

Konstitucijske kromosomske aberacije kao čimbenik rizika zloćudnih bolesti hematološkog sustava

Nonković, Martin

Master's thesis / Diplomski rad

2015

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:436319>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-05**



Repository / Repozitorij:

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET**

Martin Nonković

**KONSTITUCIJSKE KROMOSOMSKE ABERACIJE KAO ČIMBENIK
RIZIKA ZLOĆUDNIH BOLESTI HEMATOLOŠKOG SUSTAVA**

Diplomski rad

**Akadska godina:
2014./2015.**

Mentor:

Prim. dr. sc. Bernarda Lozić

Split, srpanj 2015.

**SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET**

Martin Nonković

**KONSTITUCIJSKE KROMOSOMSKE ABERACIJE KAO ČIMBENIK
RIZIKA ZLOĆUDNIH BOLESTI HEMATOLOŠKOG SUSTAVA**

Diplomski rad

**Akadska godina:
2014./2015.**

Mentor:

Prim. dr. sc. Bernarda Lozić

Split, srpanj 2015.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Kromosomske aberacije	2
1.2. Tipovi kromosomskih aberacija	3
1.3. Numeričke kromosomske aberacije	3
1.3.1. Downov sindrom	3
1.3.2. Turnerov sindrom	4
1.3.3. Klinefelterov sindrom	4
1.3.4. Triple X sindrom	5
1.3.5. XYY sindrom	5
1.4. Strukturne kromosomske aberacije	5
1.5. Zloćudne bolesti hematološkog sustava i njihova podjela	6
1.5.1. Zloćudne bolesti mijeloidne loze	7
1.5.2. Zloćudne bolesti limfoidne loze	10
1.5.3. Etiologija i patogeneza leukemija	11
1.5.3.1. Stečene kromosomske aberacije u zloćudnim bolestima hematološkog sustava	13
1.5.3.2. Konstitucijske kromosomske aberacije u zloćudnim bolestima hematološkog sustava	14
1.6. Pregled dosadašnjih istraživanja	14
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	16
2.1. Ciljevi	17
3. MATERIJAL I METODE	18
3.1. Ustroj istraživanja	19
3.2. Mjesto istraživanja	19
3.3. Ispitanici	19
3.4. Statistička analiza podataka	20
4. REZULTATI	21
5. RASPRAVA	30
6. ZAKLJUČCI	35
7. POPIS CITIRANE LITERATURE	37
8. SAŽETAK	43
9. SUMMARY	45
10. ŽIVOTOPIS	47

Zahvaljujem svojoj mentorici prim.doc.dr.sc. Bernardi Lozić na strpljenju, vodstvu i savjetima pri izradi ovog diplomskog rada.

Želio bih se zahvaliti svojoj obitelji, djevojci i prijateljima koji su mi bili velika podrška tokom mog studiranja.

1. UVOD

1

1.1. Kromosomke aberacije

Svaka somatska stanica čovjeka ima 46 kromosoma, odnosno 22 homologna para autosoma i jedan par gonosoma ili spolnih kromosoma. Spolni par kromosoma različit je u žena i muškaraca. U žena su oba spolna kromosoma oblikom jednaka (XX), a u muškarca su različita (XY) (1).

Kromosomske anomalije ili kromosomske aberacije (engl. *chromosomal aberration* – CA) jesu odstupanja u broju ili strukturi kromosoma u stanicama. Bolesti ili anomalije koje zbog toga nastaju poznate su kao klinički prepoznatljive bolesti ili kromosomopatije, odnosno sindromi. One u pravilu (uz brojne iznimke poput nekih anomalija spolnih kromosoma) zahvaćaju duboko u strukturu i funkciju više organskih sustava i kod čovjeka čine spektar patologije u kojem odlučujuće značenje u oblikovanju patološkog fenotipa ima naslijeđe, dok je utjecaj čimbenika okoliša relativno malen. CA su zapravo mikroskopski vidljivi dijelovi patoloških DNA-promjena, akumuliranih različitim mehanizmima popravka loma dvolančane DNA (1). Jednom proizveden lom dvolančane DNA (engl. *double-strand break*-DSB) u stanici, ako nije uspješno ponovno prespojen, može uzrokovati staničnu smrt, ostaviti genetsku mutaciju, kromosomska preuređenja, onkogenu transformaciju i uzrokovati druge fenotipske stanične abnormalnosti koji su važni mehanizmi leukemogeneze (2). Normalan broj kromosoma u tjelesnim (somatskim) stanicama čovjeka je 46- euploidija (diploidan broj - $2n$), a 23 (haploidan broj - n) u spolnim stanicama (gamete). Poliploidija je numerička kromosomska aberacija karakterizirana povećanjem broja haploidne kromosomske garniture ($3n$, $4n$, $5n$ itd.). Aneuploidija je numerička kromosomska aberacija koju karakterizira promjena broja kromosoma unutar kromosomskog para, zahvaća pojedine kromosome u setu (monosomije: 45, polisomije: 47, 48, 49). Pojavu stanica u organizmu s različitim brojem kromosoma nazivamo mozaicizmom ili miksoploidijom. Razlikujemo konstitucijsku ili razvojnu miksoploidiju dok se proliferativna miksoploidija javlja kasnije tijekom života i vezana je uz procese starenja i stvaranja neoplastičnih tvorbi. Miksoploidija je češće vezana uz gonosome (1).

1.2 Tipovi kromosomskih aberacija

Konstitucijska kromosomska aberacija nasljeđuje se od roditelja nosioca ili se pojavljuju kao *de novo* u vrijeme gametogeneze i prisutna je u svim tkivima nosioca. S druge strane stečena kromosomska aberacija pojavljuje se tijekom života i ograničena je na specifične sustave (3).

Konstitucijske kromosomske aberacije bilo numeričke bilo strukturne pojavljuju se s učestalosti u oko 1 od 150 novorođenčadi ili 0,6-0,9% (4). Poznato je da da neke od njih stvaraju predispoziciju za razvoj leukemije kao što je trisomija 21. kromosoma (5).

1.3. Numeričke kromosomske aberacije

1.3.1. Downov sindrom

Downov sindrom (DS) je najčešća klinički važna kromosomopatija s prosječnom incidencijom u općoj populaciji, bez obzira na dob majke, od 1:650 novorođene djece (0,15 %). U citogenetskom pogledu postoji tzv. *regularni tip* i *translokacijski tip* DS. U 92% slučajeva posrijedi je *regularni tip* pa dijete u svim svojim stanicama ima trisomiju 21. U oko 3% djece postoji kromosomski mozaik (*miksoploidija*): jedna loza stanica ima trisomiju 21, a druga loza je euploidna. U oko 5% djece s ovim sindromom posrijedi je tzv. *translokacijski tip*: u stanicama je broj kromosoma normalan 46, ali ipak ima višak kromosomske mase, zbog nebalansirane translokacije. Klinički se sindrom očituje mentalnom zaostalošću različitog stupnja. Uz to postoji znatno intrauterino i postnatalno zaostajanje u tjelesnom razvoju i rastu. Oboljeli imaju karakterističan fenotip koji se prepoznaje već u neonatalnoj dobi. Bolest prati veća učestalost srčanih mana (40%), česte su stenoze i atrezije probavnog trakta te aganglioza crijeva (6). Djeca s DS-om obolijevaju 20-50 puta učestalije od svih tipova leukemija dok je pojava solidnih tumora znatno niža u osoba s DS nego u općoj populaciji (7).

1.3.2. Turnerov sindrom

Turnerov sindrom (TS) je genetski poremećaj koji se javlja 1:2500-3000 živorođenih osoba ženskog spola (0.03%-0.04%), a uzrokovan je potpunim ili djelomičnim nedostatkom X kromosoma (8). Citogenetski nalaz pokazuje u oko polovice bolesnica totalnu monosomiju za X-kromosom- 45,X. Nešto manje od polovice oboljelih ima kromosomski mozaik s dvije stanične loze: 45,X/46,XX, obično s blažom kliničkom slikom (6). Tipične dvije najstalnije kliničke značajke TS su nizak rast i disgeneza jajnika (8,9). Mentalni je razvoj uglavnom normalan, a velik broj bolesnica bude prepoznat tek u školskoj dobi kad se zamijeti veći zaostatak rasta u visinu (6). Gubitak specifičnih gena smještenih na X-kromosomu smatra se odgovornim za širok spektar poremećaja, uključujući osteoporozu, hipotiroidizam, kardiovaskularne, endokrine i gastrointestinalne bolesti, kao i poremećaje sluha, vida te poremećaje kože (9,10). Pri TS, morbiditet i mortalitet su povišeni uglavnom zbog kardiovaskularnih bolesti, kongenitalnih malformacija i endokrinih bolesti (11,12). Iako je velik broj neoplazmi, uključujući neurogene tumore, ginekološke tumore i tumore crijeva, zabilježen kod osoba s TS, ne čini se da je povišen rizik za nastanak neoplazmi, osim za nastanak karcinoma debelog crijeva (9,11,13,14).

1.3.3. Klinefelterov sindrom

Klinefelterov sindrom (KS) prvi put je opisan 1942. kao endokrini poremećaj karakteriziran ginekomastijom, hipogonadizmom, atrofičnim testisima i povišenom razinom folikulo-stimulirajućeg hormona (FSH). Dodatni X kromosom se naknadno pokazao odgovornim za kliničke manifestacije kod ovih bolesnika (15). KS je sa incidencijom od 1:600 (0.16%) muške novorođenčadi najučestaliji tip X kromosomske aneuploidije. Oko 80% bolesnika ima kariotip 47,XXY (16). U određenog manjeg broja bolesnika postoji mentalna zaostalost. Budući da nije klinički prepoznatljiv prije puberteta, sindrom nije pedijatrijski problem, nego se najčešće otkriva u muškaraca koji dolaze liječniku zbog neplodnosti, ali koji u većini slučajeva vode normalan život (6). Bolesnici pokazuju veći rizik razvoja karcinoma dojke, karcinoma zametnih stanica i non-Hodgkin limfoma (NHL), ali rijetko dolazi do razvoja akutne mijeloične leukemije (AML) (engl. *acute myeloid leukemia* - AML) (16).

1.3.4. Triplo X sindrom

Triplo X sindrom ima vrlo varijabilan klinički fenotip, nije rijetka, ali je često nedijagnosticirana bolest (17). Taj se sindrom otkriva najčešće slučajno, s učestalošću 1:1000 ženske novorođenčadi (0.1%). Bez obzira na relativno visoku prevalenciju triplo X sindroma, nije potpuno razjašnjen njihov fenotip i razvojne osobitosti od rođenja do starosti. Poznato je da mlađa djeca imaju usporen govorno-jezični razvoj, abnormalnosti EEG-a, niži intelektualni nivo te ubrzan rast do puberteta. Manji broj u odrasloj dobi ima primarnu ili sekundarnu amenoreju, a neke imaju emotivne teškoće u društvenom prilagođavanju i veću učestalost psihijatrijskih poremećaja (18).

