

Универзитет у Београду
Медицински факултет

Срђа Ј. Јанковић

Значај одређивања нивоа експресије
Вилмсовог туморског гена 1
код педијатријских пацијената
са акутном леукемијом

Докторска дисертација

Београд 2016.

Faculty of Medicine
University of Belgrade

Srdja J. Janković

Significance of determination of
Wilms' tumor 1 gene expression levels
in pediatric patients with acute leukemia

PhD Thesis

Belgrade 2016

Ментор:

Проф. др Драгана Јанић, Катедра за педијатрију Медицинског факултета
Универзитета у Београду

Коментор:

Н. Сав. др Соња Павловић, Институт за молекуларну генетику и генетичко
инжињерство у Београду

Чланови комисије:

Проф. др Ивана Новаковић, Институт за хуману генетику Медицинског факултета
Универзитета у Београду

Доц. др Нада Крстовски, Катедра за педијатрију Медицинског факултета
Универзитета у Београду.

Проф. др Драгана Вучевић, Медицински факултет Војномедицинске академије
Универзитета одбране у Београду

Изјаве захвалности

На првом месту, захваљујем мојој менторки, проф. др Драгани Јанић, и коменторки, проф. др Соњи Павловић на поузданом и инспиративном вођству, пресудним путоказима и правовременим подстицајима за превазилажење препрека и сопствених слабости. Захвалан сам колегиницама и колегама из Службе за хематологију и онкологију Универзитетске дечје клинике и из Института за молекуларну генетику и генетичко инжињерство на великој части и задовољству заједничког рада. Посебно захваљујем техничарима имунолошке лабораторије УДК и колегиницама и колегама из суседне цитогенетичке лабораторије на свакодневној несебичној помоћи и подршци без које би сваки корак био корак преко непремостиве провалије.

Захваљујем се мојој мајци, која ме је од детињства усмерила путевима сазнања, супруги Ивани и нашој деци Константину, Андреи и Теодору, без којих ништа не би имало смисла, и свим члановима моје породице и пријатељима који су ми деценијама пружали све видове подршке.

Значај одређивања нивоа експресије Вилмсовог туморског гена 1 код педијатријских пацијената са акутном леукемијом

Резиме

Акутне дечје леукемије су група обољења која представља најчешће малигне болести дечјег доба. Одликују се блокадом диференцијације и неконтролисаном пролиферацијом прекурсорских ћелија крвних лоза. Акутне дечје леукемије су данас у великој мери излечиве. Акутна мијелоидна леукемија (АМЛ) и акутна лимфобластна леукемија (АЛЛ) су суштински различите болести. Акутна мијелоидна леукемија се најчешће примарно класификује по француско-америчко-британском (ФАБ) систему морфолошке класификације на типове М0-М7, уз значајну допуну на основу савремених имунофенотипских, цитогенетичких и молекуларно-генетичких испитивања. Код значајног дела деце са АМЛ, анализом кариотипа могуће је открити хромозомске аберације. Многе од њих су специфично повезане са биолошким типом леукемије и имају прогностички значај. У том смислу, нарочито су важне транслокације повезане са генским реаранжманима, као што су t(8;21) (фузиони ген *AML1/ETO*), inv(16)(p13;q22) (фузиони ген *CBFβ/MYH11*), транслокације/реаранжмани који захватају ген *MLL* на хромозомском локусу 11q23 и t(15;17) (фузиони ген *PML/RARα*). На ток и прогнозу АМЛ утичу и многобројне генске мутације, као што је интерна тандем дупликација гена *FLT3*.

