Bloomfield C.D.: Wilm's 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: 4595–4602
- [53] Reddy K.S., Parsons L., Mak L., Dighe P., Saphner T., Crow M.K., Scott M.: Segmental amplification of 11q23 region identified by fluorescence in situ hybridization in four patients with myeloid disorders: a review. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 2001; 126: 139–164
- [54] Rodon N., Solé F., Espinet B., Salido M., Zamora L., Cigudosa J.C., Woessner S., Florensa L.: A new case of acute nonlymphocytic leukemia (French-American-British subtype M1) with double minutes and C-MYC amplification. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 2002; 132: 161–164
- [55] Rücker F.G., Bullinger L., Schwaenen C., Lipka D.B., Wessendorf S., Fröhling S., Bentz M., Miller S., Scholl C., Schlenk R.F., Radlwimmer B., Kestler H.A., Pollack J.R., Lichter P., Döhner K., Döhner H.: Disclosure of candidate genes in acute myeloid leukemia with complex karyotypes using microarray-based molecular characterization. *J. Clin. Oncol.*, 2006; 24: 3887–3894
- [56] Schlenk R.F., Döhner K., Krauter J., Fröhling S., Corbacioglu A., Bullinger L., Habdank M., Späth D., Morgan M., Benner A., Schlegelberger B., Heil G., Ganser A., Döhner H., German-Austrian Acute Myeloid Leukemia Study Group: Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.*, 2008; 358: 1909–1918
- [57] Shook D., Coustan-Smith E., Ribeiro R.C., Rubnitz J.E., Campana D.: Minimal residual disease quantitation in acute myeloid leukemia. *Clin. Lymphoma Myeloma*, 2009; 9(Suppl. 3): S281–S285
- [58] Spiekermann K.: Biology of AML with a normal karyotype. Acute leukemias XL Prognostic factors and treatment strategies. *Ann. Hematol.*, 2006; 85(Suppl. 1): 107–110
- [59] Stirewalt D.L., Kopecky K.J., Meshinchi S., Appelbaum F.R., Slovak M.L., Willman C.L., Radich J.P.: *FLT3*, *RAS*, and *TP53* mutations in elderly patients with acute myeloid leukemia. *Blood*, 2001; 97: 3589–3595
- [60] Suela J., Alvarez S., Cigudosa J.C.: DNA profiling by arrayCGH in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. *Cytogenet. Genome Res.*, 2007; 118: 304–309
- [61] Szczepanek J., Styczyński J., Haus O., Tretny A., Wysocki M.: Postępy w kierunku molekularnej klasyfikacji nowotworów u dzieci. *Postępy Hig. Med. Dosw.*, 2008; 62: 222–240
- [62] Taskesen E., Bullinger L., Corbacioglu A., Samders M.A., Erpelinck C.A., Wouters B.J., van der Poel-van de Luytgaarde S.C., Damm F., Krauter J., Ganser A., Schlenk R.F., Löwenberg B., Delwel R., Döhner H., Valk P.J., Döhner K.: Prognostic impact, concurrent genetic mutations, and gene expression features of AML with CEBPA mutations in a cohort of 1182 cytogenetically normal AML patients: further evidence for CEBPA double mutant AML as a distinctive disease entity. *Blood*, 2011; 117: 2469–2475
- [63] Thiede C., Koch S., Creutzig E., Studel C., Illmer T., Schaich M., Ehninger G.: Prevalence and prognostic impact of NPM1 mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood*, 2006; 107: 4011–4020
- [64] Tyybäkinöja A., Saarien-Pihkala U., Elonen E., Knuutila S.: Amplified, lost, and fused genes in 11q23→q25 amplicon in acute myeloid leukemia, an array-CGH study. *Genes Chromosomes Cancer*, 2006; 45: 257–264
- [65] Vardiman J.W., Thiele J., Arber D.A., Brunning R.D., Borowitz M.J., Porwit A., Harris N.L., Le Beau M.M., Hellström-Lindberg E., Tefferi A., Bloomfield C.D.: The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*, 2009; 114: 937–951
- [66] Wieser R., Scheideler M., Hackl H., Engelmann M., Schnecklenleithner C., Hiden K., Papak C., Trajanoski Z., Sill H., Fonatsch C.: MicroRNAs in acute myeloid leukemia: expression patterns, correlations with genetic and clinical parameters, and prognostic significance. *Genes Chromosomes Cancer*, 2010; 49: 193–203
- [67] Wolman S.R., Gundacker H., Appelbaum F.R., Slovak M.L.: Impact of trisomy 8 (+8) on clinical presentation, treatment response, and survival in acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group study. *Blood*, 2002; 100: 29–35
- [68] Zhao N., Stoffel A., Wang P.W., Eisenbart J.D., Espinosa 3rd, Larson R.A., Le Beau M.M.: Molecular delineation of the smallest commonly deleted region of chromosome 5 in malignant myeloid diseases to 1-1.5 Mb and preparation of a PAC-based physical map. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997; 94: 6948–6953
- [69] Zmorzyński S., Karczmarek-Borowska B., Filip A.: Molekularne markery kancerogenezy wykorzystywane w diagnostyce i planowaniu terapii nowotworu gruczołu piersiowego. *Współcz. Onkol.*, 2008, 12: 205–211
- [70] Żmieńko A., Handschuh L., Góralski M., Figlerowicz M.: Zastosowanie mikromacierzy DNA w genomice strukturalnej i funkcjonalnej. *Biotechnologia*, 2008; 4: 39–53

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.