1.3.5. XYY sindrom

47,XYY sindrom se kariotipski manifestira dodatnom kopijom Y kromosoma u svakoj stanici s incidencijom od 1:969 u novorođenačkoj populaciji prema istraživanju Hsua (19). Fenotip muškaraca s ovim kariotipom klinički se teško prepoznaje iako se povezuje s rastom većim od prosjeka, govorno-jezičnim poteškoćama, a moguće i s promjenama ponašanja i socijalne interakcije. Većina muškaraca s 47, XYY sindrom je fertilna (6).

1.4. Strukturne kromosomske aberacije

Konstitucijske i stečene strukturne kromosomske aberacije su mutacije uzrokovane lomovima i spajanjem odlomljenih krajeva kromosoma. Odlomljeni dijelovi mogu promijeniti položaj na kromosomu, biti premješteni na neki drugi kromosom, zaokrenuti se unutar kromosoma ili se izgubiti tijekom stanične diobe. Stoga ih dijelimo na intrakromosomske, u kojih je došlo do premještanja kromosomskih segmenata unutar jednog kromosoma, i interkromosomske, u kojih postoji izmjena segmenata između dva ili više kromosoma. Strukturne aberacije mogu biti balansirane i nebalansirane, ovisno o tome postoji li višak ili manjak genetičkog materijala. Balansirane strukturne aberacije konstitucijskog karaktera obično ne uzrokuju promjene fenotipa, dok su stečene strukturne aberacije najčešće povezane sa zloćudnim tumorima (20).

1.5. Zloćudne bolesti hematološkog sustava i njihova podjela

Tradicionalno, podjela leukemija je polazila od morfoloških značajki leukemijskih stanica, tj. koja je stanična loza zahvaćena, mijeloična ili limfocitna. Najnovija podjela prema smjernicama Svjetske zdravstvene organizacije (SZO) iz 2008. godine pored fenotipskih obilježja leukemijskih stanica (morfolologija, citokemija, imunofenotipizacija, genetika) uz kliničke parametre bolesnika uključuje i biološke pokazatelje koji uz dijagnozu određuju i prognostičke markere koji definiraju djelotvorniju ciljanu terapiju određene leukemije (21).

S obzirom na stanično porijeklo najvažnije je razlikovati zloćudne bolesti mijeloidne i limfoidne loze (22). Na temelju zrelosti leukemijskih stanica klasificiraju se u akutne ili kronične. Kod akutne leukemije simptomi bolesti traju kratko i mnogo je nezrelih oblika stanica u koštanoj srži i/ili perifernoj krvi. Kod kroničnih leukemija simptomi bolesti traju dugo, a u koštanoj srži i/ili perifernoj krvi bolesnika nalaze se većinom zrele stanice. S obzirom na kliničku sliku i raspodjelu tumorske mase, zloćudne bolesti hematopoetskog sustava dijele se na leukemije i limfome (22). Limfomi se očituju povećanjem limfnih čvorova i slezene, a nastaju zbog infiltracije zloćudnim stanicama. Leukemija je sindrom koji obuhvaća skupinu klonskih zloćudno promijenjenih hematopoetskih matičnih stanica. Osnovna je klinička značajka leukemije nakupljanje leukemijskih stanica u koštanoj srži i njihova pojava u perifernoj krvi, slezeni, limfnim čvorovima i drugim organima (22,23). U leukemiji, zloćudno preobražene stanice ne dozrijevaju i ne gube sposobnost diobe, nego tvore klon koji nekontrolirano buja (23).

Stopa incidencije malignih bolesti limfoidne loze u Europskoj populaciji je općenito veća (24,5 na 100 000 stanovnika) od malignih bolesti mijeloidne loze, a kojoj je incidencija 7,55 na 100 000 stanovnika. Incidencija se općenito povećava s dobi, dosegnuvši najvišu stopu u dobi od 75 do 99 godina, izuzev nekih iznimki kao što su Hodgkin limfom (HL) i akutna limfoblastična leukemija (ALL) (engl. *acute lymphoblastic leukemia* - ALL). Za HL, incidencija je bimodalna, s maksimumom kod 15 - 44 godina i 65-74 godina. ALL ima najveću incidencija u dobnoj skupini 0-14 godina, potom se smanjuje u dobi od 45 do 54 godina, a nakon toga ponovno povećava sa starenjem s maksimumom u dobi od 75 do 99 godine (24).

Dobro je poznata pojava da je incidencija zloćudnih bolesti hematološkog sustava općenito niža u žena nego u muškaraca, a moguće je posljedica niže izloženosti faktorima rizika iz okoliša (25,26).

Od leukemije obolijeva na godinu prosječno 30 od 100 000 djece u dobi do 14 godina. Pretežno obolijevaju djeca između 2. i 7. godine života, a maksimum je učestalosti oko 4. godine. Bolest je nešto češća u dječaka nego u djevojčica. Leukemije dječje dobi pretežno su „nezrele“ (akutne), a svega 3% do 5% su kronične. Prema morfoloiji i podrijetlu zloćudno preobraženih stanica, najveća je učestalost ALL (75%). Daljnjih 20% čine AML. Kronična mijeloidna leukemija (CML) (engl. Chronic myeloideus leukemia – CML) i atipične leukemije čine preostalih 5% (6).

1.5.1. Zloćudne bolesti mijeloidne loze

Zloćudne bolesti mijeloidne loze definiraju se kao zloćudne bolesti stanica mijelopoeze. Podjela nastoji povezati genetske promjene i kliničku sliku s morfoloijom, citokemijom i imunofenotipizacijom i predlaže četiri glavne skupine mijeloidnih zloćudnih bolesti (22):

1. mijeloproliferativne bolesti,
2. mijeloproliferativne bolesti sa znacima mijelodisplazije,
3. sindrom mijelodisplazije,
4. akutne mijeloične leukemije.

1. **Mijeloproliferativne bolesti (MPD)** (engl. *myeloproliferative disorders* - MPD) su klonalne bolesti hematopoetskih matičnih stanica koje karakterizira pojačana hematopoeza i zato povećani broj krvnih stanica u periferiji, bilo jedne ili više mijeloidnih loza, uz hepatosplenomegaliju (Tablica 1) (27).

Tablica 1. Podjela mijeloproliferativnih bolesti

Kronična mijeloična leukemija, Ph+ (t(9;22)(q34,q31), BCR/ABL), Filadelfija pozitivna (CML)
Kronična granulocitna leukemija
Kronična eozinofilna leukemija/hipereozinofilni sindrom
Kronična idiopatska mijelofibroza
Policitemija rubra vera (PRV)
Esencijalna trombocitemija
Mijeloproliferativna bolest (neklasificirana)

Kronična mijeloična leukemija (CML) u dječjoj dobi je rjeđa nego u odraslih i čini 3% do 5% ukupnog broja leukemija. Patognomoničan je nalaz *Philadelphia* (Ph) kromosoma u granulocitima, što je zapravo translokacija t(9;22) kojom nastaje združeni onkogen *bcr/abl* (22).

2. Mijeloproliferativne bolesti sa znacima mijelodisplazije uključuju bolesti koje istodobno pokazuju znakove mijeloproliferacije i morfološke značajke mijelodisplazije. Tu spadaju juvenilna i kronična mijelomonocitna bolest (27).

3. Sindrom mijelodisplazije (MDS) (engl. *myelodysplastic syndrom* - MDS) obuhvaća skupinu klonalnih poremećaja matičnih hematopotskih stanica koja se očituje različitim poremećajima u morfologiji i sazrijevanju staničnih prekursora jedne ili više loza, uz posljedičnu citopeniju u perifernoj krvi te različitu sklonost progresiji u AML (Tablica 2) (27).

Tablica 2. Podjela mijelodisplazija prema SZO

Refraktorna anemija
Refraktorna anemija s prstenastim sideroblastima (RARS)
Refraktorna citopenija s displazijom više krvotvornih loza (RCMD)
Refraktorna citopenija s displazijom više krvotvornih loza i prstenastim sideroblastima (RCMD-RS)
Refraktorna anemija sa suviškom blasta-1 (RAEB-1)
Refraktorna anemija sa suviškom blasta-2 (RAEB-2)
Mijelodisplastički sindrom s izoliranom delecijom 5q-
Mijelodisplastički sindrom (neklasificirani) (MDS-U)

4. Akutne mijeloične leukemije (AML) (engl. *acute myeloid leukemia* - AML) moraju sadržavati leukemijsku masu od 20% ili više blasta u koštanoj srži prema definiciji SZO. Prema podjeli SZO razlikujemo četiri skupine akutnih mijeloičnih leukemija (Tablica 3) (28).

Tablica 3. Podjela akutnih mijeloičnih leukemija

AML s citogenetskim translokacijama
AML sa znacima mijelodisplazije
AML i MDS nakon terapije
Ostale AML

AML s citogenetskim translokacijama – to su specifične abnormalnosti svojstvene pojedinim citomorfološkim oblicima, primjerice delecije kromosoma 5 ili 7, trisomija 8, t(9;22), t(8;21) i druge. Druga podskupina AML, koja nastaje iz prethodnog MDS, ima lošu prognozu. Pretpostavlja se da su sve ove bolesti posljedica sličnoga genskog oštećenja, izazvanog okolišem ili ijtrogeno. Sekundarne AML (treća podskupina ovih leukemija) obično su posljedica kemoterapije. Ta skupina AML ima nepovoljnu prognozu zbog prisutnosti displazije u više hematopoetskih loza u vrijeme dijagnoze te prethodne terapije alkilirajućim tvarima (22, 28).

1.5.2. Zloćudne bolesti limfoidne loze

Limfoproliferativne bolesti su zloćudne preobrazbe stanica limfopojeze, a klinički se javljaju u dva osnovne klinička oblika: ALL i kao kronična limfocitna leukemija (CLL) (engl. *chronic lymphoblastic leukemia*- CLL).

Akutna limfoblastična leukemija (ALL) limfoproliferativna je bolest hematopoetskih matičnih stanica T i B loze i najčešća je leukemija dječje dobi. Podjela ALL polazi od citomorfološkog dokaza zahvaćenosti limfoidne loze (postojanje limfoblasta). Zbog jednostavnosti i brzine, a radi potvrde dijagnoze, uvijek valja napraviti i citokemijsku analizu koja će obično potvrditi zahvaćenost limfoidne loze. Potom slijedi obvezatna rutinska citogenetska, imunološka i molekularno-genetska analiza. Podjela ALL prema prognostičkim citogenetskim promjenama navedena je u tablici (Tablici 4) (22,29).