Акутна лимфобластна леукемија је у педијатријском узрасту знатно чешћа од акутне мијелоидне леукемије (~ 9:1) и чини око 30% свих малигнух процеса дечје доби. Као и АМЛ, и АЛЛ представља хетерогено обољење, односно групу сродних неопластичних процеса. Према имунофенотипу, АЛЛ се деле на леукемије Б и Т ћелијске лозе. Према степену зрелости, односно експресији молекула CD10 и цитоплазматског μ ланца имуноглобулина, Б прекурсорске леукемије се деле на про-Б, „*common*“ Б и пре-Б, док зрела Б-ћелијска леукемија, која се одликује експресијом имуноглобулина на површини ћелије, представља засебан ентитет и биолошки је еквивалентна Буркиовом лимфому. Т-ћелијске леукемије је такође могуће поделити према степену зрелости на рану, средњу и касну, али ова подела има релативно скроман клинички значај. Стандардним

цитогенетичким испитивањем се хромозомске аберације откривају код 60-85% деце оболеле од АЛЛ. Хипердиплоидија се среће код 35-50% пацијената и удружена је са повољном прогнозом. Насупрот томе, хиподиплоидију, која је заступљена у 7-8% деце са АЛЛ, прати лоша прогноза. Исто важи и за број хромозома близак хаплоидном. Хромозомске транслокације/генски реаранжмани који се рутински испитују код Б-прекурсорске АЛЛ обухватају $t(12;21)$ (*TEL/AML1*), $t(4;11)$ (*MLL/AF4*), $t(1;19)$ (*E2A/PBX*) и $t(9;22)$ (*BCR/ABL*). Фузија *TEL/AML1* је најчешћа (око 25% АЛЛ) и удружена је са повољном прогнозом. Јавља се код АЛЛ са пре-Б фенотипом, претежно код деце узраста 1-10 година. Реаранжмани *MLL/AF4* и *BCR/ABL* удружени су са неповољном прогнозом. Учесталост фузије *BCR/ABL* у дечјој АЛЛ износи 3-5%. Њено присуство је рационална основа за генски циљану терапију специфичним инхибиторима тирозин-киназе.

Брзина којом малигне ћелије ишчезавају из организма детета представља најважнији прогностички параметар, будући да је она збирни исход деловања великог броја познатих и непознатих биолошких чинилаца. Будући да је праг осетљивости морфолошког праћења броја бласта при контролним аспирацијама коштане сржи ограничен на око 5%, развијена су три осетљивија и прецизнија начина да се процени заступљеност леукемијских ћелија, што се назива минималном резидуалном болешћу (МРБ). То су имунофенотипизација мултипараметарском проточном цитометријом, детекција клонски реаранжираног гена за антигенске рецепторе (уколико постоји у леукемијским ћелијама) и детекција фузионог гена карактеристичног за леукемијске ћелије (уколико постоји).

Вилмсов тумор (*WT1*) је транскрипциони фактор који игра значајну улогу у регулацији ћелијског раста и диференцијације. Мада је првобитно откривен код Вилмсовог тумора, ретке неоплазме ембрионалних ћелија која превасходно захвата бубрег, нађено је да *WT1* игра улогу у патогенези широког спектра малигних процесâ. Занимљиво је да *WT1*, под различитим околностима, може да игра како улогу онкогена, тако и улогу тумор-супресорског гена. У коштаног сржи пацијената са АМЛ, често постоји повећана експресија *WT1*, што је показано као негативан прогностички чинилац, како код одраслих, тако и код деце. Међутим, у

појединим истраживањима корелација између експресије *WT1* у коштаног сржи при дијагнози и прогнозе исхода обољења није нађена. За разлику од АМЛ, експресија *WT1* код АЛЛ је најчешће блиска оној код здравих особа, премда постоје и пацијенти са релативно високим нивоом експресије.

У наше истраживање је укључено 20 деце оболеле од АМЛ (12 дечака и 8 девојчица), узраста од 3 до 16 година (медијана 9½ година) и 20 деце са АЛЛ (11 дечака и 9 девојчица) узраста од 6 месеци до 17 година (медијана 5 година). Контролна група је формирана од 15 деце усклађеног пола и узраста која су подвргнута аспирацији коштане сржи због имунске тромбоцитопенијске пурпуре (ИТП). Деца са АМЛ лечена су по протоколу BFM-AML-2004, а деца са АЛЛ по протоколу BFM-ALL-IC-2009. Експресија гена *WT1* анализирана је у узорцима коштане сржи методом ланчане реакције полимеразе са реверзном транскрипцијом, а протеин *WT1* је детектован проточном цитометријом.

