UNIVERSITETI I TIRANËS
FAKULTETI I SHKENCAVE TË NATYRËS
DEPARTAMENTI I BIOLOGJISË

DISERTACION

PËR MARRJEN E GRADËS SHKENCORE "DOKTOR I SHKENCAVE"

REZULTATET E MJEKIMIT ME GLIVEK TEK LEUKOZA MIELOIDE NË FAZËN KRONIKE TË VLERËSUARA NËPËRMJET PËRGJIGJEVE CITOGJENETIKE

Disertanti:
Dorina Roko

Udhëheqësit shkencor:
Prof. Dr. Zyri Bajrami
As.Prof. Anila Babameto-Laku

TIRANË, 2014

REPUBLIKA E SHQIPËRISË
UNIVERSITETI I TIRANËS
FAKULTETI I SHKENCAVE NATYRORE
DEPARTAMENTI I BIOLOGJISË

Programi i doktoraturës: Biologji molekulare

DISERTACION
Paraqitur nga;

DORINA ROKO
për marrjen e gradës ¨**DOKTOR I SHKENCAVE**¨

TEMA: **REZULTATET E MJEKIMIT ME GLIVEK TEK LEUKOZA MIELOIDE NË FAZËN KRONIKE TË VLERËSUARA NËPËRMJET PËRGJIGJEVE CITOGJENETIKE**

Mbrohet më datë, ____/____/ 2014, para Komisionit të përbërë nga:
1._____ Kryetar
2 ._____ Anëtar /Oponent
3._____ Anëtar /Oponent
4._____ Anëtar
5._____ Anëtar

PASQYRA E LËNDËS

Faqja

Pasqyra e lëndës..... i
Publikime dhe pjesëmarrje nëpër konferenca..... iv
Parathënie.....v
Qëllimi vii

I. PJESA TEORIKE

1.1 Sindromet mieloproliferative.....1
1.2 Leukoza mieloide kronike 2
1.2.1 Fiziopatologjia.....2
1.2.2 Shenjat klinike të shfaqjes së sëmundjes.....3
1.2.3 Evolucioni.....3
1.2.4 Etiologjia 4
1.2.5 Epidemiologjia 5
1.2.6 Prognoza.....5
1.3 Formimi i kromozomit Philadelphia 5
1.4 Gjenet dhe proteinat ABL, BCR dhe BCR-ABL 6
1.4.1 Gjeni dhe proteina ABL 6
1.4.2 Gjeni dhe proteina BCR 7
1.4.3 Proteina BCR-ABL 7
1.5 Mekanizmat e vetive të transformimit BCR- ABL 9
1.5.1 Aftësia adezive (ngjitëse) e dëmtuar 9
1.5.2 Aktivizimi i rrugëve të tejçimit të sinjaleve nga BCR-ABL 10
1.5.2.1 Rruga e tejçimit RAS e MAP kinazë.....10
1.5.2.2 Rruga e tejçimit JAK-STAT.....13
1.5.2.3 Rruga e tejçimit PI3 kinazë (PI3K)-AKT.....15
1.5.3 Frenimi i apoptozës 16
1.5 Anomali të tjera citogjenetike 16

1.7 Diagnoza pozitive 17
1.7.1 Kariotipi 17
1.7.2 Hibridizimi in situ (Fluorescent In Situ Hybridization – FISH 18
1.7.3 Real Time - quantitative Polymerase Chain Reaction (RT- qPCR) 20
1.8 Terapia e LMC 21
1.8.1 Glivek 22
1.8.1.1 Struktura 22
1.8.1.2 Mekanizmi i veprimit 23
1.8.1.3 Farmakokinetika 24
1.8.1.4 Efektet anësore të Glivekut 24
1.8.1.5 Ndërveprimet me ushqimet 24
1.8.1.6 Ndërveprimet me medikamente të tjera 25
1.8.1.7 Rezistenca ndaj Glivekut 25
1.9 Teknikat e monitorimit dhe përcaktimi i kritereve të përgjigjes 26
1.9.1 Përgjigjet hematologjike 26
1.9.2 Përgjigjet citogjenetike 26
1.9.3 Përgjigjet citogjenetike molekulare 26
1.9.4 Përgjigjet molekulare 26
1.9.5 Përgjigjet optimale dhe suboptimale 27
1.10 Progresoni i sëmundjes 27
1.11 Dështimi i terapisë 27

II. MATERIALI DHE METODAT

2.1 Të dhëna të përgjithshme për studimin 28
2.2 Plotësimi i skedës dhe konsensusit të informimit 29
2.3 Vlerësimet prognostike 32
2.4 Protokolli i proçedurave të citogjenetikës standarte (Kariotipi) 32
2.5 Protokolli i proçedurës së citogjenetikës molekulare (FISH) 33
2.6 Analiza statistikore 34

III. REZULTATET DHE DISKUTIMET

3.1 Klasifikimi i pacientëve sipas gjinisë, moshës dhe vendbanimit 35
3.2 Vlerësimi i parametrave diagnostikues për llogaritjen e formulës së Sokalit 35
3.3 Vlerësimi i parametrave diagnostikues për sistemin prognostik 38
3.4 Arritja e përgjigjes hematologjike 40
3.5 Arritja e përgjigjeve citogjenetike gjatë 24 muajve të trajtimit me Glivek 42
3.6 Lidhja e vlerësimeve prognostike me arritjen e përgjigjeve hem. dhe cit 48
3.7 Evolucioni klonal 50
3.8 Arritja e përgjigjeve citogjenetike molekulare në bazë të kryerjes së teknikës 54
3.9 Arritja e përgjigjeve molekulare me anën e RT-PCR 60
3.10 Arritja e përgjigjeve optimale, suboptimale dhe dështimeve të pacientëve 62
3.11 Analiza për mbijetesën e përgjithshme dhe mbijetesën e pakushtëzuar 63
PËRFUNDIME 67
SHKURTIME 69
MIRËNJOHJE 73
LITERATURA 74
SHTOJCAT 86
PËRMBLEDHJE 106
ABSTRACT 106

PUBLIKIME DHE PJESËMARRJE NËPËR KONFERENCA

1. International Congress of Biomedical Sciences May 1 – 4, 2013 Tirana, Albania
Comparison of chromosome banding analysis and interphase FISH in chronic myeloid leukemia patients treated with Gleevec.
Dorina Roko, Anila Babameto-Laku, Vahe Mokini, Maksim Cikuli.

2. International Conference of Ecosystems - Proceeding Book ISBN 978-9928-4068-7-3, May 31- June 5, 2013 Tirana, Albania
Significance of Sokal score in chronic myeloid leukemia patients treated with Gleevec in chronic phase.
Dorina Roko, Anila Babameto-Laku

3. Konferenca e 14-të Kombëtare e Pediatrisë (me pjesëmarrje ndërkombëtare) 19-20 Prill, 2013 Tirana, Albania
Përgjigjet citogjenetike në të sëmurët e moshave pediatrike me Leukozë Mieloide Kronike të trajtuar me Imatinib mesylate.
Dorina Roko, Anila Babameto-Laku, Vahe Mokini, Maksim Cikuli, Donjeta Bali.

4. 18-th Congress of the European Hematology Association June 13-16, 2013 Stockholm/ Suedi
Comparison of fluorescence in situ hybridization and chromosome banding analysis for the definition of complete cytogenetic response in chronic myeloid leukemia patients treated with gleevec.
Dorina Roko, Anila Babameto-Laku, Tatjana Caja, Donjeta Bali.

5. Buletini i Shkencave Natyrore ISSN 2305-882X Nr 14, Viti 2012
Përgjigjet hematologjike dhe citogjenetike të Imatinib mesylate në fazën kronike të leuçemisë mieloide.
Dorina Roko, Anila Babameto-Laku, Vahe Mokini

6. Medicus ISSN 1409-6366 UDC 61 Vol -18 (2) Shtator 2013
Ndjeshmëria e lartë e metodës FISH (Fluorescence in situ hybridization) në ndjekjen e të sëmurëve me leukozë mieloide kronike të trajtuar me Glivek.
Dorina Roko, Anila Babameto-Laku, Pal Xhumari, Donjeta Bali, Vahe Mokini, Maksim Cikuli.

7. Albanian Medical Journal 3 - 2013
Hematological and cytogenetic responses of Imatinib Mesylate and significance of Sokal score in chronic myeloid leukemia patients.
Dorina Roko, Anila Babameto-Laku, Vahe Mokini, Maksim Cikuli

PARATHËNIE

Leukoza mieloide kronike (LMC), është një patologji mieloproliferative si rrjedhojë e një transformimi klonal neoplazik të një qelize staminale hemolimfopoietike të palcës së kockës dhe karakterizohet nga një hiperplazi e linjës qelizore granulocitare me stade të ndryshme diferencimi në gjakun periferik dhe palcën e kockës.
Kjo sëmundje karakterizohet nga prania ose mungesa e kromozomit Philadelphia si edhe nga aberracione kromozomike të fituara të kariotipit, të cilat janë shenjë për progresionin klinik të sëmundjes.

Evidentimi i kësaj sëmundje u krye për herë të parë në fillim të vitit 1845 nga patologët Virchov, Bennet e Craigie në disa pacientë të cilët kishin splenomegali, anemi dhe rritje të numrit të granulociteve.

Kuadri klinik i LMC ka një ecuri trefazore:

- *faza kronike, është faza fillestare në të cilën vihet diagnoza e sëmundjes, e cila karakterizohet nga rritje masive e linjës granulocitare.*
- *faza e përshpejtimit, që mund të zgjasë deri në 1 vit, vjen nga grumbullimi i dëmtimeve gjenetike dhe epigjenetike gjatë fazës kronike.*
- *faza e krizës blastike, që karakterizohet nga ndërprerja e diferencimit (pjekjes) dhe grumbullimi (mbi 30%) i pararendësve të padiferencuar mieloidë (në 2/3 e të sëmurëve) ose limfoidë (në 1/3 e të sëmurëve) në gjakun periferik dhe palcën e kockës.*

LMC është sëmundja e parë e zbuluar më 1960 nga Peter Nowell dhe David Hungerford me një anomali specifike të kariotipit, i zbuluar fillimisht si një delecion i kromozomit 22. Më 1973 Janet Rowley përcaktoi se kromozomi Ph ishte i formuar nga një translokacion reciprok midis krahut të gjatë të kromozomit 9 dhe krahut të gjatë të kromozomit 22: t (9; 22) (q32; q11). Ky translokacion prodhon një kromozom 22 me gjatësi më të vogël (22q-) i quajtur kromozomi Filadelfia (Ph-Philadelphia)) nga emri i qytetit ku u zbulua për herë të parë dhe nga një kromozom 9 më i gjatë (9q+).
Me metodat e biologjisë molekulare është realizuar evidentimi i pikave të thyerjes në nivelin e gjenit ABL (Abelson murine leukemia) të kromozomit 9 dhe BCR (Breakpoint cluster region) të kromozomit 22 të cilat thyhen respektivisht në q34 dhe q11.
Proto-onkogjeni BCR-ABL, i lindur nga translokacioni t (9; 22) (q34; q11) u identifikua në vitin 1982 dhe hapi një kapitull të ri në fushën e onko-terapisë. Ky gjen hibrid kopjohet në një ARN-mesazhere e cila përkthehet në një proteinë anormale me një aktivitet të fortë tirozin-kinazik duke marrë pjesë në rrugën e tejçimit intraqelizor të sinjalit dhe duke shkaktuar proliferimin, qëndrueshmërinë e qelizave të prejardhura nga linja mieloide dhe një evolucion drejt fazës terminale të sëmundjes.

Studimet e para në laborator për inhibimin e aktivitetit tirozin-kinazik të riorganizimit gjenetik BCR-ABL nëpërmjet medikamentit Glivek (Imatinib mesylate) filluan në vitin 1993, ndërsa në vitin 1999 filloi aplikimi i tij për herë të parë tek njeriu nga biokimisti Nicholas Lydon dhe onkologu Brian Druker.

Gliveku filloi të përdorej si mjekim në linjën e parë të trajtimit për të sëmurët me leukozë mieloide në fazën kronike në maj 2001 (në vendin tonë 2004) dhe nga rezultatet që ka dhënë është konfirmuar efikasiteti i tij në këta pacientë në saj të aktivitetit specifik dhe të fuqishëm si inhibues i aktivitetit tirozin-kinazik të p210 BCR-ABL.

Monitorimi i rezultateve që jep Gliveku tek pacientët me leukozë mieloide në fazën kronike kryhet me metoda të citogjenetikës konvencionale [kariotip], citogjenetikës molekulare [hibridizimit in situ (Fluorescent In Situ Hybridization – FISH) dhe metodave të biologjisë molekulare si [Real Time-Quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)].

Qëllimi i terapisë tek këta pacientë në ditët e sotme është arritja e përgjigjes citogjenetike molekulare të plotë.

Ekzaminimi me anën e kariotipit mbetet metoda e artë për ndjekjen e të sëmurëve me LMC të trajtuar me Glivek në fazën kronike jo vetëm për përcaktimin e kromozomit Ph+, por edhe të anomalive të tjera kromozomike në kariotipin e këtyre pacientëve, të cilat me përdorimin e teknikave të tjera qofshin këto edhe molekulare është e pamundur të vëzhgohen.

Përdorimi i teknikës FISH për monitorimin e pacientëve të diagnostikuar me LMC dhe të trajtuar me Glivek ka përparësi krahasuar me kariotipin sepse rezulton si teknikë më e ndjeshme për shkak të analizimit të një numri më të madh qelizash që në stadin e interfazës krahasuar me numrin e metafazave të analizuara nga kariotipi. Kjo teknikë evidenton edhe riorganizimet gjenetike BCR-ABL kriptike, të cilat rezultojnë negative nga ekzaminimi i kariotipit për kromozomin Ph+.

Përdorimi i teknikës PCR konsiderohet si metoda më e mirë për vlerësimin e riorganizimeve BCR-ABL minimale të mbetura pas trajtimit me Glivek.

Ky studim është i pari i këtij lloji në vendin tonë, duke bërë të mundur që të dhënat për popullatën shqiptare të renditen krahas atyre të vendeve të tjera që prej vitesh kanë publikuar studime shkencore në lidhje me efektivitetin e terapisë me Glivek në fazën kronike të LMC.

Mendoj se studimi ynë do të jetë me interes dhe vlerë në diagnostikimin dhe monitorimin e pacientëve me leukozë mieloide kronike duke i ardhur në ndihmë mjekëve hematologë dhe do të shërbejë si një bazë e mirë të dhënash për studimet e mëtejshme.

QËLLIMI I STUDIMIT

Ky studim u ndërmor dhe u krye si një përpjekje për të përcaktuar efikasitetin për një prognozë të mirë si edhe vlerësimin për mbijetesë që jep trajtimi me Glivek në popullatën e pacientëve me LMC të marrë në studim.

Nëpërmjet këtij punimi kërkojmë të bëjmë të mundur që të dhënat për popullatën shqiptare të renditen krahas atyre të vendeve të tjera që prej vitesh kanë publikuar studime shkencore në lidhje me efektivitetin e terapisë me Glivek në fazën kronike tek të sëmurët me leukozë mieloide.

Duke u bazuar në përfundimet e studimeve shkencore të kryera në vende të ndyshme të botës për efektin e shkëlqyer që jep trajtimi me Glivek, për popullatën e pacientëve të marrë në studim kemi formuluar disa hipoteza për efikasitetin dhe sigurinë e Glivekut në nivelin hematologjik dhe citogjenetik të përgjigjeve të arritura, hipoteza të cilat do të vërtetohen duke pasur parasysh disa qëllime si;

- Vlerësimi i kohës të arritjes së përgjigjes të pjesshme dhe asaj të plotë hematologjike.

- Përcaktimi i arritjes dhe kohëzgjatjes së përgjigjes citogjenetike të vlerësuar nga citogjenetika standarte.

- Vlerësimi i arritjes së përgjigjes citogjenetike molekulare nëpërmjet teknikës së hibridizimit fluoreshent in situ (FISH).

- Evidentimi i avantazheve dhe disavantazheve midis dy metodave të përdorura (citogjenetikës standarte dhe FISH) në përcaktimin e përgjigjeve citogjenetike.

- Përcaktimi i korrelacionit ndërmjet dy sistemeve të vlerësimit prognostik [Sokal e European Treatment and Outcome Study (EUTOS)] dhe përgjigjeve hematologjike dhe citogjenetike.

- Vlerësimi i mbijetesës së përgjithshme dhe mbijetesës së pakushtëzuar në muajin 12 dhe 24 të trajtimit me Glivek.

I. PJESA TEORIKE

1.1 Sindromet mieloproliferative

Koncepti i sëmundjeve mieloproliferative është i lidhur me dëmtimet e shpeshta dhe të njëpasnjëshme të shumë linjave mieloide dhe është propozuar për herë të parë në 1951 nga hematologu William Dameshek.

Në ditët e sotme ky term i referohet çrregullimeve klonale të hematopoezës që çojnë në një prodhim të shtuar të një ose më shumë linjave qelizore të palcës së kuqe të kockave (fig. 1-1).

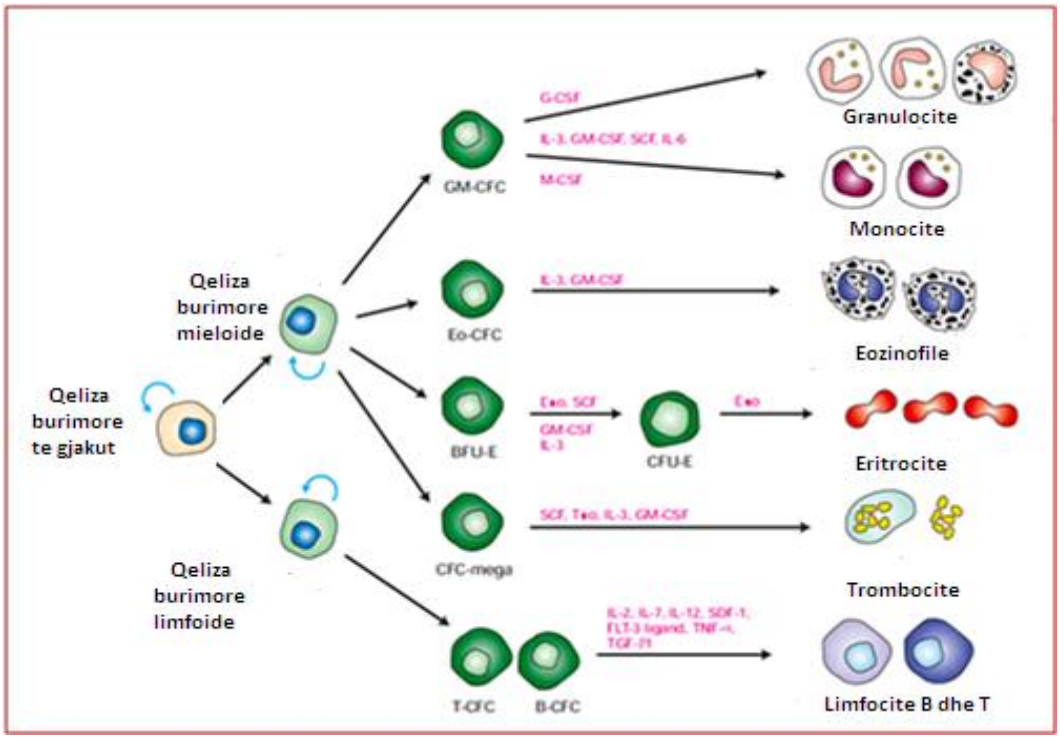


Figura 1-1. Skema e thjeshtuar e formimit të qelizave të gjakut (Hematopoeza)
(*Burimi: Myelodysplastic/Myeloproliferative Diseases Treatment (PDQ®)*)

Në vitin 1964 W. Dameshek duke u nisur nga tipi i qelizës që proliferon (granulocit, eritrocit apo trombocit) dhe shkalla e ***mielofibrozës*** apo e ***splenomegalisë*** grupoi nën termin sëmundje mieloproliferative 4 sëmundje:

- Leukoza Mieloide Kronike, pozitive për kromozomin Philadelphia që shoqërohet me rritje të numrit të granulociteve dhe leukociteve.
- Policitemia Vera, negative për kromozomin Philadelphia e shoqëruar me rritje të numrit të eritrociteve.
- Trombocitemia Esenciale, negative për kromozomin Philadelphia që shoqërohet me rritje të numrit të trombociteve.
- Mielofibroza Primitive, negative për kromozomin Philadelphia e shoqëruar me rritje të sasisë të kolagjenit (77).

Këto sëmundje e kanë piknisjen nga një qelizë burimore e cila mund të jetë e orientuar tek linja mieloide ose limfoide (38).

Në vitin 1990 u vërtetua se leukozat mund të ishin akute (progresion i shpejtë i blasteve të pamaturuara) ose kronike (progresion më i ngadaltë i blasteve por me më shumë qeliza kancerogjene të maturuara).

Duke u nisur nga studime morfologjike dhe citokimike leukozat klasifikohen në;

- limfoide akute
- limfoide kronike
- mieloide akute
- mieloide kronike

dhe karakterizohen nga aberracione të ndryshme kromozomike të fituara dhe nga prania ose mungesa e kromozomit Philadelphia (14). Në adultët 85% e rasteve të leukozave janë mieloide dhe 15% janë limfoide, ndërsa tek fëmijët është e kundërta 80% e rasteve janë limfoide dhe 20% mieloide.

Njohja e llojit të leukozës nga ana e mjekut bën të mundur që pacientit t'i përzgjidhet mjekimi i duhur dhe t'i lehtësohet prognoza për sëmundjen në fjalë.

Nga të dhënat e fundit të kulturave qelizore, të kinetikës qelizore, të enzimologjisë, të citogjenetikës, të biologjisë molekulare dhe të mikroskopisë elektronike mendohet se në këto sëmundje kemi një anomali të fituar në nivelin e qelizës mëmë totipotente e cila nuk është maturuar akoma dhe ndodhet në rrugën e diferencimit eritro-granulo-trombocitar (11) (fig. 1-2 & 1-3).

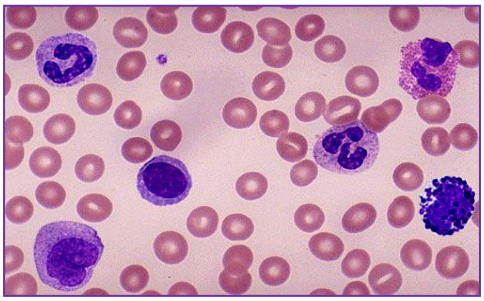


Figura 1-2. Pamje nga hematopoeza normale
(Burimi: Making pathology easy and fun)

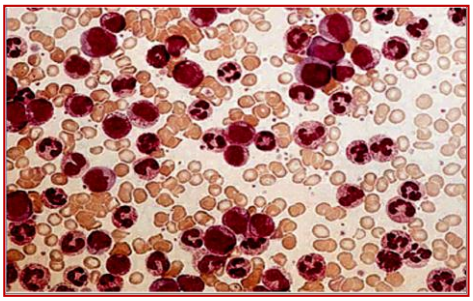


Figura 1-3. Pamje nga LMC
(Burimi: Making pathology easy and fun)

1.2 Leukoza Mieloide Kronike

1.2.1 Fiziopatologjia

Ashtu si sindromet e tjera mieloproliferative, ***leukoza mieloide kronike*** është një sëmundje që shkaktohet nga një proçes malinj, që rezulton nga dëmtimi i një progenitori pluripotent (42). Sëmundja karakterizohet nga proliferimi monoklonal i qelizave pararendëse mieloide malinje që çojnë në një rritje të theksuar të qelizave mieloide.

Nga pikpamja citogjenetike leukoza mieloide kronike (LMC) karakterizohet nga një aberracion i fituar i kariotipit, rrjedhojat molekulare dhe biologjike të të cilit tani janë mjaft mirë të studiuara dhe shërbejnë si një model referimi për patologjitë e ngjashme.

Bëhet fjalë për ***kromozomin Philadelfia*** i cili mori emrin e qytetit Philadelphia/USA ku më 1960 Peter Nowell nga Universiteti i Pennsylvanisë dhe David Hungerford nga "Fox Chase Cancer Center" zbuluan dhe përshkruan këtë anomali për herë të parë. Në fillim u mendua për një delecion, ku krahu i gjatë i kromozomit 22 ishte i shkurtër, ndërsa më 1973 Rowley dhe kolegët e tij duke përdorur fluoreshencën me quinakrinë dhe bandimin me ngjyruesin Giemsa zbuluan se kromozomi Philadelphia ishte rezultat i një translokacioni midis krahëve të gjatë të kromozomeve 9 dhe 22. Këto kromozome këputen respektivisht në q34 dhe q11 dhe shkurtimisht shkruhet t (9; 22) (q34; q11), miratuar nga "International System for Human Cytogenetic Nomenclature" (ISCN- 2009).

Kromozomi Philadelphia haset në 95% të pacientëve me LMC, ndërsa në 5% të tyre ku nuk identifikohet kromozomi Philadelphia në analizën citogjenetike standarte mund të identifikohet prania e riorganizimit BCR - ABL me teknika të tjera si ***Fluorescent In Situ Hybridization*** *(FISH)* dhe teknika të tjera të biologjisë molekulare si ***Real Time- Polymerase Chain Reaction*** *(RT-PCR).*

Prania e këtij kromozomi nuk është e mjaftueshme për vendosjen e diagnozës së LMC. Ky kromozom mund të gjendet edhe në leukozat akute limfoblastike në 25-30% të rasteve tek adultët, 2-10 % në moshat pediatrike dhe në disa raste në leukozat mieloide akute.

1.2.2 Shenjat klinike të shfaqjes së sëmundjes

Sëmundja "instalohet" në mënyrë të fshehtë. Zbulimi i saj në 30% të pacientëve është rastësor dhe identifikohet nga disa shenja që mund të ndahen në:

1. Simptoma të varura nga rritja e numrit të granulociteve, eozinofileve dhe leukociteve, të lidhura direkt me rritjen e volumit të shpretkës, infarkte splenike dhe hemoragji.
2. Simptoma që lidhen me dobësi të përgjithshme të pacientit, rënie të lehtë në peshë, ethe, temperaturë, disa herë djersitje natën, dhimbje muskulare ose/dhe kockore.

Në shumicën e rasteve sëmundja zbulohet nga një ekzaminim klinik edhe pse shenjat klinike të sëmundjes janë shpesh të pakta. Në ekzaminimin klinik splenomegalia është shenja kryesore dhe ndoshta e vetme e sëmundjes. Shpesh shpretka është e zmadhuar duke zënë të gjithë kuadrantin abdominal superior të majtë. Në disa raste të LMC me leukocitozë pak të shprehur, mund të mos ketë splenomegali. Hepatomegalia është e rrallë dhe e moderuar. Dhimbja gjatë digitopresionit në sternum takohet në 50-70% të rasteve. Në disa raste mund të ketë fenomene hemoragjike apo një temperaturë subfebrile.

Shumica e shenjave dhe simptomave në LMC ndodhin sepse qelizat leuçemike zëvendësojnë qelizat normale të palcës së kockës pra qelizat formuese të gjakut. Si rrjedhojë të sëmurët nuk prodhojnë mjaftueshëm eritrocite, leukocite dhe trombocite pasojë e të cilave janë; anemia, leukopenia dhe trombocitopenia (130).

1.2.3 Evolucioni i LMC-së

Një nga karakteristikat kryesore të LMC është edhe evolucioni i saj. Kuadri klinik i saj ka një ecuri trefazore (43, 109):

1. faza kronike ose mielocitare
2. faza e përshpejtimit
3. faza e transformimit akut

1. Në momentin e diagnozës rreth 85% e pacientëve janë në fazën kronike dhe shfaqin shenja të tilla si lodhje dhe dhimbje në pjesën e majtë abdominale. Vihet re gjithashtu një leukocitozë e shprehur në gjakun periferik mbi 100.000 leukocite/mm³ gjak, pothuajse të gjitha qeliza granulare dhe pjesa tjetër e papjekur. Si rregull kjo fazë zgjat nga 3-5 vjet, por shumë e rëndësishme në zgjatjen e saj është koha kur është vendosur diagnoza dhe skema e mjekimit. Mungesa e trajtimit bën që pacienti shumë shpejt të kalojë në fazën e përshpejtimit (87).

2. Faza e përshpejtimit të sëmundjes karakterizohet nga shenja klinike jo specifike si: dobësim i gjendjes së përgjithshme, rritje e shpejtë e volumit të shpretkës dhe numrit të leukociteve. Nga pikpamja hematologjike numri total i bazofileve dhe i eozinofileve mund të arrijë >20%, ndërsa në mielogramë numri i blasteve dhe i promielociteve nuk arrin shifrat për të konfirmuar një transformim akut (10-20%). Në këtë fazë pacientit mund t'i shtohen edhe anomali të tjera kromozomike si rezultat i përparimit të sëmundjes. Modifikimi i mjekimeve mund të lejojë që pacienti të kthehet në fazën kronike por në përgjithësi për një periudhë kohe të shkurtër. Transplanti i palcës së kockës ka më pak rezultate se në fazën kronike.

3. Transformimi akut është edhe përfundimi natyral i kësaj sëmundjeje. Pas një faze përshpejtimi progresiv në 50-70% të rasteve vihet re transformimi akut. Kriteret diagnostikuese hematologjike mund t'i përmbledhim në të paktën 30% blaste në gjakun periferik ose në palcë ose të paktën 50% blaste-mieloblaste-promielocite në mielogramë. Të dhënat klinike mund të jenë shenja që ndjekin fazën e përshpejtimit por mund të jenë edhe të menjëhershme si: anoreksia, rënia në peshë, temperaturë pa infeksione, dobësim i gjëndjes së përgjithshme, djersitje natën, kollë pa probleme pulmonare, dhimbje kockore dhe muskulare, dhimbje të shpretkës etj (43, 109, 110). Në këtë fazë situata është gjithmonë e rëndë, megjithatë mund të fitohet ndonjë përgjigje citogjenetike me kthim në fazën kronike sidomos në format limfoide. Këto përmirësime janë shumë të shkurtra, ndërsa transplanti i palcës së kockave nuk ka rezultate të mira por mbetet e vetmja mënyrë për të sëmurin e këtij stadi.

1.2.4 Etiologjia

Në disa raste rrezatimet jonizuese janë përgjegjse për shfaqjen e LMC. Këtë e kanë treguar më së miri statistikat e bëra nga radiologët tek subjektet me ***spondiloartrit ankilozant***, tek japonezët që i janë nënshtruar bombardimit atomik në 1945, tek të sëmurët e prekur nga kanceri që i nënshtrohen proçedurave të shpeshta radiologjike etj. Një rol të rëndësishëm në shfaqjen e LMC luan edhe benzeni, pesticidet, fushat elektromagnetike të frekuencave të ulta, si edhe infeksionet virale dhe tymi i duhanit. Në këto raste mund të flitet edhe për rastësi, por mund të dyshohet për një ndjeshmëri të veçantë të këtyre subjekteve ndaj efekteve mutagene dhe imunodepresuese të mjekimeve të mëparshme si kimioterapia dhe radioterapia (1, 58, 82).

Deri më sot nuk është gjetur ndonjë lidhje për këtë sëmundje midis binjakëve monozigotë (77). Njerëzit me imunitet të ulur si ata të trajtuar me kimioterapi ose me AIDS, kanë probabilitet më të lartë për t'u sëmurur me leukozë sesa me ndonjë sëmundje tjeter kancerogjene.

1.2.5 Epidemiologjia

Incidenca e leukozës mieloide kronike në botë është 10-15 raste të reja në vit/ 1.000.000 banorë. Shpeshtësia e saj arrin në 4-5 herë më pak se leukozat akute ose përbën 15-20% të të gjitha leukozave të adultëve (62, 103) ose 3% të të gjitha sëmundjeve kancerogjene. Incidenca e sëmundjes rritet progresivisht me moshën. Kështu deri në moshën 10 vjeç është 1/1.000.000 fëmijë dhe rritet deri në 30/1.000.000 individë midis moshave 50 dhe 60 vjeç, kurse në shtatzëni ka një incidencë prej 1/20.000 shtatzëni. LMC është më e shpeshtë tek meshkujt sesa tek femrat me një raport 1,4/1 (15, 54).

1.2.6 Prognoza

Shumë elemente klinikë kanë vlera prognostike por disa faktorë si mosha, përmasat e shpretkës, numri i trombociteve dhe përqindja e blasteve në gjakun periferik shërbejnë për të llogaritur prognozën e sëmundjes sipas një formule të përpunuar nga Sokal në vitin 1984 (51, 112). Të katër parametrat prognostike të mësipërm janë të përfshirë tek formula e mëposhtme.

[0.116 (mosha - 43.4)] + 0.0345 (madhësia e shpretkës - 7.51) + 0.188 [(numri i trombociteve/700)^2 - 0.563] + 0.0887 (përqindja e blasteve - 2.10)

Në vitin 2011 është publikuar një tjetër sistem vlerësimi prognostik - ***European Treatment and Outcome Study*** *(EUTOS),* i cili është më i vlefshëm se vlerësimi i Sokal-it jo vetëm në mundësinë prognostike, por edhe në thjeshtësinë e llogaritjes. Ky vlerësim bazohet në vlerat e dy parametrave diagnostikues: madhësia e shpretkës dhe numri i bazofileve në momentin e vendosjes së diagnozës. Sipas këtij vlerësimi parashikohet përgjigja citogjenetike e plotë në muajin e 18 pas fillimit të terapisë me Glivek (Imatinib mesylate), që është e pamundur të arrihet duke përdorur vlerësimin sipas Sokal-it. Kjo llogaritet me formulën:

7 x nr.i bazofileve në gjakun periferik + 4 x madhësia e shpretkës (33).

1.3 Formimi i kromozomit Philadelphia

Metodat e biologjisë molekulare kanë treguar se pikat e këputjes ndodhen në nivelin e ***gjenit ABL (****Abelson murine leukemia****)*** të kromozomit 9 dhe ***BCR (****Breakpoint cluster region****)*** të kromozomit 22. Pjesa centromerike 5’ e BCR është vendosur në vazhdim të pjesës C terminale 3’ të protoonkogjenit ABL. Gjeni hibrid BCR-ABL kopjohet në një ARN-mesazhere e cila përkthehet në një proteinë anormale me një aktivitet të fortë tirozin-kinazik duke marrë pjesë në rrugën e tejçimit intraqelizor të sinjalit (37, 75) (fig. 1-4).

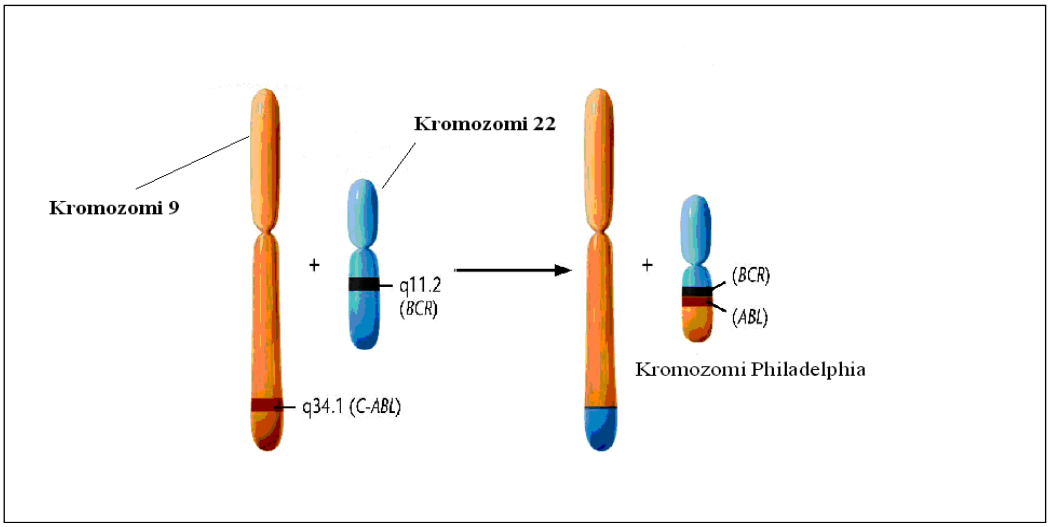


Figura 1-4. Formimi i Kromozomit Philadelphia
(*Burimi: Philadelphia chromosome.html*)

Tirozin kinaza bën pjesë në nënklasën e protein-kinazave, karakteristikë e të cilave është se mund të transferojnë një grup fosfat nga ATP-ja tek një proteinë qelizore p.sh. tek aminoacidi serinë ose treoninë. Fosforilimi i proteinave nga kinazat është një mekanizëm i rëndësishëm në komunikimin e sinjalit brenda qelizës dhe rregullimin e aktivitetit qelizor së bashku me ndarjen qelizore, duke funksionuar si një switch on/off në këto funksione qelizore. Protein-kinazat mund të jenë të mutuara dhe të funksionojnë vetëm në pozicionin "on" duke shkaktuar rritjen e pakontrolluar të numrit të qelizave dhe duke çuar deri në formimin e sëmundjeve kancerogjene. Për të reduktuar aktivitetin tirozin-kinazik të këtyre enzimave futen në veprim molekulat inhibitore të tirozin-kinazave, një prej të cilave është edhe Gliveku.

1.4 Gjenet dhe proteinat abl, bcr dhe bcr-abl

Për të kuptuar plotësisht mekanizmin përmes të cilit gjeni hibrid BCR-ABL favorizon shumimin e qelizave leuçemike është e nevojshme të analizojmë funksionin e dy gjeneve të përfshirë në translokacion (37, 75, 114) (fig. 1-5).

1.4.1 Gjeni dhe proteina ABL

Gjeni ABL është një proto-onkogjen, homolog i onkogjenit viral v-ABL i pranishëm te retrovirusi i leuçemisë së miut i Abelson (Abelson murine Leukemia virus). Ai ka 12 ekzone dhe shtrihet në një gjatësi prej 230 kb. Kopjimi i gjenit mund të prodhojë, nëpërmjet splicing-ut alternativ, mRNA të ndryshme prej 6-7 kb që përfshijnë ose ekzonin 1a ose atë 1b. Në të dy rastet prodhohet një proteinë prej 145 kDa që kodon për një tirozin-kinazë citosolike (ku lidhet me aktinën e citoskeletit), ashtu edhe në bërthamë ku lidhet me ADN-në (78).

Në skajin aminofundor proteina ABL përmban tre zona homologe Src (SH- Src Homology): zona SH1 ka aktivitet tirozin kinazik, zonat SH2 dhe SH3 luajnë një rol në ndërveprimin me proteina të tjera të pasura përkatësisht në tirozinë të fosforiluar dhe prolinë. Përveç kësaj, SH2 ka një afinitet për ekzonin e parë të gjenit BCR.

Pjesa qëndrore e proteinës ABL përmban zona të pasura në prolinë, të afta për t'u lidhur me zonat SH3 të proteinave të tjera, si ***Crk*** *(Calcium receptor kinase)*. Në këtë

pjesë gjenden edhe tre sinjale të lokalizimit bërthamor (NLS-Nuclear Localization Signal), përgjegjës të futjes së ABL në bërthamë (26, 83).

Në skajin karboksifundor proteina ABL përmban një zonë të lidhjes me aktinën dhe një sinjal të eksportit bërthamor (NES-Nuclear Export Signal), që kryen daljen e proteinës nga bërthama në citoplazëm.

Proteina ABL normale është një tirozin kinazë që merr pjesë në rregullimin e ciklit qelizor, në përgjigjen ndaj streseve gjenotoksikë, në adezionin qelizor dhe në vdekjen qelizore të programuar (apoptozë), (44, 110).

1.4.2 Gjeni dhe proteina BCR

Gjeni BCR shtrihet në një segment të DNA prej 130 kb dhe përmban 23 ekzone. Emri i tij vjen nga Breakpoint Cluster Region që tregon se ai mund të pësojë këputje në pika të ndryshme, dhe në fakt proteinat e prodhuara nga translokacioni BCR-ABL janë të ndryshme. Gjeni BCR normalisht kodon për një proteinë me peshë molekulare prej 160 kDa. Proteina BCR normale gjendet si në citoplazëm ashtu edhe në bërthamë.

Në skajin aminofundor proteina BCR përmban një zonë oligomerizimi për 61 aminoacidet e para që shërben për aktivizimin e veprimtarisë tirozin kinazike të ABL në onkoproteinën hibride BCR-ABL. Në ekzonin 1 gjendet një zonë serin-treoninë kinazike për fosforilimin e substrateve dhe sitet e lidhjes me zonat SH2 si ajo e proteinës adaptuese Grb-2 (Growth factor Receptor-bound protein 2) që është e përfshirë në aktivizimin e proteinës RAS (Rat sarcoma).