Tablica 4. Podjela akutnih limfoblastičnih leukemija

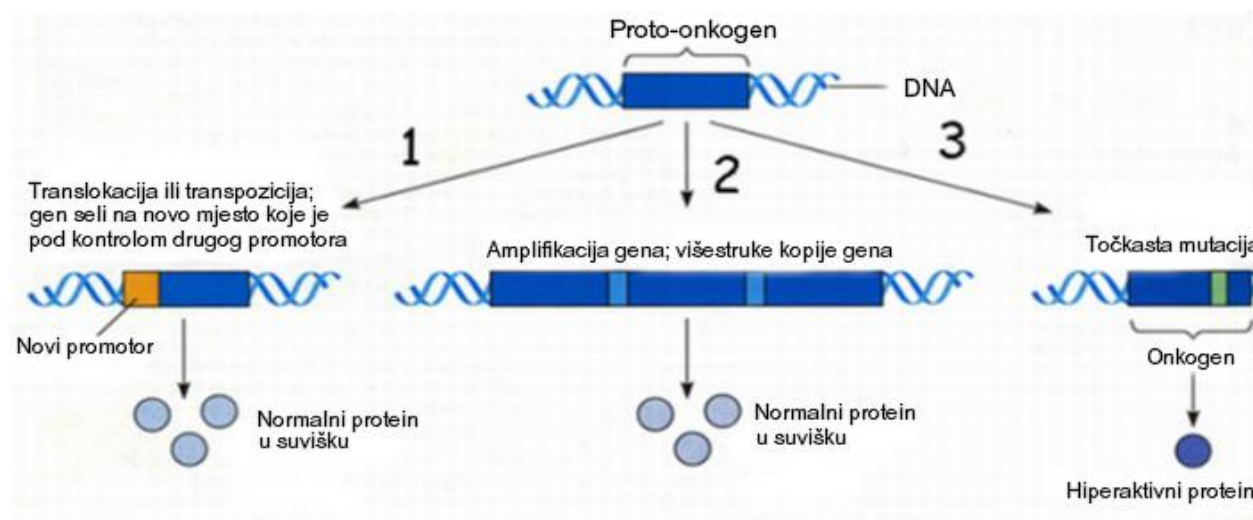
<p>Prekursorske B-stanične ALL (citogenetske podskupine)</p> <ul style="list-style-type: none">• t(9;22)(q34;q11); BCR/ABL• t(v;11q23); preustroj MLL• t(1;19)(q23;p13); E2A/PBX1• t(12;21)(p12;q22); ETV/CBF-alpha <p>Prekursorske T-stanične ALL</p> <p>Akutna leukemija Burkittovih stanica</p>

Kronična limfocitna leukemija (CLL) je klonska limfoproliferativna bolest obilježena infiltracijom koštane srži i periferne krvi limfocitima dok je infiltracija ostalih organa promjenjiva (22).

1.5.3. Etiologija i patogeneza leukemija

Etiologija leukemija zasad nije sasvim jasna, ali se zna da su za nastanak leukemije osim genetskih čimbenika važni i čimbenici okoliša. Leukemija nastaje zbog promjena u genomu matične hematopoetske stanice. Novonastalo kromosomsko preuređenje dovodi do patološke ekspresije staničnih onkogenata koji kontroliraju rast stanica i dovode do rasta leukemijskog kлона koji potiskuje normalnu hemocitopoezu i postepeno infiltrira koštanu srž i druga tkiva i organe i uzrokuje klinički prepoznatljivu bolest. Stanični onkogeni aktiviraju se s nekoliko mehanizama: retrovirusnom transdukcijom, delecijom, insercijom kromosoma, amplifikacijom gena, i preuređenjem gena. Diobom te stanice nastaju nove stanice koja imaju istovjetne biološke značajke prve stanice i tako nastaje maligni klon stanica. Stanice kлона rastu autonomno, imaju prednost pa potiskuju zdravu populaciju stanica (30).

Stanični genom sadržava gene koji nadziru staničnu diobu i zriobu (proliferaciju i diferencijaciju). Geni koji upravljaju staničnom diobom isprva su otkriveni u tumorima pa se vjerovalo da su specifični upravo za tumorske stanice, stoga su nazvani *onkogenima*. Pokazalo se, međutim, da onkogeni postoje u svim stanicama, ali u inaktivnom obliku, kao tzv. *protoonkogeni*. Normalna se stanica preobražava u zloćudnu zbog aktivacije protoonkogenata (Slika 1) (31).

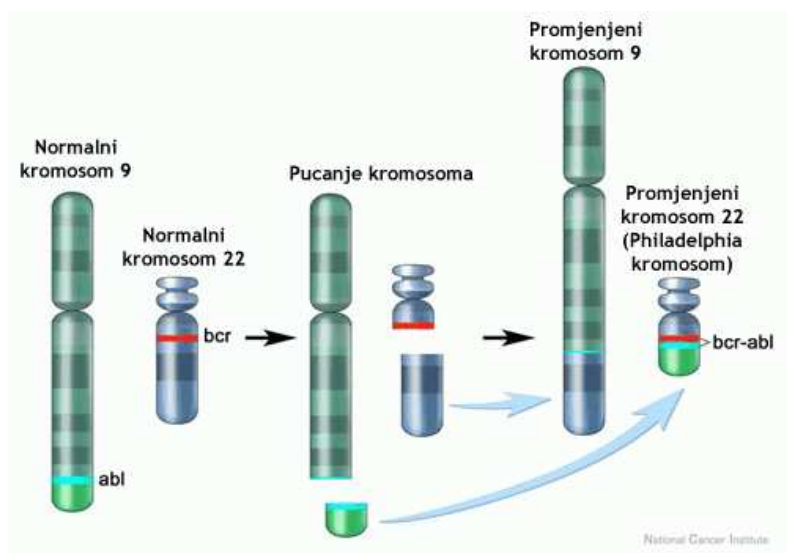


Slika 1. Protoonkogeni postaju onkogeni: translokacijom ili transpozicijom (1); amplifikacijom (2); točkastom mutacijom (3). (Preuzeto s mrežnog užbenika iz genetike; dostupno na www.genetika.biol.pmf.unizg.hr/index.html)

To nastaje djelovanjem izvanjskih činitelja koji oštećuju stanični genom tako da nastaju točkaste mutacije ili opsežnije kromosomske aberacije, primjerice translokacije, inverzije, delecije i sl. Zbog mutacije ili promjene genskog okružja inaktivni se protoonkogen aktivira. Drugi je mehanizam zloćudne preobrazbe da se poremeti funkcija nadzornih gena koji ograničavaju djelatnost protoonkogenata i čuvaju stanicu od zloćudne preobrazbe. Te gene nazivamo *tumorsupresornim* genima. Proteinski produkti tih gena nadziru prepisivanje aktivnih dijelova genoma i sudjeluju u popravku oštećene DNK, reguliraju prijenos poruka u citoplazmi. Prestanak ili smanjenje djelatnosti tih gena otvara put malignoj preobrazbi. Glede funkcije onkogeni su dominantni, a tumorsupresorni geni su recesivni. Stoga se poremećaj nadzornih mehanizama koji štite stanicu od zloćudne preobrazbe očituje tek kad prestanu funkcionirati oba alela tumorsupresornog gena. Drugim riječima, poremećaj funkcije tumorsupresornog gena ne izražava se dokle je god stanica heterozigotna glede alelskog para tog gena. Međutim, gubitak heterozigotnosti (LOH-engl. *loss of heterozygosity*) otvara put zloćudnoj preobrazbi. Ono što se nasljeđuje i očituje kao predispozicija za obolijevanje od raka jesu defektni alel tumorsupresornog gena. Kasnije se somatskim mutacijama inaktivira normalan alel i stanica izgubi heterozigotnost (LOH). Mutacije nastaju zbog djelovanja vanjskih činitelja koji oštećuju stanični genom, a katkada i spontano. Izvanjske činitelje koji oštećuju stanični genom svrstavamo u tri osnovne skupine: fizički, kemijski i biološki agensi. Tipični su predstavnici tih skupina ultravioletno zračenje, karcinogeni spojevi u duhanskom dimu i onkogeni virusi. Prve dvije skupine karcinogenih činitelja od veće su važnosti u etiologiji neoplazma svojstvenih odrasloj dobi. U djece, veće se značenje pridaje onkogenim virusima, ali to gledište nije potvrđeno. Za sada se jedino Burkittov limfom s velikom vjerojatnošću može pripisati infekciji Epstein-Barrovim virusom. Nerijetko se dječji tumori javljaju u sklopu kongenitalnih sindroma i malformacija, vjerojatno zbog naslijeđene ili prirodene nestabilnosti i defektnosti cjelokupnog genoma (31). Akutna leukemija učestalija je u bolesnika s kongenitalnim bolestima kao što su Downov, Bloomov, Klinefelterov, Fankonijev i Wiskott-Aldrichov sindrom (30).

1.5.3.1. Stečene kromosomske aberacije u zloćudnim bolestima hematološkog sustava

Translokacije u ljudi najčešće su povezane s različitim tumorima. Maligno alteriranim stanicama kronične mijeloične leukemije svojstvena je translokacija $t(9;22)(q34;q11)$. Očituje se kao nazočnost tzv. *Philadelphia* (Ph) kromosoma u mijeloblastima. Tom se translokacijom protoonkogen *c-abl* sa 9q34 premjesti tik uz protoonkogen *c-bcr* na 22q11 te nastaje kimerični protoonkogen *bcr-abl* (Slika 2). On kodira proizvodnju proteinskog produkta koji poremeti kontrolu stanične diobe i uzrokuje zloćudnu preobrazbu. Translokaciju karakterističnu za CML nalazimo i u drugim vrstama leukemije (31).



Slika 2. *Philadelphia* kromosom. Dio kromosoma 9 i dio kromosoma 22 nakon loma se recipročno zamjene i formiraju *bcr-abl* novi fuzijski onkogen. (Preuzeto iz baze podataka NCI; dostupno na www.cancer.gov)

Recipročnom translokacijom 8;14 nastaje Burkittov limfom gdje protoonkogen *c-myc* translokacijom bude premješten u blizinu regije pojačivača (enhancer) gena za teški (H) (engl. *heavy-H*) lanac antitijela što pojača njegovu ekspresiju uzrokujući nereguliranu diobu B limfocita. Međutim, uloga konstitucijskih kromosomskih aberacija (CCA) (eng. *constitutional chromosome aberration* - CCA) u zloćudnim bolestima hematološkog sustava nije još uvijek jasna (7).