Код пацијената са АМЛ забележена је значајно већа експресија гена *WT1* ($139,42 \pm 244,03$) него код пацијената са АЛЛ ($1,18 \pm 54,37$; $U=82$; $p<0,01$) или у контролној групи пацијената са ИТП ($0,76 \pm 1,01$; $U=32$; $p<0,01$). Експресија гена *WT1* код пацијената са АЛЛ није се статистички значајно разликовала од оне код пацијената са ИТП ($U=105,5$; $p>0,05$)

Експресија гена *WT1* при дијагнози код 16 деце која су ушла у пуну ремисију болести била је $139,42 \pm 186,51$, док је експресија гена *WT1* при дијагнози код четворо деце која су преминула не ушавши у ремисију износила $300,80 \pm 407,01$. У време анализирања (медијана праћења 1½ година), 14 деце је и даље било у животу, а њихова експресија гена *WT1* при дијагнози износила је $181,42 \pm 192,52$. Код укупно шесторо деце која су до тренутка анализирања подлегла болести (четворо без уласка у ремисију, једно услед релапса и једно услед фаталне инфективне компликације) експресија гена *WT1* при дијагнози је износила $104,29 \pm 354,87$. Разлика између горње две групе није била статистички значајна ($U=41$, $p>0,05$). У групи од шесторо пацијената са акутном промијелоцитном леукемијом (која је код свих потврђена доказаним присуством генског реаранжмана *PML/RAR α* , експресија гена *WT1* при дијагнози је била $379,53 \pm 183,52$. Ман-Витнијевим *U* тестом није добијена статистичка значајност разлике између пацијената са промијелоцитном леукемијом и оних са другим

ФАБ типовима ($U=18$, $p>0,05$; слика 2), што се може објаснити малобројношћу подгрупе. Експресија гена *WT1* при дијагнози код петоро деце са ФАБ типом М1 или М2 износила је $5,20 \pm 100,7$ ($U=22$, $p>0,05$), а код седморо деце са ФАБ типом М5 $51,02 \pm 186,66$ ($U=24$, $p>0,05$). Код једног од два детета са леукемијом ФАБ типа М4 забележена је највећа вредност експресије гена *WT1* при дијагнози у читавој серији пацијената (874,92), док је код другог детета са овим типом леукемије износила 305,91.

Мали број деце са Т-АЛЛ укључене у истраживање онемогућио је статистичко поређење експресија гена *WT1* при дијагнози у односу на друге типове или подтипове леукемије. Међутим, код свих четворо је експресија гена *WT1* при дијагнози премашила медијану код здравих контрола (ИТП) за више од 3 стандардне девијације. Исто важи за четворо од шеснаесторо пацијената са Б-АЛЛ (25%). Подаци контролног испитивања након месец дана добијени су код 15 деце. Свега двоје од петоро деце код које се експресија гена *WT1* месец дана по дијагнози налазила у четвртом квантилу било је живо у време анализирања, док су сва деца (10 од 10) са експресијом у прва три квантила била жива. Ова разлика ипак није статистички значајна на основу Фишеровог теста тачне вероватноће ($p=0,0952$), што је вероватно превасходно последица малог броја испитаника.

Примењеном методом индиректне флуоресценце/проточне цитометрије, молекула *WT1* је детектован при дијагнози у леукемијским ћелијама код 16 пацијената са АМЛ и свих четворо пацијената са Т-АЛЛ. Код пацијената са Б-АЛЛ, *WT1* на протеинском нивоу није детектован. Ни у једном узорку добијеном контролним прегледима коштане сржи током лечења, експресија *WT1* није детектована на нивоу протеина.