Pjesa qëndrore e proteinës BCR përmban një zonë të quajtur GEF (Guanine Exchange Factor) që katalizon shkëmbimin e GDP me GTP nga siti katalitik i proteinave të superfamiljes së GTPazave.

Në skajin karboksifundor të proteinës BCR ka një zonë të quajtur GAP (Guanine Activating Protein) që hidrolizon GTP në GDP duke inaktivizuar proteinat e superfamiljes së GTP-azave.

1.4.3 Proteina BCR-ABL

Proteina BCR-ABL është një nga tirozin-kinazat e para të zbuluara në neoplazitë e njeriut. Për shkak të translokacionit (9; 22) (q34; q11) gjenet BCR dhe ABL bashkohen fizikisht, produkti i të cilit paraqet skajin aminofundor të gjenit BCR dhe skajin karboksifundor të gjenit ABL. Aktiviteti tirozin-kinazik i proteinës ABL është tepër i kontrolluar në qelizat normale, por është i çrregulluar në polipeptidin kimerik. Veprimtaria tirozin-kinazike e ABL është e aktivizuar në mënyrë të vazhdueshme. Çrregullimi i tirozin-kinazës ABL shkakton një anomali të fosforilimit të tirozinave të proteinave të tjera që janë në gjendje të lidhen me ABL p.sh: Gbr2 e SOS (Son of Sevenless), përfshirë edhe ato që marrin pjesë në kontrollin e ciklit qelizor. Përveç kësaj proteina BCR-ABL ndryshon lokalizimin; ajo gjendet vetëm në citoplazëm, ndërkohë që proteina normale ABL ndodhet në bërthamë.

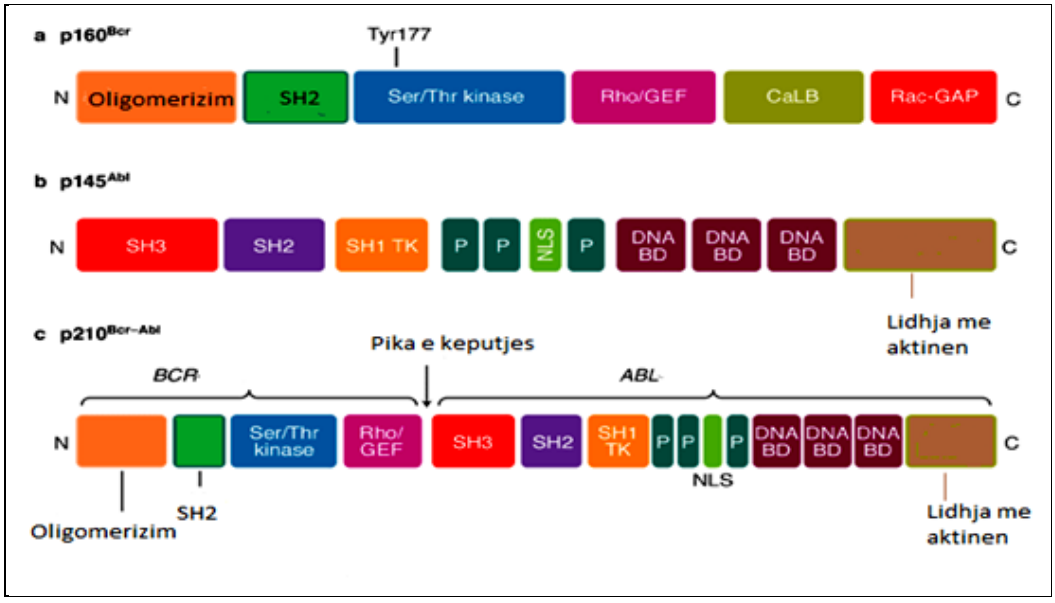


Figura 1-5. Struktura e gjeneve a. ABL, b. BCR dhe c. onkogjenit BCR-ABL (*Burimi: The c-Bcr, c-Abl and Bcr–Abl protein*)

Produkt i bashkimit të dy gjeneve janë tre proteina kimerike të ndryshme (p190, p210 dhe p230) të lidhura me forma klinike të ndryshme. Pesha molekulare e ndryshme e produkteve të gjenit hibrid rrjedh nga numri i ndryshëm i aminoacideve të koduar nga gjeni BCR të cilët bëjnë pjesë në molekulë. Të tre proteinat kanë potencial onkogjenik dhe janë përgjegjëse të proçesit leuçemik në sajë të rritjes së aktivitetit tirozin-kinazik citoplazmatik. Çrregullimi dhe delokalizimi i aktivitetit kinazik të proteinës BCR-ABL çojnë në aktivizimin e rrugëve të tejçimit të sinjaleve si: RAS, PI3K (phosphatidylinositol-3 kinase) e AKT (protein kinase B) dhe rritjen e niveleve të Bcl2 (B-cell lymphoma 2). Këto mekanizma i çojnë qelizës BCR-ABL sinjale të forta që rrisin shumëzimin qelizor, frenimin e aktivitetit apoptotik dhe anomali të adezionit qelizor.

Në translokacionin t (9;22) (q34;q11) pika e këputjes në gjenin ABL mund të ndodhë në një zonë mbi 300 kb të gjatë në fillim të ekzonit 1b, pas ekzonit 1a ose ndërmjet të dyve. Ekzonet nga a2 deri a11 (në mRNA) janë të përfshirë gjithmonë në translokacion.

Pika e këputjes mbi gjenin BCR ndodhet pothuaj gjithmonë midis ekzoneve b2 e b3 dhe përcakton zonën e quajtur "Pika Madhore e BCR" (M-BCR=*Major Breakpoint Cluster Region*). Në vartësi të ekzonit të gjenit BCR të përfshirë në translokacion do të prodhohen dy forma alternative të gjenit hibrid, b2a2 dhe b3a2, të cilat kodojnë për të njëjtën proteinë me peshë molekulare 210 kDa, përgjegjëse për mbi 90% të rasteve me LMC (128).

Në rreth 50% tek të rriturit me LLA (leukoza limfoblastike akute) Ph+ dhe në raste të pakta të LMC pikat e këputjes në BCR ndodhin në një zonë më afër centromerit të quajtur "pika e vogël e BCR" (m-BCR="*minor Breakpoint Cluster Region*"), që çon në bashkimin e ekzonit e1 të BCR me ekzonin a2 të ABL duke formuar gjenin kimerik e1a2 që përkthehet në një proteinë prej 190 kDa (71).

Së fundi,është gjetur një pikë e tretë e këputjes në gjenin BCR në një zonë të quajtur "*mikro-BCR*" që çon në bashkimin e ekzonit e19 të BCR me ekzonin a2 të ABL. Gjeni

kimerik i formuar e19a2 kodon për një proteinë prej 230 kDa, përgjegjëse e leuçemisë neutrofilike kronike (LNC) me prognozë shumë të favorshme (98, 129).

Studimi citogjenetik konvencional nuk është në gjendje të të zbulojë praninë e kromozomit Ph në të gjitha rastet dhe kjo është vërtetuar me gjetjen e këtij kromozomi me anë të teknikave të biologjisë molekulare në rastet citogjenetikisht negative për këtë kromozom. Prandaj, këto metoda, më të rëndësishmet e të cilave janë teknika e FISH dhe e RT-PCR, janë të detyrueshme për diagnozën e të gjitha rasteve të dyshuar klinikisht dhe negativë me teknikat citogjenetike standarte (fig. 1-6).

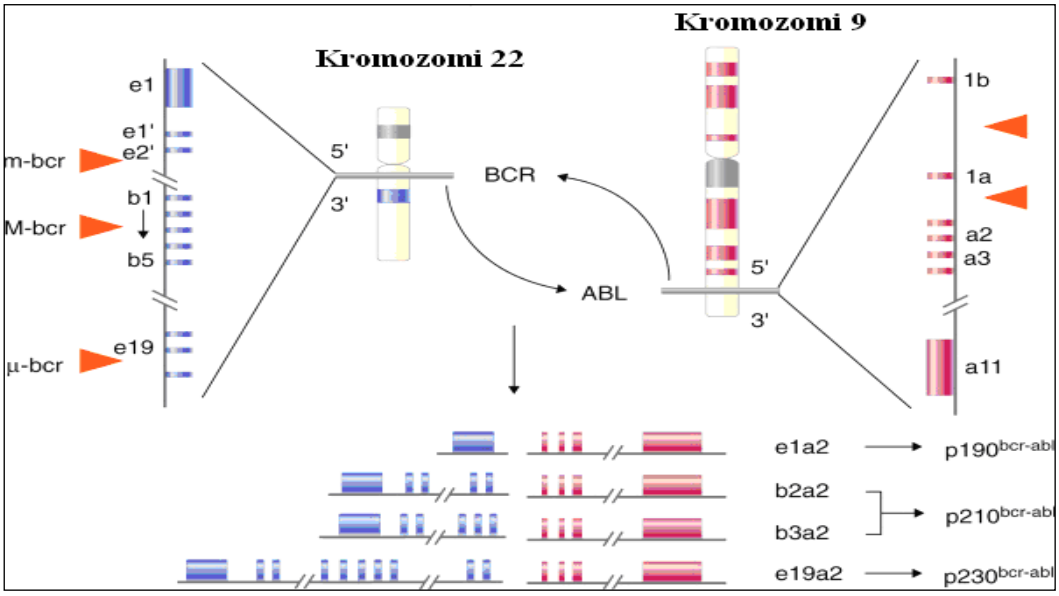


Figura 1-6. Pikat e këputjes në kromozomin 9 dhe 22 dhe formimi i proteinave përkatëse (*Burimi: Chronic Myelogenous Leukemia: Update on Biology and Treatment)*

Nuk është akoma e qartë se cilat janë mekanizmat që favorizojnë translokacionin. Një nga tre hipotezat që ekzistojnë është prania e vendeve të thyeshme përkatësisht në pikat e thyerjes të kromozomeve përkatëse. Hipoteza të tjera janë shpërndarja hapësinore e kromozomeve 9 dhe 22 në metafazë në mënyrë të tillë që të favorizojë afërsinë e gjeneve BCR dhe ABL ose prania e sekuencave të përsëritura potencialisht favorizuese të translokacionit në pikat e thyerjes.

Rritja e gjatësisë së fragmenteve të prera në gjenin BCR është e lidhur direkt me një ulje të aktivitetit tirozin kinazik të ABL. Si pasojë p230 tregon për një aktivitet tirozin-kinazik më të ulët se p210 dhe p190, kurse p210 një aktivitet më të ulët se p190.

1.5 Mekanizmat e vetive të transformimit bcr-abl

1.5.1 Aftësia adezive (ngjitëse) e dëmtuar

LMC karakterizohet nga nxjerrja e parakohshme e qelizave pararendëse nga palca e kockës në qarkullim, e cila mund t'i atribuohet defekteve të molekulave të ngjitjes (adezionit) në këto qeliza. Proteina kimerike BCR-ABL pakëson ngjitjen qelizore tek matriçja stromale duke shkaktuar një zvogëlim të ndërveprimit midis qelizave

hemopoietike dhe atyre stromale si edhe një ndërprerje të sinjaleve që lëshojnë molekulat e adezionit me rrjedhojën e zgjatjes së fazës së shumëzimit qelizor dhe vonesën e diferencimit qelizor.
Qelizat leuçemike prodhojnë një variant të integrinës β1, e cila është një frenuese e adezionit qelizor dhe nuk gjendet në qelizat pararendëse normale. Gjithashtu, meqenëse ABL përfshihet normalisht në përkthimin e sinjaleve dhe prania e proteinës BCR-ABL në citoplazëm pengon akoma më shumë tejçimin e sinjaleve nga qeliza.
Proteina CRLK (Calcium regulated receptor like kinase), një ndër proteinat e fosforiluara nga aktiviteti kinazik i BCR-ABL, luan një rol të rëndësishëm në lëvizjen dhe adezionin qelizor të ndërmjetsuar nga integrinat, duke u lidhur me proteina si paksilina dhe FAK (Focal Adhesion Kinase).

1.5.2 Aktivizimi i rrugëve të tejçimit të sinjaleve nga BCR-ABL

Onkoproteina citoplazmike ka një aktivitet tirozin-kinazik të vazhdueshëm i cili nuk është në gjendje të lidhet me DNA, por aktivizon shumë rrugë të tejçimit të sinjaleve që në popullatën e qelizave leuçemike nxit shumëzimin qelizor, pakësimin e apoptozës dhe rritje të mbijetesës edhe në mungesë të ndërveprimeve fiziologjike me mjedisin jashtëqelizor.

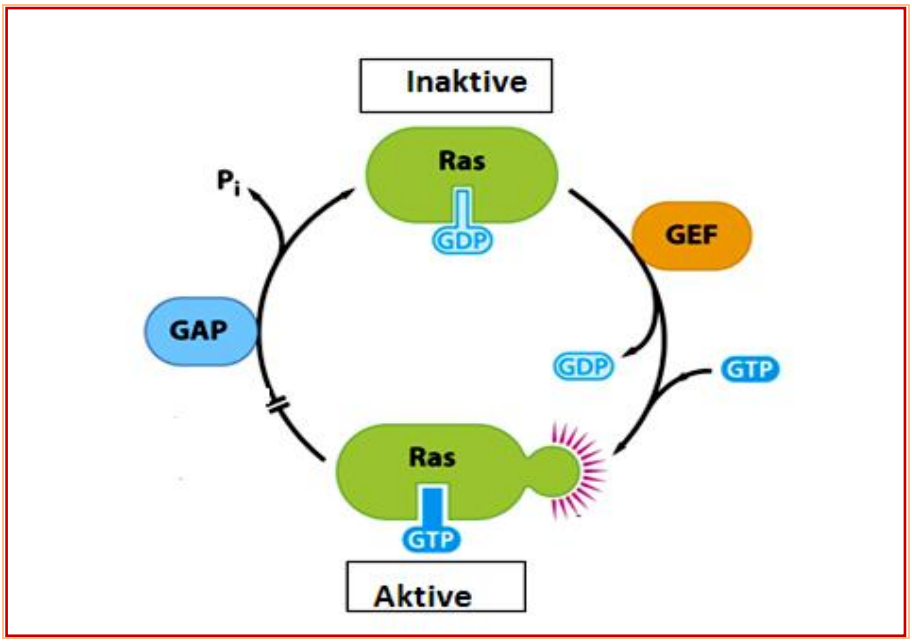
Rrugët e tejçimit të sinjaleve që rregullohen nga aktiviteti katalitik i BCR-ABL përfshijnë shumë proteina si; RAS, STAT (Signal Transducers And Activators of Transcription), MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase), MEK, PI3K dhe AKT, një pjesë prej të cilave kërkon lidhjen e BCR-ABL me proteina përshtatëse, si GRB-2 (Growth factor receptor-bound protein 2), CRLK, SHC (Src homology).

1.5.2.1 Rruga e tejçimit RAS e MAP Kinazë

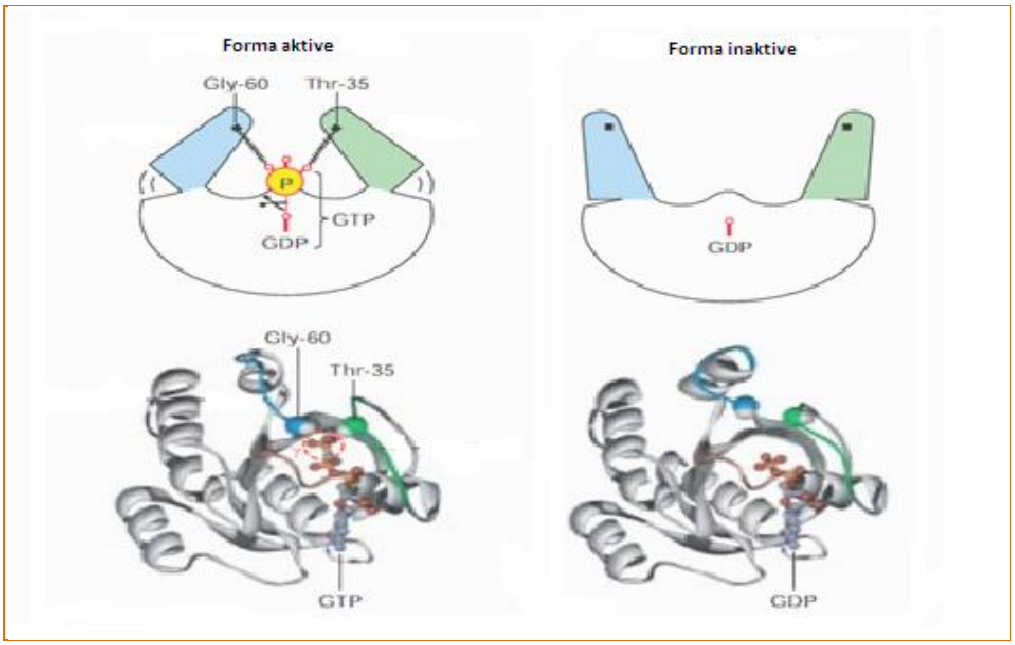
RAS është një proteinë monomerike me aktivitet GTPazik që bën pjesë në superfamiljen e proteinave G. Ajo kodohet nga proto-onkogjeni RAS që është një nga më të mutuarit në tumoret dhe gjendet në 3 forma të ndryshme H-RAS, K-RAS dhe N-RAS. Ajo merr pjesë në të paktën tre rrugë kryesore të tejçimit të sinjaleve:

- MAPK
- Fosfoinozititet
- Proteinat G të vogla

Proteina Ras funksionon si një çelës në rrugën e tejçimit të sinjaleve në brendësi të qelizës. Ajo është aktive, pra në pozicionin “e hapur”, në se lidhet me GTP, dhe jo aktive ose “e mbyllur” në se lidhet me GDP (fig 1-7).



a.



b.

Figura 1-7 a,b. Aktivizimi dhe inaktivizimi i proteinës RAS
(*Burimi: http:// cc.scu.edu.cn*)

Kalimi nga forma aktive në formën inaktive kryhet nëpërmjet disa proteinave aksesore:

- proteina e aktivizimit të GTPazës (GAP), që nxit hidrolizën e GTP të lidhur me RAS në RAS-GDP duke favorizuar inaktivizimin e proteinës RAS.
- faktori i shkëmbimit guanilik (GEF), që transformon GDP në GTP duke aktivizuar RAS (siç është p.sh proteina SOS)
- frenuesi i zbërthimit të nukleotidit (GDI=Guanine Dissociation Inhibitor), që frenon zbërthimin e GTP në GDP.
- proteina adaptore Grb-2

Sinjalet e ndryshme si ato të faktorëve të rritjes lidhen me receptorët tirozin-kinazikë, të cilët aktivizohen duke u autofosforiluar në mbetjet tirozinike. Receptorët e aktivizuar e transmetojnë sinjalin e ligandit te proteina RAS nëpërmjet proteinës Grb-2, e cila lidhet me tirozinat e fosforiluara të receptorit me anë të zonave të saj SH2 të pasura në prolinë. Proteina Grb-2 ndërvepron me proteinën SOS, që është një aktivizuese e shkëmbimit të GDP në GTP, e cila aktivizon proteinën RAS. Normalisht proteina RAS është e lidhur me GDP, pra jo aktive, por kur fosforilohet, shkëmben GDP me GTP e marrë nga citoplazma nëpërmjet faktorit GEF (36, 75) (fig.1-8 a, b, c).

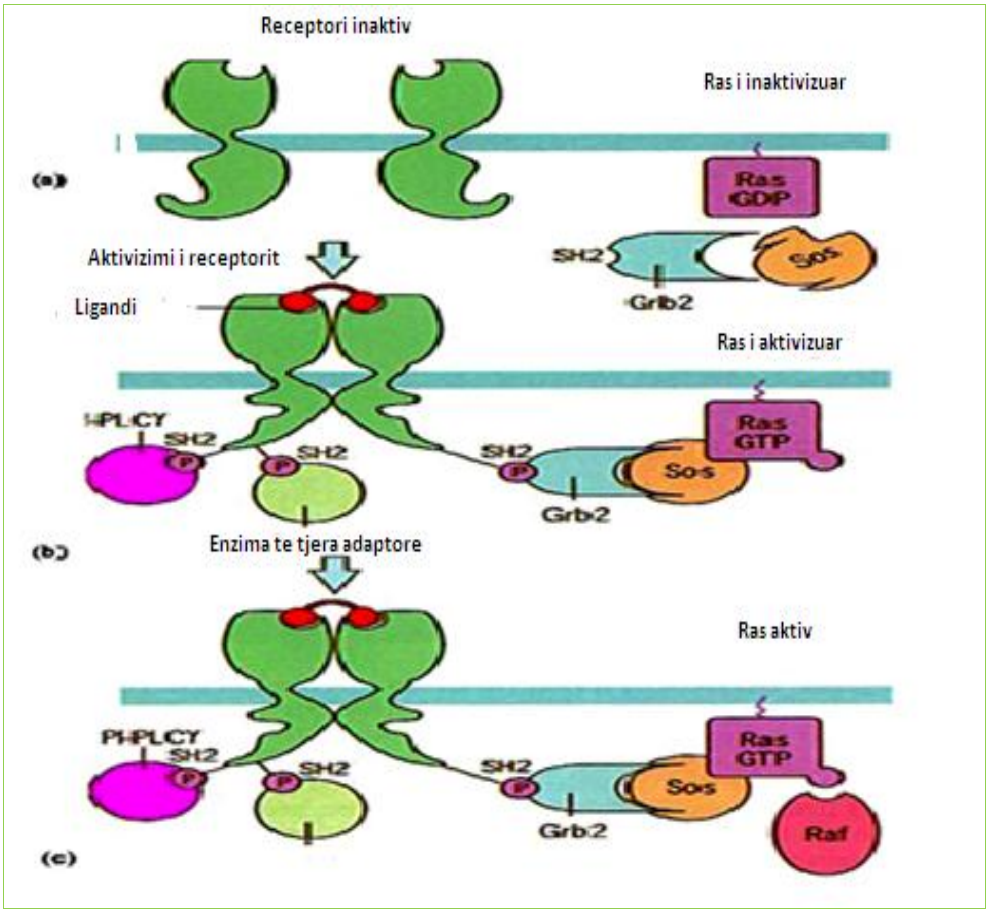


Figura 1-8a, b, c. Fazat e aktivizimit të RAS

Fosforilimi i tirozinave të receptorit dhe aktivizimi i RAS është një proçes tranzitor jetëshkurtër, pasi pothuaj menjëherë ndërhyjnë fosfatazat (GAP) që shkaktojnë hidrolizën e GTP në GDP. Për të stimuluar shumëzimin qelizor sinjali i marrë nga RAS i aktivizuar duhet të kthehet në sinjale të tjerë që zgjasin për kohë më të gjatë dhe që mund të transportojnë informacionin deri në bërthamë. Prandaj RAS nxit një seri reaksionesh të njohura me emrin "kaskada e MAP Kinazës" ose protein- kinaza të aktivizuar nga mitogenët.

RAS i aktivizuar fosforilon një kinazë të quajtur Raf (Rapidly Accelerated Fibrosarcoma) ose MAP Kinazë Kinazë Kinaza. Menjëherë pas aktivizimit të Raf, RAS çaktivizohet duke shkëmbyer GTP me GDP nëpërmjet faktorit GAP (fig.1-9).

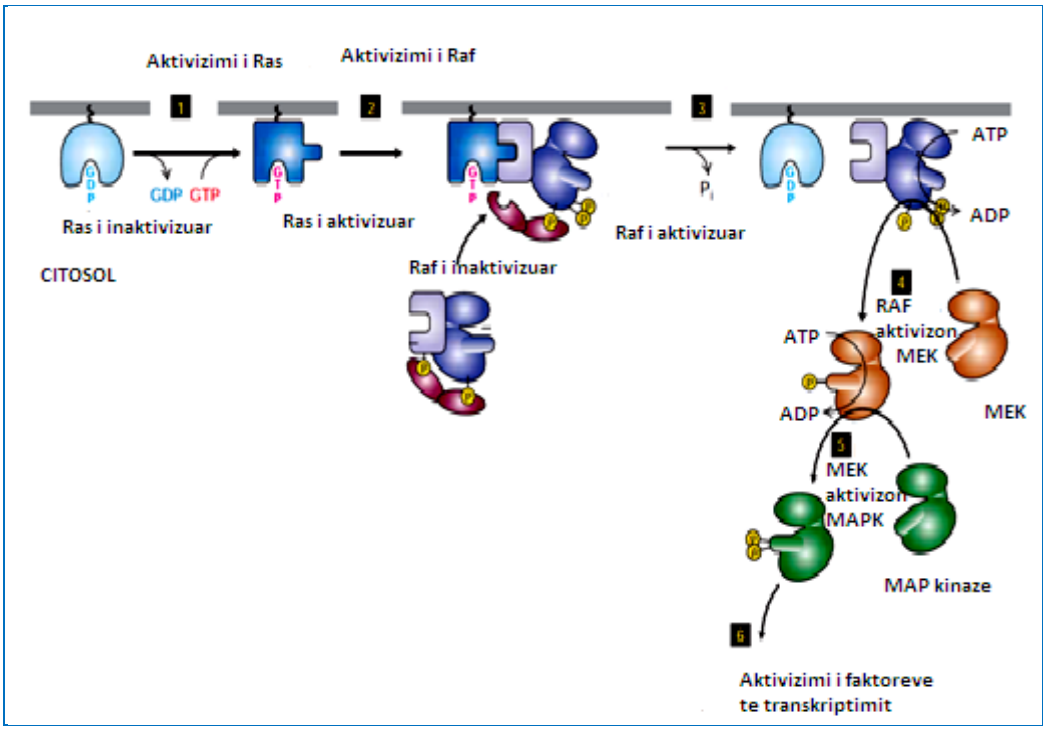


Figura 1-9. Kaskada e tejçimit MAP kinazë
(Burimi: http:// cc.scu.edu.cn)

Raf i aktivizuar fosforilon protein-kinazën MEK ose MAP Kinazë Kinazën e cila nga ana e saj aktivizon serin/treonin kinazën ERK (extracellular signal-regulated kinases) ose MAP Kinazën (MAPK). MAPK e aktivizuar translokohet nga citozoli në bërthamë ku mund të fosforilojë shumë substrate, p.sh faktorët e kopjimit (TF- Transcription Factor) c-fos, c-jun dhe c-myc, të cilët kopjojnë informacionin në mRNA që përkthehet në proteina të përfshira në shumëzimin qelizor (fig.1-9b).
Në qelizat ku proto-onkogjeni RAS është i mutuar, ky është gjithmonë aktiv dhe shumëzimi qelizor vazhdon edhe në mungesë të ligandit.

1.5.2.2 Rruga e tejçimit JAK-STAT

Familja e kinazave Janus (JAK- Just Another Kinase) përfaqëson tirozin-kinaza jo receptore, që marrin pjesë në tejçimin e sinjaleve të ndërmjetësuara nga citokinat që përfshihen në maturimin dhe diferencimin e qelizave hemopoietike dhe rregullimin e përgjigjes imune. Mutacionet e tyre që shkaktojnë shtimin ose pakësimin e shprehjes gjenike kontribuojnë në patogjenezën e disa defiçiteve imunitare dhe të disa sëmundjeve hematologjike (94, 111).

Familja JAK përbëhet nga katër kinaza: ***JAK1, JAK2, JAK3*** dhe ***TYK2*****.** Emërtimi Janus vjen nga veçoria e strukturës tretësore e këtyre proteinave që paraqet dy zona të ngjashme, sikurse zoti i romakëve dykrenar Giano (Janus). Njëra prej zonave ka funksion katalitik dhe tjetra funksion rregullues pseudokinazik.

Për të tejçuar sinjalin, proteinat JAK ndërveprojnë me receptorët monomere të citokinave. Lidhja e receptorit me ligandin (interleukinë, interferon, faktor rritjeje ose tjetër molekulë mesazhere), shkakton dimerizimin e receptorit i cili tërheq e bashkohet me një nga pjestarët e familjes JAK të pranishëm në anën citoplazmike të

receptorit që fosforilon tirozina specifike (zonën kinazike) të dimerit receptorial. Nga ana tjetër, JAK aktivizohet duke u autofosforiluar dhe fosforilon proteina të tjera (fig.1-10).

Tirozinat e fosforiluara të receptorit shërbejnë si vend ankorimi për faktorët inaktivë të kopjimit të familjes ***STAT*** ***(****Signal Transducers and Activators of Transcription****)***. Këto të fundit, aktivizohen duke u fosforiluar nga JAK dhe nga kinazat TYK2. Pas fosforilimit ato dimerizohen duke u lidhur me njëri tjetrin. Me t'u aktivizuar, STAT migron drejt bërthamës ku lidhet me ADN duke nisur kopjimin e gjeneve që marrin pjesë në rritjen, jetëgjatësinë dhe diferencimin qelizor. Me të përfunduar sinjalizimi, proteina të ndryshme frenuese të rrugës së citokinave (SOCS) dhe disa fosfataza të tirozinave ndërhyjnë duke heshtur rrugën e sinjalizimit JAK/STAT dhe kthimin e qelizës në gjendjen e parë.

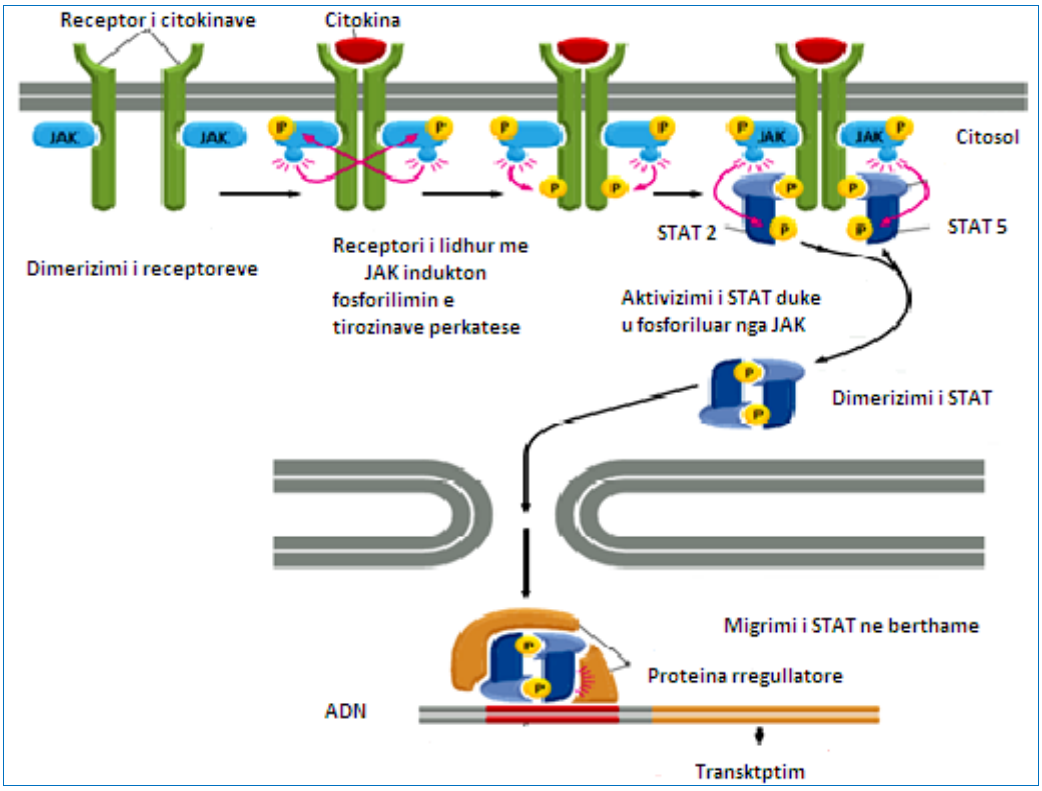


Figura 1-10. Rruga e tejçimit JAK-STAT. (Burimi: http:// cc.scu.edu.cn)

Proteinat STAT janë të përfshira në zhvillimin e sistemit imun dhe mbikqyerjen e neoplazive. Mutacionet e JAK3 çojnë në paksimin e shumëzimit të limfociteve T.

Fosforilimi i vazhdueshëm i faktorëve të kopjimit STAT (sidomos STAT5) është gjetur në linjat qelizore BCR-ABL pozitive (27, 57). Nën veprimin e stimujve normalë, proteinat JAK fosforilojnë, pra aktivizojnë faktorët STAT. Ndërsa në LMC, proteina kimerike BCR-ABL aktivizon STAT1 e STAT5 në mënyrë të drejtpërdrejtë pa nevojën e stimujve. Efekti kryesor i STAT5 në qelizat BCR-ABL është funksioni anti-apoptotik duke aktivizuar kopjimin e proteinës antiapoptotike Bcl-xl (B-cell lymphoma-extra large).

Roli i RAS dhe JAK/STAT në përgjigje ndaj faktorëve të rritjes shpjegon se si BCR-ABL i bën qelizat të pavarura nga faktorët e rritjes.

Disa të sëmurë me LMC i rezistojnë mjekimit me frenues të tirozinë kinazës. Sa më tepër zgjat sëmundja aq më tepër krijohet rezistenca ndaj mjekimit. Studimet e fundit eksperimentale po mundohen të gjejnë barna frenuese të rrugës JAK/STAT që ka një aktivitet të rritur në LMC. Në rrugën e sinjalizimit JAK/STAT, JAK2 aktivizon STAT5 që aktivizon gjenet e shumëzimit qelizor. Në qelizat leuçemike JAK2 është i çaktivizuar, prandaj për të luftuar LMC duhet eliminuar STAT5. Studimet e fundit tregojnë se përgjegjës të drejtpërdrejtë të rritjes së shumëzimit qelizor në LMC janë gjenet difektozë dhe jo inaktivizimi i JAK2. Aktivizimi i tyre formon një rrjetë të ndërlikuar që mban në jetë qelizat kanceroze. Mjekimet frenuese, si Imatinibi, janë në gjendje të bllokojnë pikat kyçe të këtij rrjeti dhe të shkaktojnë vdekjen e qelizave kanceroze. Por, disa mutacione mund të sfidojnë këta frenues duke i lejuar qelizat kanceroze të vazhdojnë invadimin e organizmit të njeriut. Gjatë ecurisë metabolike dhe rrugëve të sinjalizimit të tyre qelizat tumorale i nënshtrohen shumë përshtatjeve dhe bëhen të varura ndaj disa gjeneve. Ky fenomen është quajtur "vartësi jo onkogjene" (***NOA-*** *Non Oncogene Addiction*). Nëpërmjet frenimit të këtyre gjeneve përbrenda rrjetit të sinjalizimit, ky sistem mund të ndërpritet duke penguar rritjen e qelizave kanceroze.

Sot, po kryhen studime për të sqaruar në se STAT3 dhe STAT5, që janë të lidhur me transformimin kanceroz të shkaktuar nga BCR-ABL, të mund të përdoren në mjekimin e leuçemive. Të dy këta faktorë kopjimi janë të nevojshëm për BCR-ABL, por pas formimit të tij vetëm STAT5 është faktor kyç për mbijetesën dhe rritjen e qelizave leuçemike. Format qelizore të mutuara BCR-ABL që i rezistojnë barnave frenuese, varen nga STAT5. Ky faktor konsiderohet si "thembra e Akilit" në rrjetin e sinjalizimit BCR-ABL. Prandaj, frenimi i STAT5 mund të japë një mënyrë mjekimi të re për leuçeminë (84, 99, 115).

1.5.2.3 Rruga e tejçimit PI3 kinazë (PI3K)-AKT

BCR-ABL shkakton një aktivizim të vazhdueshëm të PI3K (fosfoinozitol 3 kinazës). Normalisht, kjo kinazë fosforilon PIP2 (fosfatidilinozitolin) dhe prodhon mesazherët e dytë për tejçimin e sinjalit tek PIP3 (fosfoinozitide). Për përfundimin e sinjalit ndërhyjnë disa fosfataza, në veçanti PTEN (phosphatase and tensin homolog), duke defosforiluar fosfoinozitidet. Mutacionet e PTEN rrisin rrezikun për disa tipe të kancerit. Ndër funksionet biologjike të PI3K rëndësi të veçantë ka rregullimi i AKT (proteinë kinazë B) që merr pjesë në mbijetesën dhe rritjen qelizore. AKT ka si substrakt proteinën me funksion pro-apoptotik Bad (the Bcl-2 associated death promoter). Normalisht, Bad jo i fosforiluar lidhet me proteinën anti-apoptotike Bcl-xl duke e frenuar këtë dhe duke nxitur vdekjen qelizore. Bad i fosforiluar inaktivizohet duke lejuar funksionimin e Bcl-xl (fig. 1-11).

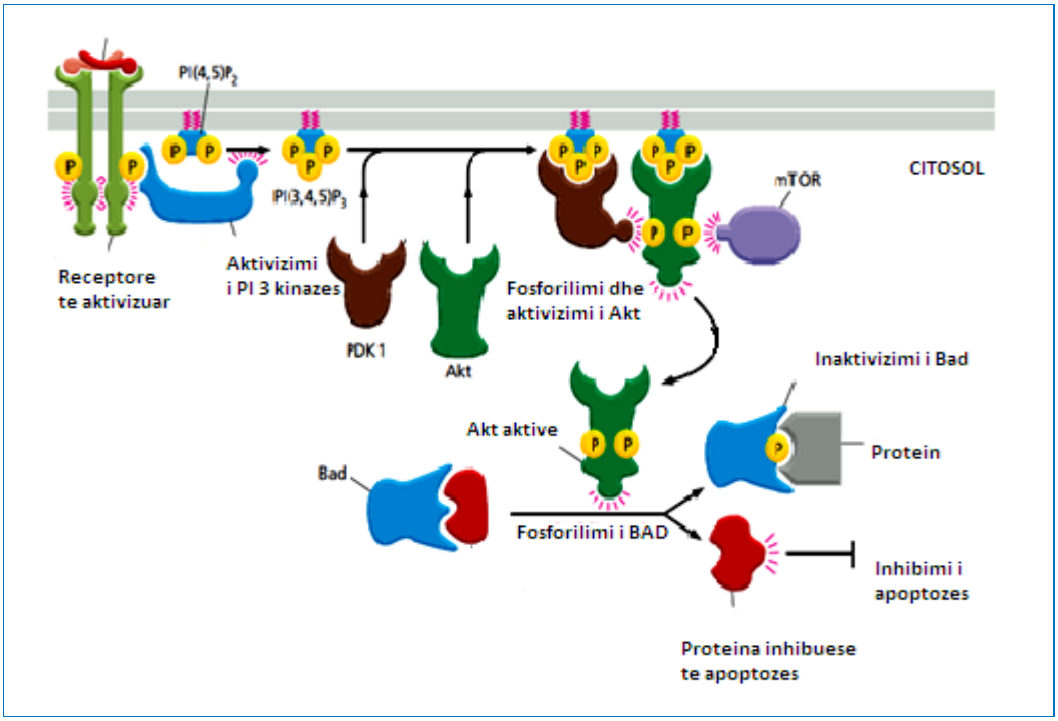


Figura 1-11. Rruga e tejçimit PI3 kinazë (PI3K)-AKT(*Burimi: www.clinicaloptions.com*)

1.5.3 Frenimi i apoptozës

Duhet theksuar së pari se shumë sinjale që rrjedhin nga BCR-ABL kanë veçori proliferative dhe anti-apoptotike.
Përveç AKT, edhe Raf-1 në rrugën e sinjalizimit të RAS fosforilon Bad e cila, e çaktivizuar, nuk mund të lidhet me proteinat anti-apoptotike si Bcl-xl. Kjo e fundit kopjohet në mënyrë aktive nga STAT5 në qelizat BCR-ABL pozitive (21, 36, 40, 47).

1.6 Anomali të tjera citogjenetike veç translokacionit bcr-abl në kariotipin e pacientëve

Riorganizimi BCR-ABL është konsideruar shkaku patogjenetik i LMC, por anomali të tjera citogjenetike dhe molekulare plotësuese janë përgjegjëse për progresionin e sëmundjes. Anomalitë e tjera kromozomike përveç kromozomit Philadelphia janë përcaktuar si evolucion klonal citogjenetik. Ky mund të jetë një shenjë e progresionit klinik të LMC dhe në këtë rast mund të reflektojë instabilitet gjenetik dhe një aktivitet të shtuar proliferativ. Frekuenca e evolucionit klonal rritet me progresionin e sëmundjes nga 30% në fazën e përshpejtimit në 80% në transformimin akut (65, 81).

Këto anomali mund të jenë prezente që në momentin e vendosjes së diagnozës në 7-8% të rasteve, por mund të shfaqen edhe gjatë progresionit të sëmundjes. Është vërejtur se 60-80 % e pacientëve me LMC në fazën e transformimit akut kanë evolucion klonal.