1.5.3.2. Konstitucijske kromosomske aberacije u zloćudnim bolestima hematološkog sustava

Dobro je poznato da određene CCA povećavaju rizik za zloćudni tumor (7). Nosioци strukturnih kromosomskih aberacija kao npr. del(13)(q14) imaju predispoziciju za nastanak retinoblastoma, a nosioци del(11)(p13) za nastanak Wilmsova tumora (32,33). Numeričke CCA se povezuju s povećanim rizikom od tumor zametnih stanica i tumora dojke u KS, DS povećava rizik od akutnih leukemija, a TS povećava rizik za tumore podrijetla neuralnog grebena (5, 34, 35). Međutim i druge CCA kao što su Robertsonova ili balansirane recipročne translokacije kao i kariotip XYY pronađene su bolesnika s zloćudnim tumorima (36).

Provedeno je svega nekoliko studija povezanosti CCA i zloćudnih bolesti hematološkog sustava pa stoga ostaje i dalje otvoreno pitanje jesu li one slučajan nalaz ili su uistinu povezane sa zloćudnom preobrazbom (38). Multiple citogenetičke studije otkrile su da 0,65-0,84% novorođenčadi (opća populacija) ima jednu od učestalijih CCA (19,37). Istraživačima se čini vjerojatno da postoji povezanost između CCA i razvoja zloćudne bolesti hematološkog sustava, iako neke veće studije nisu mogle potvrditi povećan rizik za razvoj istih među nosiocima CCA (38).

1.6. Pregled dosadašnjih istraživanja

Većina istraživanja pronašla je da trisomija 21. kromosoma predstavlja rizični genetski faktor u AML i ALL dječje dobi, dok se anomalije spolnih kromosoma kao su KS i triplo X povezuju se sa zloćudnim bolestima mijeloidne loze odrasle populacije (7,39,40).

Cerretini i sur. u studiji provedenoj na uzorku od 4164 ispitanika sa hematološkom zloćudnom bolešću pronašli su 24 ispitanika sa CCA. Njihovo istraživanje nije pokazalo značajnu razliku u učestalosti CCA između skupine bolesnika sa zloćudnom bolešću hematološkog sustava i novorođenačke populacije izuzev DS (36).

U sličnom istraživanju Alimena i sur. na manjem uzorku ispitanika (1400) pronašli su povećanu učestalosti anomalija spolnih kromosoma u skupini ispitanika sa zloćudnim bolestima mijeloidne loze u odnosu na opću populaciju (40).

Benitez i sur. u svoju studiju uključili su 5500 bolesnika sa zloćudnom hematološkom bolesti i pronašli među njima 59 ispitanika s CCA, od toga 19 sa strukturnom balansiranom CCA. Analizom podataka pokazali su da je učestalost strukturnih CCA u njihovoj skupini hematoloških bolesnika i novorođenačkoj populaciji slična, tj. da nema statistički značajne razlike (41).

Grupa francuskih hematoloških citogenetičara retrospektivnim istraživanjem citogenetskih podataka bolesnika sa zloćudnim bolestima hematološkog sustava pronašla je 56 bolesnika s CCA, od toga 25 bolesnika s trisomija 21, 9 s anomalijama spolnih kromosoma i 22 sa strukturnim CCA. Povezali su DS s akutnim leukemijama dječje dobi, dok za ostale CCA nisu našli povezanost, ali su ostavili otvoreno pitanje njihove povezanosti sa zloćudnim bolestima hematološkog sustava (42).

Welbour je u svojoj studiji od 5663 bolesnika sa zloćudnom bolesti hematološkog sustava pronašao 50 ispitanika sa CCA, od toga 26 ispitanika sa strukturnom CCA te nije našao značajnu povezanost sa zloćudnom preobrazbom (43).

Betts i sur. istraživali su djecu sa zloćudnim tumorima na prisustvo balansirane strukturne CCA. Od ukupno 518 ispitanika 312 je imalo leukemiju i upravo među njima pronašli su 5 bolesnika s CCA. Učestalost CCA u ovom istraživanju pokazala se statistički značajna, ali nedostatak ove studije da je provedena na malom uzorku (44).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

2.1. Ciljevi

1. Odrediti učestalost konstitucijskih kromosomskih aberacija među bolesnicima sa zloćudnim bolestima hematološkog sustava u dalmatinskoj populaciji.
2. Odrediti tip konstitucijskih kromosomskih aberacija u ispitanika sa zloćudnim bolestima hematološkog sustava i usporediti njihovu učestalost s učestalosti istih u općoj populaciji.

Očekujemo da ćemo ovim radom pokazati kako su konstitucijske kromosomske aberacije čimbenici rizika zloćudnih bolesti hematološkog sustava.

3. MATERIЈAL I METODE

3.1. Ustroj istraživanja

Specifični ustroj koji se koristio je presječno istraživanje koje je provedeno u periodu od 01.01.2000. do 31.012.2014. Glede načina dobivanja podataka riječ je o opažajnom istraživanju budući da je po kliničkim indikacijama određivan kariotip iz koštane srži i periferne krvi, dok je vremenska orijentacija bila retrospektivna.

3.2. Mjesto istraživanja

Iz arhiviranih podataka izdvojili smo medicinsku dokumentaciju bolesnika s različitim poremećajima hematološkog sustava kojima je prema kliničkim indikacijama određivan kariotip iz koštane srži/periferne krvi pri Citogenetskom laboratoriju, Klinike za dječje bolesti KBC Split.

3.3. Ispitanici

U razdoblju od 01.01.2000. do 31.01.2014. pri Citogenetskom laboratoriju KBC Split analizirano je 1814 bolesnika kojima je određen kariotip koštane srži prema kliničkim indikacijama, a kod 1619 bolesnika postavljena je dijagnoza neke od zloćudnih bolesti hematološkog sustava.

Svi podaci o demografskim karakteristikama kao što su spol, dob i klinički podaci o hematološkoj bolesti (dijagnoza) dobiveni su retrospektivnom analizom iz medicinske dokumentacije Citogenetskog laboratorija, Klinike za dječje bolesti KBC-a Split, koji je jedini laboratorij na području Dalmacije.

Klasičnom citogenetskom kariotipizacijom dobiveni su kariotipovi koštane srži bolesnika pri dijagnozi, a konstitucijski kariotipovi bili su potvrđeni naknadnom, također klasičnom citogenetskom analizom iz periferne krvi.

Kriterij uključenja bolesnika u ispitivanje

- kariotipovi ispitanika koji su pokazivali sljedeće konstitucijske kromosomske aberacije: aberacije spolnih kromosoma i autosoma, a koje uključuju trisomiju 21, različite tipove balansiranih translokacije (Robertsonova, recipročna i inverzija).

Kriterij isključenja bolesnika u ispitivanje

- kariotipovi ispitanika koji su pokazivali sljedeće konstitucijske kromosomske aberacije: populacijske kromosomske varijante kao što su inverzija 9 kromosoma, višak heterokromatina 1. i 16. kromosoma.

Svi bolesnici sa zloćudnom bolešću hematološkog sustava, ukupno njih 1619, podijeljeni su u dvije skupine s obzirom na dob bolesnika.

1. Skupina djece u dobi od 0 do 18 godina koja je uključila 125 ispitanika s medijanom dobi od 7 godina
2. Skupina odraslih tj. svi stariji od 18 godina koja je uključila 1494 ispitanika s medijanom dobi od 66 godina

U obje skupine izdvojili smo podskupine bolesnika s različitim tipovima zloćudnih bolesti hematološkog sustava, a koje su definirane sljedećim dijagnozama: ALL, AML, MDS, CML, MPD, CMPD, CLL i limfomi (NHL i HL).

Među njima smo istražili kolika je učestalost CCA i usporedili s učestalosti istih u općoj populaciji uzimajući u obzir učestalosti od 0,65-0,84% koja je pronađena u dvije najveće studije provedene kod novorođenčadi, a objavljene od Hsua i Nielsena (19,37). Sve dosadašnje studije su rezultate svojih istraživanja među bolesnicima sa zloćudnim bolestima hematološkog sustava također uspoređivale s rezultatima učestalosti navedenih studija.

3.4. Statistička analiza podataka

Statistička obrada razlika u zastupljenosti određene CCA između bolesnika i ispitanika opće populacije provedena je pomoću *Fisher's exact* testa i prikazana vrijednošću *p*. Rezultati su se interpretirali na razini značajnosti $p \leq 0.05$ uz korištenje statističkog paketa Statistica 12.0 (StatSoft, Tulsa, SAD).

4. REZULTATI

U istraživanje je uključeno 1619 bolesnika s različitim zloćudnim bolestima hematološkog sustava, od toga 125 djece i 1494 odraslih. Raspodjela ispitanika po skupinama i raspodjela po spolu prikazane su u tablici 5.

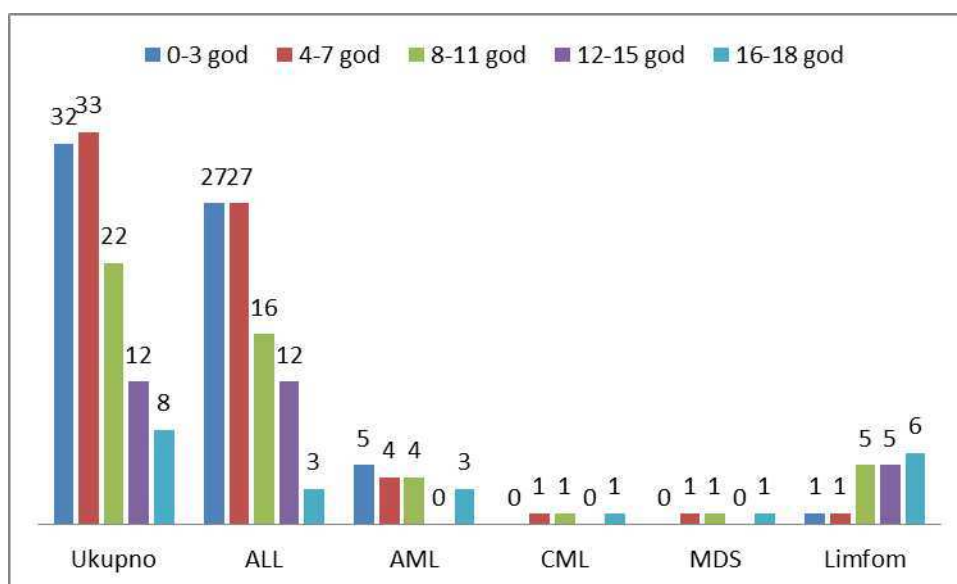
Tablica 5. Prikaz ispitanika prema broju i spolu u skupini djece i odraslih

Karakteristike skupine	Djeca	Odrasli	Ukupno
Broj ispitanika (No)	125(7,7%)	1494 (92,3%)	1619 (100%)
Spol M/Ž* (No)(%)	71(56,8%)/54	815(54%)/679	886/733

*M=muško; Ž=žensko

Prevladavali su ispitanici odrasle populacije (92,3%), dok je raspodjela ispitanika po spolu pokazala u obje skupine nešto više ispitanika muškog spola (djeca - 56,8%; odrasli - 54%).