Свеукупно, резултати овог истраживања поткрепљују закључак да би испитивање нивоа експресије гена *WT1* могло да буде корисна допуна постојећим протоколима за дијагностику дечје АМЛ, Т-ћелијске АЛЛ, као и одређене подгрупе пацијената са Б-ћелијском АЛЛ. Наши резултати такође наглашавају значај тумачења података о експресији *WT1* у складу са сложеним и индивидуализованим контекстом.

Кључне речи: Вилмсов тумор (WT)1, акутна леукемија, деца

Научна област: имунологија

Ужа научна област: генетика малигних обољења

Significance of determination of Wilms' tumor 1 gene expression levels in pediatric patients with acute leukemia

Summary

Acute childhood leukemia is a group of disorders that represents the most common malignancies in childhood. They are characterized by a block in differentiation and uncontrolled proliferation of precursor cells of blood lineages. Childhood acute leukemias are now highly curable. Acute myeloid leukemia (AML) and acute lymphoblastic leukemia (ALL) are essentially different diseases. AML is usually primarily classified by the morphological French-American-British (FAB) classification system into types M0-M7, with important complementary information based on modern methods of immunophenotyping, cytogenetic and molecular genetic investigations. In a significant portion of children with AML, analysis of karyotype may reveal chromosomal aberrations. Many of these are specifically associated with the biological type of leukemia and have a prognostic significance. In this sense, translocations related to gene rearrangements, such as t(8;21) (fusion gene *AML1/ETO*), inv(16)(p13;q22) (fusion gene *CBF β /MYH11*), translocations/rearrangements involving *MLL* gene at the 11q23 locus, and t(15;17) (fusion gene *PML/RAR α*) are of particular importance. The clinical course and prognosis of AML are also influenced by many gene mutations, such as internal tandem duplication of the *FLT3* gene.

In the pediatric age group, ALL is much more common than AML (~ 9:1) and constitutes about 30% of all childhood malignancies. ALL, as AML, is a heterogenous disorder, namely a group of related neoplastic processes. According to immunophenotype, ALL is divided into B- and T-lineage leukemias. According to the degree of maturation, displayed by the expression of CD10 and cytoplasmic immunoglobulin μ chain, B-cell precursor leukemias are subdivided into pro-B, common-B and pre-B subtypes, while mature B-cell leukemia, characterized by the surface expression of immunoglobulin, is a separate entity, biologically equivalent to Burkitt lymphoma. T-cell leukemias can also be subdivided according to the degree of maturation, into early, middle, and late forms, but this distinction is of relatively modest clinical value. Using standard cytogenetic investigation methods, chromosomal

aberrations are found in 60-85% of children with ALL. Hyperdiploidy is encountered in 35-50% of patients and is associated with favorable prognosis. Conversely, hypodiploidy, found in 7-8% of children with ALL, is a sign of poor prognosis. The same applies to a near-haploid number of chromosomes. Chromosomal translocations/gene rearrangements that are routinely investigated in B-cell precursor ALL include t(12;21) (*TEL/AML1*), t(4;11) (*MLL/AF4*), t(1;19) (*E2A/PBX*), and t(9;22) (*BCR/ABL*). *TEL/AML1* fusion is the most common (about 25% of ALL) and associated with favorable prognosis. It usually occurs with a pre-B phenotype in children aged 1-10 years. *MLL/AF4* and *BCR/ABL* rearrangements are associated with unfavorable prognosis. The frequency of *BCR/ABL* fusion in childhood AML is 3-5%. Its presence is a rationale for genetically targeted therapy by specific tyrosine-kinase inhibitors.

The rate of elimination of neoplastic cells during treatment is the most significant prognostic parameter, because it is a compound result of action of a great number of known and unknown biological factors. Since the sensitivity of morphological enumeration of leukemic cells in the bone marrow is limited to about 5%, three sensitive and accurate methods to assess the quantity of leukemic cells have been developed. This is called minimal residual disease (MRD). These methods are immunophenotyping by multiparametric flow cytometry, detection of clonally rearranged genes for antigen receptors (if present in leukemic cells), and detection of fusion genes characteristic for leukemic cells (if they exist). Novel MRD methods are being actively sought.