Tre janë anomalitë kromozomike më të shpeshta që vihen re në kuadrin e evolucionit klonal:

1. trizomia e kromozomit 8 prezente në 34% të rasteve
2. dyfishimi i kromozomit Philadelphia në 30% të rasteve
3. izokromozomi 17q në 20% të rasteve

Anomali te tjera kromozomike më pak të hasura janë:

1. trizomia e kromozomit 19 në 13% të rasteve
2. trizomia e kromozomit 17 në 5% të rasteve
3. trizomia e kromozomit 21 në 7%
4. monozomia e kromozomit 7 në 5%
5. humbja e kromozomit y në 8% të rasteve (121).

1.7 Diagnoza pozitive

Vendosja e diagnozës është e lehtë kur zmadhimi i shpretkës shoqërohet me leukocitozë të shprehur me mielocitozë, bazofili dhe trombocitozë. Megjithatë është i nevojshëm studimi i mielogramës dhe kariotipit për të përcaktuar prognozën, evolucionin dhe mjekimin. Në përgjithësi vënia e diagnozës është e vështirë në rastet me LMC atipike apo në fazën fillestare dhe duhet diferencuar nga reaksionet leukomoide apo sindromet e tjera mieloproliferative (107).

Përveç elementeve klinike dhe laboratorikë të sëmundjes bazë, studimi i kariotipit është baza e vendosjes së diagnozës. Evidentimi i riorganizimit BCR-ABL bëhet në mënyrë më të saktë me përdorimin e metodave të citogjenetikës molekulare, hibridizimit in situ fluoreshent [(FISH)- Fluorescent In Situ Hybridization] dhe metodave të biologjisë molekulare si polimerizimi i reaksionit zinxhir [(RT-PCR) - Real Time-Quantitative Polymerase Chain Reaction] (3, 30).

1.7.1 Kariotipi

Edhe pse riorganizimi BCR-ABL mbetet një pikë referimi shumë e rëndësishme për vënien e diagnozës së LMC, diagnoza përfundimtare mbështetet në ekzaminimet citogjenetike për identifikimin e anomalisë specifike gjenetike.

Në ekzaminimin citogjenetik zakonisht përdoret kariotipi me bandat G duke analizuar 25-30 metafaza (48, 60) (fig.1-12 & 1-13).

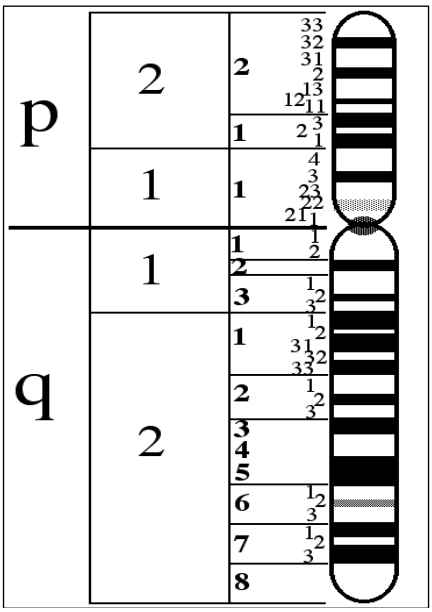


Figura 1-12. Pamje e një kromozomi të banduar me banda G
(*Burimi: Caryotypes*)

Analiza citogjenetike përcakton në 95% të pacientëve praninë e kromozomit Philadelphia që në momentin e vendosjes së diagnozës. Në pacientët e tjerë me LMC ku kromozomi Philadephia nuk evidentohet me metodën citogjenetike standarte (kariotipi), translokacioni identifikohet me përdorimin e teknikave të tjera të citogjenetikës molekulare ose biologjisë molekulare.
Ndjeshmëria e metodës citogjenetike standarte nuk është shumë e lartë për shkak të numrit të kufizuar të metafazave të studiuara por mbetet mënyra më e volitshme për monitorimin e përgjigjes citogjenetike gjatë trajtimit me Glivek dhe njëkohësisht për identifikimin e aberracioneve të tjera kromozomike përveç kromozomit Philadelfia, të cilat kanë një rol të rëndësishëm në prognozën e sëmundjes.

Figura 1-13. Kariotip 46, XY, t (9;22) (q34;q11)
(*Burimi: Hematopathology*)

1.7.2 Hibridizimi in situ (Fluorescent In Situ Hybridization – FISH)

Analiza e kariotipit nga leukocitet është konsideruar teknika standarte për monitorimin e përgjigjes në terapi, por kjo mund të plotësohet me përdorimin e teknikave të citogjenetikës molekulare si hibridizimi in situ fluoreshent (FISH). (108).

FISH-i është i bazuar kryesisht mbi të njëjtin parim si analiza Southern dhe Northern blot, një parim që shfrytëzon mundësinë e një vargu ADN-je për t'u lidhur në mënyrë komplementare me vargun tjetër.

Vargjet e ADN-së së sondës denatyrohen dhe vargu që shërben për hibridizim do të markohet me molekula fluoreshente të cilat nën mikroskopinë fluoreshente dedektojë praninë e riorganizimit gjenetik BCR-ABL (fig. 1-14).

Qelizat që do të hibridizohen me acidin nukleik të sondës mund të jenë në stadin e interfazës ose të metafazës.

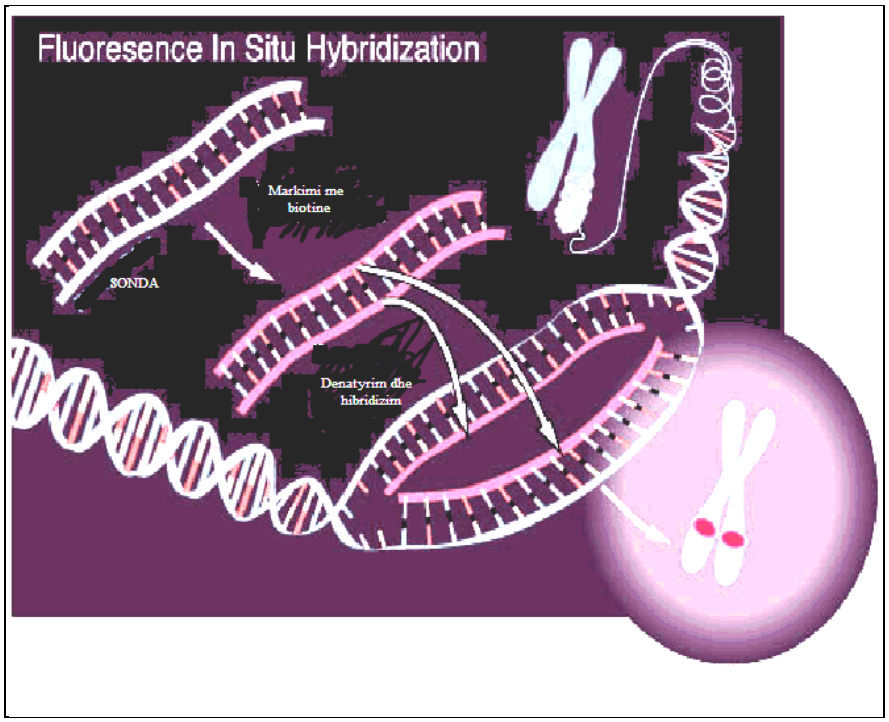


Figura 1-14. Paraqitja skematike e etapave të FISH-it
(Burimi:FISH (Fluorescent In Situ Hybridization) www.accessexcellence.org

FISH-i tradicional i njohur si dual-FISH është një teknikë që përdor kontrastin e dy ngjyrave fluoreshente të kuqe dhe të gjelbër për të përcaktuar pozicionin e gjenit respektiv; e kuqe për dedektimin e gjenit ABL në kromozomin 9 dhe e gjelbërt për gjenin BCR në kromozomin 22. Prania e riorganizimit gjenetik BCR-ABL evidentohet nga ngjyra e verdhë e formuar nga mbivendosja e ngjyrave kuqe-gjelbërt (120).

Fortësia e sinjalit fluoreshent në këtë metodë varet nga shumë faktorë si: efikasiteti shënues i sondave, tipi i sondave dhe tipi i ngjyruesit të përdorur.

FISH-i zbulon BCR-ABL në rreth 95% të pacientëve dhe përcakton gjithashtu edhe 5% të translokacioneve kriptike që nuk janë evidentuar me metodën e kariotipit (25, 90). Me anën e kësaj teknike mund të analizohen 200-500 bërthama në interfazë (39), (fig. 1-15).

Ndjeshmëria e lartë si edhe shpejtësia me të cilën metoda mund të performojë e kanë bërë FISH-in një teknikë citogjenetike që ka siguruar avancime te rëndësishme në kërkime shkencore dhe në vendosjen e diagnozave për tumore solide dhe sëmundje malinje hematologjike.

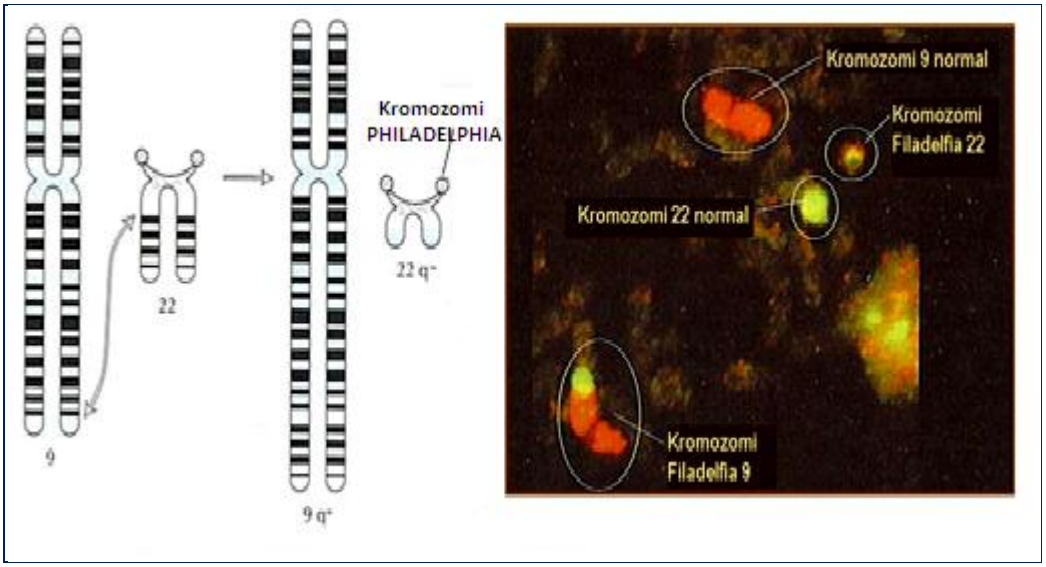


Figura 1-15. Pamja e kromozomeve të banduara dhe e FISH-it me sonda LSI BCR/ABL
(*Burimi: SBJ-25 Myeloproliferative Neoplasms crc*)

Disa nga përparësitë e kësaj teknike krahasuar me kariotipin janë:

- FISH-i është teknikë e thjeshtë dhe e shpejtë (si proçedurë laboratorike kërkon vetëm një ditë për t'u realizuar, krahasuar kjo me kariotipin që kryhet për një javë).
- Kjo teknikë përcakton në mënyrë shumë të saktë riorganizimin klasik BCR-ABL që në kohën e vendosjes së diagnozës (116).
- Vlerëson në mënyrë të plotë (veçanërisht në kohën e vendosjes së diagnozës) përqindjen e qelizave normale kundrejt atyre me proliferim të ndryshuar dhe kjo është e rëndësishme për vendosjen e strategjisë terapeutike.
- Është më e ndjeshme në përcaktimin e mbetjeve minimale të riorganizimit gjenetik BCR-ABL pas terapisë së përdorur ose transplatit alogjenik (92).

1.7.3 Real Time - quantitative Polymerase Chain Reaction (RT- qPCR)

PCR-ja është një teknikë laboratorike e përdorur në biologjinë molekulare për amplifikimin e një sekuence të shkurtër të ADN-së në mijëra dhe miliona kopje dhe është e ngjashme me proçesin e dyfishimit të përdorur nga qeliza për të kopjuar ADN e saj.

E aplikuar në 1983 nga Kary Mullis dhe e vlerësuar me çmimin Nobel në kimi, PCR-ja tani është bërë një teknikë e zakonshme dhe e domosdoshme e përdorur në mjekësi dhe laboratorët e kërkimeve biologjike në një numër të madh aplikimesh duke përcaktuar saktësisht cilësinë dhe sasinë e ADN-së së ekstraktuar (12). Nëpërmjet PCR-së vendoset një diagnozë e hershme në sëmundjet malinje si leukozat dhe limfomat. Ajo ka një përdorim të gjërë në kërkimin e kancerit duke u përdorur si rutinë në laboratorët diagnostikues dhe ka revolucionarizuar diagnozën dhe analizën molekulare të sëmundjeve gjenetike. Ajo vepron direkt në gjenomë duke identifikuar translokacionin specific BCR-ABL në qelizat malinje të të sëmurëve me LMC. Ndjeshmëria e saj është 10.000 herë më e lartë se metodat e tjera, pra ajo identifikon edhe kur në kariotipin e pacientit mungon kromozomi Ph+.

Primerat (sekuenca të shkurtra të ADN-së të cilat duhen për fillimin e sintezës së vargut) që përmbajnë sekuenca komplementare me sekuencat target dhe ADN-polimeraza (Taq-polimeraza e izoluar nga bakteri *Thermus aquaticus*) janë komponentët kryesorë për të mundësuar një amplifikim të përsëritur selektiv. ADN-polimeraza formon vargun e ri të ADN-së duke renditur nukleotidet sipas modelit të njërit prej vargjeve të ADN-së në bazë të parimit të komplementaritetit. Vargu i ri i ADN-së së formuar përdoret si model për dyfishim duke vënë në lëvizje një reaksion zinxhir ku ky varg amplifikohet në mënyrë eksponenciale.

Kjo metodë mbështetet në cikle termale të njëpasnjëshme të uljes dhe rritjes së temperaturës, 25-35 cikle në instrumentin Thermal Cycler (64). Në fazën e parë dy vargjet e ADN-së ndahen në mënyrë fizike në një temperaturë të lartë në një proçes të quajtur denatyrimi i ADN-së. Në fazën e dytë temperatura ulet dhe të dy vargjet e ADN-së shërbejnë si model për ADN polimerazën e cila në një fazë të tretë lejon shtimin e nukleotideve për të prodhuar kopjet e secilit varg të ADN-së. PCR amplifikon fragmentet e ADN-së ndërmjet 0,1 dhe 10.000 çifte bazash dhe cilësohet si teknika më e shpejtë, më pak e kushtueshme, më e ndjeshme dhe pa rrezik ndaj pacientit krahasuar me çdo metodë tjetër për analizën e acideve nukleike.

Ky proçes mund të dështojë për shkak të pranisë së inhibitorëve, shkallës së lartë të degradimit të ADN-së, sasisë së pamjaftueshme të ADN-së ose kombinimit të të gjithë faktorëve së bashku.

1.8 Terapia LMC

Terapitë e para të përdorura para vitit 1960 ishin splenektomia në një fazë të hershme dhe radioterapia në shpretkë. Raportimet e para për përdorimin e ***busulfanit*** dhe ***hydroxyuresë*** si terapi janë dhënë në fund të vitit 1960 nga Haut dhe Galton (46). Hydroksyurea preferohet edhe si mjekim fillestar kur i sëmuri është planifikuar për transplant alogjenik të palcës së kuqe të kockave.

Në vitin 1983 Talpaz M, publikoi për herë të parë përdorimin me efikasitet të interferon-α në praktikën klinike për të sëmurët me leukozë (119).

Interferon-α frenon rritjen e qelizave mieloide dhe të pararendësve të LMC-së. Nga të gjitha studimet e bëra rezulton se interferoni-α ka shumë përparësi në krahasim me mjekimet e tjera konvencionale si psh: 70-80% e të sëmurëve fitojnë përgjigje hematologjike komplete ndërsa 10-20% e të sëmurëve arrijnë një përgjigje madhore citogjenetike (6, 59). Me anën e këtij mjekimi zgjatet mesatarja logaritmike e jetëgjatësisë si edhe vonohet shfaqja e transformimit akut.

Po gjatë kësaj dekade një vend të rëndësishëm në mjekimin e LMC zuri edhe ***transplanti alogjenik*** i palcës së kuqe të kockave sidomos në të sëmurët me moshë të re, në fazën kronike të hershme.

Në vitin 1999 në mjekimin terapeutik të LMC, një vend të rëndësishëm mori ***medikamenti Glivek*** (*STI 571, IMATINIB MESYLATE*), inhibitor i tirozin-kinazës. Gliveku vepron direkt mbi gjenin BCR-ABL, jep përgjigje citogjenetike komplete në një numër më të madh pacientësh dhe ka shumë më pak efekte anësore se interferoni.

Të gjithë pacientët të cilët kanë dështuar gjatë trajtimit me Glivek në ditët e sotme i nënshtrohen trajtimit me Nilotinib me emrin komercial Tasigna, i cili jep rezultate më të shpejta dhe më të mira hematologjike dhe citogjenetike se të gjithë medikamentet e përdorura deri më sot.

Nilotinibi është një inhibitor i tirozin-kinazës i gjeneratës së dytë i cili është miratuar në USA dhe EU në korrik të vitit 2006 për përdorim në pacientët e sëmurë me leukozë mieloide kronike të cilët nga trajtimi me Glivek nuk arrijnë përgjigje(89):

- hematologjike pas tre muajve trajtim
- citogjenetike minore ose minimale pas 9 muajve trajtim
- citogjenetike të pjesshme pas 12 muajve trajtim
- citogjenetike të plotë pas 24 muajve

Nilotinibi përdoret edhe tek pacientët të cilët nën veprimin e Glivekut kanë toksicitet të plotë të mëlçisë.

1.8.1 Glivek

Terapia e LMC është revolucionarizuar në fillim të viteve 1999 nga futja e medikamentit Glivek në praktikën klinike, i cili është një inhibitor selektiv i tirozin-kinazës së implikuar në onkogjenezë. Ky medikament është aprovuar nga "Food and Drug Administration" (FDA) në vitin 2001. Ai është përdorur në trajtimin e disa sëmundjeve kancerogjene sidomos në leukozën mieloide kronike për trajtimin e qelizave pozitive për kromozomin Philadelphia.

Rezultatet e deritanishme kanë treguar një epërsi të dukshme në krahasim me përdorimin e interferon alfës. Gliveku është një medikament më i tolerueshëm dhe jep më pak komplikacione tek i sëmuri. Si të gjithë inhibitorët e tjerë të tirozin kinazave Gliveku vepron duke parandaluar veprimin e enzimës tirozin-kinazë. (17, 18, 80). Meqënëse enzima BCR-ABL ekziston vetëm në qelizat kancerogjene dhe jo në qelizat e shëndosha, Gliveku vepron si formë e terapisë së drejtuar duke eleminuar vetëm qelizat kancerogjene. Kjo është një përparësi e tij në lidhje me citostatikët e tjerë tradicionale që e kanë humbur specificitetin në vrasjen qelizore.

1.8.1.1 Struktura

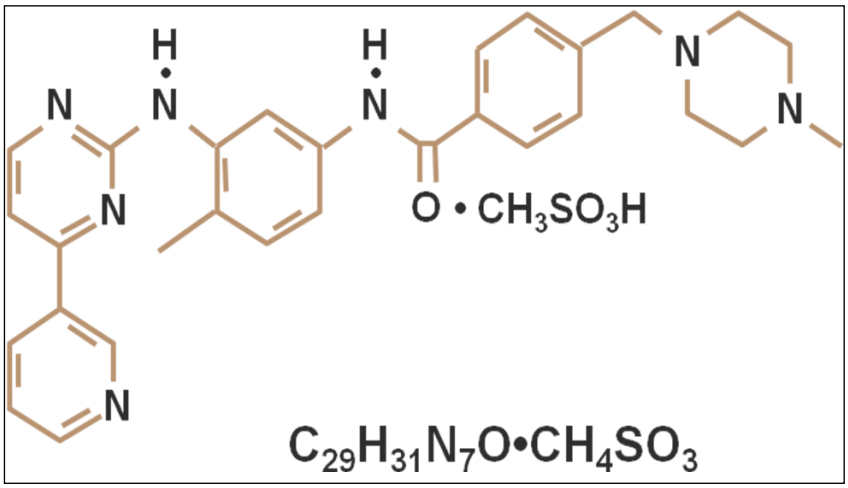
Studimet e kristalografisë kanë demonstruar se Gliveku lidhet në formën inaktive me së paku 4 tirozin- kinaza: ABL (p 160), SCF (stem cell factor- proteinë bio-aktive e destinuar për përdorim në aplikimet e kulturave qelizore) të quajtura c-kit, PDGF α dhe PDGF β (platelet derived growth factor- faktori i rritjes së trombociteve). Ai lidhet në mënyrë specifike me renditjet ABL të proteinave hibride BCR-ABL (p190, p210, p230) në formën e tyre inaktive duke penguar bashkëveprimin me ATP-në. Gliveku ka aftësinë të autofosforilojë BCR-ABL, aktivitet ky thelbësor për të penguar proliferimin dhe për të induktuar apoptozën qelizore (24, 128).

Ai indukton një përgjigje hematologjike të shpejtë dhe komplekse në gati të gjithë pacientët me LMC Ph+ që rezultojnë të jenë në fazën kronike, në gati 50% të atyre që janë në fazën e akselerimit dhe në një pjesë të vogël të atyre që janë në fazën blastike ose që kanë LAL Ph+. Përgjigja citogjenetike më e lartë është arritur në më shumë se 50% të pacientëve që kanë filluar trajtimin në fazën kronike të vonë dhe në më shumë se 80% të pacientëve të trajtuar dhe që kanë diagnozë LM në fazën kronike. Për këtë arsye nga viti 2002 Gliveku është regjistruar si terapia më e mirë për LMC.

Pavarësisht rasteve me përgjigje pozitive hematologjike dhe citogjenetike ka edhe raste të rezistencës ose të periudhës refraktare.

Gliveku sipas "Internacional Union of Pure and Applied Chemistry" (IUPAC) është kimikisht i dizenjuar si: 4-[(4-metil-1-piperazine) metil]- N -[4 metil-3-[[4-(3-

piridinil)-2 pirimidin] amino]- fenil] metan sulfonat benzamid dhe formula strukturore e tij është si më poshtë (fig. 1-16).



Figua 1-16. Struktura kimike e Glivekut
(*Burimi: Gleevec)*

Në dizenjimin e Glivekut shumë e rëndësishme është struktura e një molekule fillestare e njohur me emrin pirimidina. Ky komponim është testuar dhe është modifikuar deri në prodhimin e Glivekut.

Formula molekulare është $C_{29}H_{31}N_7O.CH_4SO_3$ dhe masa molekulare është 589,7g/mol. Është shumë i tretshëm në ujë dhe në tretësirat ujore acide ≤ 5,5 pH dhe është pak i tretshëm deri në i patretshëm në tretësitat neutrale dhe alkaline.
Ruajtja e tij bëhet në temperaturë deri në 25º C ose 77º F.

1.8.1.2 Mekanizmi i veprimit

Gliveku është një derivat i 2-fenil amino pirimidinës, që funksionon si një inhibitor specifik i një numri enzimash tirozin kinazike. Ai lidhet në vendin aktiv të tirozin kinazave dhe çon në një rënie të aktivitetit enzimatik të tyre. Në trupin tonë ekzistojnë një numër i madh i tirozin-kinazave përfshirë këtu edhe receptorët e insulinës.
Vendet aktive të tirozin kinazave kanë vende lidhje për ATP-në. Aktiviteti enzimatik i katalizuar nga tirozin kinaza është transferimi i një grupi fosfat nga ATP tek mbetjet e tirozinës në substrakt, një proçes i njohur si fosforilimi i tirozinës. Gliveku vepron duke mbyllur vendet lidhëse për ATP tek siti BCR-ABL duke e lënë atë një konformacion të inhibuar, dhe duke inhibuar aktivitetin enzimatik të proteinës. Mbetjet e tirozinës në substrakt nuk fosforilohen dhe sinjali nuk tejçohet tek efektori duke ndikuar në inhibimin e proliferimit qelizor dhe duke induktuar apoptozën e këtyre linjave qelizore (17, 34) (fig. 17).
Kjo shpjegon faktin pse shumë mutacione të BCR-ABL shkaktojnë rezistencë ndaj Glivekut duke e bërë aktiv këtë konformacion.

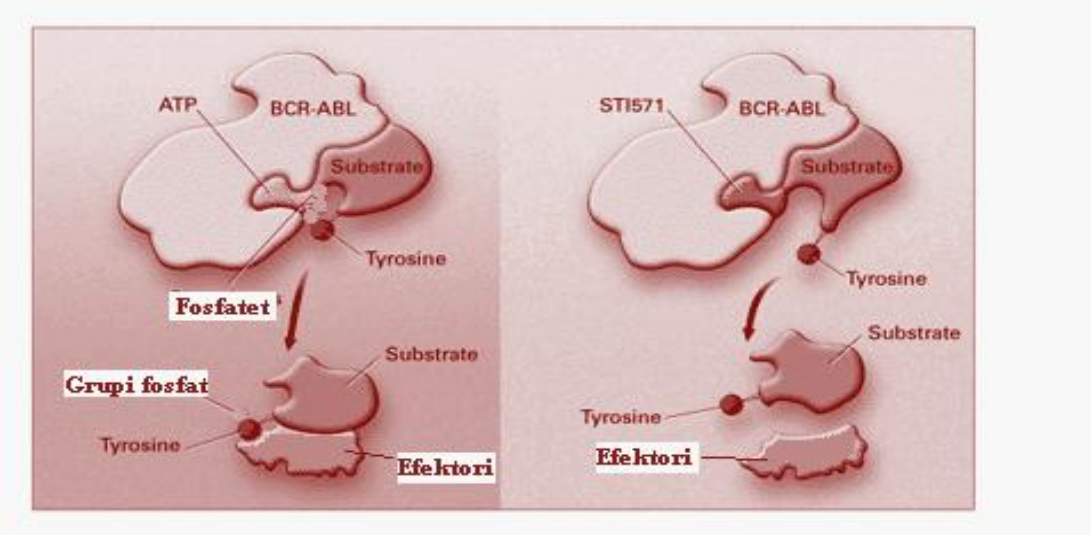


Figura 1-17. Mekanizmi i veprimit të Glivek
(*Burimi: Molecularly targeted treatment of chronic myeloid leukemia: beyond the imatinib era)*

1.8.1.3 Farmakokinetika

Gliveku absorbohet mirë pas administrimit oral dhe arrin përqëndrimin maksimal brenda 2-4 orëve pas marrjes së dozës. Mesatarja për vlefshmërinë biologjike të kapsulave është 98%. Gjysëm jeta është 18 orë për Glivekun dhe 40 orë për metabolitin kryesor aktiv të tij që është N-dimetil piperazina.

Metabolizimi i tij ndodh në mëlçi dhe është i ndërmjetësuar nga disa izoenzima të sistemit të citokromit P450 duke përfshirë ***CYP3A4***, dhe në një masë më të vogël ***CYP1A2, CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19***. Pjesa më e madhe e tyre eleminohen me lëngun biliar dhe feçe, vetëm një pjesë e vogël e medikamentit del me urinën. Rreth 80% eleminohet si metabolit (68% me feçe dhe 12 % me urinë) dhe pjesa tjetër 20% si medikament i pandryshuar. Ky eleminim ndodh brenda 7 ditëve që nga koha e marrjes.

1.8.1.4 Efektet anësore të Glivekut

Efektet anësore që jep Gliveku mund të jenë:

1. hematologjike si: neutropenia, trombocitopenia dhe anemia. Ky toksicitet mënjanohet me reduktimin e dozës ose me ndërprerjen e trajtimit me Glivek.
2. që nuk lidhen me toksitetin hematologjik përfshijnë: dobësi të përgjithshme, diarre, dhimbje koke, dhimbje barku, turbullime të pamjes, skuqje, tharje lëkure, rezistencë të ulur ndaj infeksioneve, gjakderdhje, humbje oreksi, rënie në peshë, dhe edema.

1.8.1.5 Ndërveprimet me ushqimet

Merret gjithmonë pas ushqimit për të reduktuar irritimin gastrik dhe shoqërohet me një gotë ujë. Gjatë mjekimit duhen reduktur ushqimet e pasura me yndyrna sepse vonohet absorbimi i medikamentit.

1.8.1.6 Ndërveprimet me medikamente të tjera

Duhet treguar kujdes kur administrohet Glivek me inhibitorë të familjes CYP3A4 (ketokonazole, itrakonazole, eritromicin, klaritromicin) sepse këto ulin metabolizmin e Glivekut dhe rrisin përqëndrimin e tij në plazmën e gjakut, ndërsa substancat që janë

induktuese të aktivitetit të CYP3A4 (deksametazon, phenytoin, karbamazepinë, rimfamicin, phenobarbital) rrisin metabolizmin dhe ulin përqëndrimin në plazëm të Glivekut.

1.8.1.7 Rezistenca ndaj Glivekut

Vlerësimet e përgjigjeve terapeutike të Glivekut në pacientët me LMC janë bazuar në përgjigjet hematologjike, citogjenetike dhe molekulare. Pacientët që dështojnë për të arritur këto përgjigje në kohë kronologjike të përcaktuar janë rezistentët fillestarë të terapisë, ndërsa ata që humbin përgjigjet gjatë regresionit të sëmundjes janë pacientë me rezistencë të fituar e cila mund të përcaktohet nga:

- progresioni i sëmundjes në fazat e tjera
- humbja e një përgjigjeje hematologjike ose citogjenetike të qëndrueshme
- rritja 5-10 herë e numrit të riorganizimit BCR-ABL.

Rezistentët fillestarë të terapisë janë rreth 5% e të sëmurëve me LMC dhe kjo rezistencë mund të përcaktohet në nivel hematologjik, citogjenetik ose molekular. Në përgjithsi pacientët rezistentë ndaj Glivekut mund të kenë rezistencë të varur ose jo nga mekanizmat e BCR-ABL.

Mekanizmat e varur nga BCR-ABL përfshijnë shprehjen ose amplifikimin e riorganizimit gjenetik BCR-ABL si edhe mutacionet pikëzore brenda domenit BCR-ABL kinazik që interferojnë me lidhjet e Glivekut, ndërsa mekanizmat e pavarur nga BCR-ABL përfshijnë faktorët që influencojnë në përqëndrimin e Glivekut në brendësi të qelizës si p.sh ndërveprimet me medikamente të tjera (19, 50, 55).

Rezistenca ndaj Glivekut lidhet me paaftësinë e medikamentit për të shkaktuar një normalizim të qëndrueshëm të ekzaminimit hemokromocitometrik, eleminim të metafazave Ph+ ose reduktim sinjifikativ të sasisë së hibridëve të kopjuar. Për pacientët në këto kushte mundësitë janë:

1. transplant alogjenik, nëse është i disponueshëm një donator dhe nëse transplanti nuk kundraindikohet
2. Glivek me doza më të larta (600-800 mg/ditë)
3. përdorimi i inhibitorëve të tirozin kinazës së gjeneratës së dytë (Nilotinib ose Dasatinib)
4. terapia eksperimentale

Rritja e dozës së Glivekut ka treguar se disa raste me rezistencë primare përmirësohen por përgjigja është shumë e shkurtër në kohë.

Medikamentet e gjeneratës së dytë ofrojnë një mundësi potenciale dhe një sukses të madh në pacientët rezistentë ndaj Glivekut duke përmirësuar normat e përgjigjes dhe rritur në mënyrë potenciale mbijetesën.

1.9 Teknikat e monitorimit dhe përcaktimi i kritereve të përgjigjes.

1.9.1 Përgjigjet hematologjike

Përgjigja hematologjike e arritur pas tre muajve trajtim me Glivek mund të jetë e plotë ose e pjesshme (11).

Kjo përgjigje është e plotë (PHP) kur normalizohet numri i qelizave të gjakut (numri i leukociteve < 10 x 10^9/ L, numri i trombociteve < 450 x 10^9/ L, numri i bazofileve < 5%) dhe kur shpretka ka arritur përmasat normale nqs ka qënë e zmadhuar.
Kur kemi normalizim të numrit të leukociteve < 10 x 10^9/L si edhe madhësi të shpretkës dhe numër të trombociteve >/=50% të reduktuara themi se pacienti ka arritur përgjigje hematologjike të pjesshme (PHPj).

1.9.2 Përgjigjet citogjenetike

Pasi pacienti ka arritur përgjigjen hematologjike të plotë diskutohet për arritjen e përgjigjes citogjenetike. Kjo përgjigje arrihet pas disa muajve trajtim me Glivek dhe bazuar në rezultate të citogjenetikës konvencionale është e përcaktuar si më poshtë: (38, 67, 104).

- përgjigje citogjenetike e plotë (PCP) 0% metafaza Ph+
- përgjigje citogjenetike e pjesshme (PCPj) 1-35% metafaza Ph+
- përgjigje citogjenetike madhore (PCM = PCP+PCPj) 0-35% metafaza Ph+
- përgjigje citogjenetike minore (PCMinore) 36-65% metafaza Ph+
- përgjigje citogjenetike minimale (PCMinimale) 66-95% metafaza Ph+
- pa përgjigje (PP) > 95% metafaza Ph+

1.9.3 Përgjigjet citogjenetike molekulare

Përgjigja citogjenetike molekulare bazohet në rezultatet e nxjerra nga teknika FISH dhe mund të jetë:

- përgjigje citogjenetike molekulare e plotë (PMP) e cila arrihet kur asnjë riorganizim BCR-ABL nuk është gjetur në gjakun e pacientit dhe mund të diskutohet për arritjen e saj vetëm kur pacienti ka arritur përgjigje citogjenetike komplete ose
- përgjigje citogjenetike molekulare madhore (PMM) që do të thotë se riorganizimi BCR-ABL gjendet në gjakun e pacientit por në nivel të ulët (0,1% - 0,9%) (85). Kjo përgjigje konsiderohet nga mjekët si e shkëlqyer për pacientët me LMC.

1.9.4 Përgjigjet molekulare

Përgjigja molekulare bazohet në rezultatet e nxjerra nga teknika RT-PCR dhe mund të jetë:

- përgjigje molekulare e plotë (PMP), kur BCR-ABL nuk është gjetur në gjakun e pacientit dhe mund të diskutohet për arritjen e saj vetëm kur pacienti ka arritur përgjigje citogjenetike komplete të zbuluar nga citogjenetika standarte ose
- përgjigje molekulare madhore (PMM), që do të thotë se riorganizimi BCR-ABL gjendet në gjakun e pacientit por në nivel të ulët (< 0,1% ose sipas shkallës internacionale < log 3).

Pacientët me përqëndrimin e BCR-ABL > 0,1 janë të vlerësuar praktikisht pa përgjigje molekulare dhe nuk vazhdojnë trajtimin me Glivek (11).

1.9.5 Përgjigja optimale dhe suboptimale

Përcaktimi i përgjigjes optimale dhe suboptimale është gjithashtu i vlefshëm për monitorimin e pacientëve me LMC. Vlerat e këtyre përgjigjeve janë të ndryshme në kohë të ndryshme të trajtimit të pacientit dhe vlerësohen si shpjegohet tek tabela më poshtë (11) (tabela 1-1):

Në momentin e vendosjes së diagnozës tek asnjë prej pacientëve nuk mund të flitet për përgjigje optimale dhe suboptimale.

Pacientët kanë arritur përgjigje optimale kur në muajin e 12 të trajtimit kanë arritur përgjigje citogjenetike të plotë, ndërsa në muajin 24 përgjigje molekulare të plotë ose madhore.

Pacientët kanë arritur përgjigje suboptimale kur në muajin e 12 kanë arritur përgjigje citogjenetike të pjesshme dhe në muajin 24 janë pa përgjigje molekulare.

Tabela 1-1. Monitorimi i përgjigjeve optimale dhe suboptimale tek të sëmurët me LMC gjatë dy viteve trajtim me Glivek

Periudha kohore e llogaritjes së përgjigjes	Përgjigje Optimale	Përgjigje Suboptimale
Në momentin e vendosjes së Diagnozës	Nuk aplikohet	Nuk aplikohet
Muaji 12	PCP	Ph+ 1-35%
Muaji 24	PMP+PMM	< PM

1.10 Progresioni i sëmundjes

Progresioni i sëmundjes është përcaktuar nga prania e të paktën një prej këtyre kritereve vijuese (10):

- 15% të blasteve në gjakun periferik
- trombocitopenia persistente PLT < 100000/ µl gjak
- ≥ 20% bazofile në gjakun periferik
- prania e vatrave të mëdha të qelizave blastike në biopsinë e kockës.

1.11 Dështimi i terapisë

Dështimi i terapisë është përcaktuar me marrëveshje nga "European Leukemia Net" (ELN) nga prania e një prej kritereve te mëposhtme (10):

- mungesa e përgjigjes hematologjike për 3 muaj
- mungesa e përgjigjes hematologjike të plotë për 9 muaj trajtim
- mungesa e përgjigjeve citogjenetike për 9 muaj
- mungesa e përgjigjes citogjenetike të pjesshme për 12 muaj
- mungesa e përgjigjes citogjenetike të plotë për 24 muaj
- progresioni ose shfaqja e mutacioneve të aftë për të dhënë rezistencën ndaj Glivekut.

II. MATERIALI DHE METODAT

2.1 Të dhëna të përgjithshme për studimin

Është marrë në analizë një kampion i përbërë nga 70 pacientë (29 femra dhe 41 meshkuj) të cilët vijnë nga rrethe të ndryshme të Shqipërisë. Këta pacientë janë diagnostikuar për herë të parë në Shërbimin e Hematologjisë në QSU ¨Nënë Tereza¨ Tiranë me Leukozë Mieloide Kronike gjatë periudhës Prill 2011- Dhjetor 2011. Të sëmurët që kanë qënë objekt i këtij studimi janë të moshave 18-72 vjeç dhe janë ndjekur për periudhën Prill 2011- Dhjetor 2013 sipas protokolleve terapeutike të propozuara nga ”Italian Group For Hematologic Malignancies of the Adult - Chronic Myeloid Leukemia - Working Party” (GINEMA-CML-WP).

Asnjë nga pacientët nuk ka qënë i shtruar para vënies së diagnozës në Shërbimin e Hematologjisë dhe nuk kanë marrë mjekim më parë. Pacientët janë paraqitur në spital në mënyrë ambulatore vetëm në ditët e caktuara nga mjekët për kryerjen e ekzaminimeve përkatëse. Që në momentin e vendosjes së diagnozës secili pacient ka filluar mjekimin me Glivek një herë në ditë, katër tableta 100 mg në mëngjes.

Trajtimi i pacientëve dhe studimi i protokolleve janë bërë në marrëveshje me praktikat laboratorike të miratuara nga deklarata e Helsinkit dhe Gliveku është siguruar në formë ndihme nga Novartis Pharma.

Teknika e kariotipit (analiza kromozomike me banda G) është kryer në Shërbimin e Gjenetikës Mjekësore në Qëndrën Spitalore Universitare “Nënë Tereza” Tiranë, si qëndra e vetme e këtij lloji në Shqipëri, teknika e hibridizimit in situ FISH është kryer në bashkëpunim me laboratorin mjekësor “Intermedica” në Athinë/ Greqi ndërsa konfirmimi me teknikën PCR është kryer në laboratorin mjekësor “Labdia” në Vjenë/ Austri.

Vitin e fundit në Shërbimin e Hematologjisë konfirmimi i nivelit të riorganizimit gjenetik BCR-ABL/ABL vlerësohet nga teknika e Real Time- Polymerase Chain Reaction (RT-PCR).

Ecuria në periudhë kohore e kryerjes së proçedurave laboratorike të mësipërme është paraqitur në tabelën 2-1.

Tabela 2-1. Periudhat kohore të monitorimit të pacientëve me LMC me kariotip, FISH dhe PCR

Periudha kohore kur është kryer analiza	Në momentin e vendosjes së diagnozës	Muaji 12	Muaji 24
Lloji i analizës së kryer	Kariotip	Kariotip + FISH + konfirmim me PCR	Kariotip

Ekzaminimet e citogjenetikës standarte dhe citogjenetikës molekulare janë kryer në leukocite, si qeliza që kanë aftësinë për t’u rritur dhe për t’u ndarë me shpejtësi në kulturat qelizore in-vitro.

2.2 Plotësimi i skedës dhe konsensusit të informimit

Çdo pacient i ardhur në Shërbimin e Gjenetikës Mjekësore është i pajisur me një fletë kërkesë për kryerjen e analizave gjenetike të dhëna nga mjeku hematolog i Shërbimit te Hematologjisë në QSUT.