Slika 3. Distribucija skupine djece prema dobi i tipu zloćudne bolesti hematološkog sustava

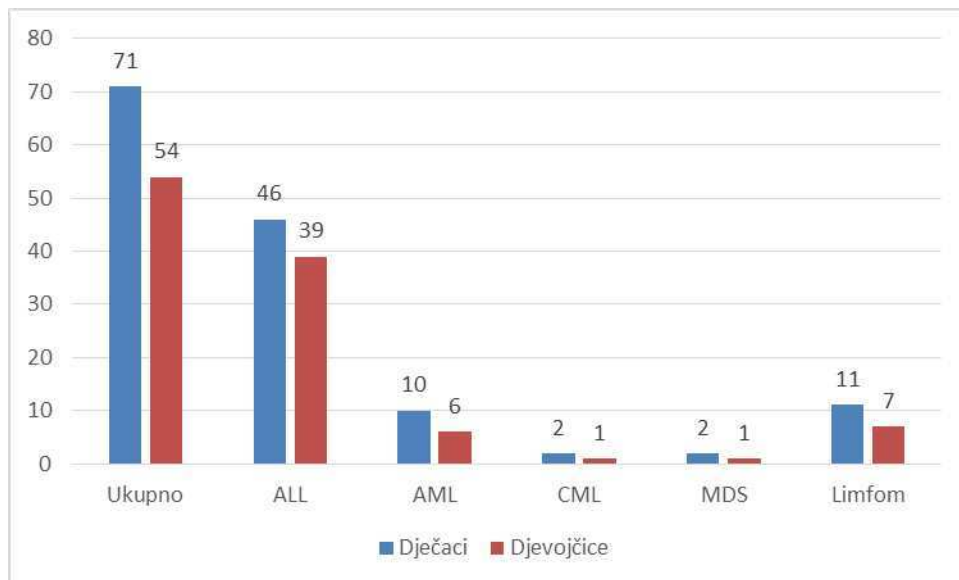


ALL- Akutna limfoblastična leukemija (engl. *acute lymphoblastic leukemia*); AML- Akutna mijeloična leukemija (engl. *acute myeloid leukemia*); CML- Kronična mijeloična leukemija (engl. *chronic myeloid leukemia*); MDS- Sindrom mijelodislazije (engl. *myelodysplastic syndrom*).

Od leukemija pretežno obolijevaju djeca u prve dvije dobne skupine i to podjednako u dobnim skupinama 0-3 godine i 4-7 godine. Najveći broj ispitanika (85) ima ALL (80%),

daljnjih 15% čine akutne mijeloblastične leukemije (AML). Kronična mijeloidna leukemija i MDS čine preostalih 5% (Slika 3).

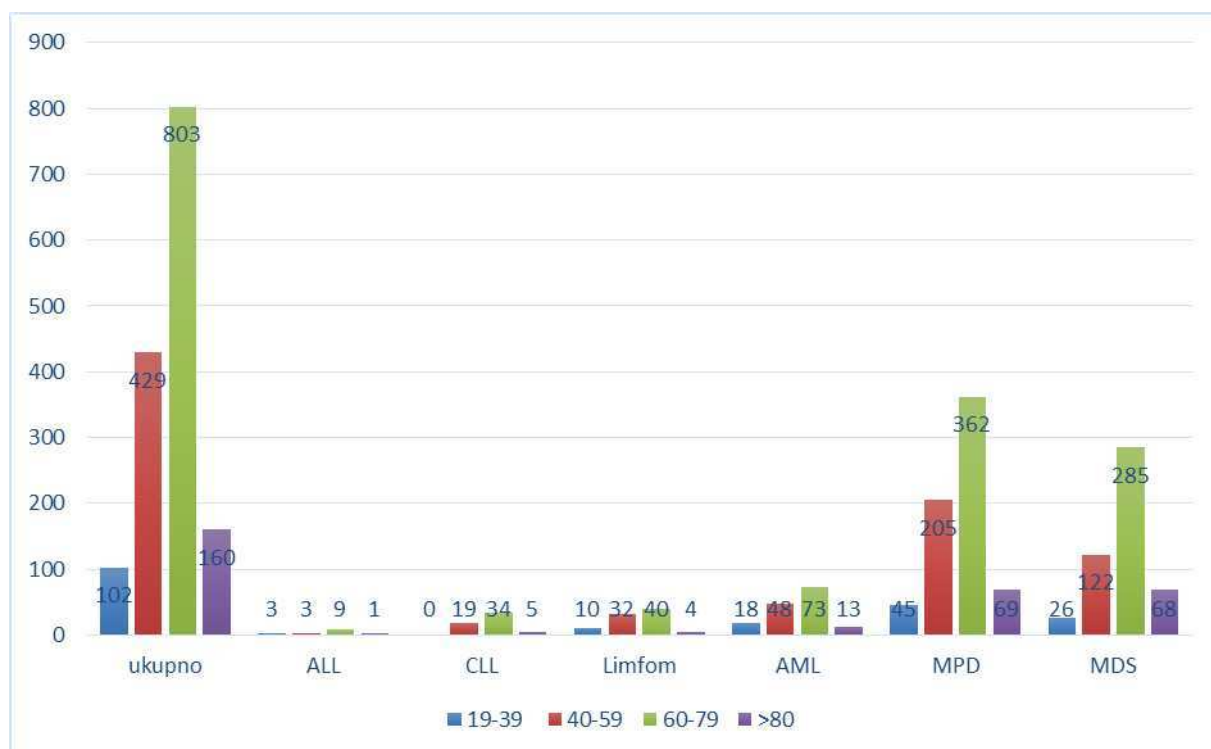
Slika 4. Distribucija skupine djece prema spolu i tipu zloćudne bolesti hematološkog sustava



ALL- Akutna limfoblastična leukemija (engl. *acute lymphoblastic leukemia*); AML- Akutna mijeloična leukemija (engl. *acute myeloid leukemia*); CML- Kronična mijeloična leukemija (engl. *Chronic myeloideus leukemia*); MDS- Sindrom mijelodisplazije (engl. *myelodysplastic syndrom*).

Zloćudne bolesti hematološkog sustava su nešto češća u dječaka (56%) nego u djevojčica, a najveća razlika pronađena je u skupini AML (62.5%) (Slika 4).

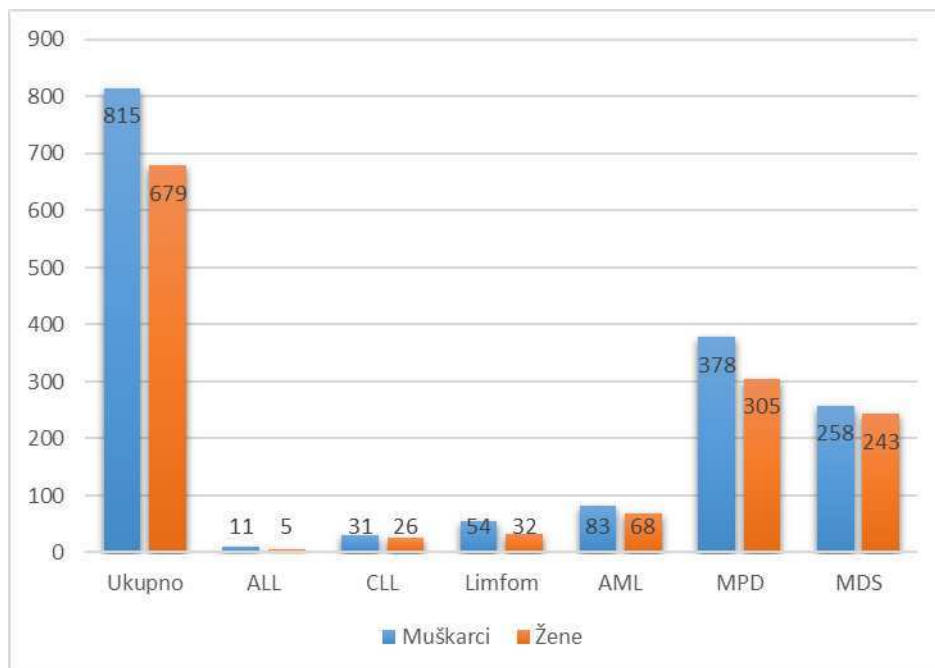
Slika 5. Distribucija skupine odraslih prema dobi i tipu zloćudne bolesti hematološkog sustava



ALL- Akutna limfoblastična leukemija (engl. *acute lymphoblastic leukemia*); CLL- Kronična limfoblastična leukemija (engl. *chronic lymphoblastic leukemia*); AML- Akutna mijeloična leukemija (engl. *acute myeloid leukemia*); MPD- Mijeloproliferativne bolesti (engl. *myeloproliferative disorders*); MDS- Sindrom mijelodisplazije (engl. *myelodysplastic syndrom*).

Ukupan broj bolesnika sa zloćudnom bolešću hematološkog sustava povećava se s dobi ispitanika, dosegnuvši najvišu učestalost (53%) u dobnoj skupini od 60 do 79 godina (Slika 5).

Slika 6. Distribucija skupine odraslih prema spolu i tipu zloćudne bolesti hematološkog sustava



ALL- Akutna limfoblastična leukemija (engl. *acute lymphoblastic leukemia*); CLL- Kronična limfoblastična leukemija (engl. *chronic lymphoblastic leukemia*); AML- Akutna mijeloična leukemija (engl. *acute myeloid leukemia*); MPD- Mijeloproliferativne bolesti (engl. *myeloproliferative disorders*); MDS- Sindrom mijelodisplazije (engl. *myelodysplastic syndrom*).

Učestalost zloćudne bolesti hematološkog sustava općenito je niža u žena (46%) nego u muškaraca kod svih tipova, a najniža u limfomima (37%) (Slika 6).

Tablica 6. Prikaz učestalosti prema spolu i broju ispitanika s konstitucijskim kromosomskim aberacijama u skupini djece i odraslih među ispitanicima koji boluju od zloćudnih bolesti hematološkog sustava

Karakteristike skupine	Djeca	Odrasli	Ukupno
Ukupni broj ispitanika (No)	125	1494	1619
Broj ispitanika bez CCA(No)	117	1480	1597
*Spol ispitanika bez CCA (M/Ž)(No)	66/51	807/673	873/724
Broj ispitanika s CCA (No)(%)	8(0.49%)	14(0.87%)	22 (1,36%)
*Spol ispitanika s CCA (M/Ž)(No)	5/3	8/6	13/9

CCA- konstitucijska kromosomska aberacija (engl.*constitutional chromosome aberration*); *M=muško; Ž=žensko

U 22 (1,36%) bolesnika sa zloćudnom bolesti hematološkog sustava pronašli smo CCA. Oni uključuju 8 bolesnika dječje dobi i 14 bolesnika odrasle dobi (Tablica 6).