Wilms tumor (WT)1 is a transcription factor that plays a significant role in the regulation of cell growth and differentiation. Although it was originally discovered in Wilms tumor, WT1 is now known to be important in the pathogenesis of a wide range of neoplastic processes. It is interesting to note that *WT1*, under different circumstances, may play both the role of an oncogene and that of a tumor-suppressor gene. *WT1* is often hyperexpressed in the bone marrow of AML patients, and this has been demonstrated as an unfavorable prognostic factor, both in adults and in children. However, in some studies, no correlation between *WT1* bone marrow expression at diagnosis and disease outcome has been observed. In contrast to AML, *WT1* expression in ALL is mostly similar to that in healthy persons, although patients with a relatively high expression have been encountered.

The subjects of our research were 20 children suffering from AML (12 boys and 8 girls), aged 3-16 years (median 9½ years) and 20 children with ALL (11 boys and 9 girls) aged 6 months to 17 years (median 5 years). The control group was formed by 15 sex- and age-matched children who underwent bone marrow aspiration because of immune thrombocytopenic purpura (ITP). Children with AML were treated according to the BFM-AML-2004 Protocol, while those with ALL were treated according to the BFM-ALL-IC-2009 Protocol. *WT1* gene expression was analysed in bone marrow samples by reverse-transcription polymerase chain reaction, while *WT1* protein detection in leukemic cells was performed by flow cytometry.

A significantly higher *WT1* gene expression was observed in AML patients ($139,42 \pm 244,03$) than in ALL patients ($1,18 \pm 54,37$; Mann-Whitney $U=82$; $p<0,01$) or in the control group with ITP ($0,76 \pm 1,01$; $U=32$; $p<0,01$). *WT1* gene expression in ALL did not statistically significantly differ from that of ITP controls ($U=105,5$; $p>0,05$). *WT1* gene expression at diagnosis in 16 children who entered full remission was $139,42 \pm 186,51$, while the four children who died without reaching remission had *WT1* expression at diagnosis of $300,80 \pm 407,01$. At the time of analysis (median follow-up 1½ years), 14 children were still alive, and their *WT1* expression was $181,42 \pm 192,52$. In a total of six children who succumbed to the disease by the time of analysis (four without entering remission, one due to relapse and one as a consequence of a fatal infectious complication), *WT1* gene expression at diagnosis was $104,29 \pm 354,87$. The difference between the above groups was not statistically significant ($U=41$, $p>0,05$).

In the group of six patients with acute promyelocytic leukemia (confirmed in all cases by the presence of gene rearrangement *PML/RAR α*), *WT1* gene expression at diagnosis was $379,53 \pm 183,52$. The difference between children with promyelocytic leukemia and those with other FAB types was not shown to be statistically significant ($U=18$, $p>0,05$), a fact that could be explained by insufficient subgroup size. *WT1* gene expression at diagnosis in five children with FAB type M1 or M2 was $5,20 \pm 100,7$ ($U=22$, $p>0,05$), and that in seven children with FAB type M5 was $51,02 \pm 186,66$ ($U=24$, $p>0,05$). One of the two patients with FAB type M4 had the highest value of *WT1* expression at diagnosis observed in our series (874,92), while the other child with this type of leukemia displayed *WT1* expression at diagnosis of 305,91.

A small number of children with T-ALL enrolled in this study prevented statistical comparison of *WT1* gene expression at diagnosis with other leukemia types or subtypes. However, in all four T-ALL patients, *WT1* expression at diagnosis was above the median for healthy controls (ITP) by more than three times the standard deviation. The same was true for four of 16 B-ALL patients (25%). Data on *WT1* expression on control examination one month after diagnosis were obtained for 15 children. Just two of the five children who, a month after diagnosis, had *WT1* expression in the fourth quartile were alive at the time of writing, while all children (10 of 10) with *WT1* expression below the fourth quartile survived. This rather conspicuous difference was still not statistically significant on Fisher's exact probability test ($p=0,0952$), which can probably also be explained by the small number of subjects.