FLETE KERKESE PER ANALIZE GJENETIKE

EMRI MBIEMRI_____

DATA E LINDJES_____ VENDLINDJA_____

ADRESA_____TELEFONI_____

INSTITUCIONI DERGUES_____

MJEKU DERGUES_____FIRMA_____

DATA E DERGIMIT_____

MATERIALI PER T'U ANALIZUAR:

Gjak periferik_____

ANALIZA E KERKUAR

Kariotip_____FISH_____DNA_____

DIAGNOZA GJENETIKE PER LMC (Leukoze Mieloide Kronike)_____

DATA_____ FIRMA E KERKUESIT_____

EMRI MBIEMRI I MARRESIT_____FIRMA_____

Për çdo pacient të paraqitur në Shërbimin e Hematologjisë dhe të monitoruar me ekzaminime citogjenetike në Shërbimin e Gjenetikës Mjekësore është hartuar një skedë specifike dhe fleta e konsensusit për kryerjen e ekzaminimeve citogjenetike.

1. Skeda përfshin të dhënat personale, anamnestike, hematologjike, parametrat klinik për sistemet prognostike Sokal dhe EUTOS, të dhëna të citogjenetikës konvencionale dhe molekulare.

SKEDE SPECIFIKE PER TE SEMURET ME LMC

- Të dhënat personale

a- Emri, Mbiemri _____
b- Mosha _____ Gjinia F ___ M___
c- Vendi i lindjes _____

- Anamneza personale dhe familjare

a- Shenjat e shfaqjes së sëmundjes_____
b- Koha e shfaqjes së sëmundjes _____
c- Mjekimi që kanë marrë _____
d- Familjarë të tjerë me LMC _____

- Parametrat klinik të vlefshme për sistemet prognostike Sokal dhe EUTOS

a- Blaste (%)_____
b- Bazofile (%)_____
c- Shpretka (cm)_____

- Të dhënat për arritjen e përgjigjes hematologjike

	Muaji 1	Muaji 2	Muaji 3	Muaji 6
Leukocite x 10^9/L				
Trombocite x 10^9/L				

- Të dhënat për arritjen e përgjigjes citogjenetike

Përgjigja citogjenetike (% e metafazave Ph+)	Koha e vendosjes së Diagnozës	Muaji 12	Muaji 24
E plotë 0%			
Pjesshme 1-35 %			
Madhore 0-35 %			
Minore 36-65%			
Minimale 66%-95%			
Pa Përgjigje > 95%			

- Të dhënat për arritjen e përgjigjes citogjenetike molekulare dhe molekulare

Pergjigja citogjenetike molekulare	FISH	_____ %BCR-ABL
Pergjigja molekulare	RT-PCR	_____ % BCR-ABL/ABL

2. Konsensusi i informimit është nënshkruar nga të sëmurët ose të afërmit e tyre përpara kryerjes së ekzaminimit citogjenetik. Në të përshkruhet indi që do të ekzaminohet (gjaku periferik), sasia e gjakut që do të merret, ekzaminimet që do të kryhen, koha e zgjatjes së ekzaminimeve dhe mundësia e përsëritjes së tyre.

KONSENSUS PER MARRJEN E GJAKUT PERIFERIK PER KRYERJEN E KARIOTIPIT, FISH-IT dhe PCR-SE

Informacion

Gjaku periferik për kryerjen e kariotipit, FISH-it dhe PCR-së merret për pacientët me LMC (Leukozë Mieloide Kronike) pasi ata kanë kryer ekzaminimet klinike dhe hematologjike në Shërbimin e Hematologjisë, QSUT.

-Proçedura e kariotipit

Proçedura e kariotipit kryhet në momentin e vendosjes së diagnozës, në fundin e vitit të parë dhe të dytë të mjekimit me Glivek.

Gjaku merret nga vena kubitale e krahut nëpërmjet një shiringe të thjeshtë të heparinizur dhe nuk paraqet asnjë rrezik.

Gjaku i marrë mbillet në terrene ushqyese të përshtatshme (kultura qelizore) ku qelizat shumëzohen, më pas përpunohen dhe analizohen për të dhënë rezultatin përfundimtar.

Kriteret e përdorura për analizën citogjenetike janë ato të rekomanduara nga ISSN 2009 (International System for Human Cytogenetic Nomenclature) 2009.

-Koha e nevojshme për të dhënë rezultatin është 20 ditë.

-Në disa raste të rralla, për arsye të ndryshme gjaku i mbjellë nuk shumëzohet dhe për këtë ekzaminimi duhet përsëritur.

-Proçedura e FISH-it dhe PCR-së

Proçedura e FISH-it dhe PCR-së kryhen pas vitit të parë të trajtimit me Glivek.

Marrja e gjakut periferik dhe proçedura e kryerjes së FISH-it dhe PCR-së nuk paraqesin asnjë rrezik për pacientin.

-Koha e nevojshme për të dhënë rezultatin e të dyja proçedurave është 48 orë.

I/E nënshkruara _____

I/E informuar sa më sipër, shpreh konsensusin për kryerjen e kariotipit, FISH-it dhe PCR-së nga gjaku periferik.

Data: _____ Firma _____

Firma e marrësit të konsensusit _____

2.3 Vlerësimet prognostike

Dy janë vlerësimet prognostike sipas të cilëve u gjykua për ecurinë e sëmundjes tek pacientët e marrë në studim;

1. Vlerësimi sipas Sokal-it

Për të vlerësuar mundësinë që mund të kenë pacientët (të ulët < 0,8; mesatare 0,8-1,2; të lartë > 1,2) për prognozën jo të mirë në kohën e paraqitjes në QSUT është përdorur formula e llogaritur sipas Sokal-it:
[0.116 (mosha - 43.4)] + 0.0345 (madhësia e shpretkës - 7.51) + 0.188 [(numri i trombociteve/700)² - 0.563] + 0.0887 (përqindja e blasteve - 2.10), në të cilën janë përfshirë katër parametra diagnostikues:

- mosha e pacientit
- madhësia e shpretkës e vlerësuar nga echo abdominale
- numri i trombociteve i vlerësuar nga analiza e gjakut komplet
- përqindja e blasteve e vlerësuar nga kryerja e mielogramës. (shtojca 2)

2. Vlerësimi sipas EUTOS

Për të vlerësuar mundësinë që mund të kenë pacientët për të arritur ose jo përgjigjen citogjenetike të plotë në muajin e 18 të trajtimit me Glivek u përdor vlerësimi sipas EUTOS-it me formulën e mëposhtme;

7 x nr.i bazofileve në gjakun periferik + 4 x madhësia e shpretkës

Në këtë formulë janë përdorur dy parametra diagnostikues:

- numri i bazofileve në gjakun periferik
- madhësia e shpretkës në momentin e vendosjes së diagnozës.

Nëse kjo shumë del > se 87 pacienti ka mundësi të lartë për të mos e arritur përgjigjen citogjenetike të plotë deri në muajin 18 të trajtimit, ndërsa kur shuma është më e vogël se 87 tregon mundësi të ulët për mos ta arritur këtë përgjigje.
Pacientët që nuk e arrijnë këtë përgjigje pas 18 muajve terapi janë më pak të predispozuar për ta arritur këtë përgjigje më vonë dhe kanë mundësi të lartë për progresin e sëmundjes drejt fazës së përshpejtimit ose të transformimit akut.

2.4 Protokolli i proçedurës të citogjenetikës standarte (Kariotipi)

Protokolli i proçedurës të citogjenetikës standarte është kryer sipas teknikave të mëposhtme:

a) Marrja dhe mbjellja e gjakut
b) Sinkronizimi i kulturave qelizore. Metodika për kromozomet me rezolucion të lartë (> 500 banda) Kit " Synchroset''
c) Teknika citogjenetike standarte
d) Hapja e materialit në lama
e) Bandimi i kromozomeve me banda G

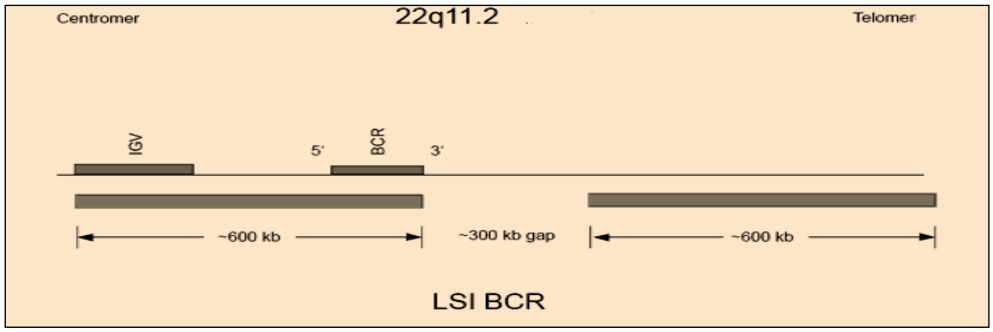
f) Ngjyrimi i preparateve me tretësirë Giemsa
g) Vrojtimi i lamave me aparatin për kariotipizimin automatik (Workstation Genikon)

2.5 Protokolli i proçedurës të citogjenetikës molekulare (FISH)

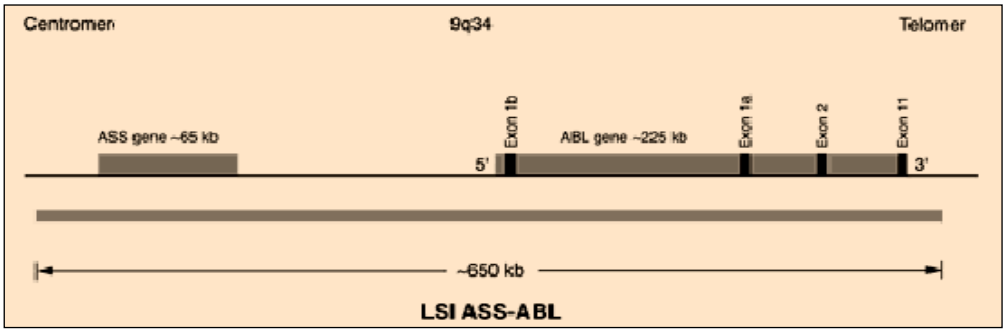
Protokolli i proçedurës të citogjenetikës standarte është kryer sipas teknikave të mëposhtme:

a) Pregatitja e sondave

Fillimisht bëhet pregatitja e sondës e cila duhet të ketë një gjatësi të caktuar për tu hibridizuar në mënyrë specifike me zonën shenjë. Proçesi i hibridizimit pengohet nëse gjatësia e sondës është më e madhe se niveli i caktuar. Sonda është e shënuar me një substance fluoreshente me vende të përcaktuara për biotinën ose antitrupat. Sondat e përdorura janë ***LSI- BCR VYSIS*** që mbulon gjatësinë gjenomike prej 300 Kb dhe ***LSI- ABL VYSIS*** prej 650 Kb.



a .



b.

Figura 2-1. Pamja e sondave të përdorura në teknikën FISH a. sonda LSI BCR, b. sonda LSI ABL *(Burimi: Vysis LSI BCR/ABL ES Dual Color Translocation Probe)*

b) Pregatitja e lamave
c) Hibridizimi
d) Larja e shpejtë dhe dedektimi i riorganizimit gjenetik BCR-ABL

Hollësitë e mëtejshme për kryerjen e këtyre teknikave si edhe sasitë e kimikateve të përdorura janë paraqitur në shtojcën 8 dhe 9.

2.6 Analiza statistikore

Për të gjithë variablat është përcaktuar vlera mesatare dhe deviacioni standart shoqërues. Koefiçientët e korrelacionit janë kalkuluar me metodën parametrike të korrelacionit të Pearsonit. Për përpunimin e të dhënave u përdor sistemi "Statistical Package for Social Sciences" (SPSS) version 11 për Windows.

III. REZULTATE DHE DISKUTIME

3.1 Klasifikimi i pacientëve sipas gjinisë, moshës dhe vendbanimit.

Nga të dhënat personale nga plotësimi i skedës së parë nga pacientët ka rezultuar se: 29 pacientë ose 41,5% janë femra dhe 41 ose 58,5% janë meshkuj, me raportin meshkuj / femra 1,4 (tabela 3-1, shtojca 1).

Tabela 3-1. Grupimi i pacientëve sipas gjinisë dhe moshës

Grupmoshat (vjeç)	**</=20**		**21-40**		**41-60**		**>/= 61**	
Femra/ Meshkuj	F	M	F	M	F	M	F	M
	1	0	7	7	18	24	3	10
Shpeshtësia	1 ose 1,42%		14 ose 20%		42 ose 60%		13 ose 18,5 %	

Mosha mesatare në studimin tonë është 49,2 vjeç dhe numri më i madh i pacientëve (42 ose 60%) janë të grup-moshës 41-60 vjeç.

Duke marrë parasysh faktin që Shërbimi i Hematologjisë dhe Shërbimi i Gjenetikës Mjeksore në QSUT janë të vetmit në Shqipëri për trajtimin dhe ndjekjen e këtyre të sëmurëve, pacientët e diagnostikuar me LMC janë nga rrethe të ndryshme (tabela 3-2).

Tabela 3-2. Grupimi i pacientëve sipas rretheve nga të cilët ata vijnë

Rrethi	**SH**	**KR**	**KA**	**VL**	**FR**	**DR**	**TR**	**KO**	**BR**	**SR**
Pacient	2	1	1	2	1	2	55	3	2	1
%	2,85	1,42	1,42	2,85	1,42	2,85	78	4,28	2,85	1,42

Numri më i madh i pacientëve në studimin tonë 55 ose 78% janë nga Tirana.
Nga anamneza e marrë në çdo pacient ka rezultuar se 100% e tyre nuk kanë pasur familjarë me LMC të sëmurë më parë, pra kjo sëmundje është shfaqur për herë të parë në familjet e tyre.

3.2 Vlerësimi i parametrave diagnostikues të vlefshëm për llogaritjen e formulës së Sokal-it

Një vlerësim shumë i rëndësishëm dhe i besueshëm prognostik për pacientët me LMC është vlerësimi sipas Sokal-it, i cili llogaritet me ekuacionin e mëposhtëm;

[0.116 (mosha - 43.4)] + 0.0345 (madhësia e shpretkës - 7.51) + 0.188 [(numri i trombociteve/700)^2 - 0.563] + 0.0887 (përqindja e blasteve - 2.10)

Parametri i splenomegalisë është vlerësuar nëpërmjet echos abdominale dhe ka rezultuar se 60 pacientë ose 85% e numrit total të pacientëve kanë pasur splenomegali (tabela 3-3; shtojca 1, 2)

Në studime të tjera splenomegalia gjendet në vlerat: 100%, 80,9%, 90% dhe 75,8% (49, 61, 72, 108).

Tabela 3-3. Vlerat e madhësisë së shpretkës në momentin e vendosjes së diagnozës

Përmasat e shpretkës **10-12 cm** **Vlerat normale**	**Splenomegali** **13-15 cm**	**Splenomegali** **16-18 cm**
10 (14%) e pacientëve	55 (78%) e e pacientëve	5 (7 %) e pacientëve

Parametri i përqindjes së blasteve është vlerësuar nëpërmjet kryerjes së mielogramës dhe vlerat e blasteve të gjetura tek secili pacient janë paraqitur në tabelën 3-4.

Tabela 3-4. Vlerat e blasteve në mielogramë

Blaste në mielogramë	**Numri i pacientëve**	**%**
< 5% Vlera normale	12	17
5-8%	25	35
9-12%	20	28
13-16%	13	18

Vlerat normale të blasteve në mielogramë janë gjetur vetëm në 12 pacientë, kurse në 58 pacientë numri i blasteve nuk është në kufijtë e normës.

Parametri i numrit të trombociteve është vlerësuar nëpërmjet ekzaminimit të gjakut periferik (hemogramë) dhe cilësohet si një parametër diagnostikues mjaft i rëndë-sishëm për prognozën e pacientëve me LMC (tabela 3-5).

Tabela 3-5. Vlerat e trombociteve në gjakun periferik

Vlera e trombocite në gjakun periferik	**Numri i pacientëve**	**%**
50000-80000 /µl gjak	9	12
90000-120000 / µl gjak	10	14

130000-150000 / µl gjak	31	44
150000-450000/ µl gjak (Vlera normale)	20	28

Pasi është llogaritur formula e Sokal-it duke përdorur të katër parametrat diagnostikues, pacientët janë klasifikuar përsa i përket prognozës që do të kenë (tabela 3-6, shtojca 2).

Tabela 3-6. Klasifikimi i pacientëve sipas vlerësimit të Sokal-it

Vlerësimi sipas Sokal-it	**Numri i pacientëve**	**%**
I ulët (< 0,8)	25 (12F+13M)	35
Mesatar (0,8-1,2)	7 (4F+3M)	10
I lartë (> 1,2)	38 (13F+25M)	54

Në studimin tonë rezultoi se 25 pacientë ose 35% e tyre janë me mundësi të ulët sipas Sokal-it për të pasur prognozë jo të mirë, 7 pacientë ose 10% janë me mundësi mesatare dhe 38 ose 54% janë vlerësuar me mundësi të lartë.

Meqënëse në formulën e Sokal-it janë llogaritur katër parametra diagnostikues është e vështirë që rezultatet e nxjerra nga llogaritja e kësaj formule për pacientët tanë të krahasohen me përfundimet e studimeve të tjera. Disa krahasime me studime të tjera për pacientë të sëmurë me LMC jepen tek tabela 3-7 dhe duket se përfundimet ndryshojnë nga njëri studim tek tjetri (66, 61, 95, 105, 122).

Tabela 3-7. Përfundimet sipas Sokal-it për studime të ndryshme

		Vlerësime sipas Sokal-it		
Studimi	**Numri i pacientëve**	**Mundësi e ulët %**	**Mundësi e mesme %**	**Mundësi e lartë %**
Roko.D 2013 Shqipëri	70	35	10	54
Rousselot.P 2012 Francë[105]	30	30	37	33
Oyekunle.AA2012 Nigeri[95]	134	40	33	26
Usman.M 2007 Turqi[122]	136	67,7	27,4	3,7
Hasford.J Gjermani[66]	2060	39	37	24
Ćojbašić.I Serbi[61]	21	47.6	42.9	9.5

Mosha e madhe e pacientit është një faktor i mirënjohur që ndikon negativisht në prognozën e sëmundjes (tabela 3-8). Tek një pacient në studimin tonë (70 në shtojcë) edhe pse parametrat e tjerë janë në normë, mosha ka një rol të rëndësishëm dhe e

klasifikon atë nga formula e llogaritur me risk të lartë për të pasur prognozë jo të mirë.

Tabela 3-8. Shpërndarja e pacientëve sipas grupmoshave në lidhje me vlerësimin sipas Sokal-it

	Grupmoshat e pacientëve (vjeç)							
Vlerësimi sipas Sokal-it	**</=20**		**21-40**		**41-60**		**>/= 61**	
	Nr.i pacientë -ve	**%**	**Nr.i pacientë -ve**	**%**	**Nr.i pacientë -ve**	**%**	**Nr.i pacientë -ve**	**%**
I ulët 25	1/25	4	14/25	56	10/25	40	-	-
Mesatar 7	-	-	-	-	7/7	100	-	-
I lartë 38	-	-	-	-	25/38	65	13/38	34

Duke parë moshën e pacientit vëmë re se të gjithë pacientët (15 pacientë) me moshë më të vogël se 40 vjeç e kanë mundësinë të ulët për të pasur një prognozë jo të mirë, kurse pacientët me moshë më të madhe se 40 vjeç (38 pacientë) janë me mundësi të lartë.

3.3 Vlerësimi i parametrave diagnostikues të vlefshëm për sistemin prognostik EUTOS

Vlerësimi sipas EUTOS-it është një vlerësim tjetër shumë i rëndësishëm për të vlerësuar prognozën e pacientëve i cili llogaritet nga formulimi i mëposhtëm:

7 x nr.i bazofileve në gjakun periferik + 4 x madhësia e shpretkës

Sipas këtij vlerësimi pacientët ndahen në pacientë me mundësi të ulët dhe të lartë për të mos e arritur përgjigjen citogjenetike të plotë në muajin e 18 të trajtimit me Glivek (shtojca 5).
Vlerat e përmasës së shpretkës në momentin e diagnozës janë të paraqitura tek tabela 3-3, kurse vlerat e bazofileve në gjakun periferik janë si në tabelën 3-9.

Tabela 3-9. Vlerat e bazofileve në gjakun periferik

Nr. i bazofileve %	**Numri i pacientëve**	**%**
0,01-3% Vlerat e normës	5	7
3,1 - 5,9%	65	92

Të dy parametrat diagnostikues për secilin pacient janë llogaritur tek formulimi sipas EUTOS-it dhe ka rezultuar se 72% e pacientëve janë me mundësi të ulët për të mos arritur përgjigjen citogjenetike të plotë në fund të vitit të dytë të trajtimit dhe 29% e pacientëve janë me mundësi të lartë për mos arritjen e kësaj përgjigjeje.

Sipas studimit të bërë nga Joerg Hasford për 2060 pacientë në vitin 2011 në Gjermani është theksuar se vlerësimi sipas EUTOS-it ka vlera prognostike më të mira se vlerësimi i bërë nga Sokal (66).

Përfundimet e vlerësimit EUTOS për studimin tonë janë krahasuar me përfundimet e dy studimeve të tjera si më poshtë: studimi i Gjermanisë nga Joerg Hasford ka vlerësuar me mundësi të ulët 79% të pacientëve dhe me mundësi të lartë 20,9% kurse sipas një studimi në Londër në vitin 2011 nga David Marin për 277 pacientë u klasifikuan sipas sistemit EUTOS 88,8 % e pacientëve me risk të ulët dhe 11,2 % me risk të lartë për të mos arritur përgjigjen citogjenetike të plotë deri në muajin 18 të trajtimit (66, 33).

Pacientët e vlerësuar sipas sistemit EUTOS janë grupuar sipas grupmoshave tek tabela 3-10.

Tabela 3-10. Shpërndarja e pacientëve të studimit tonë sipas grupmoshave në lidhje me vlerësimin sipas EUTOS-it

		Grupmoshat e pacientëve (vjeç)							
Vlerësimi sipas EUTOS		**</=20**		**21-40**		**41-60**		**>/= 61**	
		Numri i pacientëve	**%**	**Numri i pacientëve**	**%**	**Numri i pacientëve**	**%**	**Numri i pacientëve**	**%**
I ulët	51	1/51	1,9	13/51	25,4	26/51	50,9	11/51	21,5
I lartë	19	-	-	1/19	5,2	16/19	84,2	2/19	10,5

Sipas vlerësimit të EUTOS-it nuk mund të gjendet një lidhje midis moshës së pacientit dhe këtij vlerësimi sepse në grupmoshën 41-60 vjeç shohim që kemi numër të konsiderueshëm të pacientëve të vlerësuar me mundësi të ulët dhe të lartë.

Vlerat e parametrave diagnostikues të përdorura me formulat e Sokal-it dhe EUTOS-it në studimin tonë dhe në disa studime të tjera shkencore (66, 95, 126) për këtë sëmundje janë përmbledhur në tabelën 3-11.

Tabela 3-11. Përmbledhja e vlerave të variablave të përdorura në formulat e Sokal-it dhe EUTOS-it

Studimi / **Variabli i Përdorur**	Roko D. 2013 Shqipëri	Hasford J. 2011 në Gjermani[66]	Oyekunle në Nigeri 2012[95]	Yusuf Bilen në Turqi 2009[126]
Mosha e pacientit (vjeç) Sokal	18-72	18-83	13-75	18-75
Madhësia e shpretkës (cm) Sokal, EUTOS	10-18	0-38	3-31	0-20
Numri i trombociteve ($10x10^9$/l) Sokal	50-450	34-3050	45-600	134-1571
Përqindja e blasteve (%) Sokal	2-16	0-15	1-8	1-8
Përqindja e bazofileve (%) EUTOS	0,1-3	0-21	1-10	0-9

Meqënëse këto vlera nëpër studime shkencore të ndryshme nuk janë të njëjta edhe grupimet sipas Sokal-it dhe EUTOS-it janë me përqindje të ndryshe ashtu si u diskutua më sipër.

3.4 Arritja e përgjigjes hematologjike

Përveç vlerësimeve të Sokal-it dhe EUTOS-it një rol shumë të rëndësishëm në prognozën e sëmundjes për çdo pacient kanë koha dhe shkalla e arritjes së përgjigjeve hematologjike, citogjenetike, citogjenetike molekulare dhe molekulare si edhe anomalitë e tjera të gjetura përveç kromozomit Philadelpia në kariotipin e pacientit.

Duke bërë krahasimin me arritjen e përgjigjeve shumë të mira hematologjike në studime shkencore në vende të ndryshme të botës formulojmë një hipotezë për efikasitetin e Glivekut tek pacientët tanë në nivelin hematologjik.

Për të vërtetuar këtë hipotezë të ngritur vlerësojmë periudhën kohore për arritjen e përgjigjes hematologjike të plotë ose të pjesshme duke përsëritur analizën komplete të gjakut periferik në fund të muajit të parë, të dytë dhe të tretë të marrjes së Glivekut (shtojca 3). Për arritjen e këtyre përgjigjeve një rol të rëndësishëm kanë vlerat e leukociteve dhe trombociteve.

Për pacientët që nuk kanë arritur përgjigje hematologjike të plotë pas një muaji trajtim me Glivek analiza e gjakut periferik është përsëritur muajin e 2, 3 dhe 6 të trajtimit.

Nga analiza komplete e gjakut periferik për tre muaj rezultoi si në tabelën 3-12.

Tabela 3-12. Periudha kohore e arritjes së përgjigjeve hematologjike

Përgjigja Hematologjike	Muaji 1		Muaji 2		Muaji 3	
	Numri i pacientëve	%	Numri i pacientëve	%	Numri i pacientëve	%
E plotë	45	64%	58	82%	64	91%
E pjesshme	19	27%	6	8%	-	-
Pa përgjigje	6	8%	6	8%	6	8%

Veprimi i medikamentit Glivek ka qënë pozitiv në fund të muajit të parë tek 45 pacientë ose në 64% të pacientëve për arritje të përgjigjes hematologjike të plotë tek të cilët numri i leukociteve ka filluar të zvogëlohet, ndërsa numri i trombociteve të rritet. Në fund të muajit të parë përgjigja e pjesshme hematologjike u arrit në 19 pacientë ose në 27% të tyre, ndërkohë pa përgjigje hematologjike në muajin e parë të trajtimit mbetën vetëm 6 pacientë.

Në fund të muajit të dytë numri i pacientëve që arritën përgjigje të plotë hematologjike arriti në 58 ose 82% dhe në fund të muajit të tretë numri i pacientëve të përgjigjur hematologjikisht shkoi në 64 ose 91%.

Këto shifra tregojnë në mënyrë të qartë se Gliveku është shumë efektiv në përgjigjet e nivelit hematologjik në pacientët me LMC në fazën kronike, ashtu si ne edhe e prisnim.

Për 6 pacientët (respektivisht me numrat rendor në shtojcë; 10, 12, 29, 47, 50, 70) të cilët edhe pse duke marrë tre muaj mjekim me dozën 400 mg/ditë nuk arritën përgjigje hematologjike skema e mjekimit u ndryshua. Ata janë cilësuar si rezistentë fillestarë të nivelit hematologjik dhe prandaj filluan trajtimin me dozë më të lartë Gliveku.

Ky trajtim vazhdoi deri në fund të muajit të gjashtë dhe në momentin kur tek këta pacientë përsëri nuk ishte arritur asnjë ndryshim në formulën e gjakut u ndërrua skema e mjekimit. Këta pacientë nuk ishin më pjesë e këtij studimi sepse janë përsëri rezistentë edhe ndaj dozës së shtuar të Glivekut.

Studimi për arritjen e përgjigjeve citogjenetike vazhdoi me 64 pacientë.

Rezultatet e shkëlqyera të studimit tonë për arritjen e përgjigjeve hematologjike në muajin e tretë janë të krahasueshme me rezultate të studimeve të tjera për arritjen e përgjigjes hematologjike si paraqiten tek tabela 3-13 (20, 41, 49, 61, 122, 125, 126, 130) dhe hipoteza e ngritur për efikasitetin e Glivekut në nivelin hematologjik në popullatën e pacientëve tanë është vërtetuar më së miri.

Tabela 3-13. Arritja e përgjigjes hematologjike të plotë në studime të tjera

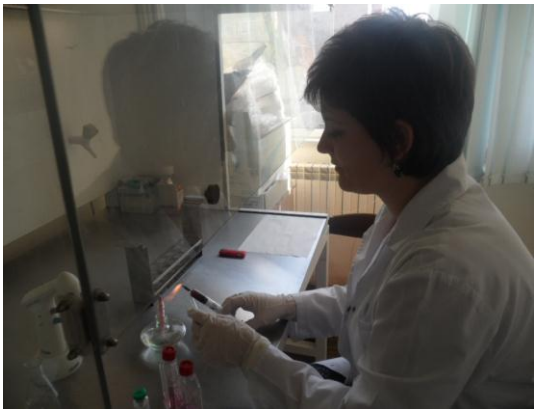
Studimi	Numri i pacientëve	Përgjigja hematologjike %
Roko D. 2013 Shqipëri	70	91
IRIS 2006 USA [20]	553	96
Castagnetti F. 2009 Itali [41]	78	97
Usman M. 2007 Turqi [122]	136	86
Gupta A. 2006 Indi [49]	16	93,75
Cojbasic I. Serbi [61]	21	90,48
Vaneuza A. 2005 Brazil [125]	98	86
Zhao Y. 2009 Kinë [130]	116	94,1
Bilen Y. 2012 Turqi [126]	31	80,6

3.5 Arritja e përgjigjeve citogjenetike në bazë të kryerjes së kariotipit gjatë 24 muajve trajtim me Glivek

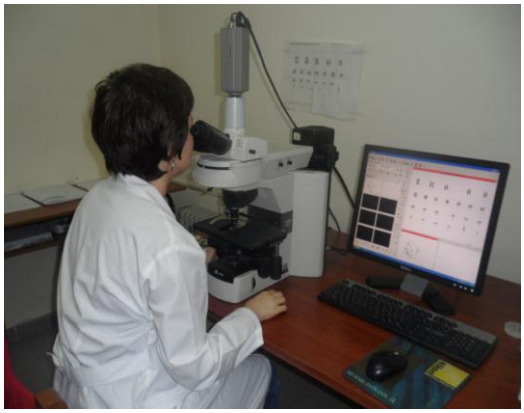
Në mënyrë që pacientit t'i vendoset diagnoza e saktë përveç të dhënave personale, të dhënave anamnestike, ekzaminimit klinik, analizës së gjakut komplet, mielogramës dhe echos abdominale i kërkohet edhe kryerja e kariotipit nga gjaku periferik. Proçedura e kariotipit kryhet për të evidentuar praninë e kromozomit Philadelphia si rezultat i traslokacionit midis krahëve të gjatë (q) të kromozomeve 9 dhe 22.

Duke marrë parasysh arritjen e përgjigjeve citogjenetike të plota në shifra të konsiderueshme të studimeve shkencore të tjera formulojmë një hipotezë për arritjen e kësaj përgjigjeje në nivel të lartë edhe për popullatën e pacientëve që ne kemi marrë në studim (20, 41, 95, 91, 66, 86, 105, 125, 126, 130).

Për të vëtetuar hipotezën e formuluar për nivelin citogjenetik, gjatë periudhës kohore dy vjeçare që pacientët u morrën në studim analiza e kariotipit (ose analiza kromozomike me banda G sipas proçedurës së citogjenetikës standarte të përshkruar tek pjesa e metodikës dhe tek shtojca 9) është kryer për 70 pacientë në momentin e vendosjes së diagnozës, në fund të vitit të parë dhe në fund të vitit të dytë të trajtimit.Për secilin pacient kemi analizuar mesatarisht 25 metafaza në mënyrë që të jemi të sigurt për të vendosur diagnozën. Për pacientët në lamat e të cilëve numri i metafazave nuk është i mjaftueshëm proçedura e analizës kromozomike është përsëritur.

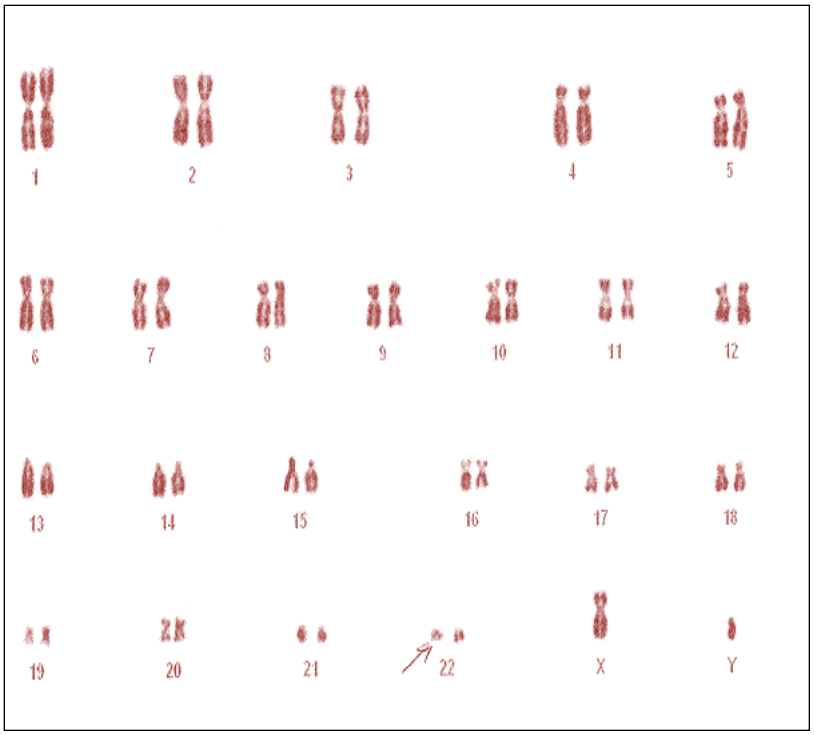


a.

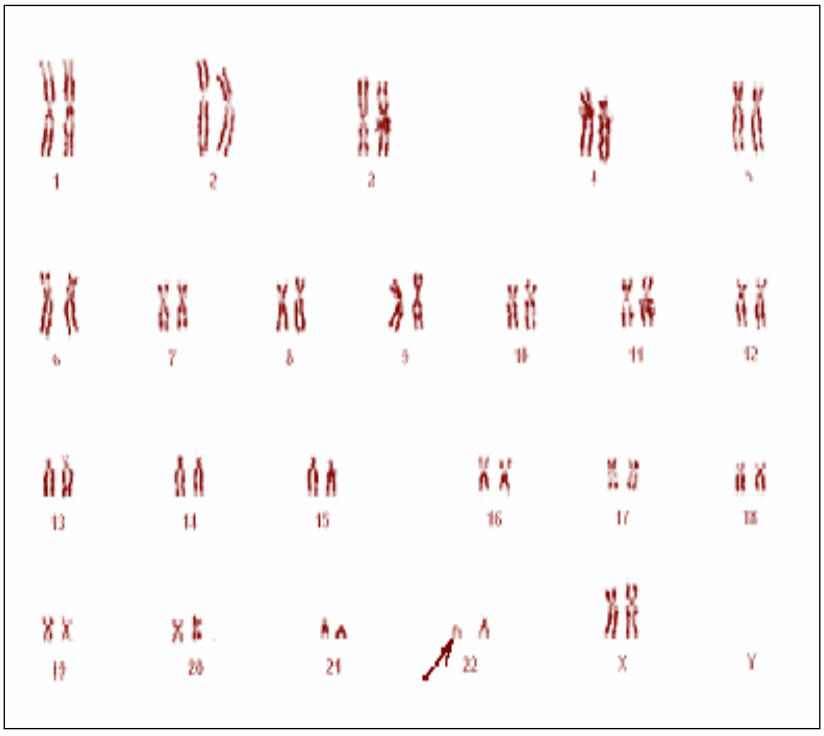


b.

Foto 1. Pamje nga puna në Laboratorin e Citogjenetikës në Shërbimin e Gjenetikës Mjekësore QSUT; a. mbjellja e gjakut në hotin steril b. kariotipizimi automatik me Workstation Genikon. Pamja e kariotipit me banda G ku evidentohet prania e kromozomit Philadelphia jepet për të dyja gjinitë tek figura 3-1.



a.

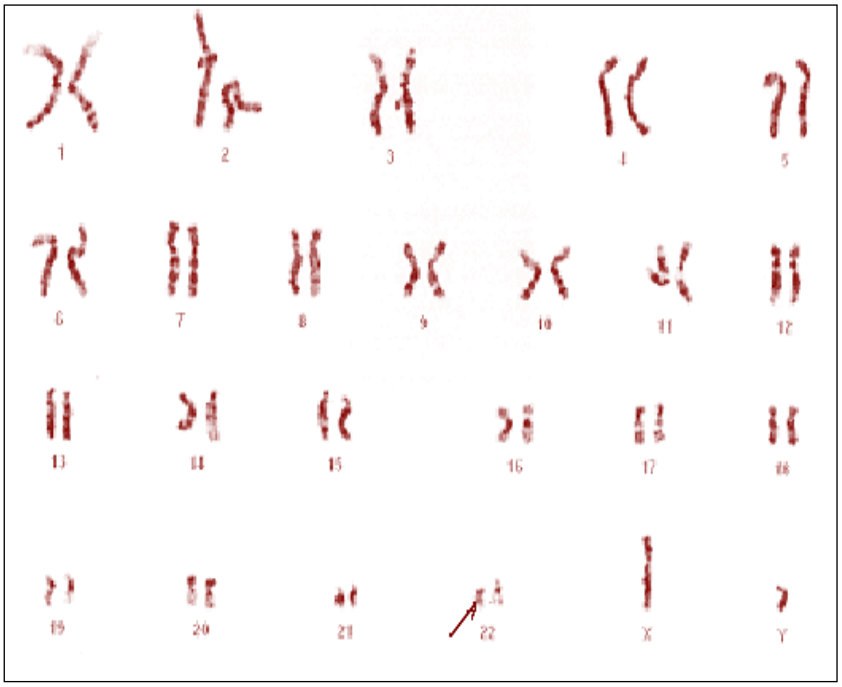


b.

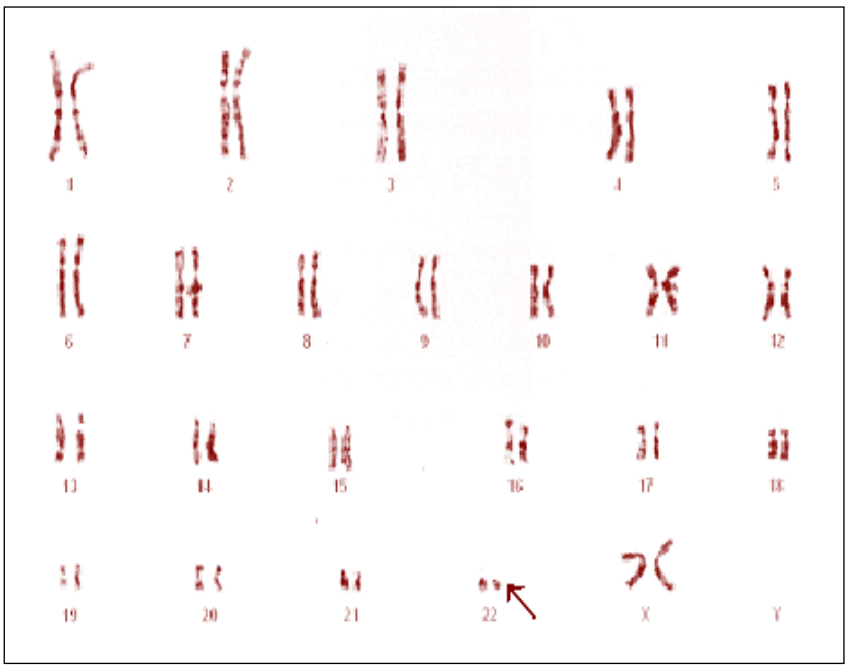
Figua 3-1. Skemat e kariotipit të pacientëve të kryer në Shërbimin e Gjenetikës QSUT
a.Kariotip 46, XY Ph+ dhe b. Kariotip 46, XX Ph+

Tek të gjithë pacientët në kohën e vendosjes së diagnozës zbatojmë metodikën për kromozomet me rezolucion të lartë sinkronset. Nga kjo proçedurë janë fituar **kromozome prometafazikë me një numër më të madh bandash (>500 banda).**

Skema e kariotipeve të kryera me metodën sinkronset tek pacientët e të dyja gjinive është paraqitur në figurën 3-2.



a.



b.

Figura 3-2. Skemat e kariotipit me sinkronset të pacientëve të kryer në Shërbimin e Gjenetikës QSUT a. Kariotip 46, XY Ph+ dhe b. Kariotip 46, XX Ph+.