Od 22 bolesnika s CCA pronašli smo 8 bolesnika s trisomijom 21. kromosoma (+21), 9 bolesnika s aberacijama spolnih kromosoma i 5 bolesnika s balansiranim strukturnim aberacijama (Tablica 7).

Tablica 7. Kliničke i citogenetske karakteristike 22 bolesnika s konstitucijskim i stečenim kromosomskim aberacijama

No.	Kariotip periferne krvi CCA	*Spol/dob	Dijagnoza	Kariotip koštane srži
1	+21	M/15	ALL	+21
2	+21	M/3	ALL	+21
3	+21	M/4	ALL	+21
4	+21	M/3	AML	+21, add(7),+8
5	+21	Ž/5	AML	+21,del(16)(q22)
6	+21	Ž/7	ALL	+21
7	+21	M/5	ALL	+21
8	+21	Ž/5	AML	+21,dup(1)(q32q42),dup(11)(q23)
9	XXY	M/61	MDS	XXY
10	XXY	M/37	MDS	XXY
11	XXY	M/61	MDS	XXY
12	XY/XXY	M/79	MDS	X,-Y/XX,-Y/XY
13	XYY	M/20	ALL	XYY
14	XXX/XX	Ž/51	CML	XXX,t(9;22)(q34;q11)
15	XXX/XX	Ž/55	CML	XXX,t(9;22)(q34;q11)
16	X/XX/XXX	Ž/60	MDS	X/XX/XXX
17	X/XX	Ž/58	MPD	X/XX
18	t(8;11)(q24;p13)	M/79	MPD	t(8;11)(q24;p13)
19	inv(7)(p12;q36)	Ž/59	CMPD	inv(7)(p12;q36)
20	rob(14;22)(q10;q10)	M/73	MPD	rob(14;22)(q10;q10)
21	rob(13;14)(q10;q10)	M/72	MDS	rob(13;14)(q10;q10),+2,+8,+14,+22,+X
22	t(8;18)(p23;p21)	Ž/44	MDS	t(8;18)(p23;p21)

*Spol: M=muško; Ž=žensko; Dob=godine. CCA- konstitucijska kromosomska aberacija (engl.*constitutional chromosome aberration*); dup- duplikacija; add- dodatak kromosomu, dup – duplikacija kromosomske regije; t- translokacija; rob- Robertsonova translokacija, inv- inverzija; ALL- Akutna limfoblastična leukemija (engl. *acute lymphoblastic leukemia*); AML- Akutna mijeloična leukemija (engl. *acute myeloic leukemia*); MPD - Mijeloproliferativne

bolesti (engl. *myeloproliferative disorders*); MDS- Sindrom mijelodisplazije (engl. *myelodysplastic syndrom*); CML- kronična mijeloična leukemija (engl. *chronic myeloideus leukemia*); CMPD- Kronična mijeloproliferativna bolest (engl. *chronic meyloproliferative disorders*).

Dodatne citogenetske aberacije u stanicama koštane srži pronađene su u 7 bolesnika sa CCA i to u 3 bolesnika dječje dobi s trisomijom 21 koji su bolovali od AML, potom u 3 bolesnika odrasle dobi s anomalijama spolnih kromosoma. Sva 3 bolesnika imali su mozaični konstitucijski kariotip u perifernoj krvi. Od toga su dvije bolesnice s triplo X u stanicama koštanoj srži imale dodatnu kromosomsku aberaciju *Philadelphia* kromosom, dok je mozaični oblik sindroma Klinefelter izgubio Y kromosom u obje stanične linije. Jedan bolesnik s Robertsonovom translokacijom razvio je poliploidiju u stanicama koštane srži (Tablica 7).

Nadalje smo izdvojili djecu s CCA po tipu CCA i tipu zloćudne bolesti hematološkog sustava (Tablica 8).

Tablica 8. Prikaz broja djece s DS (47,+21) prema tipu zloćudne hematološke bolesti u skupni djece sa zloćudnom bolesti hematopetskog sustava

Karakteristike skupine	Djeca Bez CCA No(%)	Down (47,+21) No(%)	Ukupno No
Ukupni broj ispitanika (No)	117	8	125
Dijagnoza:			
AML	13(81,3)	3(18,7)	16
ALL	80(94,1)	5(5,9)	85
CML	3(100)	0	3
MDS	3(100)	0	3
Limfom	18(100)	0	18

CCA- konstitucijska kromosomska aberacija (engl. *constitutional chromosome aberration*); ALL- Akutna limfoblastična leukemija (engl. *acute lymphoblastic leukemia*); AML- Akutne mijeloične leukemije (engl. *acute myeloic leukemia*); CML- Kronična mijeloična leukemija (engl. *Chronic myeloideus leukemia*); MDS- Sindrom mijelodisplazije (engl. *myelodysplastic syndrom*).

Skupina djece s CCA su isključivo bolesnici s DS (47,+21) njih 8, a oboljeli su od ALL (5 bolesnika) ili AML (3 bolesnika). Iako je malen broj djece s AML, svega 16/117, učestalost CCA je kod njih veća (18,7%) nego kod djece s ALL (5,9%).

Tablica 9. Rezultati *Fisher's exact* testa usporedbe učestalosti konstitucijskih kromosomskih aberacija između ispitanika sa zloćudnom bolesti hematološkog sustava naše studije i dvije studije (Hsuova i Nielsenova) provedene u općoj populaciji.

Ukupno	Ispitanici Naše studije No- 1619	Ispitanici Hsuove studije No- 68159		Ispitanici Nielsenove studije No- 34910	
Tip CCA	CCA-No/(%)	CCA-No/(%)	<i>p</i>	CCA-No/(%)	<i>p</i>
Ukupno	22(1,36)	442(0.65)		294(0.84)	
Rob. tanslokacija	2(0.123)	62(0.090)	0,393	43(0.123)	0,367
Rec. Translokacije	2(0.123)	64(0.093)	0,371	49(0.140)	0,277
Inverzije	1(0.062)	13(0.019)	0,498	12(0.034)	0,616
47,XXY	4(0.247)	45(0.045)	0,193	28(0.080)	0,171
47,XXX	2(0.123)	27(0.040)	0,406	18(0.052)	0,414
47,XYY	1(0.062)	45(0.045)	0,337	21(0.120)	0,535
45,X	2(0.123)	9(0.013)	0,091	9(0.226)	0,174
47,+21	8(0.494)	82(0.120)	0,043	59(0.169)	0,068

CCA- konstitucijska kromosomska aberacija (engl.*constitutional chromosome aberration*);

Bolesnici s DS (47,+21) u našoj skupini ispitanika sa zloćudnom bolesti hematološkog sustava predstavljaju 0,49% (8/1619) od ukupnog broja bolesnika. Usporedbom ove učestalosti s učestalost DS u općoj populaciji iz Hsuove studije *Fisher's exact* testom dobivena je statistički značajna razlika ($p=0,043$). Učestalosti ostalih CCA u našoj istraživanoj skupini nisu pokazale statistički značajnu razliku u odnosu na opću populaciju istraženu od Hsua, kao ni opću populaciju Nielsena (Tablica 9).

U ovom radu smo po prvi put u našoj populaciji istražili učestalost CCA u bolesnika kojima je citogenetski određivan kariotip iz stanica koštane srži zbog različitih zloćudnih bolesti hematološkog sustava. Cilj našeg istraživanja je bio ispitati imaju li ispitanici s CCA povećan rizik za nastanak specifičnog zloćudnog hematološkog poremećaja.

Naša ispitivana skupina uključila je ukupno 1619 bolesnika od toga 125 djece i 1494 odrasle osobe. U 22 bolesnika ili 1,36% pronašli smo CCA. Oni uključuju 8 bolesnika s trisomijom 21. kromosoma (DS), 9 bolesnika s aberacijama spolnih kromosoma i 5 bolesnika s balansiranim strukturnim aberacijama. Slične rezultate u istraživanju pronašli su u svojoj studiji Alimena i sur. (40). U njihovoj skupini od 1400 hematoloških bolesnika bio je 21 (1,5%) ispitanik s CCA. Među njima najbrojniji je bio DS (10 ispitanika), potom ispitanici s anomalijama spolnih kromosoma (6 ispitanika), 5 ispitanika s balansiranim strukturnim aberacijama (Robertsonova translokacija u 4 slučaja i balansirana recipročna translokacija u jednom slučaju) (40). Cerretini i sur. u studiji provedenoj na uzorku od 4164 ispitanika s hematološkom zloćudnom bolešću pronašli su 24 ispitanika s CCA. Njihovo istraživanje nije pokazalo značajnu razliku u učestalosti CCA između skupine bolesnika sa zloćudnom bolešću hematološkog sustava i novorođenačke populacije izuzev DS (36).

Ispitanike s trisomijom 21. kromosoma pronašli smo u 8 bolesnika sa zloćudnom bolesti hematološkog sustava (8/1619) ili 0,49% od ukupnog broja ispitanika što je oko tri puta više od učestalosti pronađene u općoj populaciji (0,12-0,17%), a *Fisher exact* testom dobivena je statistički značajna razlika ($p=0,043$). Cerretini i sur u svojoj studiji pronašli su također 3 puta veću učestalost trisomije 21 kod svojih hematoloških bolesnika. U našem istraživanju trisomija 21 pronađena je isključivo u skupini djece s AML i ALL što podupiru i druga istraživanja (7,36,40). Bolesnici s DS naše studije predstavljaju 8/125 ili 6,6% od ukupnog broja ispitivane djece, što je u usporedbi s učestalosti istih u općoj populaciji (0,12 - 0,17%) za 53 odnosno 38 puta učestalije što je sukladno rezultatima studije Haslea i sur. koji su pronašli da djeca s DS oboljevaju 20-50 puta učestalije od svih tipova leukemija nego opća populacija (7). Visoki rizik za razvoj AML i ALL imaju djeca mlađe životne dobi što je vidljivo i iz našeg istraživanja (7).

U našem istraživanju sve ostale CCA 14/1619 ili 0,87% nađene su isključivo u skupini odraslih bolesnika, a oni su činili glavninu naših ispitanika (92,3%). Učestalost od 0,87%

CCA među našim odraslim bolesnicima sa zloćudnom bolešću hematološkog sustava je vrlo slična učestalosti CCA u općoj populaciji (0,65 -0,84%) pronađene u istraživanjima Hsua i Nielsena (19,37). Ovim istraživanjem nismo dokazali povećan rizik za razvoj zloćudne hematološke bolesti među nosiocima ostalih CCA što je sukladno istraživanjima provedenim u nekim većim studijama (38).