Using indirect fluorescence and flow cytometry, WT1 protein was detected at diagnosis in leukemic cells in 16 patients with AML and four patients with T-ALL. However, it was not detected in any B-ALL patients. None of the samples from control bone marrow investigations during treatment had a detectable level of WT1 protein by flow cytometry.

Taken as a whole, the results of this study support the conclusion that routine *WT1* expression testing could be a useful addition to the existing diagnostic protocols for childhood AML, T-cell ALL and a subset of patients with B-ALL. Our results also emphasize the importance of interpreting *WT1* expression data in children with leukemia within a complex and highly individualized context.

Key words: Wims tumor (WT)1, acute leukemia, children

Scientific Area: Immunology

Narrow Scientific Area: Genetics of Neoplasia

Садржај

1. Увод.....	1
1.1 Акутне леукемије код деце.....	1
1.1.1. Акутна мијелоидна леукемија.....	1
1.1.2. Етиологија АМЛ.....	4
1.1.3. Клиничка слика дечје АМЛ.....	5
1.1.4. Хромозомске аберације код АМЛ.....	6
1.1.5. Мутације које утичу на прогнозу АМЛ.....	8
1.1.6. Лабораторијска дијагностика дечје АМЛ.....	9
1.1.7. Лечење дечје АМЛ.....	11
1.2 Акутна лимфобластна леукемија.....	12
1.2.1. Епидемиологија и етиологија дечје АЛЛ.....	12
1.2.2. Клиничка слика дечје АЛЛ.....	15
1.2.3. Дијагностика дечје АЛЛ.....	16
1.2.4. Лечење дечје АЛЛ.....	18
1.2.5. Минимална резидуална болест.....	19
1.3. Транскрипциони фактор Вилмсов тумор (WT)1.....	20
2. Циљеви истраживања.....	22
3. Пацијенти и методе.....	22
3.1. Пацијенти.....	22
3.2. Дијагностичке лабораторијске анализе.....	23
3.3. Анализа експресије гена <i>WT1</i>	25
3.4. Анализа експресије протеина WT1.....	26
3.5. Статистичка анализа.....	26
4. Резултати.....	27
4.1. Експресија гена <i>WT1</i> у главним групама.....	27
4.2. Експресија гена <i>WT1</i> у односу на достизање ремисије/преживљавање пацијената са АМЛ.....	28
4.3. Експресија гена <i>WT1</i> при дијагнози у подгрупама деце са АМЛ.....	30
4.4. Експресија гена <i>WT1</i> при дијагнози код пацијената са АЛЛ.....	31
4.5. Експресија гена <i>WT1</i> при контролним аспирацијама коштане сржи.....	32

4.6. Детекција експресије протеина WT1.....	35
5. Дискусија.....	37
6. Закључци.....	42
7. Литература.....	43
Списак скраћеница коришћених у тексту.....	60
Биографија аутора.....	61

1. Увод

1.1 Акутне леукемије код деце

Акутне леукемије су група обољења која збирно чине најчешће малигне процесе у дечјем добу, обухватајући 25-35% укупног броја малигнух обољења у педијатријском узрасту (Radhi и сар., 2015). Ове болести се одликују блокадом диференцијације и неконтролисаном пролиферацијом прекурсорских ћелија крвних лоза. Познато је да генетичка предиспозиција игра једну од најзначајнијих улога у патогенези дечјих леукемија (Brisson и сар., 2015). Акутне мијелоидне леукемије (АМЛ) и акутне лимфобластне леукемије (АЛЛ) суштински су различите болести (Pui и сар., 2012). Дечје леукемије су у високом степену излечиве савременим протоколима који подразумевају комбиновану хемиотерапију и, по потреби, трансплантацију хематопоетских матичних ћелија.