Përgjigjet citogjenetike të fituara janë ndarë në përgjigje citogjenetike të plotë, të pjesshme, madhore, minore, minimale dhe pa përgjigje dhe numri i pacientëve që kanë fituar secilën prej tyre është paraqitur tek tabela 3-14 (34, 67, 104).

Tabela 3-14. Klasifikimi i pacientëve sipas periudhave kohore të arritjes së përgjigjeve citogjenetike

Përgjigje citogjenetike	**Muaji 0**		**Muaji 12**		**Muaji 24**	
	Numri i pacientëve	**%**	**Numri i pacientëve**	**%**	**Numri i pacientëve**	**%**
E plotë 0% e metafazave Ph+	-	-	46	65,7%	58	82,8%
Pjesshme 1-35 % e metafazave Ph+	43	61,4%	13	18,5%	1	1,4%
Madhore 0-35 % e metafazave Ph+	43	61,4%	59	84,2%	59	84,2%
Minore 36-65% e metafazave Ph+	7	10%	-	-	-	-
Minimale 66%-95% e metafazave Ph+	8	11,4%	5	7,14%	-	-
Pa Përgjigje > 95% e metafazave Ph+	12 (6)	17,1%	-	-	-	-
Numri total i rasteve	70	-	59	-	58	-

Legjenda:
Nënvizim – pacienti rrit dozën e mjekimit.
Ngjyra e kuqe – pacienti largohet nga skema e trajtimit.

Nga analiza citogjenetike e kryer në momentin e vendosjes së diagnozës kromozomi i kërkuar Philadelphia është gjetur në 100% të pacientëve me klasifikimin e mëposhtëm; 43 pacientë me kromozomin Ph+ në 1-35% të mitozave të numëruara, 7 pacientë me 36-65% Ph+, 8 pacientë me 66-95% Ph+ dhe në 12 pacientë kromozomi Ph+ ishte në më shumë se 95% të mitozave të numëruara (respektivisht në gjakun e pacientëve me numrat rendorë; 3, 10, 11, 12, 21, 29, 36, 47, 50, 56, 66, 70).

6 pacientë (respektivisht me numrat rendorë; 10, 12, 29, 47, 50, 70) që nuk arritën përgjigje hematologjike ndërruan skemën e mjekimit. Në këta pacientë në analizën e kariotipit më shumë se 95% e qelizave kanë rezultuar me kromozom Ph (Ph+).

64 pacientët që arritën përgjigje hematologjike të plotë gjatë 3 muajve të parë të mjekimit vazhduan mjekimin me Glivek rregullisht dhe ju nënshtruan edhe dy herë të tjera proçedurës së kariotipit për monitorimin e sëmundjes (në fund të muajit të 12 dhe 24).

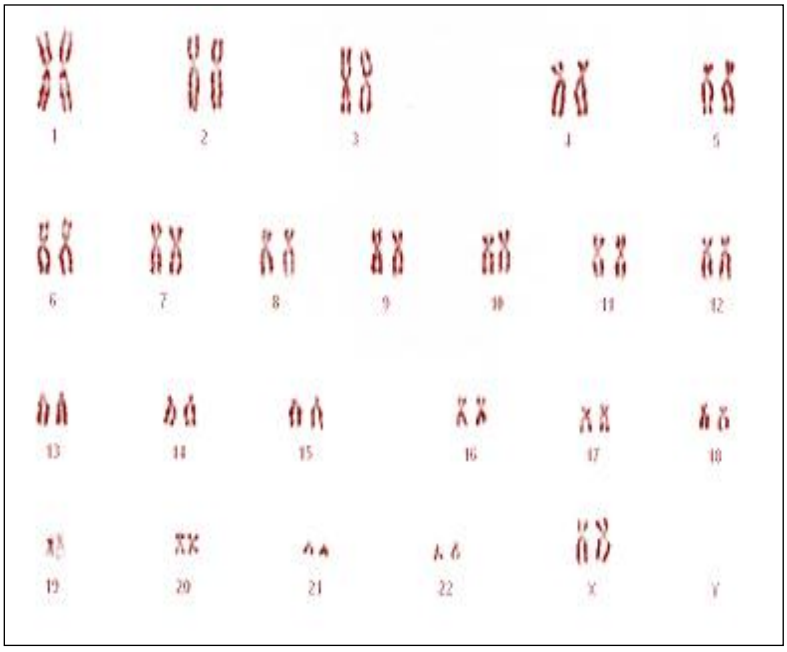
Në muajin 12 të trajtimit 13 pacientë (respektivisht me numrat rendor; 1, 4, 9, 14, 15, 30, 32, 36, 37, 44, 56, 66, 68) ose 18,5% që kanë arritur përgjigje të pjesshme citogjenetike me 1-35% të kromozomit Ph+ në metafazat e vëzhguara në mikroskop janë rezistentë ndaj dozës 400 mg Glivek/ditë (10). Këtyre pacientëve është ndryshuar skema e mjekimit duke i rritur dozën e medikamentit. (Rritja e dozës së Glivekut është bërë në përputhje me studimin IRIS dhe kriteret e bazuara tek ELN) (20).

Në muajin 12 të trajtimit në 5 pacientë ose në 7,14% të pacientëve u vu re se përqindja e kromozomit Ph+ ishte e lartë në shifrat 66-95%, e cilësuar kjo si përgjigje minimale. Duke u bazuar tek kriteret e nxjerra nga ELN dhe kriteret e nxjerra nga studimi i Baccaranit 2006 këta pacientë (respektivisht me numrat rendor 3, 8, 11, 21, 31) largohen nga kjo mënyrë trajtimi duke mos qënë më pjesë e studimit tonë (10).

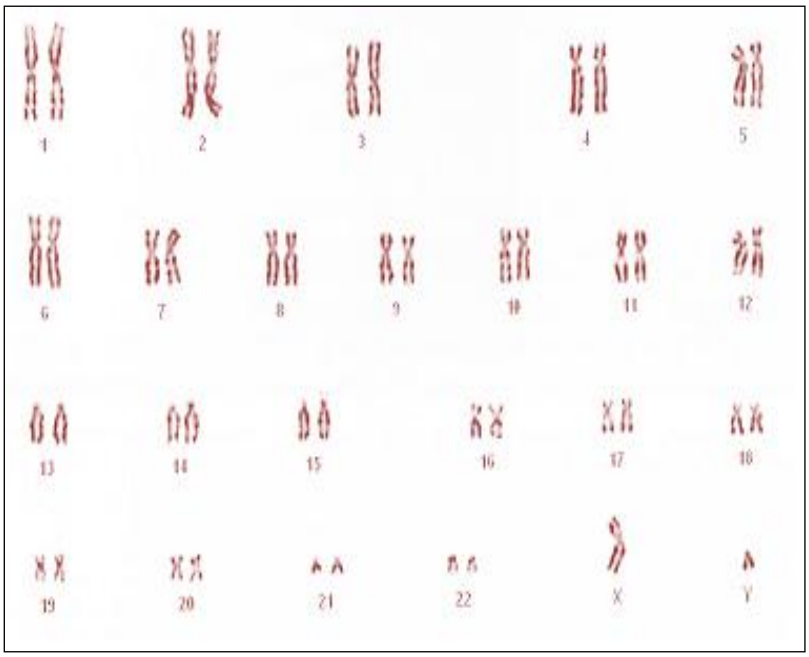
Përgjigja citogjenetike e plotë në muajin 24 të trajtimit u arrit në 58 pacientë ose 82,8%. Vetëm një pacient, (me numrin rendor në shtojcë 14) arriti përgjigje citogjenetike të pjesshme, e cila sipas kritereve të ELN për këtë periudhë kohore e klasifikon pacientin si të dështuar për këtë mënyrë trajtimi për shkak të mos arritjes së përgjigjes citogjenetike të plotë. Ky pacient u largua nga studimi ynë për t'u trajtuar me inhibitorë të tjerë të tirozin-kinazës, por të gjeneratës së dytë si Nilotinibi ose me emrin tregëtar Tasigna. Ky medikament ka filluar të përdoret vetëm muajt e fundit në QSUT në Shërbimin e Hematologjisë për të sëmurët me LMC.

Përgjigjen e plotë citogjenetike në muajin e 12 dhe 24 e kanë arritur 65,7% dhe 82,8% e pacientëve. Përgjigjet e pjesshme të arritura pikërisht në këto muaj janë 18,5% dhe 1,4%.

Kromozomi Philadelphia nuk evidentohet në kariotipin e pacientëve që kanë arritur përgjigje citogjenetike të plotë pavarësisht muajit kur është arritur kjo përgjigje (fig.3-3).



a.



b.

Figura 3-3. Pamja e kariotipit të pacientëve që kanë arritur përgjigje citogjentike komplete a. Kariotip normal 46, XX dhe b. Kariotip normal 46, XY

Rezultatet e studimit tonë për arritjen e përgjigjeve citogjenetike të plota në muajt 12 dhe 24 janë të krahasueshme me përfundimet e studimeve të tjera për arritjen e këtyre përgjigjeve si jepen tek tabela e mëposhtme (20, 41, 66, 86, 91, 95, 105, 125, 126, 130).

Tabela 3-15. Arritja e përgjigjeve citogjenetike të plota në muajin 12 dhe 24 në studime të ndryshme

Studimi	**Numri i pacientëve**	**Përgjigje citogjene - tike e plotë (Muaji 12)**	**Përgjigje citogjene -tike e plotë (Muaji 24)**
Roko D. 2013 Shqipëri	70	65,7	82,8
IRIS 2006 USA [20]	553	69	87
Rousselet P. 2012 Francë[105]	30	71,4	78,5
Testoni N. 2009 Itali [91]	664	80,8	-
Castagnetti F. 2009 Itali [41]	78	88	91
Hausford J. Gjermani [66]	1223	74	82
Vaneuza A. 2005 Brazil [125]	98	61	-
Zhao Y. 2009 Kinë [130]	116	69,6	-
Nannya Y. 2008 Japoni [86]	35	93	-
Bilen Y. 2012 Turqi [126]	31	71	88
Oyekunle AA. 2012 Nigeri [95]	134	33	68

Në të gjitha studimet e mësipërme përfshirë edhe studimin tonë nga muaji 12 në 24 përqindja e pacientëve që arrijnë përgjigjen citogjenetike të plotë me 0% të kromozomit Philadelphia rritet dukshëm. Kjo arrihet në sajë të efektit të shkëlqyer të Glivekut tek këta pacientë (shtojca 4). Hipoteza e ngritur që në fillim të studimit për rëndësinë që ka përdorimi i Glivekut në arritjen e këtyre përgjigjeve citogjenetike është dukshëm e vërtetuar.

Sipas studimeve të Castagnetti F. në 2009, Kantarjian H. në vitin 2004 dhe studimit të kryer nga Cortes J. në 2003 rritja e dozës së Glivekut deri në 800 mg/ditë indukton përgjigje citogjenetike më të shpejta dhe më të larta sesa doza 400mg/ditë (41, 67, 31).

Në studimin tonë, ky rezultat pas rritjes së dozës të Glivekut u vu re në 12 pacientë në të cilët medikamenti ka vepruar në mënyrë të shkëlqyer dhe në kariotipin që u është kryer pacientëve në muajin 24 është parë se përqindja e kromozomit Ph+ është ulur ndjeshëm duke i klasifikuar pacientët me përgjigje citogjenetike komplete. Nuk ka ndodhur e njëjta situatë vetëm për një pacient (respektivisht atë me numër rendor 14) tek i cili edhe pse u aplikua një dozë më e lartë medikamenti përgjigja citogjenetike e plotë nuk u arrit.

Sipas studimit 5-vjeçar IRIS të Brian J. në 2006 është shumë e rëndësishme të theksohet se pacientët të cilët arrijnë përgjigjen citogjenetike të plotë më shpejt në kohë kanë mundësi të ulët për të kaluar në fazat më të avancuara të sëmundjes së LMC në krahasim me pacientët që i arrijnë më vonë këto përgjigje (20). Arritja e përgjigjes citogjenetike vlerësohet si faktor prognostik shumë i rëndësishëm për këtë grup pacientësh dhe tregon për efikasitetin që po tregon terapia me Glivek.

3.6 Lidhja e vlerësimeve të Sokal-it dhe EUTOS-it me arritjen e përgjigjeve hematologjike dhe citogjenetike

Nga literatura është vënë re që vlerësimet prognostike sipas Sokal-it dhe EUTOS-it janë cilësuar si vlerësime shumë të rëndësishme prognostike (105, 95, 122, 66, 61, 20). Ne presim që edhe në studimin tonë të nxjerrim një përfundim të tillë, prandaj për të vërtetuar këtë shohim se si qëndron lidhja e vlerësimeve të Sokal-it dhe EUTOS-it me arritjen e përgjigjeve hematologjike dhe citogjenetike.

Lidhja e vlerësimit sipas Sokal-it me arritjen e përgjigjeve hematologjike dhe citogjenetike në fund të studimit është paraqitur tek tabela 3-16.

Tabela 3-16. Shpërndarja e pacientëve sipas vlerësimit të Sokal-it në lidhje me përgjigjet hematologjike dhe citogjenetike të arritura në fund të vitit të dytë të trajtimit

Vlerë-simi sipas Sokal	Përgjigje hematolo-gjike e plotë		Përgjigje citogjenetik e e plotë		Përgjigje citogjenetik e e pjesshme		Përgjigje citogjenetike madhore		Larguar
	Nr	%	Nr	%	Nr	%	Nr	%	Nr
Të ulët 25	25	100	25	100	-	-	25	100	0
Mes-atar 7	7	100	6	85	-	-	6	85	1
Të lartë 38	32	84	27	71	1	2	28	73,6	5
Gjithsej 70	64	91	58	82	1	1	59	84,2	6

Meqënëse numri i parametrave diagnostikues të llogaritur tek formula e Sokal-it është 4 atëherë nuk mund të nxjerrim ndonjë përfundim të rëndësishëm në lidhje me këto të dhëna dhe arritjen e përgjigjeve hematologjike dhe citogjenetike. Megjithatë shumë i rëndësishëm është përfundimi se pacientët me mundësi të ulët kanë arritur 100% përgjigje hematologjike të plotë dhe citogjenetike të plotë në krahasim me pacientët me mundësi mesatare dhe të lartë ku këto përgjigje janë arritur në shifra më të ulta.

Edhe në studimin e Nigerisë nga Oyekunle theksohet fakti se tek pacientët me mundësi të ulët sipas Sokal-it mundësia për të arritur përgjigje hematologjike dhe citogjenetike është më e lartë se në grupet e tjera të riskut (95).

Rezultatet e studimit tonë për arritjen e përgjigjeve hematologjike të plota, citogjenetike të plota dhe për pacientët e mbetur pa përgjigje të shpërndarë sipas grupeve të mundësive sipas Sokal-it janë krahasuar me rezultatet e studimit IRIS në Amerikë dhe studimit të M. Usman në Turqi dhe jepen tek tabela 3-17 (20, 122).

Tabela 3-17. Krahasimi i përfundimeve të studimit tonë me studimin IRIS dhe studimin e M.Usman

Vlerësimi sipas Sokal-it	**Roko.D**			**Brian. J (IRIS)[20]**	**M.Usman [122]**		
	PHP %	PCP %	PP %	PCP %	PHP %	PCP %	PP %
Ulët	100	100	0	89	75	36	35
Mesatar	100	85	0	82	86	18	64
Lartë	84	71	21	69	83	16	83

Edhe vlerësimi sipas EUTOS-it është cilësuar si një vlerësim me rëndësi prognostike sipas studimit të David M. 2011 (33). Lidhja e këtij vlerësimi me përgjigjen citogjenetike të plotë të muajit 24 është dhënë tek tabela 3-18.

Tabela 3-18. Lidhja e vlerësimit sipas EUTOS me përgjigjen citogjenentike të plotë të muajit 24 të trajtimit me Glivek

Vlerësimi sipas EUTOS			**Përgjigja citogjenetike e plotë në muajin 24**	
	Nr	%	Nr	%
I ulët	51	72	58	82
I lartë	19	27	12	17

Nga studimi ynë shifrat për vlerësimin sipas EUTOS-it në kohën e vendosjes së diagnozës janë; me mundësi të ulët për të mos e arritur përgjigjen citogjenetike të plotë në muajin 24 vlerësohen 72% e pacientëve dhe me mundësi të lartë për të mos e

arritur këtë përgjigje 27%. Pas 24 muaj trajtimi rezultoi se përgjigja citogjenetike e plotë u arrit në 82% të pacientëve dhe nuk u arrit në 17 % të tyre.

Në studimin për vlerësimin prognostik të pacientëve me LMC të bërë nga Joerg Hasford në Gjermani 2011 rezultoi se me risk të ulët ishin 90% e pacientëve dhe me risk të lartë vetëm 10% ndërsa në muajin 18 të studimit përgjigja citogjenetike e plotë ishte arritur në 77% të pacientëve dhe nuk ishte arritur akoma në 6,5% të tyre (66).

Nga përpunimi statistikor rezulton se koefiçienti i korrelacionit për kariotipin e kryer në muajin 24 dhe vlerësimit sipas EUTOS-it në diagnozë është 0,197. Ky përfundim tregon hapësirën në të cilën dy variablat ndryshojnë në lidhje me njëri-tjetrin në një mënyrë lineare. Të dyja vlerësimet lidhen midis tyre me sinjifikancë sipas vlerës sigma 0,01. Mqs kjo vlerë rezulton në studimin tonë < 0,05 atëherë themi se ky ndryshim është i parëndësishëm nga ana statistikore duke theksuar korrelacionin që ezkziston dhe aftësinë e mirë prognostike të vlerësimit EUTOS.

Rezultatet e dy tabelave të mësipërme për lidhjen e drejtë midis dy vlerësimeve prognostike dhe arritjen e përgjigjeve hematologjike dhe citogjenetike nëpër grupet përkatëse të pacientëve tanë vërtetojnë hipotezën e ngritur për vlefshmërinë e sistemeve prognostike.

3.7 Evolucioni klonal

Në aspektin klinik analiza citogjenetike luan një rol të rëndësishëm jo vetëm në vendosjen e diagnozës, por edhe në vlerësimin e prognozës dhe të anomalive të tjera në kariotipin e pacientit të cilat nuk mund të evidentohen me anën e hibridizimit in situ.
Duke u nisur nga përfundime të studimeve me vlera të mirfillta shkencore (16, 81, 66) ngrehim hipotezën që pacientët e vlerësuar me evolucion klonal ndikojnë direkt në llogaritjen e mbijetesës së pakushtëzuar si edhe nuk kanë një prognozë të mirë gjatë trajtimit me Glivek.
Gjatë fazës kronike të LMC, kromozomi Philadelphia është gjendur në 100% të pacientëve dhe në shumicën e tyre është anomalia citogjenetike e vetme.
Përveç pranisë së tij në kariotipin e dy pacientëve ose në 2,8% të tyre është zbuluar trizomia e kromozomit 8 (Figura 3-4).
Në një pacient (me numër rendor 10) kjo anomali është vënë re që në momentin e vendosjes së diagnozës në 8% të metafazave të vëzhguara, kurse tek pacienti tjetër
(me numër rendor 31) kjo anomali është vënë re pas 12 muaj trajtimi me Glivek në 10% të metafazave.

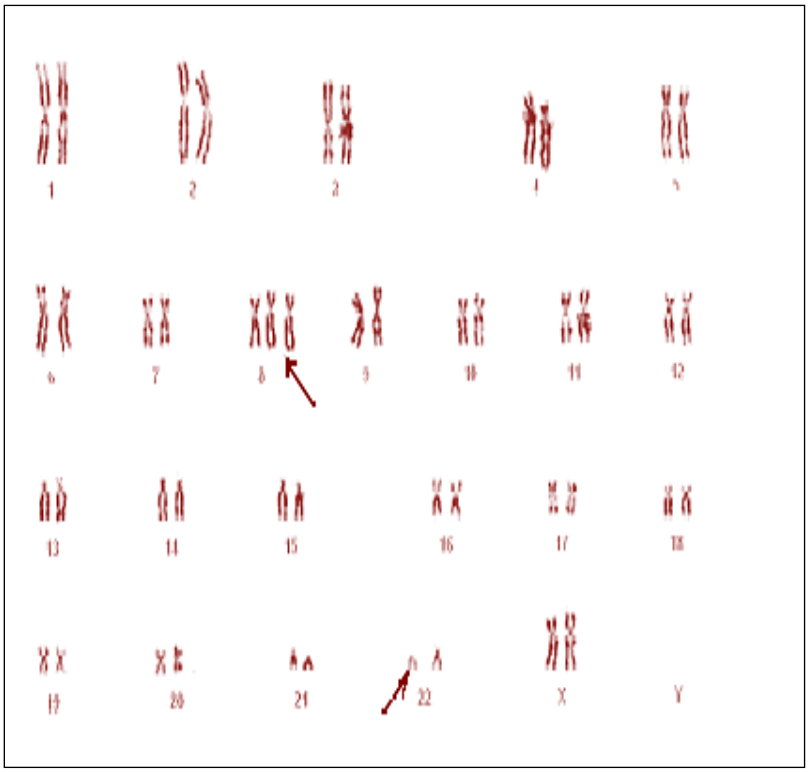


Figura 3-4. Pamja e kariotipit të një pacienti me trizomi të kromozomit 8 dhe prani të kromozomit Ph+

Në kohën e vendosjes së diagnozës është gjendur vetëm në një pacient (me numër rendor 29) ose në 1,4 % të pacientëve kromozomi Philadelphia i dyfishtë. Ky kromozom u gjend në 35% të metafazave të vëzhguara (Figura 3-5).

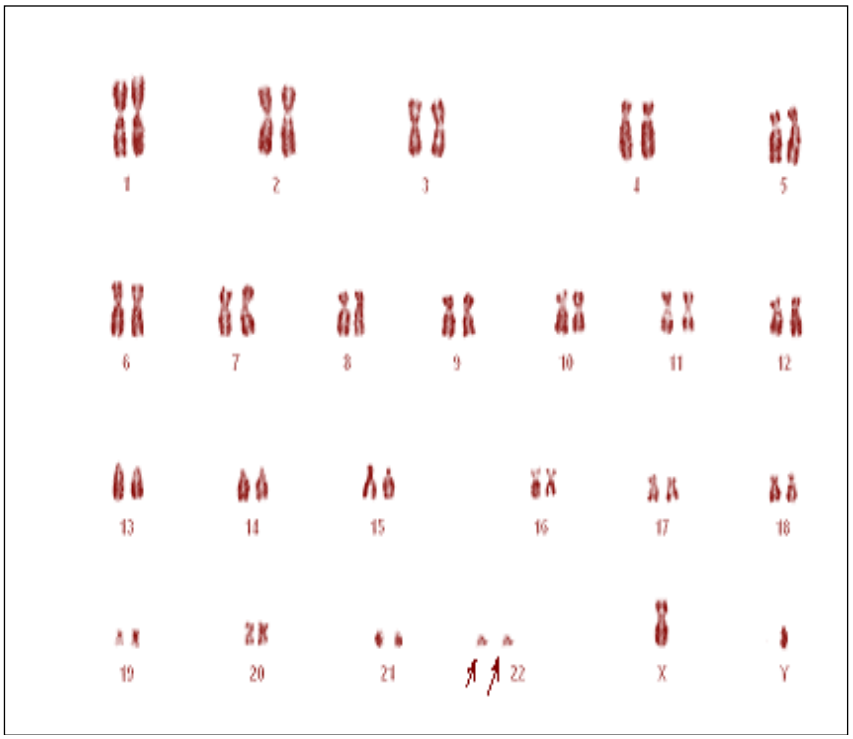
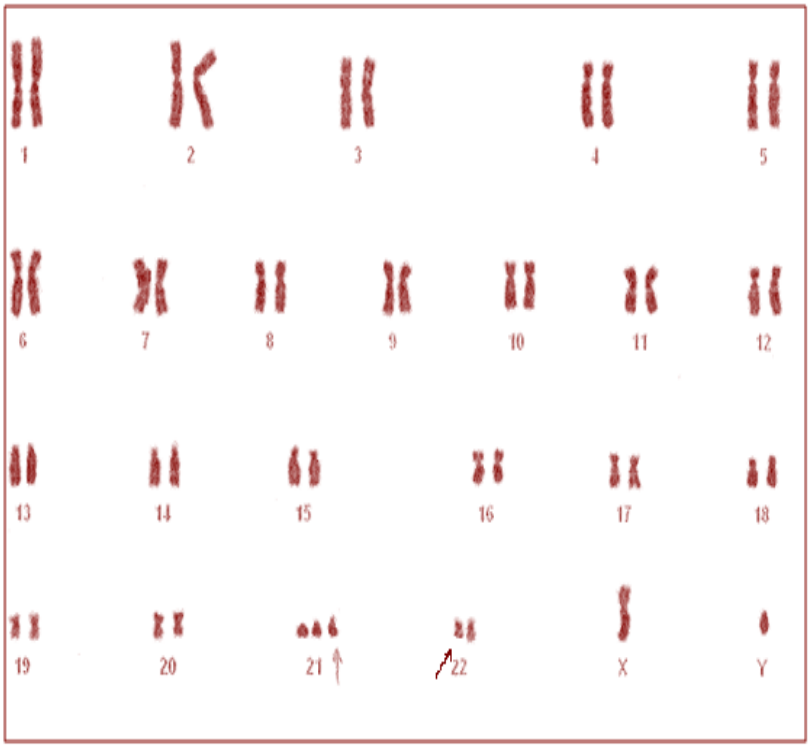
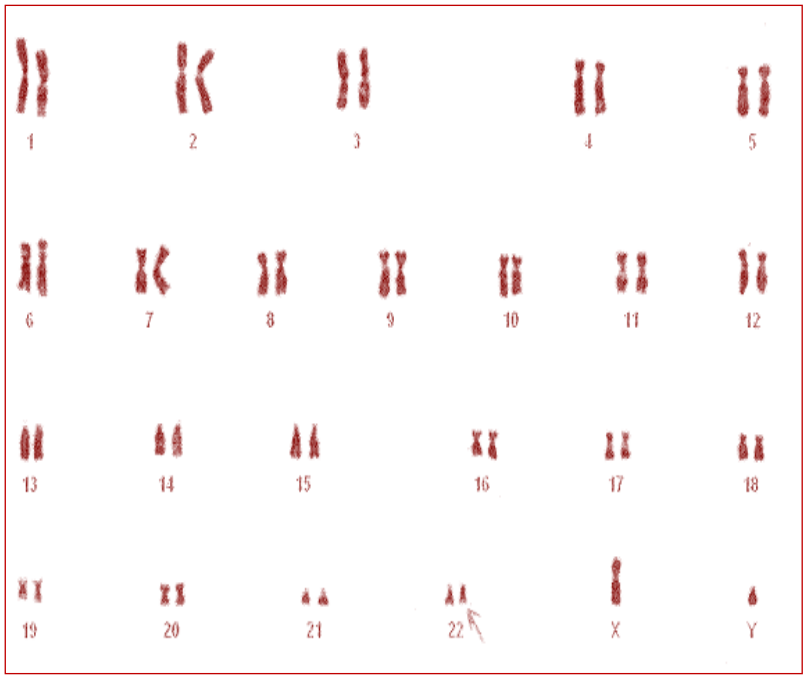


Figura 3-5. Pamje e kariotipit të një pacienti me Ph+ dyfish

Në një pacient (numri rendor 50) ose në 1,4% të pacientëve përveç kromozomit Ph+ është gjendur edhe në 40% të metafazave të vërejtura një kromozom 21 më shumë ose trizomia e kromozomit 21. Dy pamje nga kariotipi i këtij pacienti jepen tek figura 3-6.



a.



b.

Figura 3-6. Pamje e kariotipit të pacientit me kariotipin a. 47 XY, + 21 dhe b. 46 XY, Ph+

Pacienti që ka rezultuar me trizomi të kromozomit 8 në diagnozë për shkak se nuk ka arritur përgjigje hematologjike për 6 muaj trajtim largohet nga studimi ynë për të

vazhduar mjekimin me dozë më të lartë Gliveku dhe për t'u trajtuar si pacient në fazën e akselerimit.

Pacienti me trizomi të kromozomit 8 në muajin 12 të trajtimit tregon për një prognozë jo të mirë nën efektin e medikamentit Glivek. Ky pacient largohet nga kjo skemë trajtimi sepse edhe përgjigja citogjenetike e arritur është minimale në këtë kohë dhe është jo brenda kufijve të vendosur nga ELN-ja për këtë mënyrë trajtimi.

Përveç këtyre pacientëve nga studimi ynë largohen edhe pacientët që kanë pasur trizomi të kromozomit 21 dhe prani të kromozomit Philadelphia të dyfishtë sepse nuk përgjigjen hematologjikisht ndaj dozës 400 mg Glivek/ditë.

Edhe në studime të tjera është vënë re evolucioni klonal; p.sh në studimin e bërë nga Anupam Kaur në Indi trizomia e kromozomit 8 vërehet në 10% të metafazave të vëzhguara kurse trizomia e kromozomit 21 në 40% të tyre (4). Përveç këtyre ndryshimeve në pacientët e këtij studimi janë vënë re edhe qeliza me -7, -17, +1, +22, +19, i(17q) si edhe humbja e kromozomit Y.

Në studimin e Anwar N. në Michigan trizomia 21 është vënë re në 12 % të pacientëve, trizomia 8 në 36% të pacientëve dhe kromozomi Ph+ i dyfishtë në 43% të pacientëve (5). Anomali të tjera shtesë janë edhe +19, i(17q), 17p-, +17, 5q-, inv(16) (p13q22). Në studimin e bërë nga Chin Yuet Meng me pacientët malajziane në momentin e vendosjes së diagnozës rezultuan 14,9% e pacientëve me evolucion klonal (28).

Sipas studimit të Mitelman 1993 anomalitë e tjera përveç kromozomit Ph+ mund të jenë prezente që në momentin e vendosjes së diagnozës në 7-8% të rasteve (81). Në studimin tonë evolucioni klonal ka rezultuar në 5,7% të pacientëve dhe që në momentin e vendosjes së diagnozës në 4,2% të pacientëve.

Në pacientët e studimit tonë kur këto anomali gjenden në momentin e diagnozës evolucioni klonal flet për një evolucion të rëndësishëm të sëmundjes së LMC drejt stadeve më të avancuara të saj, ndërsa kur anomalitë shfaqen gjatë trajtimit me Glivek flitet për prognozë jo të mirë të pacientit.

Në studimin e Béla Kajtár në 2011 është theksuar se pacientët të cilët kanë qënë rezistentë ndaj dozës 400 mg Glivek/ditë kanë shfaqur evolucionin klonal (16). Edhe në studimin tonë si u diskutua më sipër 4 prej pacientëve rezistentë ndaj kësaj doze të përdorur të Glivekut kanë rezultuar me evolucion klonal.

Evolucioni klonal është konsideruar edhe në studimin e Joerg Hasford 2010 si një nga faktorët negativë në termat e mbijetesës prandaj pacientët e vlerësuar me evolucion klonal meqënëse largohen nga studimi ynë ndikojnë direkt në llogaritjen e mbijetesës së pakushtëzuar (66).

Këto përfundime vërtetojnë hipotezën që kishim menduar duke theksuar se evolucioni klonal është negativ për sa i përket prognozës dhe mbijetesës së pakushtëzuar të këtyre pacientëve.

Për këta pacientë edhe vlerësimet e llogaritura nga formula e Sokal-it edhe EUTOS-it tregojnë për prognozë jo të mirë, gjë e cila lidhet me një vlerësim shumë të mirë sipas të dy sistemeve.

3.8 Arritja e përgjigjeve citogjenetike molekulare në bazë të kryerjes së teknikës FISH

Për të verifikuar diagnozën si edhe për monitorimin e pacientëve me LMC përdoren edhe teknika të tjera të citogjenetikës molekulare si hibridizimi in situ me fluoreshencë (FISH). Sipas studimit të Nicoletta Testoni për secilin pacient janë analizuar mesaratisht 300 bërthama në interfazë duke evidentuar riorganizimin BCR-ABL në kromozomin Philadelphia në stadin e interfazës (91).

Roli i FISH-it në monitorimin e pacientëve me LMC është plotësimi i informacionit prognostik të vendosur nga analiza e kariotipit. Për të zbuluar këtë rol rezultatet e nxjerra nga FISH-i janë krahasuar me ato të kariotipit, duke qënë se kjo është një metodë studimi më e shpejtë dhe më e ndjeshme në monitorimin e përgjigjeve të terapisë. Nëpërmjet rezutateve të nxjerra nga teknika e FISH-it kërkojmë të vërtetojmë hipotezën që pacientët e vlerësuar me përgjigje citogjenetike të plotë nga teknika e kariotipit kanë arritur edhe përgjigje citojenetike molekulare të plotë të vlerësuar nga FISH-i.

Për shkak të kostos së lartë dhe të pamundësisë për t'u kryer në vendin tonë kjo teknikë realizohet vetëm një herë për secilin pacient pas 12 muaj trajtim me Glivek në laboratorin Intermedica në Athinë/ Greqi me dy sonda VYSIS LSI BCR/ABL dhe përfundimet jepen tek tabela e mëposhtme.

Tabela 3-19. Arritja e përgjigjeve citogjenetike të plota dhe citogjenetike molekulare pas vitit të parë të mjekimit

Përgjigja	**Muaji 12**	
	Numri i pacientëve	**%**
Citogjenetike e plotë Kariotip - 0 % metafazave Ph+	46	65,7
Citogjenetike molekulare e plotë FISH - negative për bcr/abl	42	60
Citogjenetike molekulare madhore FISH - klone pozitive deri në 1% për bcr/abl	4	5,7

Përgjigja citogjenetike molekulare e plotë në muajin 12 është arritur në 60% të pacientëve, krahasuar me 65,7% të pacientëve me përgjigje citogjenetike të plotë nga teknika e kariotipit. Përgjigja citogjenetike molekulare madhore është arritur në 4 pacientë ose në 5,7% të tyre ku riorganizimi gjenetik BCR-ABL është gjetur në përqindjet 0,1-1% të interfazave të analizuara.

Në studime të tjera përgjigja citogjenetike molekulare e plotë gjendet në vlerat 56%, 25%, 63% (41, 23, 85).

Lidhja e detajuar që ekziston midis vlerësimit të kariotipit dhe FISH-it për pacientët e studimit tonë jepet tek tabela 3-20.

Tabela 3-20. Shpërndarja e rezultateve të nxjerra nga kariotipi në lidhje me përgjigjet e FISH-it në fund të vitit të parë të trajtimit

Numri i pacientëve me përgjigje citogjenetike nga kariotipi	Përgjigje citogjenetike molekulare me FISH					
	0/% BCR-ABL	< 1% BCR-ABL	1,1-5% BCR-ABL	5,1-20% BCR-ABL	20,1-50% BCR-ABL	>50,1% BCR-ABL
E plotë 46	42/46 91,3%	4/46 8%	-	-	-	-
Pjesshme 13	-	-	-	4/13 30,7%	9/13 69%	-
Madhore 59	42/59 71,1%	4/59 6,7%	-	4/59 6,7%	9/59 15,2%	-
Minore -	-	-	-	-	-	-
Minimale 5	-	-	-	-	-	5/5 100%
Pa përgjigje -	-	-	-	-	-	-

Në studimin tonë 91,3% e pacientëve që kanë arritur përgjigje citogjenetike të plotë me kariotip kanë arritur edhe me FISH përgjigje citogjenetike molekulare të plotë. Në studimin e Italisë së Nicoletta Testoni në 2009 nga analiza e citogjenetikës molekulare ka rezultuar se vetëm 82 % e pacientëve që kanë arritur përgjigjen citogjenetike të plotë kanë arritur edhe përgjigje citogjenetike molekulare të plotë (91). Kjo shifër më e ulët në këtë studim është edhe për shkak të numrit më të madh të pacientëve me LMC të përfshirë në studimin e Italisë, 664 pacientë krahasuar me 70 pacientë të studimit tonë.

Një pamje e FISH-it që evidenton bërthama fiziologjike dhe bërthama me translokacionin BCR-ABL jepet tek figura 3-7.

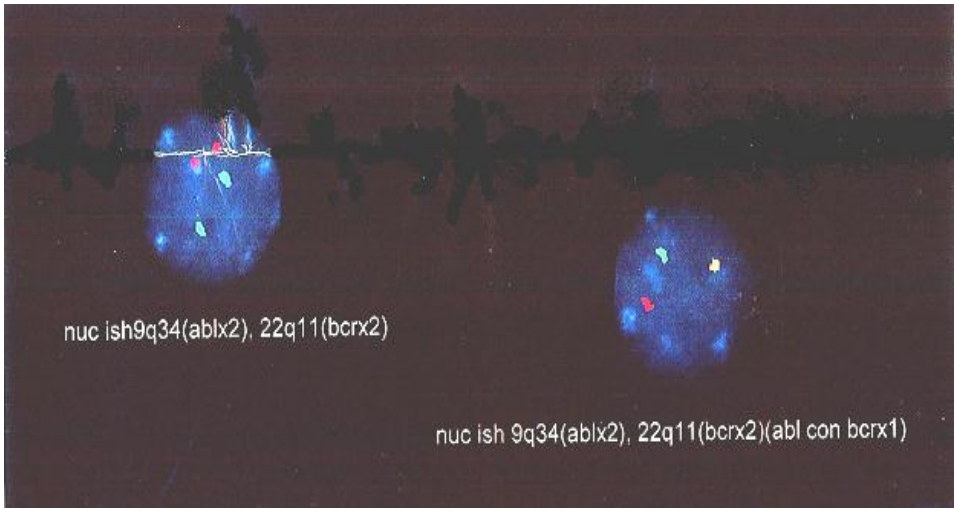


Figura 3-7. Pamje e FISH-it për një pacient i cili ka bërthama fiziologjike (majtas) dhe me translokacionin BCR-ABL (djathtas)

Bërthamat fiziologjike identifikohen me praninë e 4 shenjave fluoreshente, 2 me ngjyrë jeshile që evidentojnë praninë e kromozomeve 9 dhe 2 shenja të kuqe për kromozomet 22.
Bërthamat ku është i pranishëm translokacioni BCR-ABL kanë një shenjë jeshile, një të kuqe dhe një të verdhë për praninë e translokacionit.
Tek figura 3-8 jepet pamja e dy bërthamave me translokacionin BCR-ABL.

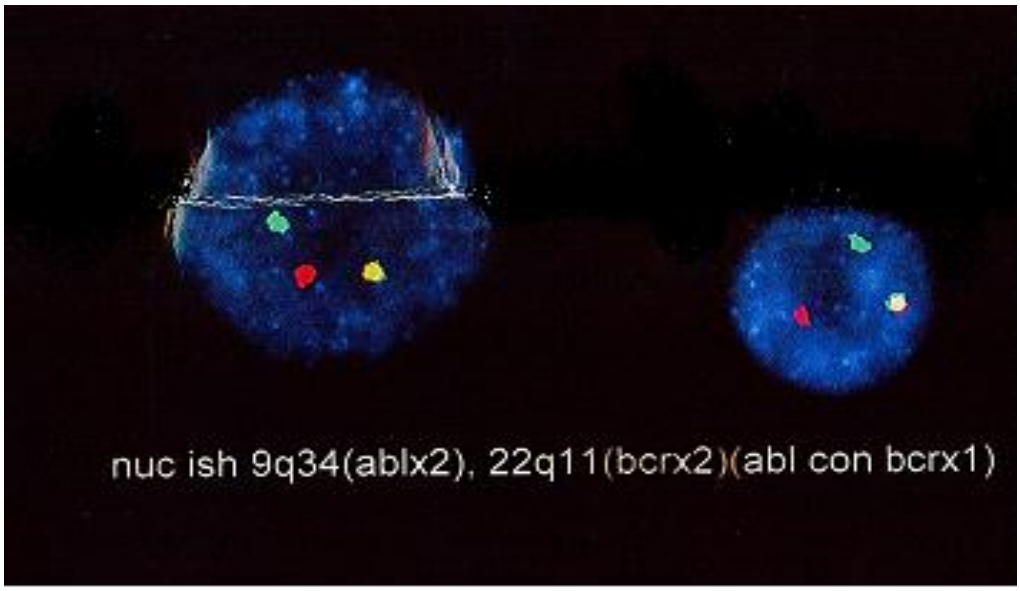


Figura 3-8. Pamje nga FISH-i i një pacienti të studimit tonë me bërthama në interfazë të cilat përmbajnë translokacionin BCR-ABL

Përveç translokacionit BCR-ABL nga analiza e FISH-it në muajin 12 është vërejtur trizomia e gjenit ABL në dy pacientë ose në 2,8% të tyre.