U našem istraživanju anomalije spolnih kromosoma pronašli smo u 9 bolesnika od toga 4 bolesnika sa KS, jednog bolesnika s XYY, 2 bolesnice s triplo X i 2 bolesnice s monosomijom X ili sindromom TS. Svi bolesnici s navedenim anomalijama spolnih kromosoma našli smo u odrasloj skupini i razvili su poremećaj mijeloidne loze izuzev bolesnika sa sindromom XYY koji je bolovao od ALL. Ovi rezultati našeg istraživanja suglasni su s podacima iz literature u kojima se KS i triplo X povezuju sa zloćudnim bolestima mijeloidne loze odrasle populacije i sugeriraju da dodatni X kromosom ima visoki onkogeni potencijal i predstavlja rizični čimbenik u razvoju leukemije (39,40,45). Dodatni X kromosom kao jedina stečena aberacija je opisana u bolesnika s nekoliko hematoloških bolesti kao što su ALL, AML i kronična neutrofilna leukemija (46,47,48,49).

Zanimljivo je istaknuti da smo među bolesnicima s anomalijama spolnih kromosoma imali 5/9 bolesnika s mozaičnim kariotipom u perifernoj krvi gdje je druga stanična linija bila normalnog kariotipa. U praksi je ponekad teško razlučiti je li dodatni X kromosom konstitucijska ili stečena promjena u bolesnika s zloćudnom bolesti hematološkog sustava, stoga citogenetska analiza limfocita periferne krvi predstavlja zlatni standard za potvrdu nalaza iz koštane srži. Također je zanimljivo istaknuti da smo u koštanoj srži kod dviju bolesnica s mozaičnim oblikom sindroma triplo X (47,XXX/46,XX), a obje oboljele od *Philadelphia* pozitivne CML, dodatnu stečenu aberaciju t(9;22) pronašli isključivo u patološkoj staničnoj liniji (47,XXX). Moguće je da stanice koštane srži s kariotipom (47,XXX) imaju neke prednosti preživljavanja nad urednim kariotipom (46,XX), iako povezanost između triplo X sindroma i CML ostaje nejasna. U literaturi su opisani pojedinačni slučajevi konstitucijske aberacije triplo X sindroma i stečene aberacije 11 kromosoma koja je tipična za AML M5b s kariotipom 47,XXX del(11) (q23) koja je pokazala rezistenciju na kemoterapiju (45).

Strukturne balansirane CCA u našoj studiji pronađene su u ukupno 5 bolesnika, a od toga 2 bolesnika imala su Robertsonovu translokaciju, 2 recipročnu translokaciju, a 1 inverziju. Welbourn je u svojoj studiji od 5663 bolesnika sa zloćudnom bolešću hematološkog sustava pronašao 50 ispitanika s CCA, a od toga 26 ispitanika sa strukturnom CCA. Iako nije našao značajnu povezanost i dalje smatra da one predstavljaju genetsku predispoziciju za zloćudnu preobrazbu. Opisuje moguće mehanizme u kojima CCA predstavljaju čimbenik rizika za razvoj zloćudne bolesti, a to su: a) balansirana strukturna CCA nije uistinu balansirana, ima manjak ili višak genetičkog materijala; b) balansirana strukturna CCA rezultira abnormalnom funkcijom gena, dovodi do stvaranja novih fuzijskih gena ili ometa regulatorne sekvence gena (43).

Iako ni druge velike studije nisu potvrdile povećan rizik za zloćudnu bolest hematološkog sustava među nosiocima strukturnih CCA, one ipak predstavljaju poseban interes za istraživače jer su kromosomski lomovi u CCA vrlo slični onima koje nalazimo u stečenim recipročnim translokacijama koje su prisutne u bolesnika sa zloćudnom hematološkom bolešću (36,38,41,42,43).

Stečene recipročne translokacije su markeri zloćudne hematološke bolesti koje dovode vrlo često do fuzije ili neke druge alteracije gena stvarajući novi genski produkt koji je uključen u patogenezu bolesti (50). S druge strane istraživači navode da vjerojatno postoji i genetska predispozicija za kromosomske lomove i ponovna prespajanja određenih regija. Naime određene kromosomske regije predstavljaju utočišta za onkogene i tumorsupresorne gene koji alteriraju pri ponovnom prespajanju određenih regija. Stoga takva genetska predispozicija uz izlaganje čimbenicima okoliša vjerojatno akumulira DNA oštećenja i stvara genetsku nestabilnost i uvjete za razvoj zloćudne bolesti hematološkog sustava (38).

Distribucija naših ispitanika po dobnim skupinama i tipu zloćudne hematološke bolesti u skupini djece je pokazala da djeca pretežno obolijevaju od leukemije u prve dvije dobne skupine i to podjednako u dobnim skupina 0-3 godine i 4-7 godina i da najveći broj ispitanika (80%) ima ALL. U skupini odraslih jasno je vidljivo da se učestalost zloćudne bolesti hematološkog sustava općenito povećava s dobi, dosegnuvši najveću učestalost u dobnoj skupini od 60 do 79 godina (53%), a prevladavaju MPD. Navedeni podaci su skladni s rezultatima epidemioloških istraživanja Europske populacije (24).

Dobro je poznata pojava da je incidencija hematoloških malignih bolesti općenito niža u žena nego u muškaraca, a moguće je posljedica niže izloženosti čimbenicima rizika iz okoliša (25,26). U našoj studiji raspodjela ispitanika po spolu također je pokazala u obje skupine nešto više ispitanika muškog spola, u skupine djece 56,8%, a u skupini odraslih 54%.

Ova studija po prvi put pokazuje učestalost CCA u bolesnika sa zloćudnom bolešću hematološkog sustava u našoj populaciji koja iznosi 1,36% što je oko 1,6-2 puta više od učestalosti istih u općoj populaciji (0,65-0,84%). Među nosiocima CCA pronašli smo statistički značajnu razliku ($p=0,043$) u bolesnika s DS. Ovim istraživanjem smo potvrdili da i u našoj populaciji (Dalmacija) DS nosi povećan rizik za nastanak specifičnog zloćudnog hematološkog poremećaja (AML i ALL). Nismo potvrdili povećan rizik za zloćudne hematološke bolesti među nosiocima strukturnih CCA i anomalijama spolnih kromosoma. Bilo bi stoga od velike važnosti prikupiti što više hematoloških bolesnika s CCA, istražiti određene sekvence kromosoma na funkcionalnoj i molekularnoj razini radi razjašnjenja postoji li uistinu povećani rizik razvoja zloćudne bolesti krvotvornog sustava kod istih.

6. ZAKLJUČCI

1. Ova studija po prvi put pokazuje učestalost CCA u bolesnika sa zloćudnom bolešću hematološkog sustava u našoj populaciji koja iznosi 1,36% što je oko 1,6-2 puta više od učestalosti istih u općoj populaciji (0,65-0,84%).
2. Ispitanike s trisomijom 21. kromosoma (DS) pronašli smo u 0,49% bolesnika sa zloćudnom bolešću hematološkog sustava, a što je oko tri puta više od učestalosti istih pronađenih u općoj populaciji (0,12-0,17%), a to predstavlja statistički značajnu vrijednost ($p=0,043$).
3. Učestalost ostalih CCA u našoj populaciji od 0,87% među bolesnicima sa zloćudnom bolešću hematološkog sustava te je vrlo slična učestalosti CCA pronađenoj u općoj populaciji (0,65 -0,84%)

7. POPIS CITIRANE LITERATURE

1. Obe G, Pfeiffer P, Savage JR et al. Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution. *Mutat Res* 2002;504(1-2):17-36.
2. Ferguson DO, Alt FW. DNA double strand break repair and chromosomal translocation: lessons from animal models. *Oncogene* 2001;20(40):5572-9.
3. Chen Z, Sandberg AA. Molecular cytogenetic aspects of hematological malignancies: clinical implications. *Am J Med Genet* 2002;115(3):130-41.
4. Jacobs P A, Browne C, Gregson N, Joyce C, White H. Estimates of the frequency of chromosome abnormalities detectable in unselected newborns using moderate levels of banding. *J Med Genet* 1992;29:103-8.
5. Hasle H. Pattern of malignant disorders in individuals with Down's syndrome. *Lancet Oncol* 2001;2(7):429-36.
6. Mardešić D. Nasljedne i prenatalno stečene bolesti. U: Mardešić D i sur. *Pedijatrija*. 7.izd. Zagreb: Školska knjiga;2003. str. 93-100.
7. Hasle H, Clemmensen IH, Mikkelsen M. Risks of leukaemia and solid tumours in individuals with Down's syndrome. *Lancet* 2000;355(9199):165-9.
8. Sybert VP, McCauley E. Turner's syndrome. *N Engl J Med* 2004;351:1227-38.
9. Elsheikh M, Dunger DB, Conway GS, Wass JAH. Turner's syndrome in adulthood. *Endocr Rev* 2002;23(1):120-40.
10. Gravholt CH. Turner syndrome in adulthood. *Horm Res Stochholm* K, Juul S, Juel K, Naeraa RW, Gravholt CH. Prevalence, incidence, diagnostic delay, and mortality in Turner syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:3897-902.
11. Gravholt CH, Juul S, Naeraa RW, Hansen J. Morbidity in Turner syndrome. *J Clin Epidemiol* 1998;51:147-58.
12. Stochholm K, Hjerrild B, Mortensen KH, Juul S, Frydenberg M, Gravholt CH. Socioeconomic parameters and mortality in Turner syndrome. *Eur J Endocrinol* 2012;166(6):1013-19.
13. Wertelecki W, Fraumeni JF, Mulvihill JJ. Nongonadal neoplasia in Turner's syndrome. *Cancer* 1970;26:485-8.
14. Hasle H, Olsen JH, Nielsen J, Hansen J, Friedrich U, Tommerup N. Occurrence of cancer in women with Turner syndrome. *Br J Cancer* 1996;73:1156-9.
15. Klinefelter HF. Klinefelter syndrome: historical background and development. *South Med J* 1986;79:1089-93.