Në një pacient (me numrin rendor 8) nga analiza e FISH-it ka rezultuar se nga 100 bërthama të vërejtura:

- 12 bërthama janë gjetur me 4 shenja fluoreshente (2 të kuqe dhe 2 jeshile që tregojnë për bërthama fiziologjike), 9q34(ABLx2), 22q11(BCRx2).
- 24 bërthama vërehen me 5 shenja fluoreshente (3 të kuqe dhe 2 jeshile) që shfaqin trizominë në zonën ABL, 9q34(ABLx3), 22q11(BCRx2).
- 16 bërthama janë gjetur me dy shenja fluoreshente të bashkuara që shfaqin translokacionin që skematizon hibridin BCR-ABL, 9q34(ABLx2), 22q11(BCRx2), (ABL me BCRx1).
- 48 bërthama vërehen me 2 shenja fluoreshente të bashkuara kuqe-jeshil dhe një shenjë tjetër e kuqe që shfaq trizominë e zonës BCR-ABL, 9q34(ABLx3), 22q11(BCRx2), (ABL me BCRx1).

Nga kjo analizë rezulton se pacienti është pozitiv për hibridin BCR-ABL në sasinë 64% dhe pozitiv për trizominë e gjenit ABL në sasinë 72% të bërthamave të vërejtura.

Në pacientin tjetër (me numër 31) janë studiuar 100 bërthama dhe ka rezultuar se;

- në 23 bërthama janë vërejtur 4 shenja fluoreshente (2 të kuqe dhe 2 jeshile) që tregojnë bërthama fiziologjike, 9q34(ABLx2), 22q11(BCRx2).

- në 25 bërthama vërehen 5 shenja fluoreshente (3 të kuqe dhe 2 jeshile) që shfaqin trizomi të zonës ABL, 9q34(ABLx3), 22q11(BCRx2).
- në 18 bërthama vërehen 2 shenja të bashkuara fluoreshente kuqe-jeshile që shfaqin translokacionin që skematizon hibridin, 9q34(ABLx2), 22q11(BCRx2), (ABL me BCRx1).
- në 34 bërthama vërehen 2 shenja fluoreshente të bashkuara e kuqe-jeshile për tranlokacionin dhe një shenjë e kuqe që shfaq trizominë e kromozomit 9, 9q34(ABLx3), 22q11(BCRx2), (ABL me BCRx1).

Nga kjo analizë rezultoi se pacienti është pozitiv për hibridin BCR-ABL në sasinë 52% dhe pozitiv për trizominë e gjenit ABL në sasinë 59%.
Meqënëse në muajin 12 këta pacientë janë të vlerësuar me përgjigje citogjenetike minimale, në bazë të kritereve të ELN largohen nga kjo skemë mjekimi.
Një pamje e nxjerrë nga teknika FISH për pacientët me trizominë e gjenit ABL dhe praninë e translokacionit BCR-ABL është dhënë tek figura 3-9.

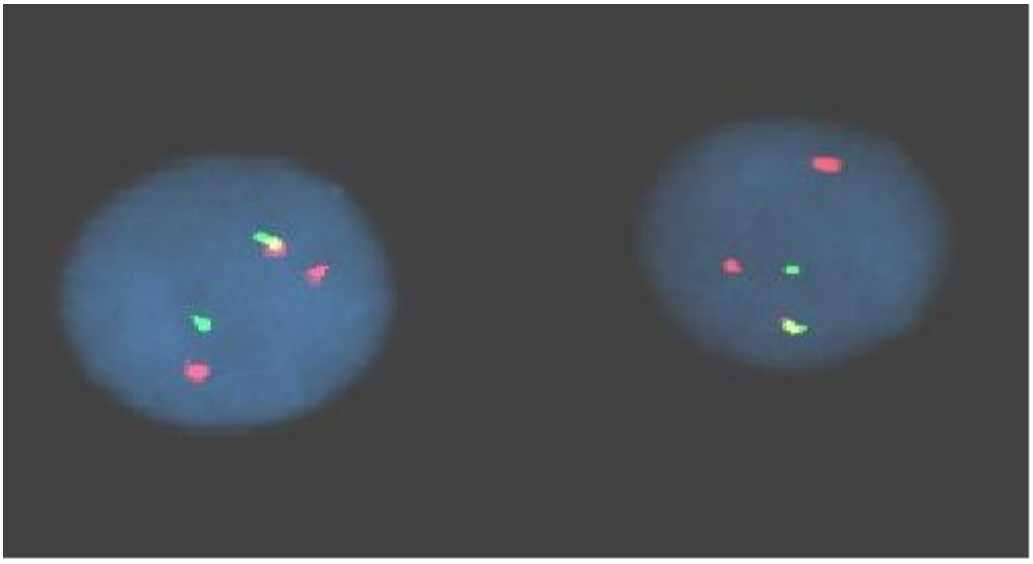


Figura 3-9. Pamje e FISH-it me riorganizimet BCR-ABL dhe me trizominë e gjenit ABL tek një pacient i studimit tonë

Një pamje e FISH-it për përgjigje citogjenetike molekulare komplete është dhënë tek figura 3-10.

Në studimin tonë është gjetur një korrelacion i ngushtë ndërmjet kariotipit dhe FISH-it në muajin 12 ashtu sikurse ne edhe e prisnim, i cili rezulton me koefiçientin e korrelacionit të Pearsonit r^2= 0,987 dhe vlera p = 0,01. Ky korrelacion theksoi se përqindja e bërthamave BCR-ABL+ ishte proporcionale me përqindjen e metafazave Ph+ tek pacientët e studimit tonë në fazën kronike të LMC.

Koefiçienti i korrelacionit të Pearsonit "r" është madhësia e shpërndarjes së pikave rreth një boshti linear ashtu si duket edhe tek grafiku i mëposhtëm ku mqs korrelacioni midis dy variablave është pothuajse maksimal =1 edhe shpërndarja e pikave siç duket nga grafiku linear është minimale

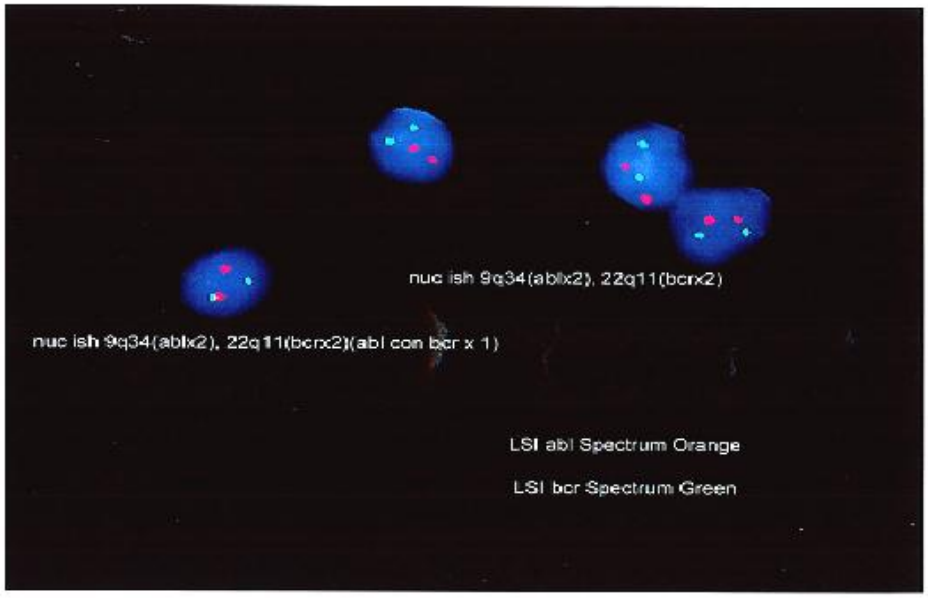


Figura 3-10. Pamje nga FISH me dy sonda LSI BCR-ABL i një pacienti të studimit tonë që ka arritur përgjigjen komplete citogjenetike molekulare

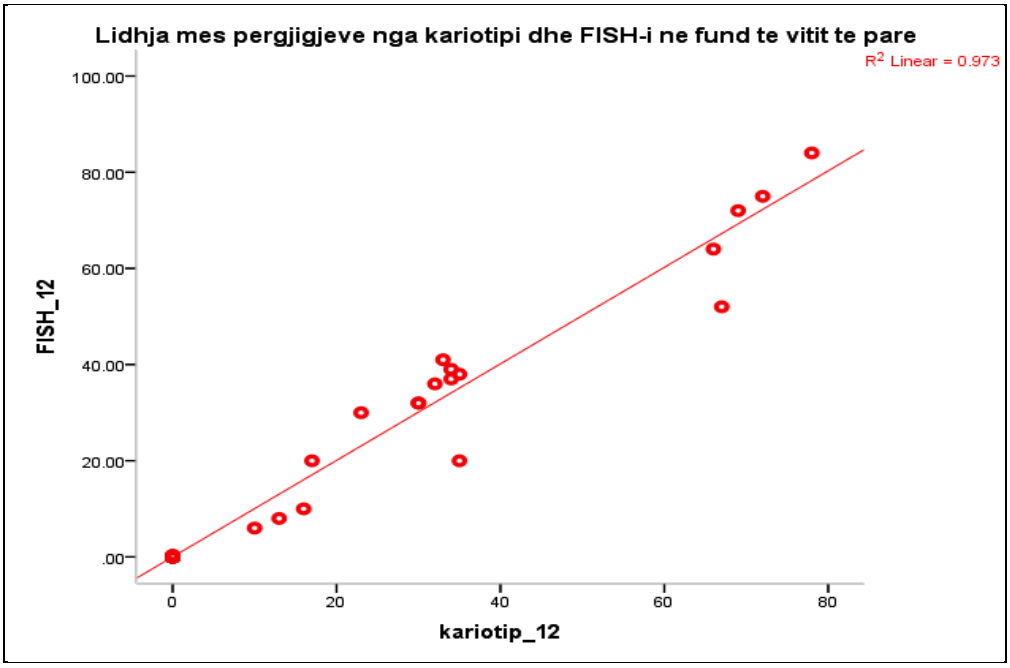


Figura 3-11. Korrelacioni ndërmjet kariotipit dhe FISH-it në muajin 12

Përfundimi ynë për lidhjen e dy metodave të përdorura është i përafërt me rezultatet e studimeve të tjera; r^2= 0,89; 0,98; 0,86 dhe 0,95 (91, 118, 23, 85).

Në ndryshim nga kariotipi, FISH-i analizon edhe qelizat në interfazë, duke analizuar kështu një numër më të madh bërthamash afërsisht 300 krahasuar me 20-30 metafaza të analizuara nga kariotipi. Kjo cilësi e bën FISH-in një teknikë me ndjeshmëri dhe besueshmëri më të lartë krahasuar me teknikën e kariotipit.

Meqënëse kjo teknikë analizon një numër më të madh qelizash ekziston mundësia që me anën e saj të zbulohen translokacione kriptike midis kromozomeve 9 dhe 22 duke gjetur riorganizime BCR-ABL+ të cilat nuk mund të vrojtohen me kryerjen e analizës citogjenetike standarte.

Në studimin tonë aftësia më e lartë zbuluese e FISH-it vihet re në 4 pacientë ose 5,7% (respektivisht me numrat 6, 18, 40, 48) të cilët kanë qënë me përgjigje citogjenetike të plotë nga kariotipi. Nga kryrja e teknikës së citogjenetikës molekulare tek këta pacientë është evidentuar riorganizimi BCR-ABL+ në përqindjet e mëposhtme; 0,3%, 0,2%, 0,1% dhe 0,3% duke i klasifikuar këta pacientë me përgjigje citogjenetike madhore molekulare.

Rezultatet e mësipërme vërtetojnë hipotezën e ngritur për korrelacionin e lartë midis dy teknikave të përdorura.

Në studimin e kryer në Gjermani në 2002 nga Schoch. C u vrojtua translokacioni kriptik në 20 pacientë tek të cilët riorganizimi gjenetik BCR-ABL+ gjendej në vlerat 0,2 – 10% të bërthamave të numëruara (23).

Aftësia e lartë zbuluese e FISH-it është vënë re edhe në studimin e Francës së vitit 2000 nga Steven Le Gouill në 40% të pacientëve (118).

Kosto për reagentët e teknikës FISH është më e lartë në krahasim me koston e reagentëve të kariotipit.

Pavarësisht numrit të ulët të metafazave të analizuara kariotipi konsiderohet si një teknikë mjaft e rëndësishme për monitorimin e pacientëve ku gjendet edhe prezenca e anomalive të tjera kromozomike të cilat me teknikën FISH nuk mund të vlerësohen.

Shpërndarja e pacientëve sipas arritjes së përgjigjeve citogjenetike të plota molekulare dhe grupeve të mundësisë për prognozë jo të mirë sipas Sokal-it jepet tek tabela 3-21.

Tabela 3-21. Arritja e përgjigjeve citogjenetike të plota molekulare në grupet e pacientëve të vlerësuara sipas Sokal-it pas vitit të parë të trajtimit

Grupimi sipas Sokal-it	**Përgjigje citogjenetike molekulare e plotë muaji 12**	
	Numri i pacientëve	**%**
I ulët	20/25	80
Mesatar	5/7	71,4
I lartë	17/38	44,7

Nga ky studim ka rezultuar se 80% e pacientëve me mundësi të ulët sipas Sokal-it për prognozë jo të mirë janë përgjigjur në mënyrë të plotë molekulare, po kështu 71,4% dhe 44,7% e pacientëve me mundësi mesatare dhe të lartë sipas Sokal-it e kanë arritur këtë përgjigje.

Lidhja e vlerësimit të EUTOS-it dhe arritjes së përgjigjeve të citogjenetikës molekulare është dhënë tek tabela 3-22.

Tabela 3-22. Arritja e përgjigjeve citogjenetike molekulare të plota në grupimin sipas sistemit EUTOS pas vitit të parë të trajtimit

Grupimi sipas EUTOS-it	Përgjigje citogjenetike molekulare e plotë muaji 12	
	Numri i pacientëve	%
I ulët	34/51	66,6
I lartë	8/19	42,1

Sipas vlerësimit EUTOS 66,6% e pacientëve të vlerësuar me mundësi të ulët për të mos arritur përgjigje të plotë citogjenetike në fund të muajit 24 kanë arritur përgjigje citogjenetike molekulare të plotë.
Këto rezultate theksojnë akoma më shumë se vlerësimi i Sokal-it dhe EUTOS-it janë vlerësime të mira prognostike për pacientët me LMC në fazën kronike dhe se

përqindja e pacientëve të vlerësuar me mundësi të ulët sipas Sokal-it dhe EUTOS-it që kanë arritur përgjigje citogjenetike molekulare të plota është më e lartë se ajo e pacientëve të grupeve të tjera.

3.9 Arritja e përgjigjeve molekulare me anën e Real Time-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Në Shërbimin e Hematologjisë në QSUT ndjekja e pacientëve me LMC në vitin e fundit po kryhet me anën e RT-PCR. Kjo teknikë evidenton BCR-ABL+ minimale që kanë mbetur pas trajtimit me terapinë e Glivekut pasi qëllimi kryesor i kësaj terapie është arritja e përgjigjes molekulare të plotë. PCR-ja ka sensitivitet më të lartë krahasuar me teknikat e përdorura më parë dhe zbatohet vetëm në rastet kur pacienti ka arritur përgjigje citogjenetike të plotë me kariotip. Me anën e kësaj teknike arrihet të verifikohet diagnoza e pacientit e vendosur në bazë të kariotipit dhe jepet një vlerësim më i saktë për prognozën e secilit pacient. Kjo teknikë kryhet në laboratorin mjekësor “Labdia” në Vjenë të Austrisë.

Duke u nisur nga vlerat e shkëlqyera që ka dhënë trajtimi me Glivek në arritjen e pëgjigjes molekulare të vlerësuar nga PCR-ja për monitorimin e pacientëve me LMC në studime shkencore të tjera, formulojmë edhe për studimin tonë hipotezën që pacientët e vlerësuar me përgjigje citogjenetike nga kariotipi dhe citogjenetike molekulare të plotë nga FISH-i arrijnë edhe përgjigje molekulare në nivele të konsiderueshme për të njëjtat periudha kohore (20, 49, 41, 125, 130, 86, 126, 105).

Në figurën 3-12 jepet vlera e riorganizimit gjenetik BCR-ABL të gjetur tek një pacient me LMC nga PCR-ja.

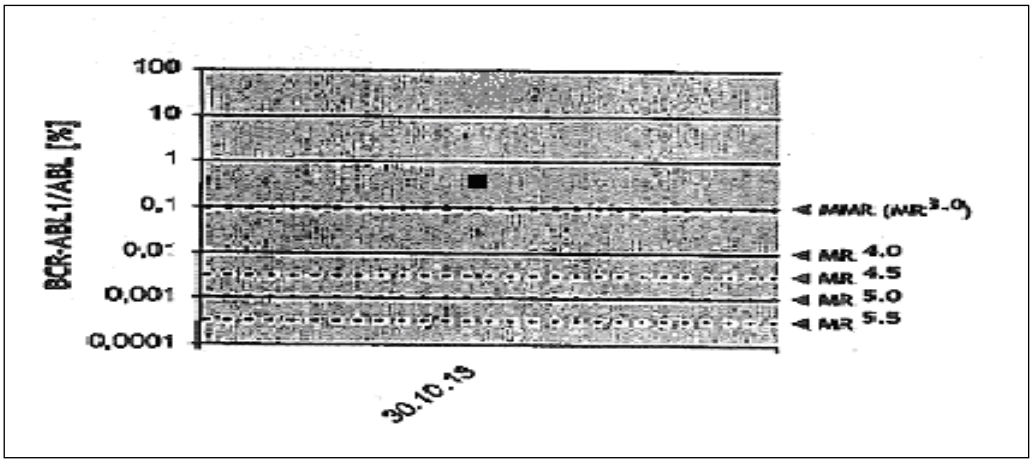


Figura 3-12. Skema e PCR-së e kryer për një pacient të studimit tonë

Nqs vlera e BCR-ABL/ABL del nën vlerën 0,1 ose me shkallë internacionale log-3 atëherë pacienti ka arritur përgjigje molekulare e cila do të jetë e plotë vetëm kur kjo vlerë del e barabartë me 0% riorganizime BCR-ABL.
Nqs vlera është > se log-3 atëherë pacienti nuk ka arritur përgjigje molekulare dhe nuk trajtohet me Glivek, por fillon mjekimin me Tasigna.
Arritja e përgjigjeve molekulare në lidhje me rezultatet e FISH-it jepet tek tabela 3-23.

Tabela 3-23. Korrelacioni ndërmjet përgjigjes citogjenetike molekulare të vlerësuar nga FISH-i dhe përgjigjes molekulare të vlerësuar nga PCR-ja

		FISH			
Përgjigje citogjenetike e plotë	**Përgjigje molekulare**	**0% bcr-abl**		**<0,1% bcr-abl**	
		Nr	**%**	**Nr**	**%**
46	Pozitive 25/70 ose 35,7%	25	100	-	-
	Negative 21/70 ose 30%	17/21	80,9	4/21	19

Përgjigja molekulare e përcaktuar me anën e teknikës PCR mund të përdoret si një parametër për vlerësimin afatgjatë të pacientëve të trajtuar me Glivek.

Në tabelën e mësipërme duket qartë se vetëm 35,7% e pacientëve të studimit tonë që kanë pasur përgjigje citogjenetike të plotë kanë arritur edhe përgjigje molekulare (shtojca 6) ku vlera e riorganizimit gjenetik BCR-ABL është nën vlerën 0,1 ose log 3. 100% e këtyre pacientëve kanë qënë me përgjigje citogjenetike molekulare të vlerësuar nga FISH-i.

Analiza statistikore jep korrelacionin midis përgjigjeve citogjenetike të vlerësuara nga kariotipi dhe përgjigjeve molekulare nga teknika PCR me sinjifikancë 0,08 dhe koefiçient korrelacioni sipas Pearsonit r^2= 0,521 që tregon se midis dy metodave të përdorura nuk ka korrelacion. Ndryshimet në rezultatet e nxjerra nga analiza e

kariotipit dhe e PCR-së theksojnë edhe më shumë ndjeshmërinë më të lartë të PCR-së krahasuar me kariotipin.

Nga analiza statistikore është parë edhe lidhja që ekziston midis përgjigjeve citogjenetike molekulare të muajit 12 të nxjerra nga FISH dhe përgjigjeve molekulare të vlerësuara nga PCR-ja. Është gjendur koeficienti i korrelacionit të Pearsonit në shifrën 0,346 me sinjifikancë 0,06 që do të thotë se nuk kemi korrelacion nga ana statistikore midis dy metodave të përdorura. Këto përfundime theksojnë ndjeshmërinë më të lartë të teknikës së biologjisë molekulare (PCR) krahasuar me teknikën e citogjenetikës molekulare (FISH) për vlerësimin e riorganizimit gjenetik BCR-ABL.

Duke parë përfundimet e mësipërme hipoteza e formuluar nuk vërtetohet për të gjithë pacientët e studimit tonë, dhe kjo ndodh pikërisht nga ndjeshmëria më e lartë e PCR-së krahasuar me kariotipin dhe FISH-in.

Në tabelën 3-24 jepet arritja e përgjigjes molekulare në studime të tjera (20, 41, 49, 86, 105, 125, 126, 130) për pacientët me LMC.

Tabela 3-24. Përgjigjet molekulare të vlerësuara nga autorë të ndryshëm

Studimi	Numri i pacientëve	Përgjigja molekulare %
Roko D. 2013 Shqipëri	70	35,7
IRIS 2006 USA[20]	553	53
Gupta A. 2006 Indi [49]	16	37,5
Castagnetti F. 2009 Itali [41]	78	69
Vaneuza A. 2005 Brazil [125]	98	9
Zhao Y. 2009 Kinë [130]	116	54,9
Nannya Y 2008 Japoni [86]	35	50
Bilen Y. 2012 Turqi [126]	31	85
Philippe R.2012 Francë[105]	29	51,7

Nga 25 pacientët e vlerësuar me mundësi të ulët sipas Sokal-it përgjigjen molekulare e kanë arritur 17 pacientë, për mundësinë mesatare me përgjigje molekulare janë vlerësuar 2 nga 7 pacientë dhe për grupin me mundësi të lartë kemi 6 nga 38 pacientë.

Sipas vlerësimit EUTOS përgjigjen molekulare nga rezultatet e PCR-së e arrijnë 22 nga 51 pacientët e vlerësuar me mundësi të ulët sipas sistemit EUTOS kurse nga 19 pacientët e vlerësuar nga sistemi EUTOS me mundësi të lartë përgjigjen molekulare e arrijnë vetëm 3 pacientë.

Të dyja vlerësimet e mësipërme na rezultuan të vlefshme për përcaktimin e përgjigjes molekulare në pacientët me LMC.

3.10 Arritja e përgjigjeve optimale, suboptimale dhe dështimeve gjatë dy viteve trajtim me Glivek

Në tabelën 3-25 jepet klasifikimi i pacientëve sipas arritjes së përgjigjes optimale, suboptimale dhe dështimeve në fundin e vitit të parë dhe të dytë të trajtimit me medikamentin Glivek (10).

Tabela 3-25. Shpërndarja e pacientëve sipas arritjes së përgjigjeve optimale, suboptimale dhe dështimeve gjatë dy viteve të trajtimit me Glivek

Periudha kohore	Përgjigje optimale		Përgjigje suboptimale		Dështime	
	Nr	%	Nr	%	Nr	%
Muaji 12	46	65,7	13	18,5	11	15,7
Muaji 24	25	35,7	21	30	24	34,2

Në muajin 12 përgjigjen optimale e kanë arritur 46 pacientë të cilët deri në këtë periudhë kohore kanë arritur përgjigjen citogjenetike të plotë, kurse në muajin 24 e arrijnë këtë përgjigje vetëm 25 pacientë që kanë arritur përgjigjen molekulare (të plotë dhe madhore). Ashtu si duket edhe në tabelën e mësipërme numri i pacientëve me përgjigje optimale nga muaji 12 në 24 ulet për shkak të ndjeshmërisë më të lartë të PCR-së krahasuar me FISH-in për vlerësimin e përqindjes së BCR-ABL+ të gjetur në gjakun periferik.

Në muajin 12 me përgjigje suboptimale vlerësohen 13 pacientë që kanë arritur përgjigje të pjesshme citogjenetike. Tek ky grup pacientësh u aplikua doza e Glivekut më e lartë se 400 mg/ditë.

Në muajin 24 me këtë përgjigje vlerësohen 21 pacientë të cilët nuk kanë arritur përgjigje molekulare. Për këta pacientë në bazë të vlerës të BCR-ABL+ të gjetur (> 0,1) me PCR duhet ndryshuar skema e mjekimit. Ata duhen trajtuar me inhibitor të tirozin kinazës së gjeneratës së dytë.

Pacientët e dështuar në muajin 12 janë 11 ose 15,7% e pacientëve të cilët deri në këtë periudhë kohore nuk kanë arritur përgjigje hematologjike dhe citogjenetike madhore. Në muajin 24 klasifikohen si të dështuar 24 pacientë të cilët duke iu referuar muajit 12 nuk kanë arritur përgjigje citogjenetike të plotë.

Koha e arritjes së këtyre përgjigjeve jo gjithmonë ndikon në vlerësimin e prognozës së pacientëve megjithatë sipas studimit të Assouline S. të Universitetit të Torontos pacientët të cilët nuk i arrijnë këto përgjigje në kohën e përcaktuar kanë mundësi të lartë për prognozë jo të mirë në sëmundjen e LMC (7).

3.11 Analiza për mbijetesën e përgjithshme dhe mbijetesën e pakushtëzuar

Mbijetesa e përgjithshme në studimin tonë në fundin e vitit të parë dhe të dytë të trajtimit me Glivek rezulton 100%. Kjo mbijetesë varet nga gjëndja e përgjithshme e pacientit, nga progresioni i sëmundjes, doza e medikamentit të marrë prandaj në studime të tjera kjo shifër nuk është maksimale. Kështu p.sh në studimin e Oyekunle. AA në Nigeri mbijetesa e përgjithshme për muajt 12 dhe 24 është 99% dhe 94% (95).

Për të nxjerrë rezultatin e mbijetesës së pakushtëzuar (mosarritja e përgjigjeve sipas standarteve të vendosura nga ELN, progresioni i sëmundjes, vdekjet nga ndonjë shkak, humbja e përgjigjes hematologjike të plotë, humbja e përgjigjes madhore citogjenetike ose ndërprerja e trajtimit me Glivek) i referohemi tabelës 3-26.

Tabela 3-26. Monitorimi i pacientëve për arritjen e mbijetesës së pakushtëzuar

Muaji i monitorimit të pacientit	Fillojnë trajtimin (pacientë)	E lënë trajtimin	Ndryshojnë dozën e mjekimit	Vazhdojnë trajtimin
0	70	0	0	70
6	70	6	0	64
12	64	5	13	59
24	59	1	0	58

Në mënyrë të përmbledhur do të theksonim se nga 70 pacientë që u përfshinë në studim e ndërprenë atë për arsye të mosarritjes së përgjigjes hematologjike 6 pacientë (8,5%) në muajin e 6 të trajtimit, 5 pacientë (7,1%) që nuk fituan përgjigje citogjenetike të pjessshme pas 12 muaj trajtimi dhe 1 pacient (1,4%) në fund të muajit 24 sepse nuk fitoi përgjigje të plotë citogjenetike. Gjithsej largohen nga ky studim 12 pacientë ose 17 % krahasuar me 28% të studimit IRIS (20).

6 pacientët që largohen në muajin e 6 të trajtimit janë cilësuar si rezistentë fillestarë të terapisë. Kjo rezistencë mund të vijë nga ndonjë mutacion pikëzor brenda zonës BCR-ABL kinazik që interferon me lidhjet e Glivekut dhe për pasojë nuk arrihet përgjigja hematologjike.

Një arsye tjetër mund të jetë edhe bashkëveprimi i Glivekut me medikamente të tjera, por kjo në pacientët tanë rezistentë nuk mund të ndodhë pasi ata nuk kanë marrë mjekime të tjera më parë dhe nuk marrin tjetër medikamet përveç Glivekut gjatë kohës së trajtimit për LMC.

Pacientë që kanë humbur përgjigjet gjatë regresionit të sëmundjes (rezistentë sekondare) ose me rezistencë të fituar nuk janë evidentuar.

Deri në fundin e muajit 24 vetëm 58 pacientë ishin të përfshirë në studim ose 72% krahasuar kjo shifër me 69% të studimit IRIS. Në 51 pacientë ose 72,8% doza e marrë e Glivekut është sa ajo e fillimit 400 mg/ditë krahasuar kjo me 82% të pacientëve të studimit IRIS dhe me 47% të studimit të Joerg Hasford në Gjermani (19, 66).

Mbijetesa e pakushtëzuar në muajin e 12 dhe 24 nga studimi ynë rezultoi 84,2% dhe 82,8%, ndërsa në studimin e Nigerisë nga Oyekunle. AA këto mbijetesa janë 95% dhe 83% (95).

Në tabelën 3-27 dhe grafikun e mëposhtëm jepet shpërndarja e pacientëve sipas grupimit të Sokal-it në lidhje me mbijetesën e pakushtëzuar.

Tabela 3-27. Lidhja e vlerësimit të Sokali-it në mbijetesën e pakushtëzuar

		Mbijetesa e pakushtëzuar		
		Po	Larguar	Total
Sokal	> 1.2	27	11	38
		37.14%	15.71%	52.86%
	0.8-1.2	6	1	7
		8.57%	1.43%	10.00%
	<0.8	25	0	25
		37.14%	0.00%	37.14%
Total		58	12	70
		82.86%	17.14%	100.00%

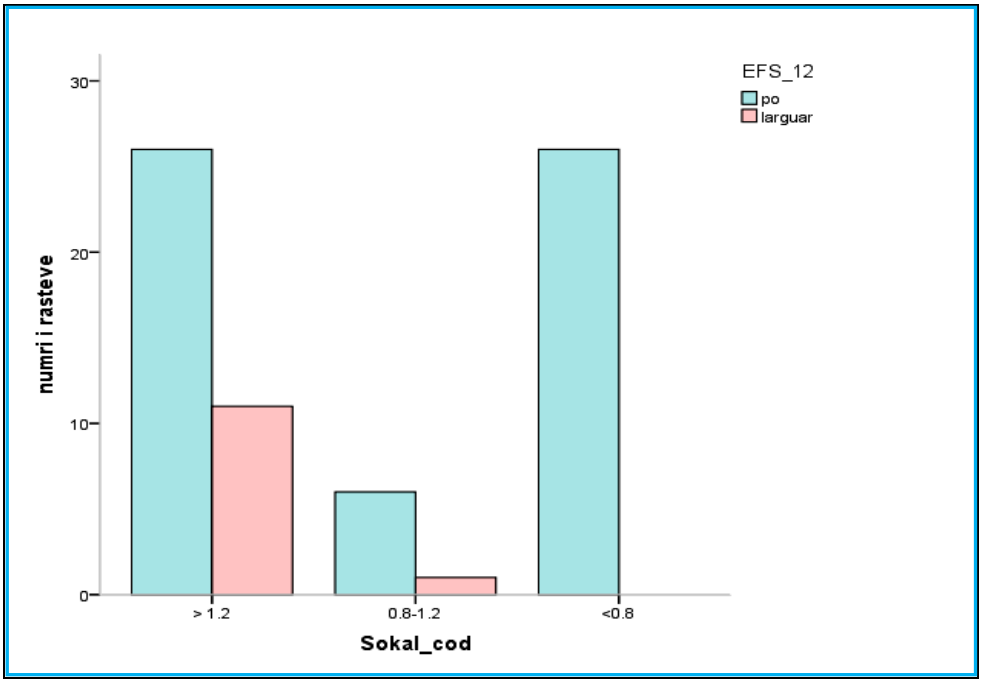


Figura 3-13. Shpërndarja e pacientëve sipas arritjes së mbijetesës së pakushtëzuar dhe vlerësimit të Sokal-it

Duke u nisur nga studimet e Hughes. TP në 2003 dhe Aziz. Z në 2010 ku theksohet se vlerësimi i ulët sipas Sokal-it është një faktor shumë i rëndësishëm për përcaktimin e mbijetesës së pakushtëzuar edhe për studimin tonë presim të nxjerrim të njëjtin përfundim (56, 8).
Në studimin tonë nga rezultatet e nxjerra vihet re se pacientët me mundësi të ulët për prognozë jo të mirë sipas Sokal-it kanë pasur një mbijetesë të pakushtëzuar në 100% të rasteve. Nga tabela dhe grafiku i mësipërm duket se pacientët me mundësi të lartë sipas Sokal-it janë ata që ndikojnë drejtpërdrejt në llogaritjen e mbijetesës së pakushtëzuar duke vërtetuar më së miri supozimin që kishim formuluar.

Lidhja e vlerësimit sipas EUTOS-it dhe arritjes së mbijetesës së pakushtëzuar shpjegohet tek tabela 3-28.

Tabela 3-28. Shpërndarja e vlerësimit sipas EUTOS në lidhje me arritjen e mbijetesës së pakushtëzuar

Vlerësimi sipas EUTOS	**Muaji 12**		**Muaji 24**	
Numri i pacientëve ose %	**Numri i pacientëve**	**%**	**Numri i pacientëve**	**%**
I ulët 51 ose 72%	45/51	88,2	45/51	88,2
I lartë 19 ose 27%	14/19	73,6	13/19	68,4

Në studimin tonë ne presim gjithashtu që pacientët me vlerësim të lartë sipas EUTOS-it të ndikojnë si të vetëm në llogaritjen e mbijetesës së pakushtëzuar, kjo duke marrë shkas edhe nga studimi i Joerg Hasford në Gjermani ku theksohet se pacientët me mundësi të lartë sipas këtij vlerësimi ndikojnë direkt në llogaritjen e kësaj mbijetese (66).

Nga përfundimet e tabelës së mësipërme për studimin tonë vëmë re se në llogaritjen e mbijetesës së pakushtëzuar ndikojnë si pacientët me mundësi të ulët për mos t'a arritur përgjigjen citogjenetike të plotë në muajin 24 të trajtimit ashtu edhe ata me mundësi të lartë të vlerësuar sipas EUTOS-it. Ky përfundim është në kundërshtim me përfundimin e nxjerrë nga studimi i mësipërm.

Në tabelën 3-29 jepet shpërndarja e pacientëve sipas grupmoshave dhe arritjes së mbijetesës së pakushtëzuar në fundin e muajit 24 të trajtimit me Glivek.

Tabela 3-29. Shpërndarja e pacientëve sipas moshës dhe arritjes së mbijetesës së pakushtëzuar

Grupmoshat e pacientëve (vjeç)	**</=20**	**21-40**	**41-60**	**>/= 61**
Numri i pacientëve	1	14	42	13
Mbijetesa e pakushtëzuar %	1/1 ose 100	14/14 ose 100	35/42 ose 83,3	8/13 ose 61,5

Nga tabela e mësipërme duket qartë se mbijetesa e pakushtëzuar vetëm në moshat relativisht të reja është 100%, ç'ka tregon që me rritjen në moshë rritet edhe mundësia për të pasur një jetesë të kushtëzuar nga faktorë të tillë si: mosarritja e përgjigjeve sipas standarteve të vendosura nga ELN, progresioni i sëmundjes, humbja e përgjigjes hematologjike komplete, humbja e përgjigjes madhore citogjenetike ose ndërprerja e trajtimit me Glivek.

Ky përfundim i nxjerrë për pacientët tanë është në përputhje edhe me përfundimet e nxjerra në studimet e Gugliotta G. dhe Usman M. ku mosha e re e pacientit nuk ndikon në përcaktimin e mbijetesës së pakushtëzuar (51, 122).

Nga studimi ynë 100% e pacientëve që ishin në monitorim për përgjigjet hematologjike, citogjenetike dhe molekulare deri në fund të studimit nuk kaluan në fazën e përshpejtimit. Ky përfundim krahasohet me përfundimet e studimeve të tjera: 93% dhe 100% (20, 61).

PËRFUNDIME

1. Gliveku rezultoi si një medikament i sigurt dhe efektiv në trajtimin e pacientëve me LMC në QSUT për periudhën kohore prill 2011- dhjetor 2013 kur u përdor si linjë e parë trajtimi. Efektet e shkëlqyera të tij dhanë përfundimet e mëposhtme;

   - Arritja e përgjigjes hematologjke të plotë pas 6 muaj trajtim në shifrën 91% ku vetëm në muajin e parë kjo përgjigje është arritur në 64% të pacientëve.
   - Arritja e përgjigjes citogjenetike të plotë në muajin e 12 në shifrën 65,7% dhe në muajin 24 e arritur në 82,8% të pacientëve.
   - Arritja e përgjigjes citogjenetike molekulare të plotë në fund të vitit të parë 60%.

2. Nga muaji 12 në 24 në sajë të efektit të shkëlqyer të Glivekut numri i pacientëve që arritën përgjigjen citogjenetike të plotë me 0% të kromozomit Philadelphia u rrit dukshëm. Në muajin 12 të trajtimit korrelacioni ndërmjet përqindjes së bërthamave BCR-ABL+ të përcaktuara nga FISH-i dhe përqindjes së metafazave Ph+ të vlerësuara nga citogjenetika standarte u vëtetua se ishte i ngushtë. Kjo u vërtetua nga koefiçienti i korrelacionit të Pearsonit r^2= 0,987 dhe vlera p = 0,01 të cilat evidentojnë një ndryshim jo të rëndësishëm nga ana statistikore midis dy metodave të përdorura.

3. Rritja e dozës së medikamentit ndikoi më shumë në fitimin e përgjigjeve citogjenetike të plota sesa në fitimin e përgjigjeve hematologjike të plota.

   - Asnjë nga 6 pacientët e trajtuar me dozë më të lartë Gliveku nuk arriti përgjigje hematologjike të plotë.
   - 92% e pacientëve të trajtuar me dozë më të lartë Gliveku arritën përgjigje citogjenetike të plotë.

4. Ekzaminimi me anën e kariotipit mbetet metoda e artë për ndjekjen e të sëmurëve me LMC të trajtuar me Glivek në fazën kronike jo vetëm për përcaktimin e kromozomit Ph+, por edhe të anomalive të tjera kromozomike në kariotipin e këtyre pacientëve. Me përdorimin e teknikave të tjera qofshin këto edhe molekulare evolucioni klonal është e pamundur të evidentohet. Në studimin tonë evolucioni klonal rezultoi në 5,7% të pacientëve dhe është konsideruar si një nga faktorët negativë në termat e mbijetesës sepse këta pacientë janë rezistentë ndaj dozës 400mg/ditë Glivek.

5. Për monitorimin e pacientëve të diagnostikuar me CML dhe të trajtuar me Glivek mund të përdoret metoda e citogjenetikës standarte dhe FISH-it, por FISH-i mbetet një teknikë më e ndjeshme se citogjenetika standarte dhe rezulton edhe më e saktë në përfundimin për vlerësimin e përgjigjeve citogjenetike të arritura për shkak se:

   - Analizon bërthamat në interfazë në një numër më të madh krahasuar me metafazat që analizohen me teknikën e kariotipit.
   - Ndjeshmëria më e lartë e teknikës FISH vihet re në 5,7% të pacientëve duke identifikuar raste me riorganizimin gjenetik BCR-ABL kriptik, të cilët rezultojnë negativ nga ekzaminimi i kariotipit për kromozomin Ph+.
   - Rezulton gjithashtu si një teknikë më e shpejtë por me kosto më të lartë.

6. Vlerësimet sipas Sokal-it dhe EUTOS-it kanë rezultuar si vlerësime të rëndësishme prognostike sepse përqindja e pacientëve të vlerësuar me mundësi të ulët sipas Sokal-it dhe EUTOS-it që kanë arritur përgjigje hematologjike, citogjenetike të plotë dhe citogjenetike molekulare të plotë është më e lartë se ajo e pacientëve të grupeve të tjera.

   - 100% e pacientëve të vlerësuar me mundësi të ulët sipas Sokal-it arrijnë përgjigje hematologjike dhe citogjenetike të plota, dhe 80% e këtyre pacientëve arrijnë përgjigjen citogjenetike molekulare të plotë.
   - 100% e pacientëve me risk mesatar sipas Sokal-it arrijnë përgjigje hematologjike të plotë, 85% e tyre arrijnë përgjigje citogjenetike të plotë dhe 71,4% arrijnë përgjigjen citogjenetike molekulare të plotë.
   - Për pacientët me risk të lartë sipas Sokal-it përgjigja hematologjike e plotë është arritur në 84% të pacientëve, përgjigja citogjenetike e plotë në 71% dhe përgjigja citogjenetike molekulare e plotë në 44,7% të pacientëve.
   - Sipas vlerësimit EUTOS në momentin e vendosjes së diagnozës dhe rezultateve të studimit tonë në muajin 24 të monitorimit u vrojtua një korrelacion i ngushtë (r^2=0,197; p= 0,01) me ndryshime jo të rëndësishme nga ana statistikore.

7. Mbijetesa e përgjithshme u arrit në 100% të pacientëve, ndërsa mbijetesa e pakushtëzuar në shifrat 84,2% dhe 82,8% në fund të vitit të parë dhe të dytë të trajtimit.

V. SHKURTIME

ABL – Abelson murine leukemia, gjen që ndodhet në kromozomin 9.

ATP/ADP - Adenozinë Tre Fosfat/ Adenozinë Dy Fosfat, molekula që shërbejnë si burim energjie ose aktivizuese të substratit në reaksionet metabolike.

BCR - Break point cluster region, gjen që ndodhet në kromozomin 22.

BCR-ABL - Riorganizim gjenetik midis kromozomeve 9 dhe 22.

Banda G - Bandat me ngjyruesin Giemsa.

CaLB - Calcium dependent lipid binding domain, zona lidhëse e lipideve të varura nga kalçiumi.

Crlk - Proteinë përshtatëse e përfshirë në rolin patogjenetik të riorganizimit BCR-ABL.

c-kit - Proteinë tirozinë kinazë.

$C_{29}H_{31}N_7O.CH_4SO_3$ - Formula kimike e Glivekut.

citokromi P_{450} - Përfshin një grup të madh dhe të ndryshëm të enzimave që katalizojnë oksidimin e substancave organike.

CYP_3A_4, CYP_1A_2, CYP_2D_6, CYP_2C_9, CYP_2C_{19} - Janë proteina të përfshira në oksidimin e një numri të madh substratesh.

DAPI - 4',6-diamidino-2-phenylindole, ngjyrues fluoreshentë që lidhet fort në rajonet e pasura me A dhe T të ADN-së.

ELN - Europea Leukemia Net, Rrjeti Europian i Leukozave.

EFS - Event free survival, mbijetesa e pakushtëzuar (mosarritja e përgjigjeve sipas standarteve të vendosura nga ELN, progresioni i sëmundjes, vdekjet nga ndonjë shkak, humbja e përgjigjes hematologjike komplete, humbja e përgjigjes madhore citogjenetike dhe ndërprerja e trajtimit me Glivek).

FDA - Food and Drug Administration, Administrimi i ushqimit dhe medikamenteve.

FISH - Fluorescence In situ Hybridization, Hibridizimi in situ me fluoreshencë.

FOXO 4 - Gjen që kodon për proteina që marrin pjesë në rritjen dhe diferencimin qelizor.

GTP/GDP - Guanozinë Tre Fosfat/ Guanozinë Dy Fosfat, molekula që shërbejnë si burim energjie ose aktivizuese të substratit në reaksione metabolike.

GRB 2 - Growth Factor Receptor Bound Protein 2, proteinë përshtatëse e përfshirë në përthkthimin e sinjalit për komunikimin qelizor.

GAP - proteina e aktivizimit të GTPazës që rrit hidrolizën e GTP të lidhur me RAS

GEF - faktori i shkëmbimit guanilik, që transformon GDP në GTP duke aktivizuar

RAS - Rat sarcoma

GAB2 - Protein përshtatëse.

G_0/G_1 - Faza të ciklit qelizor.

ISCN - International System for Human Cytogenetic Nomenclature, Sistem Internacional për emërtim në citogjenetikën humane.

IRIS - International Randomized Study of Interferon, Studim Internacional për Interferonin.

IUPAC - Internacional Union of Pure and Applied Chemistry, Bashkim internacional i kimisë së aplikuar.

JAK-STAT - Janus Kinase-Signal Transducers and Activators of Transcription, grup proteinik që shndërron sinjalin qelizor dhe aktivizon transkriptimin.

kDa - KiloDalton.

LAL - Leukoza Limfoblastike Akute.

LNC - Leukoza Kronike Neutrofilike.

LMC - Leukoza Mieloide Kronike.

LDL - Low Density Lipoprotein, një nga pesë grupet e lipoproteinave.

m- bcr - Minor breakpoint cluster region, është vendi i këputjes në kromozomin 22 dhe ndodhet midis ekzoneve e1-e2.

M- bcr - Major breakpoint cluster region, është vëndi i këputjes në kromozomin 22 dhe ndodhet midis ekzoneve b1-b5.

µ- bcr - Mikro breakpoint cluster region, është vendi i këputjes në kromozomin 22 dhe ndodhet midis ekzoneve e19-e20.

MEK 1 /2 - Proteina, anëtarë të kaskadës së sinjalizimit RAS-MAPK.

MAPK - Mitogen Activated Protein Kinases, proteinë kinaza aktivizuese të mitozës.

MYC - Gjen rregullator që kodon për një faktor transkriptimi.

NADPH - Nikotinamid Adenin Dinukleotid Fosfati i reduktuar, një koenzimë që merr pjesë në reaksionet anabolike.

NLS - Nuclear Localisation Signal, Sinjal i lokalizimit bërthamor.

NP- 40 - Nonyl phenoxypolyethoxylethanol, detergjent i vlefshëm për të tretur membranën qelizore dhe jo membranën bërthamore të qelizës.

NES - Nuclear Export Signal, Sinjali i eksportimit bërthamor.

PDGF α, PDGF β – Platelet Derived Growth Factor, faktori i rritjes së trombociteve janë 2 nga shumë faktorët e rritjes ose proteina që rregullojnë rritjen dhe ndarjen qelizore.

Ph+ - Prania e kromozomit Philadelfia.

Ph- - Mungesa e kromozomit Philadelfia.

PHP - Përgjigje Hematologjike e Plotë.

PHPj - Përgjigje Hematologjike e Pjesshme.

PCP - Përgjigje Citogjenetike e Plotë.

PCPj - Përgjigje Citogjenetike e Pjesshme.

PCM - Përgjigje Citogjenetike Madhore.

PCMinimale - Përgjigje Citogjenetike Minimale.

PCMinore - Përgjigja Citogjenetike Minore.

PP - Pa Përgjigje.

PMP - Përgjigja Molekulare e Plotë.

PMM - Përgjigja Molekulare Madhore.

p190, p210, p220 - proteina me pesha molekulare të ndryshme.

P13K/AKT - Fosfoinositide 3 kinazë, rrugë kalimi në sinjalizimin brendaqelizor i rëndësishëm në apoptozën e qelizave kancerogjene.

PTEN – fosfataza që defosforilojnë fosfoinozitidet

PHA - Fitohematoglutininë.

RAS - Superfamilje proteinash me funksione rregullatore.

RAF - Ras-activated factor, Faktor aktivizues i proteinave RAS.

RT-PCR - Real Time-Polymerise Chain Reaction, Polimerizimi i reaksionit zinzhir në kohë reale.

SH1, SH2 dhe SH3 - Vende me aktivitet rregullues që gjenden tek gjeni ABL.

SOS - Son Of Sevenless, grup gjenesh që kodojnë faktorët e këmbimit të nukleotidit guaninë dhe veprojnë me familjen Ras.

STAT 1 dhe STAT 5 - Signal Transducers And Activators of Transcription, sinjale transduktimi dhe aktivizuesa të transktiptimit.

S - Faza e sintezës në ciklin qelizor.

Sonda LSI - Sonda për hibridizimin fluoreshent.

STI 571 - Glivek ose Imatinib mesylate.

SCF - Stem Cell Factor, proteinë bioaktive e destinuar për përdorim në aplikimet e kulturave qelizore.

SSC - Sodium Saline Citrat- Solucion i përbërë nga kloruri i natriumit dhe nga citrati i natriumit.

t(9;22) (q34;q11) - Translokacion midis krahëve të gjatë të kromozomeve 9 dhe 22, dhe pikërisht tek zonat 34 dhe 11.

MIRËNJOHJE

Dëshiroj të shpreh mirënjohje të sinqertë për të gjithë ata që mundësuan realizimin e kësaj teze doktorature. Falenderime speciale për;

- **Prof. Dr. Zyri Bajramin**, udhëheqsin e kësaj teme, për gatishmërinë që ka treguar për të më konsultuar në çdo moment dhe për të më udhëhequr në çdo etapë të punës sime metodike shkencore.

- **As. Prof Anila Babameto-Laku**, udhëheqsen e kësaj teme nga e cila kam mësuar rëndësinë e të menduarit në mënyrë të qartë dhe racionale për shkencën. E falenderoj përzemërsisht për ndihmën e pakursyer që më ka dhënë çdo ditë, për mbështetjen dhe besimin që pati tek unë për të ndërmarrë dhe për të realizuar një temë të tillë.

- **Prof. Dr. Vahe Mokini,** shef i Shërbimit të Gjenetikës Mjeksore në QSUT. E falenderoj me ndjenjën e respektit të thellë dhe mirënjohjes së përhershme për mbështetjen dhe sugjerimet që më ka dhënë për të realizuar këtë tezë doktorature.

Të gjithë personelin e Shërbimit të Gjenetikës Mjekësore në QSUT për kontaktet që kam pasur me to në punën e përditshme dhe për eksperiencën e dhënë në fushën e citogjenetikës ku unë jam mbështetur për punën time shkencore.

Prof. Dr. Tefta Rexha, shefe e Departamentit të Biologjisë në FSHN për përzemërsinë dhe dashamirësinë që e karakterizon, për të gjitha sygjerimet e vlefshme dhe shpjegimet shkencore të dhëna.

Prof. Dr. Ilia Mikerezi për reçensën dhe sygjerimet e vlefshme nga të cilat morra mësime të vyera.

As. Prof. Anila Mitre për mundësinë që më krijoi për plotësimin e rezultateve të teknikës FISH, të vlefshme në realizimin e kësaj teze dhe për gjithë këshillat dashamirëse të dhëna.

Të gjithë profesorët e Departamentit të Biologjisë në FSHN për mbështetjen morale dhe sygjerimet e vlefshme.

Mjekët hematologë të Shërbimit të Hematologjisë në QSUT për gatishmërinë që treguan për të më ndihmuar me kartelat e pacientëve, për gjithcka të konsultuar dhe për mundësinë që kanë krijuar për pacientët për realizimin e teknikës së PCR-së në Austri.

Dr. Donjeta Bali për ndihmën e pakursyer në publikimin e artikujve dhe për diskutimet shkencore në fushën e onko-hematologjisë.

As. Prof. Ela Petrela, shefen e Shërbimit të Statistikës për përpunimin statistikor të studimit.

Në fund dua të falenderoj **prindërit dhe vëllain** për inkurajimin e vazhdueshëm si edhe **bashkëshortin dhe djalin** tim për dashurinë dhe mbështetjen e pakufi gjatë gjithë kohës.

LITERATURA

1. Aksoy M, Dincol K, Erdem S, Akgun T, Dincol G. Leukemia in shoe-workers exposed chronically to benzene. Blood. 1974 Dec; 44 (6): p. 837-841.

2. Afar DE, Goga A, McLaughlin J, Witte ON, Sawyers CL. Differential complementation of Bcr-Abl point mutants with c-Myc. Science. 1994 Apr 15; 264 (5157): p. 424-426.

3. Aurich J, Duchayne E, Huguet-Rigal F, Bauduer F, Navarro M, Perel Y, Pris J, Dastugue Clinical, morphological, cytogenetic and molecular aspects of a series of Ph- negative chronic myeloid leukemias. Hematol Cell Ther, 1998. 40(4): p. 149-158.

4. Anupam Kaur, Simran Preet Kaur, Amarjit Singh. Karyotypic findings in chronic myeloid leukemia cases undergoing treatment. 2012, volume 18: p. 66-70.

5. Anwar N. Mohamed1, Pamela Pemberton, Jeffrey Zonder, Charles A. Schiffer The Effect of Imatinib Mesylate on Patients with Philadelphia Chromosome-positive Chronic Myeloid Leukemia with Secondary Chromosomal Aberrations Clin Cancer Res April 2003, 1333.

6. Allan NC, Richards SM, Shepherd PC: UK Medical Research Council randomised, multicentre trial of interferon-alpha n1 for chronic myeloid leukaemia: Improved survival irrespective of cytogenetic response, The UK Medical. Research Council's Working Parties for Therapeutic Trials in Adult Leukaemia. Lancet, 1995. 345(8962): p. 1392-1397.

7. Assouline S., J.H. Lipton. Monitoring response and resistance to treatment in chronic myeloid leukemia. Curr Oncol. 2011 April; 18(2): e71–e83.

8. Aziz Z, Iqbal J, Bano K, et al. Sustained superior long-term outcomes and cytogenetic responses with imatinib mesylate in chronic phase chronic myeloid leukemia: Report from a developing country. Japan Journal of Clinical Oncology. 2010; 40(6): p.549-55.

9. Babameto-Laku, V. Mokin, M. Cikuli, A. Mitre, P. Xhumari.: "Cytogenetic responses in chronic myeloid leukemia patients treated with imatinib mesylate". Balkan Journal of Clinical Laboratory XII, 05, 1, Tirana, Albania, 28 September-1 October 2005, T-065, 106.

10. Baccarani M, Saglio G, Goldman J, et al . Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an export panel of behalf of the European LeukemiaNet. Blood 2006; 108: p. 1809-1820.

11. Baccarani M, Cortes J, Pane F, Niederwieser D, Saglio G, Apperley J et al. Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet. J Clin Oncol 2009; 27: 6041-6051.

12. Bartlett, J. M. S.; Stirling, D. (2003). "A Short History of the Polymerase Chain Reaction". PCR Protocols 226; p. 3–6.

13. Bennett JH, Case of hypertrophy of the spleen and liver, in which death took place from suppuration of the blood. Edingburgh Medical and Surgical Journal 1845. 64: p.413-424.

14. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick HR, Sultan C, (1981). The French-American-British (FAB) Co-operative group. The morphological classification of acute lymphoblastic leukemia: Concordance among observers and clinical correlations. British Journal of Haematology 47: p.553-561.

15. Berger U, et al, Gender aspects in chronic myeloid leukemia: long-term results from randomized studies. Leukemia, 2005. 19 (6): p. 984-989.

16. Béla Kajtār. Prognostic investigations in chronic myeloid leukemia. Pécs 2011.

17. Buchdunger E, et al, Inhibition of the Abl protein tyrosine kinase in vitro and in vivo by a 2-phenylaminopyrimidine derivate.Cancer Res, 1996. 56(1): p. 100-104.

18. Buchdunger E, Zimmermann J, Mett H, Meyer T, Muller M, Regenass U, and Lydon N. B, Selective inhibition of the platelet-derived growth factor signal transduction pathway by a protein-tyrosine kinase inhibitor of the 2-phenylaminopyrimidine class. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. 92(7): p. 2558-2562.

19. Branford S, et al, High frequency of point mutations clustered within the adenosine triphosphate –binding region of bcr-abl in patients with chronic myeloid leukemia or Ph positive acute lymphoblastic leukemia who develop imatinib resistance. Blood, 2002. 99(9): p. 3472-3475.

20. Brian J. Druker, M.D., François Guilhot, M.D., Stephen G. O'Brien, M.D., Ph.D., Insa Gathmann, M.Sc., Hagop Kantarjian, M.D et,al. Five-Year Follow-up of Patients Receiving Imatinib for Chronic Myeloid Leukemia N Engl J Med 2006; 355: p. 2408-2417.

21. Bhatia R, et al, Persistence of malignant hematopoietic progenitors in chronic myelogenous leukemia patients in complete cytogenetic remission following imatinib mesylate treatment. Blood, 2003. 101(12):p. 4701-4707.

22. Bocchia M, et al, Effect of a p210, multipeptide vaccine associated with imatinib or interferon in patients with chronic myeloid leukaemia and

persistent residual disease: a multicentre observational trial. Lancet, 2005. 365(9460): p. 657-662.

23. C Schoch, S Schnittger, S Bursch, D Gerstner, A Hochhaus, U Berger, R Hehlmann, W Hiddemann[1] and T Haferlach. Comparison of chromosome banding analysis, interphase- and hypermetaphase-FISH, qualitative and quantitative PCR for diagnosis and for follow-up in chronic myeloid leukemia: a study on 350 cases. Leukemia (2002) 16: p.53-59.

24. Capdeville R, et al. Gleevec a rationally developed, targeted anticancer drug- Nature Reviews, Drug Discovery 2002; 1: p. 493-502.

25. Calabrese G, Stuppia L, Franchi P. G, Peila R, Morizio E, Liberati A. M , Spadano A, Di Lorenzo R, Donti E, Antonucci A, and et al, Complex translocations of the Ph chromosome and Ph negative CML arise from similar mechanisms evidenced by FISH analysis. Cancer Genet Cytogenet, 1994. 78(2): p. 153-159.

26. Chung SW, Daniel R, Wong BY, and Wong PM, The abl genes in normal and abnormal cell development. Crit Rev Oncog, 1996. 7(1-2): p. 33-48.

27. Chai S. K, Nichols G. L, and Rothman P, Constitutrive activation of JAKs and STATs in bcr abl expressing cell lines and peripheral blood cells derived from leukemic patients. J Immunol, 1997. 159 (10): p. 4720-4728.

28. Chin Yuet Meng. Cytogenetics and molecular studies in chronic myeloid leukemia. March, 2001.

29. Cramer E, Auclair C, Hakim J, Feliu J, Boucherot J, Troube J, Bernard J. F, Bergogne E and Boivin P, Metabolic activity of phagocytosing granulocytes in chronic granulocytic leukemia, ultrastructural observation of a degranulation defect. Blood, 1997. 50(1): p. 93- 106.

30. Cortes JE, Talpaz M, Beran M, et al, Philadelphia chromosome - negative chronic myelogenous leukemia with rearrangement of the breakpoint cluster region. Long - term follow-up results. Cancer, 1995. 75(2): p. 464-470.

31. Cortes, J., et al., Result of high-dose imatinib mesylate in patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia after failure of interferon-alpha. Blood, 2003. 102(1): p. 83-86.

32. Cotta CV. and CE. Bueso-Ramos: New insights into the pathobiology and treatment of chronic myelogenous leukemia. Ann Diagn Pathol, 2007. 11 (1): p. 68-78.

33. David Marin, Amr R. Ibrahim and John M. Goldman. European Treatment and Outcome Study (EUTOS) Score for Chronic Myeloid Leukemia Still Requires More Confirmation. Journal of clinical oncology 2011.

34. Drucker BJ, et al, Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of bcr-abl positive cells. Nat Med, 1996. 2(5): p. 561-566.

35. Deininger MW, et al, Practical management of patients with chronic myeloid leukemia receiving imatinib. J Clin Oncol, 2003. 21(8): p. 1637-1647.

36. Deininger MW, Goldman JM, and Melo JV, The molecular biology of chronic myeloid leukemia. Blood, 2000. 96(10): p. 3343-3356.

37. Daley G. Q, R. A. Van Etten, and D. Baltimore, Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210 bcr/ abl gene of the Philadelphia chromosome. Science, 1990.247 (4944): p. 824-830.

38. Drucker BJ, et al, Five year follow up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. N Engl J Med, 2006. 355(23): p. 2408-2417.

39. Duba H. C, Peter S, Hilbe W, Fluckinger T, Fridrik M, Erdel M, Thaler J, and Utermann G, Monitoring of remission status by fluorescence in situ hybridization in chronic myeloid leukaemia patients treated with interferon-alfa. Int J Oncol, 1999. 14 (1): p. 145-150.

40. Di Bacco A, Keeshan K, Mc Kenna SL, et al. -Molecular abnormalities in chronic myeloid leukemia: deregulation of cell growth and apoptosis-Oncologist. 2000; 5: p. 405-415.

41. Fausto Castagnetti, Francesca Palandri, Marilina Amabile, Nicoletta Testoni, et al. Results of high-dose imatinib mesylate in intermediate Sokal risk chronic myeloid leukemia patients in early chronic phase: a phase 2 trial of the GIMEMA CML Working Party. 2009, 113: p, 3428-3434.

42. Fialkow P. J, Jacobson R. J, and Papayannopoulou T, Chronic myelocytic leukemia, clonal origin in a stem cell common to the granulocyte, erythrocyte, platelet and monocyte/ macrophage. Am J Med, 1977. 63(1): p. 125-130.

43. Faderl SA, Talpaz M, Estrov Z, O' Brien S, Kurzrock R, and Kantarjian H. M, The biology of chronic myeloid leukemia. N Engl J Med, 1999. 341 (3): p. 164-172.

44. Franz W, Berger P, and Wang J. Y, Deletion of an N-terminal regulatory domain of the c-abl tyrosine kinase activates its oncogenic potential. Embo J, 1989. 8(1): p. 137-147.

45. Fluorescent in situ Hybridization (FISH) | Sigma-Aldrich www.sigmaaldrich.com

46. Galton DA: Chemotherapy of chronic myelocytic leukemia. Semin. Hematol. 1969. 6: p. 323-343.

47. Gambacorti-Passerini C, Mologni et al, Inhibition of the ABL kinase activity blocks the proliferation of the BCR-ABL+ leukemic cells and induces apoptosis- Blood Cells Mol Dis. 1997: 23: p. 380-394.

48. Gabert J, Beillard E, van der Velden VH, Bi W, Grimwade D, Pallisgaard N, et al. Standardization and quality control studies of ‘‘real-time’’ quantitativereverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcriptsfor residual disease detection in leukemia - a Europe Against Cancer program. - Leukemia 2003; 17: p. 2318-2357.

49. Gupta A, Prasad K, Hematological and Molecular Response Evaluation of CML Patients on Imatinib JAPI, VOL. 55, February 2007.

50. Gorre M. E, et al, Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by bcr-abl gene mutation or amplification. Science, 2001. 293 (5531): p. 876-880.

51. Gugliotta G, Castagnetti F, Palandri F, et al. Frontline imatinib treatment of chronic myeloid leukemia: No impact of age on outcome, a survey by the GIMEMA CML Working Party. Blood 2011; 117: p. 5591-5599.

52. Guilhot, F. On behaf of the IRIS study group. Sustained durability of responses plus high rates of cytogenetic responses result in long term benefit for newly diagnosed chronic phase myeloid leukemia treated with Imatinib therapy: update from IRIS study (abstract). Blood 2004.104:10a. Abstract nr 21.

53. Hasford J, Ansari H, Pfirrmann M, and Helmann R, Analysis and validation of prognostic factors for CML. German CML Study Group. Bone Marrow Transplant, 1996. 17 Suppl 3: p. 549-554.

54. Hehlmann R, et al, Randomized comparison of interferon - alfa with busulfan and hydroxyurea in chronic myelogenous leukemia. The German CML Study Group. Blood, 1994. 84(12): p. 4064-4077.

55. Hochhaus A, et al, Molecular and chromosomal mechanisms of resistence to Imatinib (ST1571) therapy. Leukemia, 2002. 16 (11): p. 2190-2196.

56. Hughes TP, Kaeda J, Branford S, Rudzki Z, Hochhaus A, Hensley ML, et al. Frequency of major molecular responses to imatinib or interferon alfa plus cytarabine in newly diagnosed chronic myeloid leukemia. N Engl J Med. 2003; 349 (15): p.1423-32.

57. Ilaria R. L, Jr, and Van Etten R. A., P210 and P190 bcr/abl induce the tyrosine phosphorylation and DNA binding activity of multiple specific STAT family members. J Biol Chem, 1996. 271(49): p. 31704-31710.

58. Ishihara T, Sasaki M, Oshimura M, Kamada N, Yamada K, Okada M, et al. A summary of cytogenetic studies on 543 cases of chronic myelocytic leukemia in Japan. Cancer Genet Cytogenet, 1983. 9 (1): p. 81-91.

59. Interferon alfa-2a as compared with conventional chemotherapy for the treatment of chronic myeloid leukemia. The Italian Cooperative Study Group on chronic myeloid leukemia. N Engl J Med, 1994. 330 (12): p. 820-825.

60. Iacobucci I, Saglio G, Rosti G, Testoni N, Pane F, Amabile M, et al. - GIMEMA Working Party on Chronic Myeloid Leukemia. Achieving a major molecular response at the time of a complete cytogenetic response (CCgR) predicts a better duration of CCgR in imatinib-treated chronic myeloid leukemia patients. - Clin Cancer Res 2006; 12: p. 3037-3042.

61. Irena Ćojbašić, Lana Ma čukanović-Golubović. Hematopathologic and cytogenetic findings in imatinib mesylate treated chronic myelogenous leukemia patients: 2.5 years' experience VOJNOSANITETSKI PREGLED Volumen 67, Broj 10, UDC 616.155: p. 392–08.

62. Jaffe ES, Harris HL, Stein H and Vardiman JW: World Health Organization Classification of tumors, Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and lymphoid Tissures. IARC Press: Lyon 2001.

63. Jan Geissler, Felice Bombaci, Mina Daban, et.al. Treatment recommendations for people living with CML. Novembre 2012.

64. Joseph Sambrook and David W. Russel (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd). Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press. ISBN 0-879-69576-5. Chapter 8: In vitro Amplification of DNA by the Polymerase Chain Reaction.

65. Johansson B, Fioretos T, Mitelman F, - Cytogenetic and molecular genetic evolution of chronic myeloid leukemia. –Acta Haematologica 2002, 107: p.76-94.

66. Joerg Hasford, Michele Baccarani, Verena Hoffmann, et.al Predicting complete cytogenetic response and subsequent progression-free survival in 2060 patients with CML on imatinib treatment: the EUTOS score. Blood-2010-12-319038. vol. 118 no. 3: p. 686-692.

67. Kantarjian H. M, et al, Long- term survival benefit and improved complete cytogenetic and molecular response rates with imatinib mesylate in Philadelphia chromosome-positive chronic phase chronic myeloid leukemia after failure of interferon alfa. Blood, 2004. 104(7): p.1979-1988.

68. Kantarjian H, Sawyers C, Hochhaus A, Guilhot F, Schiffer C, Gambacorti-Passerini C, et al.Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia. N Engl J Med 2002; 346: p. 645–52.

69. Kantarjian H et al."Nilotinib in imatinib-resistant CML and Philadelphia chromosome-positive ALL". N Engl J Med, 2006. 354 (24): p. 2542–51.

70. Kiran Kucheria and Rashmi Talëar. Diagnosis and disease management in CML patients using conventional and molecular cytogenetics. IRANIAN JOURNAL of BIOTECHNOLOGY, Vol. 1, No. 1, Jan. 2003.

71. Kurzrock R, Shtalrid M, Romero P, et al, A novel c-abl protein product in Philadelphia positive acute lymphoblastic leukaemia. Nature, 1987. 325 (6105): p. 631-635.

72. Kumar L, Kumari M, Kumar S, Kochupillai V, Singh R. Clinical and laboratory features at diagnsis in 437 patients with chronic myelogenous leukemia: An experience of a tertiary care center. In: Kumar L (ed). Progress in haematologic oncology. New York: The Advanced Research Foundation, 2003: p.83–98.

73. Kumar L. Chronic myelogenous leukaemia (CML): An update, THE NATIONAL MEDICAL JOURNAL OF INDIA VOL. 19, NO. 5, 2006.

74. Larson RA, Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG et, al. Imatinib pharmacokinetics and its correlation with response and safety in chronic phase myeloid leukemia. Blood, 2008; 111(8): p. 4022-4028.

75. Lugo T. G, et al, Tyrosine kionase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products. Science, 1990; 247 (4946): p. 1079-1082.

76. Lorand-Metze I, Vassallo J, and Souza C. A, Histological and cytological heterogeneity of bone marrow in Philadelpia positive chronic myelogenous leukaemia at diagnosis. Br J Haematol, 1987; 67(1): p. 45-49.

77. Lichtman MA, (1995a). Classification and clinical manifestations of the hemopoietic stem cell disorders. In Williams Hematology (Ed E Beutler, MA Lichtman, BS Coller, TJ Kipps): p. 229-238, McGraw-Hill, Inc., New York, Fifth Edition.

78. Le Coutre P, Schwarz M, Kim TD. New developments in tyrosine kinase inhibitor therapy for newly diagnosed chronic myeloid leukemia. 110. Clin Cancer Res 2010; 16: p.1771–80.

79. Le Gouill S, Talmant P, Milpied N, Daviet A, Ancelot M, Moreau P, et.al. Fluoresence in situ hybridization on peripheral blood specimens is a reliable method to evaluate cytogenetic response in chronic myeloid leukemia. J Clin Oncol 18: p.1533-1538, 2000.

80. Manley PW, Cowan-Jacob S. W, Buchdunger E, Fabbro D, Fendrich G, Furet P, Meyer T, and Zimmermann J, Imatinib: A selective tyrosine kinase inhibitor. Eur J Cancer, 2002. 38 Suppl 5: p. 519-527.

81. Mitelman F, The cytogenetic scenario of chronic myeloid leukemia-leukemia and lymphoma. 1993; 11: p.11-15.

82. Mehlman M. A, Dangerous and cancer causing properties of products and chemicals in the oil refining and petrochemical industries. Part XXX: Causal relationship between chronic myelogenous leukemia and benzene containing solvents. Ann N Y Acad Sci, 2006. 1076: p. 110-119.

83. McWhirter J. R, Galasso D. L, and Wang J. Y, A coiled coil oligomerization domain of bcr is essential for the transforming function of bcr abl oncoproteins. Mol Cell Biol, 1993. 13(12): p. 7587- 7595.

84. McWhirter JR, Ëang JY; An actin- binding function contributes to transformation by the bcr abl oncoprotein of Philadelphia chromosome-positive human leukemias- EMBO J. 1993:12: p.1533-1546.

85. Nathalie Douet-Guilbert, Frederic Morel, Tiffen Le Charpentier et.al. Interphase FISH for Follow-up of Philadelphia Chromosome-positive Chronic Myeloid Leukemia Treatment. ANTICANCER RESEARCH 24 : (2004); p. 2535-2540.

86. Nannya Y, Yokota H, Sato Y, Yamamoto G, Takashi A, Motoshi I et al. Molecular and cytogenetic response of chronic myelogenous leukemia treated with imatinib mesylate: one institutional experience in Japan. Int J Hematol 2008; 88: p. 159-64.

87. National Comprehensive Cancer Network (13.NCCN). Clinical Practice Guidelines in Oncology: Chronic Myelogenous Leukemia. V.2.2010. Fort Washington, PA: NCCN; 2010.

88. Nowell PC, Hungerford D. A, A minute chromosome in human granulocytic leukemia. Science 1960. 132: p.1497-1501.

89. Novartis 29/10/2007 Press Release.

90. Nacheva E, Holloway T, Brown K, Bloxham D, and Green A. R, Philadelphia negative chronic myeloid leukaemia: detection by FISH of bcr-abl fusion gene localized either to chromosome 9 or chromosome 22. Br J Haematol, 1994. 87 (2): p. 409-412.

91. Nicoletta Testoni, Giulia Marzocchi, Simona Luatti, Marilina Amabile et al. Chronic myeloid leukemia: a prospective comparison of interphase for fluorescence in situ hybridization and chromosome banding analysis for the definition of complete cytogenetic response: a study of the GIMEMA CML WP. 2009 114: p. 4939-4943.

92. O'Brien S, Thall P, Siciliano M. J. - Cytogenetics of chronic myelogenous leukemia – Bailliere's Clinical Haematology 1997; 10: p.259-272.

93. O'Dwyer M. E, and Druker B. J, Chronic myelogenous leukaemia--new therapeutic principles. J Intern Med, 2001. 250 (1): p. 3-9.

94. Oda T, Heaney C, Hagopian J. R, Okuda K, Griffin J, D. and Drucker B.J, Crkl is the major tyrosine-phosphorylated protein in neutrophils from patients with chronic myelogenous leukemia. J Biol Chem, 1994. 269 (37): p. 22925-22928.

95. Oyekunle AA, Osho PO, Aneke JC, Salawu L, Durosinmi MA. The predictive value of the Sokal and Hasford scoring systems in chronic myeloid leukaemia in the imatinib era. Journal of Hematological Malignancies, June 2012, Vol. 2, No. 2

96. PMed: 20189974 http://dx.doi.org/10.1093/jjco/hyq012

97. P. Laneuville MD, M.J. Barnett BM, R. Bélanger MD, S. Couban MD, D.L. Forrest MD et al. Recommendations of the Canadian Consensus Group on the Management of Chronic Myeloid Leukemia. Current oncology, Volume 13, Number 6.

98. Pane F, Frigeri F, Sindoma M, Luciano L, Ferrara F, Cimino R, Meloni G, Saglio G, Salvatore F, and Rotoli B, neutrophilic chronic myeloid leukemia a distinct disease with a specific molecular marker (bcr abl with C3/ A2 juction). Blood, 1996. 88 (7): p. 2410-2414.

99. Pierce A, Spooncer E, Wooley S, et al, Bcr-abl protein tyrosine kinase activity induces a loss of p53 protein that mediates a delay in myeloid differentiation – oncogene. 2000 Nov 16; 19 (48): p. 5487-5497.

100. Prabhu M, Kochupillai V, Sharma S, Ramachandran P, Sundaram KR, Bijlani L, et al.Prognostic assessment of various parameters in chronic myeloid leukemia. Cancer 1986; 5: p. 1357–60.

101. Philippe R, Pascale Cony-Makhoul, Franck N et.al. Long-term safety and efficacy of imatinib mesylate (Gleevec®) in elderly patients with chronic phase chronic myelogenous leukemia: Results of the AFR04 study. American Journal of Hematology, Volume 88, Issue 1: p. 1-4.

102. Preparation of peripheral blood cells for chromosome analysis… www.lifetechnologies.com

103. Rohrbacher M, Hasford J. Epidemiology of chronic myeloid leukaemia (CML). Best Pract Res Clin Haematol 2009; 22: 295–302.

104. Rosti, G, et al, Molecular response to imatinib in late chronic phase chronic myeloid leukemia. Blood, 2004. 103(6): p. 2284-2290.

105. Philippe Rousselot, Pascale Cony-Makhoul, Franck Nicolini, François Xavier Mahon,et.al. Long-term safety and efficacy of imatinib mesylate

(Gleevec®) in elderly patients with chronic phase chronic myelogenous leukemia: Results of the AFR04 study. American Journal of Hematology, 2012.

106. Studio prospettico nella LMC Ph+: La FISH é efficace quanto la citogenetica convenzionale per la definizione della risposta al trattamento con Imatinib. Correlacione con la risposta molecolare. Nicoletta Testoni, 2008.

107. Sugita J, Tanaka J, Kurosawa M, Fukuhara T, Hashino S, Torimoto E et al. Effects of the mean daily doses of imatinib during the first year on survival of patients with chronic myeloid leukemia in Japan: a study of the Hokkaido Hematology Study Group. Eur J Haematol 2008; 80: p. 160-163.

108. Savage DG, Szydlo RM, Goldman JM. Clinical features at diagnosis in 430 patients with chronic myeloid leukaemia seen at a referral centre over a 16-year period. Br J Haematol 1997; 96: p. 111–16.

109. Sawyers C. L, Chronic myeloid leukemia. N Engl J Med, 1999. 340 (17): p. 1330-1340.

110. Sawyers C. L, The bcr abl gene in chronic myelogenous leukaemia. Cancer Surv, 1992. 15: p. 37-51.

111. Senechal K, Halpern J, and Sawyers C. L, The CRKL adaptor protein transforms fibroblasts and functions in transformation by the bcr abl oncogene. J Biol Chem, 1996. 271(38): p. 23255-23261.

112. Sokal J. E, Prognosis in chronic myeloid leukaemia, biology of the disease vs. treatment. Baillieres Clin Haematol, 1987. 1(4): p. 907-929.

113. Spiers A. S, Bain B. J, and Turner J. E, The peripheral blood in chronic granulocytic leukaemia. Study of 50 untreated Philadelphia positive cases. Scand J Haematol, 1997. 18(1): p. 25-38.

114. Shtivelman E, et al, Fused transcript of bcr and abl genes in chronic myelogenous leukaemia. Nature, 1985. 315(6020): p. 550-55.

115. Sheet AS, Jahagirdar BN, Verfaillie CM. Chronic myelogenous leukemia: mechanisms underling disease progression – Leukemia.2002; 16: p. 1401-1411.

116. Specchia G, Albano F, Anelli L, Greco G, et al. Derivative chromosome 9 deletions in chronic myeloid leukemia are associated with loss of tumor suppressor genes- Leukemia and lymphoma 2003: p.1-5.

117. Silver R. T, Morphology of the blood and marrow in clinical practice. Vol. 84. 1970, New York, NY: Grune and Stratton.

118. Steven Le Gouill, Pascaline Talmant, Noe¨l Milpied, Axelle Daviet, Miche`le Ancelot, Philippe Moreau. Fluorescence In Situ Hybridization on Peripheral-Blood Specimens Is a Reliable Method to Evaluate Cytogenetic Response in Chronic Myeloid Leukemia. Journal of Clinical Oncology, Vol 18, No 7 (April), 2000: p. 1533-1538.

119. Talpaz M, McCredie K. B, Mavligit G. M, and Gutterman J. U, Leukocyte interferon – induced myeloid cytoreduction in chronic myelogenous leukemia. Blood, 1983. 62(3): p. 689-692.

120. Tkachuk D. C, Westbrook C. A, Andreeff M, Donlon T. A, Cleary M. L, Suryanarayan K, Homge M, et al, Detection of bcr-abl fusion in chronic myelogeneous leukemia by in situ hybridization. Science, 1990. 250(4980): p. 559-562.

121. Thompson PW, White AD (1992). Cytogenetics. In Leukaemia (Ed JA Whittaker):p. 182-202. Blackwell Scientific Publications, Oxford.

122. Usman M, NN Syed, GN Kakepoto, SN Adil, M Khurshid. Chronic phase, chronic myeloid leukemia; Response of Imatinib mesylate and significance of Sokal score, age and disease duration in predicting the hematological and cytogenetic response. JAPI. Vol 55, 2007.

123. Ulla Olsson- Stromberg. Clinical and experimental studies in chronic myeloid leukemia. 2007.

124. Virchov R, Weisses Blut, Frorieps Notizen: 1845. 36: p.151-156.

125. Vaneuza A. M. Funke; Carlos R. Medeiro; Denise H. Lima; Daniela C. Setúbal; Marco A. Bitencourt; Carmem M. Bonfim; Jefferson Ruiz; José Zanis Neto; Ricardo Pasquini. Therapy of chronic myeloid leukemia with imatinib mesylate in Brazil: a study of 98 cases Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia vol. 27 nr.3 July/Sept. 2005.

126. Yusuf BİLEN, Fuat ERDEM. Hematologic, cytogenetic, and molecular responses to imatinib therapy for chronic myeloid leukemia a single-center experience in Turkey. TÜBİTAK, Turk J Med Sci 2012; 42 (1): p.31-38.

127. Yuan Wei. Molecular Monitoring of Chronic Myeloid Leukemiatreated with Imatinib mesylate. Sweden, Göteborg 2007.

128. Walz C, Sattler M. Novel target therapies to overcome imatinib mesylateresistance in chronic myeloid leukemia (CML)- Oncology Hematology 2006; 57 (2): p.145-64.

129. Wilson G, Frost L, Goodeve A, Vandenberghe E, Peake I, and Reilly J, bcr abl transcript with an e19a2(c3a2) junction in classical chronic myeloid leukemia. Blood, 1997. 89 (8): p. 3064.

130. Zhao Y, Liu L, Wang Y, Wu G, Lai X, Cao W et al. Efficacy and prognosis of chronic myeloid leukemia treated with imatinib mesylate in a Chinese population. Int J Hematol 2009; 89: p. 445-451.