16. Wikström AM, Dunkel L. Klinefelter syndrome. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2011;25:239–250
17. Gustavson KH: Triple X syndrome deviation with mild symptoms. The majority goes undiagnosed. *Lakartidningen* 1999; 96: 5646–7.
18. Otter M, Schrander-Stumpel CT, Curfs LM. Triple X syndrome: a review of the literature. *Eur J Hum Gene* 2010;18: 265-71.
19. Hsu Lilian YF. Prenatal Diagnosis of chromosomal abnormalities through amniocentesis. In Milunskya, ed. *Genetic disorders and fetus: diagnosis, prevention and treatment*. 4th ed. Baltimore and London: The Johns Hopkins University Press, 1998, pp. 179-248.
20. Turnpenny PD, Ellard S. *Emery's Elements of Medical Genetics*. Fourth Edition. Philadelphia: Elsevier – Health Sciences Division, 2011.
21. Sabattini E, Bacci F, Sagramoso C, Pileri SA. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues in 2008: an overview. *Pathologica* 2010;102(3):83-7
22. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J i sur. The WHO classification of neoplasms of the hematopoietic and lymphoid tissues. *Hematol J* 2000;1:53-66.
23. Andreis I. Poremećaj sastava i funkcije krvi i krvotvornih organa. U: Gamulin S, Marušić M, Kovač Z i sur. *Patofiziologija*. 5.izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2002. str. 722-7.
24. Sant M, Allemani C, Tereanu C et al. Incidence of hematologic malignancies in Europe by morphologic subtype: results of the HAEMACARE project. *Blood* 2010;116(19):3724-34.
25. Curado MP, Edwards B, Shin HR. *Cancer Incidence in Five Continents*. Vol. 9. Lyon, France: IARC Press; 2007. p. 160.
26. Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM. *GLOBOCAN 2002: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide IARC CancerBase*. Lyon, France: IARC Press; 2004. No. 5. Version 2.0.
27. Warmuth M, Danhauser-Riedel S, Hallek M. Molecular pathogenesis of chronic myeloid leukemia: implications for new therapeutic strategies. *Ann Hematol* 1999;78(2):49-64.

28. Pasqualucci L, Liso A, Martelli MP i sur. Mutated nucleophosmin detects clonal multilineage involvement in acute myeloid leukemia: impact on WHO classification. *Blood* 2006;108(13):4146-55.
29. Martinez-Climent JA. Molecular cytogenetics of childhood hematological malignancies. *Leukemia* 1997;11(12):1999-2021.
30. Labar B. Akutne leukemije i sindrom mijelodisplazije. U: Vrhovac B, Jakšić B, Reiner Ž i Vucelić B. *Interna Medicina*. 4.izd. Zagreb: Naklada Ijevak; 2008. str. 992-3.
31. Boranić M. Bolesti krvi i krvotvornih organa i solidni tumori dječje dobi. U: Mardešić D i sur. *Pedijatrija*. 7. izd. Zagreb: Školska knjiga; 2003. str. 671-2.
32. Yunis JJ, Ramsay N. Retinoblastoma and subband deletion of chromosome 13. *Am J Dis Child* 1978;132(2):161-3.
33. Riccardi VM, Sujansky E, Smith AC, Francke U. Chromosomal imbalance in the Aniridia-Wilms' tumor association: 11p interstitial deletion. *Pediatrics* 1978;61(4):604-10.
34. Iselius L, Jacobs P, Morton N. Leukaemia and transient leukaemia in Down syndrome. *Hum Genet* 1990;85(5):477-85.
35. Hasle H, Jacobsen BB, Asschenfeldt P, Andersen K. Mediastinal germ cell tumour associated with Klinefelter syndrome. A report of case and review of the literature. *Eur J Pediatr* 1992;151(10):735-9.
36. Cerretini R, Acevedo S, Chena C, Belli C, Larripa I, Slavutsky I. Evaluation of constitutional chromosome aberrations in hematologic disorders. *Cancer Genet Cytogenet* 2002;134(2):133-7.
37. Nielsen J, Wohlert M. Chromosome abnormalities found among 34,910 newborn children: results from a 13-year incidence study in Arhus, Denmark. *Hum Genet* 1991;87(1):81-3.
38. Panani AD. Is there an association with constitutional structural chromosomal abnormalities and hematologic neoplastic process? A short review. *Ann Hematol* 2009;88(4):293-9.
39. Rabson AB. Trisomy 21 leukemias: finding the hits that matter. *Oncogene* 2010;29(46):6099-101.

40. Alimena G, Billström R, Casalone R, Gallo E, Mitelman F, Pasquali F. Cytogenetic pattern in leukemic cells of patients with constitutional chromosome anomalies. *Cancer Genet Cytogenet* 1985;16(3):207-18.
41. Benitez J, Valcarcel E, Ramos C, Ayuso C, Cascos AS. Frequency of constitutional chromosome alterations in patients with hematologic neoplasias. *Cancer Genet Cytogenet* 1987;24(2):345-54.
42. Groupe Français de Cytogénétique Hématologique. Cytogenetic findings in leukemic cells of 56 patients with constitutional chromosome abnormalities. A cooperative study. *Genet Cytogenet* 1988;35:243-252.
43. Welborn J. Constitutional chromosome aberrations as pathogenetic events in hematologic malignancies. *Cancer Genet Cytogenet* 2004;149(2):137-53.
44. Betts DR, Greiner J, Feldges A, Caflisch U, Niggli FK. Constitutional balanced chromosomal rearrangements and neoplasm in children. *J Pediatr Hematol Oncol* 2001;23(9):582-4.
45. Bigazzi C1, Galieni P, Scarinci R, Vivarelli R, Bucalossi A, Biancolini G, Falbo R, Vessicelli F, Dispensa E. 11q- and constitutional X trisomy in a patient with M5b acute non-lymphocytic leukemia. *Haematologica* 1993;78(3):185-6.
46. Yamamoto K, Hato A, Minagawa K, Yakushijin K, Urahama N, Sada A, et al. An extra X chromosome as a sole abnormality in relapse of an adult acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 2004;155:154-5.
47. Tsutsumi Y, Tanaka J, Minami H, Musashi M, Fukushima A, Ehira N, et al. Acute biphenotypic leukemia and an acquired X chromosome. *Cancer Genet Cytogenet* 2005;157:94-5.
48. Wan TS, Yip SF, Yeung YM, Chan LC, Ma SK. Fatal diffuse alveolar damage complicating acute myeloid leukemia with abnormal eosinophils and trisomy X. *Ann Hematol* 2002;81:167-9.
49. Yamamoto K, Nagata K, Kida A, Hamaguchi H. Acquired gain of an X chromosome as the sole abnormality in the blast crisis of chronic neutrophilic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 2002;134:84-7.
50. Mitelman F, Mertens F, Johansson B. A breakpoint map of recurrent chromosomal rearrangements in human neoplasia. *Nat Genet* 1997;15:417-74.

8. SAŽETAK

U ovoj studiji istražili smo postoji li povećan rizik razvoja zloćudne bolesti hematološkog sustava u nosioca konstitucijskih kromosomskih aberacija ili je ona samo slučajan nalaz.

Analizirali smo kariotipove koštane srži i periferne krvi kod 1619 bolesnika sa zloćudnom bolesti hematološkog sustava od toga 125 djece i 1494 odrasle osobe. U 22 bolesnika ili 1,36% pronašli smo konstitucijsku kromosomsku aberaciju što je oko 1,6-2 puta više od učestalosti istih u općoj populaciji (0,65-0,84%). Oni uključuju 8 bolesnika s trisomijom 21. kromosoma (DS), 9 bolesnika s aberacijama spolnih kromosoma i 5 bolesnika s balansiranim strukturnim aberacijama.

Među nosiocima konstitucijskih kromosomskih aberacija trisomija 21 je pronađena u 0,49% bolesnika i to isključivo kod djece sa zloćudnom bolesti hematološkog sustava, a što je oko tri puta više od učestalosti trisomije 21 pronađene u općoj populaciji (0,12-0,17%), a a što je statistički značajno ($p=0,043$).

Nosioci ostalih konstitucijskih kromosomskih aberacija koji pripadaju isključivo odrasloj populaciji, a koji su pronađeni u 0,87% bolesnika sa zloćudnim bolestima hematološkog sustava, nisu pokazali značajnu razliku u učestalosti u odnosu na opću populaciju (0,65-0,84%).

U ovom istraživanju po prvi put iznosimo podatke za našu populaciju kojim potvrđujemo brojna druga istraživanja kako jedino trisomija 21 predstavlja čimbenik rizika razvoja zloćudne bolesti hematološkog sustava, dok su ostale konstitucijske kromosomske aberacije vjerojatno slučajan nalaz.

9. SUMMARY

Constitutional chromosomal aberrations as a risk factor in hematologic malignancies

In this study we have researched if there is an increased risk of developing a hematologic malignancy in carriers of constitutional chromosomal aberrations or they are just a random finding.

We analysed karyotypes of bone marrow and peripheral blood in 1619 patients with hematologic malignancies and there were include 125 children and 1494 adult persons. In 22 patients or 1.36% we found constitutional chromosomal aberrations, which are around 1.6- 2 times more of the frequency than in general, population (0.65-0.84%). They include 8 patients with the trisomy of chromosome 21, 9 patients with the aberrations of sex chromosomes and 5 patients with balanced structural aberrations.

Among the carriers of the constitutional chromosomal aberrations, the trisomy of chromosome 21 was found in 0.49% of the patients, exclusively among children with the hematologic malignancies, which is about 3 times more than the frequency of the trisomy 21 found in general population, (0.12- 0.17%) which is statistically relevant ($p=0,051$).

The carriers of the other constitutional chromosomal aberrations were found in 0.87% patients with the hematologic malignancies and exclusively among the adult population, have not shown significant differences regarding general population (0.65- 0.84%).

In this research for the first time we have shown the data for our population which have confirmed numerous of studies that the only risk factor for the development of hematologic malignancies represents the trisomy of chromosome 21, while the other constitutional chromosomal aberrations are probably a random finding.

10. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODATCI:

- Ime i prezime: Martin Nonković
- Datum i mjesto rođenja: 16. listopada 1990., Split, Hrvatska
- Adresa: Terzićeva 13, Split, Hrvatska
- E-adresa: martin.nonkovic@hotmail.com

OBRAZOVANJE:

- 2009.-2015. Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu, Split, Hrvatska
- 2005.-2009. IV. Gimnazija „Marko Marulić“, Split, Hrvatska
- 1997.-2005. Osnovna škola „Ravne njive“, Split, Hrvatska

STRANI JEZICI:

- Engleski jezik
- Slovenski jezik
- Talijanski jezik
- Njemački jezik

NAGRADE:

- 3.mjesto na Državnom natjecanju iz geografije 2009.

FAKULTETSKE AKTIVNOSTI:

- demonstrator na katedri za Anatomiju 2011.- 2014.

OSTALE AKTIVNOSTI:

- u sklopu ERASMUS+ razmjene studenata 5 mjeseci studirao na Medicinskom fakultetu u Mariboru, Slovenija (odslušao i položio kolegije: Pedijatrija, Obiteljska medicina i Laboratorijska dijagnostika)
- član Futsal kluba Maribor 2014.-2015. - 3.mjesto u 1. SFL (1. Slovenska futsal liga)
- član futsal momčadi Medicinskog fakulteta u Splitu 2011.-2015. (Prvenstvo Sveučilišta u Splitu 2013. -3.mjesto, Prvenstvo Sveučilišta u Splitu 2014. -1.mjesto)
- član futsal momčadi Sveučilišta u Splitu 2011.-2014. (Državno prvenstvo 2012. - 2.mjesto)