SHTOJCAT

Shtojca 1

Të dhënat anamnestetike të pacientëve në kohën kur janë paraqitur në QSUT

Nr	Mo-Sha	Gji-nia	Rre-Thi	Dobësi e përgji-thshm e	Rënie në peshë	Ethe	Dhimbje muskular e dhe kockore	Dhimbje në abdomen	Hemoragji	Splено-megali
1	50	F	VL	+	+	+	+	+	+	-
2	55	F	TR	+	+	+	+	-	-	+
3	50	F	SH	+	+	+	+	-	+	+
4	52	M	TR	+	-	-	+	+	-	+
5	44	F	DR	+	-	+	+	+	-	+
6	18	F	FR	+	-	+	-	-	-	-
7	40	F	BR	+	+	+	+	+	+	+
8	62	F	KR	+	-	-	+	+	-	+
9	48	M	TR	+	-	+	+	+	-	+
10	60	M	TR	+	-	+	+	+	-	+
11	72	M	TR	+	-	+	+	-	-	-
12	60	M	TR	+	-	+	+	+	+	+
13	28	F	TR	+	+	+	+	+	+	+
14	50	M	TR	+	+	+	+	+	-	+
15	57	M	TR	+	+	+	+	+	-	+
16	45	F	TR	+	-	+	+	+	-	+
17	56	M	TR	+	-	+	-	+	-	+
18	36	F	TR	+	-	+	+	+	-	+
19	53	F	TR	+	-	-	+	+	-	+
20	23	M	TR	+	+	+	+	+	-	+
21	60	F	KO	+	-	+	+	-	-	+
22	41	F	KO	+	-	+	+	+	-	+
23	35	F	VL	+	-	+	+	+	-	-
24	59	M	SR	+	-	-	+	-	-	+
25	31	M	TR	+	-	+	+	+	-	+
26	53	M	TR	+	+	+	+	+	-	+
27	38	F	TR	+	-	-	+	+	-	+
28	44	M	KJ	+	-	+	+	+	-	+
29	57	M	TR	+	+	-	+	+	-	+
30	51	F	TR	+	-	+	+	-	-	+
31	48	M	TR	+	-	-	+	+	-	+
32	45	F	TR	+	+	-	+	+	-	+
33	47	M	TR	+	-	-	+	+	-	+
34	51	F	TR	+	-	+	+	+	-	+
35	52	M	SH	+	+	-	+	+	-	-
36	54	M	TR	+	-	-	+	+	-	+
37	50	F	DR	+	-	+	+	+	-	+
38	30	M	TR	+	-	-	+	+	-	-

39	30	M	TR	+	-	-	+	+	-	+
40	41	M	TR	+	+	+	+	+	+	+
41	37	F	TR	+	-	-	+	+	-	+
42	66	M	TR	+	+	-	-	+	-	+
43	43	F	TR	+	-	+	+	+	-	+
44	67	F	TR	+	+	-	+	+	-	+
45	33	M	TR	+	-	+	+	-	-	-
46	45	F	TR	+	-	+	+	+	-	+
47	69	M	TR	+	+	+	+	+	+	+
48	40	M	TR	+	+	-	+	+	-	+
49	63	F	TR	+	-	+	+	+	-	+
50	68	M	TR	+	+	+	+	+	+	+
51	44	F	TR	+	-	-	+	-	-	-
52	72	M	TR	+	-	+	+	+	-	+
53	42	F	TR	+	-	-	-	+	-	+
54	65	M	TR	+	-	+	+	+	-	+
55	54	M	TR	+	+	-	+	+	-	+
56	68	M	BR	+	+	+	+	+	+	+
57	43	M	TR	+	-	-	+	+	-	+
58	48	M	TR	+	-	+	+	+	-	+
59	45	M	TR	+	+	-	+	+	-	+
60	65	F	TR	+	+	+	+	+	+	+
61	60	M	TR	+	+	-	+	+	-	+
62	22	M	KO	+	-	-	+	+	-	+
63	23	M	TR	+	-	+	+	+	-	-
64	57	F	TR	+	+	+	+	+	-	+
65	47	M	TR	+	+	+	+	+	-	+
66	63	M	TR	+	-	+	+	+	-	+
67	59	M	TR	+	-	+	+	-	-	+
68	48	F	TR	+	-	-	+	+	-	+
69	49	M	TR	+	+	+	+	+	-	+
70	65	M	TR	+	-	+	-	+	-	-

Shtojca 2

Parametrat diagnostikues të nevojshëm për llogaritjen e formulës së Sokal-it
[0.116 (mosha - 43.4)] + 0.0345 (madhësia e shpretkës - 7.51) + 0.188 [(numri i trombociteve/700)² - 0.563] + 0.0887 (përqindja e blasteve - 2.10)

Nr.	Mosha e pacientit	Nr. i variablave në normë	Nr. i blasteve në mielogram (%)	Nr. i trombociteve në gjakun periferik nr x 10^9 /L	Madhësia e shpretkës (cm)	Perfundimi sipas Sokal-it
1	50	3	3	370	10	0,6 Ulët
2	55	2	5	340	13	1,7 Lartë
3	50	1	6	210	13	1,2 Mes
4	52	0	9	90	15	1,7 L
5	44	0	9	80	13	0,7 U
6	18	2	4	90	10	-2,7 U
7	40	0	10	100	13	0,3 U
8	62	0	7	130	13	2,5 L
9	48	0	10	140	13	1,3 L
10	60	0	7	140	13	2,3 L
11	72	1	6	220	14	3,7 L
12	60	2	4	130	11	2,1 L
13	28	0	10	140	14	-1,7 U
14	50	1	16	150	14	2,0 L
15	57	0	8	130	14	1,3 L
16	45	1	10	150	13	0,9 M
17	56	1	11	150	13	2,9 L
18	36	2	4	440	14	-0,4 U
19	53	2	4	150	14	1,3 L
20	23	0	13	80	13	-2,8 U
21	60	0	7	130	13	2,3 L
22	41	0	12	100	15	-1,2 U
23	35	3	5	150	11	-0,6 U
24	59	0	12	120	17	2,8 L
25	31	1	6	150	15	-0,8 U
26	53	0	10	110	15	1,9 L
27	38	1	11	150	15	0,2 U
28	44	1	8	440	15	0,7 U
29	57	0	14	130	15	2,5 L
30	51	1	14	150	16	1,9 L
31	48	1	15	390	15	1,8 L
32	45	0	12	80	15	1,1 M
33	47	2	5	150	13	0,7 U
34	51	1	13	290	14	1,8 L
35	52	1	6	130	10	1,1 M
36	54	1	12	150	13	2,1 L
37	50	1	13	350	14	1,9 L
38	30	1	8	70	12	-0,6 U

39	30	0	13	130	18	-1,7 U
40	41	2	3	340	14	-2,6 U
41	37	1	9	150	13	-2,0 U
42	66	1	12	250	14	3,5 L
43	43	1	4	70	13	0,2 U
44	67	0	10	100	14	3,5 L
45	33	3	4	360	10	-1,0 U
46	45	0	6	140	14	0,6 U
47	69	1	6	410	14	3,4 L
48	40	0	7	60	14	0,3 U
49	63	1	8	150	14	2,8 L
50	68	1	6	400	15	3,3 L
51	44	1	10	150	12	0,8 M
52	72	1	16	150	14	4,6 L
53	42	1	16	210	15	-0,5 U
54	65	1	2	110	15	2,7 L
55	54	0	14	140	14	2,2 L
56	68	0	6	130	14	3,2 L
57	43	1	5	140	15	0,3 U
58	48	1	13	340	17	1,8 L
59	45	0	16	60	18	1,5 L
60	65	1	7	150	14	3,0 L
61	60	0	9	140	14	2,6 L
62	22	1	12	440	14	-1,9 U
63	23	3	2	430	12	-2,2 U
64	57	0	8	120	14	2,1 L
65	47	0	10	140	13	1,1 M
66	63	1	3	100	14	2,4 L
67	59	0	6	50	13	2,2 L
68	48	1	6	410	13	0,9 L
69	49	0	7	50	13	1,1 M
70	65	3	4	400	10	2,9 L

Vlerat e normës:
Shpretka 10-12cm
Blaste < 5%
Trombocite 150000-450000/ µl gjak

Shtojca 3

Periudha kohore e arritjes së përgjigjes të plotë dhe të pjesshme hematologjike dhe vlerat e leukociteve dhe trombociteve për çdo pacient të shprehura në shifrat x10^9/L

Nr	Në momentin e vendosjes së diagnozës leukocite :trombocite		Muaji i parë Leukocite:trombocite		Muaji i dytë leukocite :trombocite		Muaji i tretë leukocite :trombocite		Muaji i gjashtë leukocite :trombocite	
1	13	370	9	350						
2	32	340	12	250	8,3	210				
3	15	210	8,4	150						
4	34	90	17	120	9,1	150				
5	11	80	6,8	160						
6	12	90	8,7	180						
7	13,6	100	9,1	175						
8	21	130	8,9	170						
9	13	140	9,2	160						
10	34,8	140	34	160	33	140	27	60	25	90
11	24,9	220	23,7	270	12	160	6,9	160		
12	30	130	27	110	15	80	15	120	14	140
13	12,5	140	9,1	160						
14	11,3	150	8,4	160						
15	17	130	14	140	8,9	150				
16	16	150	9,2	185						
17	15	150	8,7	160						
18	13	440	6,9	430						
19	17	150	9,5	220						
20	15,8	80	6,3	170						
21	60,6	130	23	120	12	140	7,6	170		
22	34,9	100	7,5	170						
23	45,9	150	6,8	220						
24	34,9	120	14	100	7,9	240				
25	45,8	150	5,9	230						
26	56	110	18,6	120	8,6	260				
27	34	150	7,9	270						
28	32	440	8,6	350						
29	86, 3	130	27	130	18,9	120	17,9	140	15,7	290
30	34	150	27,3	320	6,4	420				
31	74,1	390	12,6	350	8,7	340				
32	32	80	7,9	220						
33	13	150	6,5	210						
34	16	290	8,1	230						
35	18,9	130	8,7	220						
36	34,9	150	6,8	210						

37	18,9	350	9,5	340							
38	19,4	70	5,7	160							
39	43	130	8	170							
40	34	340	6,5	240							
41	64,8	150	7,9	220							
42	54,8	250	6,8	210							
43	45,9	70	7,8	160							
44	34,8	100	13	120	12,5	130	9,3	240			
45	43,2	360	7,6	340							
46	34,8	140	6,8	170							
47	83,6	410	20	400	18,5	230	12,3	200	12,1	180	
48	17,5	60	6	160							
49	54,8	150	14	130	8,7	200					
50	64,9	400	23	320	17	310	15,8	220	14,2	180	
51	18,9	150	6,8	200							
52	43,6	150	6,5	220							
53	34,2	210	6,9	250							
54	65,8	110	17,4	140	9,6	200					
55	34,8	140	7,7	180							
56	54,9	130	13	130	6,8	160					
57	34,8	140	7,9	170							
58	34,7	340	8,2	180							
59	23,6	60	6,9	190							
60	85,8	150	23,1	130	12	140	5,8	200			
61	34,8	140	11,8	150	5,6	200					
62	54,8	440	7,9	340							
63	34,2	430	8,1	340							
64	31,4	120	12	230	7,9	300					
65	32,3	140	6,9	150							
66	33,6	100	14,7	130	10,7	140	6,6	220			
67	34,8	50	13,8	130	11,2	130	6,5	170			
68	45,8	410	13	310	8,6	290					
69	34,9	50	6,8	170							
70	87,6	400	34	450	29	300	27	210	16,9	220	

Legjenda
Ngjyra e verdhë - pacienti ka arritur përgjgije hematologjike të plotë.
Ngjyra e gjelbërt - pacienti ka arritur përgjigje hematologjike të pjesshme.
Ngjyra e kuqe- pacienti nuk ka arritur përgjigje hematologjike për 6 muaj dhe rrit dozën e Glivekut.

Vlera e normës së leukociteve 4-10 x 10^9/L
Vlera e normës së trombociteve 150-450 x 10^9/L

Shtojca 4

Arritja e përgjigjeve citogjenetike gjatë 24 muajve trajtim me Glivek (vlerat janë të shprehura në përqindje)

Nr	Përgjigjet citogjenetike muaji 0					Përgjigjet citogjenetike muaji 12					Përgjigjet citogjenetike muaji 24				
	PCP	PCPj	PCM	PCm	PP	PCP	PCPj	PCM	PCm	PP	PCP	PCPj	PCM	PCm	PP
1			43				30				0				
2				87		0					0				
3					92				72						
4				85			35				0				
5		12				0					0				
6		23				0					0				
7		17				0					0				
8				76					66						
9				77			30				0				
10					96										
11					98				69						
12					97										
13		5				0					0				
14			56				33					32			
15			45				32				0				
16		12				0					0				
17		29				0					0				
18		11				0					0				
19		23				0					0				
20		7				0					0				
21					97				78						
22		16				0					0				
23		29				0					0				
24		32				0					0				
25		5				0					0				
26		7				0					0				
27		7				0					0				
28		4				0					0				
29					97										
30		21					10				0				
31				84					67						
32			57				34				0				
33		32				0					0				
34		22				0					0				
35		18				0					0				
36					96		17				0				
37			61				35				0				
38		31				0					0				
39		21				0					0				
40		17				0					0				

41		13				0					0				
42		29				0					0				
43		32				0					0				
44				92			16				0				
45		32				0					0				
46		21				0					0				
47					96										
48		15				0					0				
49			58			0					0				
50					98										
51		34				0					0				
52		28				0					0				
53		19				0					0				
54		33				0					0				
55		21				0					0				
56					98		23				0				
57		22				0					0				
58		30				0					0				
59		24				0					0				
60				85		0					0				
61		32				0					0				
62		34				0					0				
63		23				0					0				
64		34				0					0				
65		27				0					0				
66					96		34				0				
67		14				0					0				
68				81			13				0				
69			62			0					0				
70					98										

Legjenda

PCP- Përgjigje citogjenetike e plotë
PCPj- Përgjigje citogjenetike e pjesshme
PCM- Përgjigje citogjenetike minore
PCm - Përgjigje citogjenentike minimale
PP- Pa përgjigje
Ngjyra e kuqe - pacienti nuk ka arritur përgjigje hematologjike ose citogjenetike dhe nuk përfshihet më në këtë skemë trajtimi
Nënvizim- doza e Glivekut rritet

Shtojca 5

Parametrat diagnostikues të vlefshëm për klasifikimin e pacientëve sipas sistemit EUTOS

7 x nr.i bazofileve në gjakun periferik + 4 x madhësia e shpretkës

Nr.	Nr. i bazofileve në gjakun periferik (%)	Madhësia e shpretkës (cm)	Përfundimi sipas EUTOS	Përfundimi sipas Sokal-it	Përgjigje citogjenetike komplete Muaji 24
1	4,1	10	67,7 U	0,6 Ulët	+
2	5,3	13	87,1 L	1,7 Lartë	-
3	5,6	13	91,2 L	1,2 Mesatar	-
4	4,1	15	88,7 L	1,7 L	-
5	3,5	13	76,5 U	0,7 U	+
6	4,2	10	69,4 U	-2,7 U	+
7	4,0	13	80 U	0,3 U	+
8	5,6	13	91,2 L	2,5 L	-
9	5,6	13	91,2 L	1,3 L	-
10	3,5	13	76,5 U	2,3 L	+
11	5,9	14	97,3 L	3,7 L	-
12	5,0	11	79 U	2,1 L	+
13	3,9	14	83,3 U	-1,7 U	+
14	5,9	14	97,3 L	2,0 L	-
15	4,1	14	84,7 U	1,3 L	+
16	3,5	13	76,5 U	0,9 M	+
17	3,5	13	76,5 U	2,9 L	+
18	4,1	14	84,7 U	-0,4 U	+
19	3,9	14	83,3 U	1,3 L	+
20	3,5	13	76,5 U	-2,8 U	+
21	5,8	13	92,6 L	2,3 L	-
22	3,9	15	86,6 U	-1,2 U	+
23	5,0	11	79 U	-0,6 U	+
24	2,5	17	85,5 U	2,8 L	+
25	3,9	15	86,6 U	-0,8 U	+
26	3,1	15	81,7 U	1,9 L	+
27	3,9	15	86,6 U	0,2 U	+
28	3,9	15	88,7 L	0,7 U	+
29	3,9	15	86,6 U	2,5 L	+
30	3,0	16	85 U	1,9 L	+
31	4,1	15	88,7 L	1,8 L	-
32	4,4	15	90,8 L	1,1 M	-
33	4,0	13	80 U	0,7 U	+
34	3,9	14	83,3 U	1,8 L	+
35	4,2	10	69,4 U	1,1 M	+
36	5,6	13	91,2 L	2,1 L	-

37	4,0	14	84 U	1,9 L	-
38	5,5	12	86,5 U	-0,6 U	+
39	2,5	18	87,5 L	-1,7 U	+
40	4,0	14	84 U	-2,6 U	+
41	3,5	13	76,5 U	-2,0 U	+
42	4,1	14	84,7 U	3,5 L	+
43	3,5	13	76,5 U	0,2 U	+
44	3,9	14	83,3 U	3,5 L	+
45	5,0	10	75 U	-1,0 U	+
46	3,9	14	83,3 U	0,6 U	+
47	4,1	14	84,7 U	3,4 L	+
48	3,9	14	83,3 U	0,3 U	+
49	4,1	14	84,7 U	2,8 L	+
50	3,9	15	86,6 U	3,3 L	+
51	5,5	12	86,5 U	0,8 M	+
52	4,1	14	84,7 U	4,6 L	+
53	3,9	15	86,6 U	-0,5 U	+
54	3,9	15	86,6 U	2,7 L	+
55	4,1	14	84,7 U	2,2 L	+
56	4,3	14	86,1 U	3,2 L	-
57	2,9	15	80,3 U	0,3 U	+
58	2,9	17	88,3 L	1,8 L	-
59	3,0	18	93 L	1,5 L	-
60	5,5	14	94,5 L	3,0 L	-
61	5,9	14	97,3 L	2,6 L	-
62	4,1	14	84,7 U	-1,9 U	+
63	5,5	12	86,5 U	-2,2 U	+
64	5,1	14	91,7 L	2,1 L	-
65	4,0	13	80 U	1,1 M	+
66	4,0	14	84 U	2,4 L	-
67	3,5	13	76,5 U	2,2 L	+
68	3,8	13	78,6 U	0,9 L	-
69	5,2	13	88,4 L	1,1 M	-
70	4,2	10	69,4 U	2,9 L	+

Vlera e normës së bazofileve: 0,01-3%

Shtojca 6

Korrelacioni midis përfundimeve të kariotipit dhe FISH-it në muajin e 12 dhe 24 të trajtimit me Glivek

	MUAJI 12			MUAJI 24
Nr	KARIOTIP	FISH	PCR	KARIOTIP
1	30% Ph+	32% BCR-ABL		0% Ph+
2	0	0	7,12 BCR-ABL	0
3	72	75		-
4	35	40		0
5	0	0	0,057	0
6	0	0,3	20,54	0
7	0	0	0,036	0
8	66	64		-
9	30	32		0
10	-	-		-
11	69	72		-
12	-	-		-
13	0	0	0,002	0
14	33	41		32
15	32	36		0
16	0	0	7,23	0
17	0	0	0,05	0
18	0	0,2	28	0
19	0	0	0,101	0
20	0	0	22,15	0
21	78	84		-
22	0	0	0,008	0
23	0	0	0,023	0
24	0	0	0,48	0
25	0	0	0,35	0
26	0	0	0,58	0
27	0	0	0,09	0
28	0	0	13,03	0
29	-	-		-
30	10	6		0
31	67	52		-
32	34	37		0
33	0	0	0	0
34	13	8		0
35	0	0	0	0
36	17	20		0
37	35	38		0
38	0	0	0,086	0
39	0	0	0,072	0

40	0	0,1	1,54	0
41	0	0	0,023	0
42	16	10		0
43	0	0	13,03	0
44	0	0	21	0
45	0	0	0,004	0
46	0	0	0,007	0
47	-	-		-
48	0	0,3	20,54	0
49	0	0	0,001	0
50	-	-		-
51	0	0	0,02	0
52	0	0	0,09	0
53	0	0	0,001	0
54	0	0	0,02	0
55	0	0	0,003	0
56	23	30		0
57	0	0	0,066	0
58	0	0	0,02	0
59	0	0	0,013	0
60	0	0	24,79	0
61	0	0	21	0
62	0	0	17,36	0
63	0	0	0,023	0
64	34	39		0
65	0	0	9,39	0
66	0	0	48,6	0
67	0	0	0,091	0
68	0	0	24,81	0
69	0	0	0,132	0
70	-	-		-

Legjenda:

Ngjyra e kuqe- pacienti largohet nga kjo skemë trajtimi

Ngjyra e verdhë – pacienti ka arritur përgjigje molekulare

Shtojca 7

Mesataret, medianat, modat, deviacionet standarte, minimumet dhe maksimumet e variablave të përdorur.

	Frekuenca	Mesatare	Mediana	Moda	SD	Minimum	Maximum
Mosha	70	49.23	50.00	45.00	12.72	18.00	72.00
Variab. në normë	70	.86	1.00	1.00	.87	.00	3.00
Blaste mielogr	70	8.56	8.00	6.00	3.82	2.00	16.00
Tromb gj per	70	187.00	145.00	150.00	115.79	50.00	440.00
Shpretka cm	70	13.69	14.00	14.00	1.66	10.00	18.00
Kariotip 12	70	9.91	.00	.00	20.15	0	78
FISH 12	70	9.96	.00	.00	20.50	.00	84.00
Kariotip 24	70	.46	.00	.00	3.82	.00	32.00
Leuk 0	70	34.41	34.00	34.80	19.21	.00	87.60
Tromb 0	70	187.00	145.00	150.00	115.79	50	440
Leuk 1	70	11.74	8.70	6.80	6.87	5.70	34.00
Tromb 1	70	203.29	177.50	160.00	88.02	.00	450.00
Leuk 2	25	12.28	9.60	12.00	6.68	5.60	33.00
Tromb 2	19	190.53	160.00	140.00	67.78	80.00	310.00
Leuk 3	11	13.71	12.30	27.00	7.75	5.80	27.00
Tromb 3	12	175.83	185.00	170.00	50.89	60.00	240.00
Leuk 6	9	10.88	14.00	.00	8.92	.00	25.00
Tromb 6	9	122.22	140.00	.00	106.39	.00	290.00
EFS 12	58	1.00	1.00	1.00	.00	1.000	1.000
PCR 12	46	6.58	.09	.02	10.99	.000	48.600

Shtojca 8

Mjetet laboratorike të nevojshme për proçedurën e kariotipit

Mjete laboratorike dhe aparatura

1. Shiringa 1cc,10cc
2. Llambë me alkool
3. Hot steril
4. Pipeta Pasteur
5. Shishe horizontale për mbjellje gjaku
6. Shënues kohe
7. Provëza
8. Vaskë horizontale dhe vertikale
9. Pipeta
10. Termometër
11. Banjomari
12. Lama mikroskopi
13. Baekers 50, 100, 500 ml
14. Cilindra qelqi 100, 250ml
15. Erlenmayer 100, 250 ml
16. Peshore
17. Centrifugë
18. Termostat
19. Mikroskop Workstation Genikon

Reagentët dhe solucionet e nevojshme

1. Phytohemagglutinin M,10 ml, lyophylized
2. Terren Lymph-grow plus
3. Colcemid (Demecholcine), 10µg/ ml, 10 ml, lyophylized
4. Synchroset
5. Klorur kaliumi, KCl 0,075 M
6. Alkool etanol absolut, C_2H_6O
7. Acid acetik glacial, $C_2H_4O_2$
8. Xylol, C_8H_{10}
9. Citat natriumi $C_6H_5Na_3O_7$ x 5,5 H_2O
10. Vaj cedri
11. Bikromat potasiumi, $Cr_2K_2O_7$
12. Acid sulfurik, H_2SO_4
13. NaCl 0,9%
14. NaCl 1,8%
15. Giemsa lossung

Mjetet laboratorike të nevojshme për proçedurën e citogjenetikës molekulare (FISH)

Reagentët, solucionet dhe aparaturat e nevojshme

1. 20 x solucion SSC (SSC: 3 M NaCl; 0,3 M citrat Na, pH 7)

2. Pepsin 40 njësi/ml në 10 mM HCl
3. Paraformaldehid për denatyrim
4. Ethanol
5. Biotin, shënuese për sondat
6. Solucion miks për hibridizim (50% formamid, 10% sulfat dextran, 0.5-1.5 ng/µl shënuese për sondat dhe 300 ng/ml ADN e spermës së salmonit) në 2x SSC
7. Solucion për larje: 20% formamide në 0.1x SSC
8. Solucion dedektimi: 0.2% Tween 20 në 4x SSC
9. Solucion bllokues: 5% albumin bovine në solucionin e dedektimit
10. Solucion për dedektim ose antitrupa (Streptavidin-Cy3 në solucionin bllokues)
11. DAPI 2
12. Mikroskop me fluoreshencë Genikon
13. Lama mikroskopi
14. Mbulesa plastike për inkubim dhe hibridizim
15. Ngrohës dhe modifikues temperature
16. Vaska Koplin për larje

Shtojca 9

Procedura e kariotipit

Marrja dhe mbjellja e gjakut

- Për çdo pacient marrim 5-10 ml gjak periferik në shiringa të shplara me 0,1 ml heparinë sodike për të penguar koagulimin e gjakut. Mendohet se heparina mund të ndërhyjë edhe në veçimin e leukociteve nga qelizat e tjera të gjakut.

- Pasi vendosim shiringën në pozicionin vertikal për 3-4 orë në mënyrë që të ndodh ndarja e elementeve të figuruara të gjakut, mbjellim në një ambjent steril 1 ml plazmë të pasur me leukocite që ndodhen në shtresën e bardhë opaleshente të gjakut. Mbjellja kryhet në shishe plastike sterile që përmbajnë 6-8 ml terren. Terrenet e përdorura mund të jenë;

a- LYMPH-GROW plus (terren komplet për limfocitet me PHA)

Përbëhet nga terren RPMI - 1640 (Roswell Park Memorial Institute - i cili është instituti ku ky terren u krijua për herë të parë) dhe që përmban vitamina, aminoacide, kripëra, karbohidrate si edhe tregues të pH. Këtij terreni bazë i shtojmë edhe L-glutaminë, serum fetal bovin dhe antibiotikë (penicilinë dhe streptomicinë).

b- CHROMOSOME SYNCHRO P

Kulturës qelizore i shtojmë edhe 0,1 ml të një agjenti mitogjen, fitohematoglutininë (ekstrakt i fasules së zakonshme *Phaseolus vulgaris*) që ka aftësinë për të nxitur ndarjen qelizore.
Të gjitha këto veprime i kryejmë në një mjedis (hot steril) në të cilin qarkullon ajër steril i dalë nga filtra të posaçëm dhe nën flakën e llambës me alkool. Për çdo kampion mbjellim dy kultura dhe i inkubojmë shishet në termostat në temperaturë 37º C për 72 orë me tapën e mbyllur mirë.

Sinkronizimi i kulturave qelizore. Metodika për kromozomet me rezolucion të lartë (> 500 banda) Kit " Synchroset''

Nëpërmjet metodikës për kromozomet me rezolucion të lartë duke përdorur kitin "Synchroset" përftojmë kromozome prometafazikë me 850-1000 banda për një komplet kromozomik haploid.
Kjo metodë është e përshtatshme për identifikimin me saktësi të disa mikroanomalive në kariotip të cilat nuk mund të evidentohen vetëm me proçedurën standarte të kariotipit. Për kryerjen e kësaj metodike përdoren solucionet A dhe B të cilat përmbajnë timidinë dhe fluorodeoksiuridinë. Këto solucione duhen ruajtur në -20 °C dhe duhen mbrojtur nga drita. Përsëritjet ngrirje-shkrirje nuk ndikojnë në uljen e performancës së metodës.

- Pas 48-56 orë, në kulturë shtojmë 0,1 ml solucion A të kitit "Synchroset".
- Inkubojmë në 37º C për gjithë natën.
- Shtojmë 0,1 ml solucion të kitit B "Synchroset" dhe e vendosim në termostat për 5 orë.

- Shtojmë 0,2 ml kolcemid (10µg/ml) dhe e vendosim në termostat për 20 minuta me qëllim që të kemi një numër më të madh prometafazash.

Teknika citogjenetike standarte

- Kalojmë përmbajtjen e shisheve në tuba centrifuge prej 15 ml dhe tubat i centifugojmë me 1000 rrotullime/ minutë për 5 minuta. Supernatantin e heqim me pipetë Pasteur.
- Në suspensionin e sedimentit shtojmë 6 ml tretësirë KCl 0,075 M (solucion hipotonik) për 45 minuta në temperaturë 37º C.
- Shtojmë 2-3 ml solucion fiksues të përbërë nga alkooli etilik absolut dhe acidi acetik glacial në raportin 3:1.
- Centrifugojmë me 1000 rrot/min për 10 minuta. Supernatantin e heqim me pipetë Pasteur.
- Risuspensionit të sedimentit i shtojmë 6-8 ml tretësirë fiksuese.
- Centrifugojmë përsëri me 1000 rrotullime/min për 10 minuta dhe pjesën e precipituar e vendosim në frigorifer në temperaturën 4º C për 24 orë.

Hapja e materialit në lama

- Në secilin tub shtojmë 6 ml solucion fiksues.
- Centrifugojmë tubat me 2000 rrot/min për 5 minuta.
- Supernatantin e heqim me pipetë Pasteur.
- Shtojmë 0,5 ml të tretësirës fiksuese në secilin tub.
- Pregatisim preparatet duke pikuar solucionin mbi çdo lamë të pastruar mirë dhe të ruajtur në ujë të ftohtë në 4º C. Hapja e materialit mbi lama bëhet nën flakën e llambës me alkool. Për secilin pacient hapen 8 lama dhe mbi çdo lamë hidhen nga një largësi prej 50 cm dy ose tre pika material. Pikat nuk duhen mbivendosur me njëra-tjetrën mbi lamë sepse vështirësohet vëzhgimi i mitozave në mikroskop.

Bandimi i kromozomeve me banda G

Bandat G përdoren si rutinë për ngjyrimin e diferencuar të kromozomeve. Ekzaminimi me banda identifikon anomalitë strukturore të kromozomeve që nuk mund të arrihet me ngjyrimin e thjeshtë me tretësirë Giemsa. Bandat e errëta janë në rajonin e heterokromatinës së kromozomit pikërisht aty ku ndodhen A-T, rajone të cilat replikohen edhe më vonë. Me ngjyrë të zbehtë përfaqësohen rajonet G-C të cilat replikohen më shpejt, përfaqësojnë zonën e eukromatinës dhe kanë më shumë gjene aktive.
Për bandimin e kromozomeve me bandat G pregatiten tre tretësira:

a- Tretësirë NaCl fiziologjike 0,9%
b- Tretësirë NaCl 1,8%
c- Tretësirë $C_6H_5Na_3O_7$ x 5,5 H_2O 0,9%

Një vaskë vertikale 100 ml e mbushim me përzierjen në raportin 1:1 të tretësirave të citratit të natriumit dhe NaCl 1,8 % dhe e vendosim në banjomari. Në momentin kur temperatura në brendësi të vaskës ka arritur 56°C vendosim lamat në pozicionin

vertikal për t'u banduar dhe i lëmë aty disa minuta (15-40 min). Lamat nxirren nga përzierja e dy tretësirave, shplahen dhe lihen të thahen në temperaturën e ambjentit. Ekziston edhe metoda me tripsinë, por ne kemi preferuar metodën e bandimit të mësipërm sepse cilësia e kromozomeve të përftuara nga kjo metodë është më e mirë.

Ngjyrimi i preparateve me tretësirë Giemsa

- Pregatisim tretësirën e holluar 4% të Giemsës dhe e hedhim në një vaskë horizontale aty ku kemi vendosur lamat që do t'i ngjyrosim dhe i lëmë në ngjyrues për 7 minuta. Gjatë ngjyrosjes marrin ngjyrim vetëm nukleotidet A dhe T, kurse C dhe G mbeten të pangjyrosura sepse kanë afinitet të ulët për këtë ngjyrues duke i dhënë kështu pamjen një kromozomi të banduar me shirita të zbehtë dhe të ngjyrosur.
- I shplajmë lamat dhe i lëmë për 2-3 orë të thahen në temperaturë ambjenti.
- Lamat pikohen me vaj cedri dhe janë gati për t'u vëzhguar në mikroskop.

Kriteret e analizës së kariotipit

1. Zgjidhen në mikroskop me zmadhimin (× 100) metafazat që kanë cilësi të lartë.
2. Metafazat vëzhgohen me objektivin me imersion me zmadhimin (×1000).
3. Për çdo individ analizohen mesatarisht 25 metafaza. Metafazat më të mira, 8-10 prej tyre analizohen me sistemin e kariotipizimit automatik dhe 3-4 metafaza të kariotipit regjistrohen për çdo rast.

Aparaturat për analizën e kariotipit

Aparati për kariotipizimin automatik (Workstation Genikon) është një sistem i fuqishëm i citogjenetikës i përbërë nga Mikroskop Nikon Eclipse 80i (me optik CF 160), kamera, PC dhe Software për analizën e kariotipit me banda.

Workstation Genikon (Software për arkivimin)

- Modifikohet numri i lamave e qelizave dhe krijohet database për çdo pacient duke ruajtur 6-10 metafaza të cilat arkivohen automatikisht. Çdo lamë ka disa imazhe (qelizat). Imazhet printohen me të dhëna për pacientin.

Software për fitimin e imazheve

- Automatikisht selektohet fokusi i imazheve live dhe bashkohen imazhet e një metafaze të vetme.
- Metafaza kariotipizohet automatikisht dhe manualisht. Lejohet ruajtja e imazheve në format file të ndryshme.

a. Software i karitipizimit manual

Ndahen kromozomet e mbivendosur dhe numërohen. Mund të llogaritet numri i bandave të kromozomeve dhe kromozomet e banduara krahasohen me idiogramat sipas International System for Human Cytogenetic Nomenclature, 2009 (ISCN 2009).

b. Software i kariotipizimit automatik

Lejon ndarjen automatike ose manuale të kromozomeve të mbivendosura ose të kryqëzuara.
Kontrasti mund të modifikohet. Kariotipet mund të sistemohen në disa mënyra, ndërsa kromozomet drejtohen duke marrë pozicionin korrekt, përmbysen ose rrotullohen, zmadhohen dy herë, qartësohen konturet dhe bëhet krahasimi me idiogramat. (www.lifetechnologies.com)

Proçedura e hibridizimit me fluoreshencë in situ

Pregatitja e sondës

- Ngrohim sondën në 37˚C për 5 minuta.
- Vorteksohen dhe centrifugohen për 1-3 sekonda.
- Bashkojmë 1,5 µl nga secila sondë me 30 µl solucion miks për hibridizim.
- I ngrohim për 5 min në 73 ˚C në banjomari për denatyrim (temperaturën në banjomari e lëmë 2˚C më të lartë dhe masim temperaturën në vaskën Jar).
- E ruajmë këtë përzierje në 4˚C në frigorifer.
- Sondat markohen me biotinë.

Pregatitja e lamave

1- Pregatisim lamat me materialin e hapur, i lëmë të pa ngjyrosura me tretësirë Giemse dhe i ruajmë lamat në temperaturën e dhomës.
2- Inkubojmë lamat me 200 µl pepsin për 10 minuta në 37 °C.
3- Shpëlajmë lamat në ujë të dejonizuar.
4- Bëjmë larjen e lamave në 2x SSC për 5 minuta (e përsërisim dy herë).
5- Vendosim lamat në paraformaldehyde për 10 minuta për denatyrim në pH 7.
6- Lajmë lamat në 2x SSC për 5 minuta (e përsërisim dy herë).
7- Dehidratojmë lamat në etanol: 70%, 80%, 95%; 2 minuta secilën lamë në çdo përqëndrim.
8- Lamat thahen në temperaturën e ambjentit.

Hibridizimi

1. Vendosim 30 µl të përzierjes së sondës në një sipërfaqe 22x50 mm mbi secilën lamë dhe e mbulojmë me një mbulesë plastike.
2. I inkubojmë lamat në 37 °C përgjatë natës duke i mbledhur me letër varaku për t'i ruajtur nga drita.

Larja e shpejtë dhe dedektimi

1- Lëvizim mbulesën plastike dhe menjëherë i vendosim lamat në një vaskë larëse me 2x SSC.
2- Lajmë lamat në solucion larës në 40 °C për 5 minuta, (e përsërisim proçedurën 2 herë).
3- Lajmë lamat në 0.1x SSC në 40 °C për 5-15 minuta në vaskën Koplin.
4- Lajmë lamat në 2x SSC në 40 °C për 5-15 minuta.
5- Thajmë lamat në temperaturën e dhomës.
6- Vendosim lamat në solucionin e dedektimit për 5 minuta.
7- I bllokojmë në solucionin e bllokimit për 20-30 minuta.

8- Inkubojmë me 50 µl antitrupa ose komponime dedektimi për 30-60 minuta (p.sh 5 µg/ml Streptavidin-Cy3 në solucion bllokues).
9- Lajmë lamat në 2x SSC për 5 minuta, e përsërisim proçedurën 2 herë.
10- Lihen lamat që të thahen në temperaturën e dhomës në errësirë.
11- Vendosim 20 µl të solucionit DAPI në zonën target dhe vendosim sipër një xham mbulues për 10 minuta. (Duhet të jemi të sigurtë që ai mbulon zonën e hibridizimit).
12- Bëjmë shpëlarje të shpejtë të lamave dhe i analizojmë me mikroskopin me fluoreshencë Genikon (www.sigmaaldrich.com).

Rezultatet e mjekimit me Glivek tek leukoza mieloide në fazën kronike të vlerësuara nëpërmjet përgjigjeve citogjenetike

Përmbledhje

Leukoza Mieloide Kronike (LMC) nga pikpamja citogjenetike karakterizohet nga prania e një translokacioni ndërmjet rajoneve 9q34 dhe 22q11 duke formuar kromozomin Philadelphia. Gliveku është një inhibitor specifik dhe i fuqishëm i tirozinë kinazës i cili jep përgjigje hematologjike dhe citogjenetike tek të sëmurët me LMC në fazën kronike. Qëllimi i këtij studimi është të përcaktojmë efektshmërinë e Glivekut në trajtimin e të sëmurëve me leukozë mieloide në fazën kronike nëpërmjet përgjigjeve citogjenetike dhe citogjenetike molekulare. Është marrë në studim një grup prej 70 të sëmurësh me LMC të diagnostikuar pranë Shërbimit të Hematologjsë dhe Gjenetikës Mjekësore QSU "Nënë Tereza" Tiranë në periudhën prill 2011 – dhjetor 2013 me grupmoshën (18-72 vjeç). Rezultatet janë përcaktuar nga analiza e gjakut periferik, mielograma, analiza citogjenetike me banda G, FISH-i (Fluorescence in Situ Hybridisation) dhe konfirmomi me RT-PCR (Real Time -Polymerase Chain Reaction). Përgjigja hematologjike e plotë u arrit në 91% të pacientëve

Në studimin tonë ne konfirmuam se FISH është teknikë më e ndjeshme se kariotipi në vlerësimin e përgjigjeve citogjenetike molekulare duke evidentuar gjenin BCR-ABL i cili nuk evidentohet nga kariotipi. Midis përgjigjeve citogjenetike standarte dhe citogjenetike molekulare në muajin 12 u gjend koefiçenti i korrelacionit të Pearsonit r^2= 0,987 dhe vlera p = 0,01.

Përgjigjet molekulare të nxjerra nga PCR-ja korrelohen me përgjigjet e citogjenetikës standarte me koefiçentin e korrelacionit sipas Pearsonit r^2= 0.521, sinjifikancë statistikore =0.08 dhe me përgjigjet e citogjenetikës molekulare me koefiçentin e korrelimit sipas Pearsonit në shifrën 0,346 me sinjifikancë 0,06 që do të thonë se nuk kemi korrelacion midis metodave të përdorura në monitorimin e pacientëve me LMC.

Fjalë kyç: Leukoza mieloide kronike, përgjigje molekulare, përgjigje citogjenetike, Glivek, FISH.

Results of treatment with Gleevec for myeloid leukemia in chronic phase, assessed by cytogenetic responses.

Abstract

From the cytogenetic standpoint, Chronic Myeloid Leukemia (CML) is characterized by the presence of a translocation between regions 9q34 and 22q11, forming the Philadelphia chromosome. Gleevec is a specific and potent inhibitor of the tyrosine kinase which gives hematologic and cytogenetic results in CML patients during the chronic phase. The objective of this study is to evaluate the effects of treatment with Gleevec (Imatinib mesylate) in the chronic stage of chronic myeloid leukemia. From April 2011 to December 2013, we analyzed 70 CML patients aged 18 -72 years old in chronic phase of the disease. All patients were diagnosed at the Haematological and Genetic Service in University Hospital Center ¨Mother Theresa¨. Results were determined by analysis of peripheral blood, bone marrow, chromosome banding analysis, FISH and confirmation with RT-PCR (Real time -polymerase chain reaction). 91% of the patients achieved complete hematological response.

In our study we confirmed that FISH is a more sensitive technic than chromosome banding analysis for the evaluation of molecular response in patients with CML detected BCR/ABL rearrangement, which were not visible by CA. Beetwen standart cytogenetic response and cytogenetic molecular response in 12 months we found Pearson's correlation coefficient r^2= 0,987 and the value of statistical significance p = 0,01.

Molecular response assesment from RT-PCR are correlated with standart cytogenetic response with Pearson's correlation coefficent r^2= 0,521, stastical significance = 0,08 and with the responses of molecular cytogenetics with Pearson's correlation coefficient 0,346 with significance 0.06 which means we haven't correlation between the methods used for monotoring patients with LMC.

Keywords: Chronic myeloid leukemia, molecular results, cytogenetic results, Gleevec, Fluorescent in situ hybridisation.