1.1.1. Акутна мијелоидна леукемија

Сматра се да све леукемије потичу од самообнављајуће матичне ћелије хематопоезе, чија је заступљеност између 0,2 и 200 на милион мононуклеарних ћелија коштане сржи (Krstovski, 2012). Новија истраживања потврђују и истичу улогу патолошких генетичких промена које су у вези са процесом ћелијске диференцијације (Ye и сар., 2015). Код АМЛ, поремећај диференцијације поменуте ћелије има за резултат клонску пролиферацију незрелих ћелија мијелоидне (*sensu stricto*), моноцитне, мегакариоцитне или еритроидне лозе. Морфолошка француско-америчко-британска (ФАБ) класификација АМЛ на типове од М0 до М7, први пут предложена 1976. године, и данас је у употреби (Rubnitz и Inaba, 2012), али је значајно допуњена информацијама које се могу добити савременим имунофенотипским, цитогенетичким (Braoudaki и Tzortzatou-Stathopoulou, 2012) и молекуларно-генетичким испитивањима. Релативна учесталост различитих ФАБ подтипова акутне мијелоидне леукемије код деце одговара оној код млађих одраслих особа, са изузетком значајно веће учесталости типова М4 и М5 код одојчади. Подтип М0 је у педијатријском животном добу велика реткост. Подтип М7 најчешће се среће код деце са Дауновим синдромом (тризомијом хромозома 21). ФАБ класификација са допунама из 1985. године

(Bennett и сар., 1985) приказана је у табели 1.1, док је важећа класификација Светске здравствене организације (Vardiman и сар., 2008) дата у табели 1.2.

Табела 1.1. ФАБ тип, хромозомски поремећаји и клиничке карактеристике АМЛ код деце

ФАБ подтип	Заступљеност (%)	Хромозомски поремећаји	Клин. и лаб. одлике
M0	2	-5 или del(5), -7 или del(7)	Бласти често испољавају CD34 и TdT
M1	10-18		
M2	27-29	t(8;21)(q22;q22)	Мијелобластоми (често у пределу орбите)
		t(6;9)(p23;q34)	
M3	5-10	t(15;17)(q22;q21)	ДИК
M4e		inv(16)(p13;q22) или t(16;16)(p13;q22)	Леукемија ЦНС, еозинофилија
M4	16-25	t(9;11)(p22;q23)	Конгенитална и код млађе деце (<2 г.); екстремедуларна (кожа), хиперлеукоцитоза
		t(11;19)(q23;p13.1)	
		t(10;11)(p12;q23)	
M5	13-22	t(9;11)(p22;q23)	Конгенитална и код млађе деце (<2 г.); екстремедуларна (кожа), хиперлеукоцитоза; секундарна након епиподофилотоксина
		t(11;19)(q23;p13.1)	
		t(10;11)(p12;q23)	
M6	1-3		
M7	4-8	t(1;22)(p13;q13)	Одојчад, мијелофиброза, Даунов синдром

Табела 1.2. Класификација АМЛ према критеријумима СЗО

АМЛ са понављаним цитогенетским поремећајима

АМЛ са t(8;21)(q22;q22), (*RUNX1/RUNX1T1*)

АМЛ са inv(16)(p13.1;q22) или t(16;16)(p13.1;q22)(*CBFβ/MYH11*)

АПЛ са t(15;17)(q22;q21)(*PML/RARα*)

АМЛ са t(9;11)(p22;q23); *MLLT3-MLL*

АМЛ са t(6;9)(p23;q34); *DEK-NUP214*

АМЛ са inv(3)(q21;q26.2) или t(3;3)(q21;q26.2); *RPN1-EVII*

АМЛ (мегакариобластна са t(1;22)(p13;p13); *RBM15-MKLI*)

АМЛ са мутацијом *NPM*

АМЛ са мутацијом *CEBPA*

АМЛ са променама карактеристичним за мијелодисплазију

АМЛ настала услед лечења

Мијелоидни сарком

Мијелоидне пролиферације везане за Даунов синдром

Мијелоидна леукемија удружена са Дауновим синдромом

Пролазна абнормална мијелопоеза

АМЛ која није класификована на други начин

АМЛ, минимално диференцирана

АМЛ без сазревања

АМЛ са сазревањем

Акутна мијеломоноцитна леукемија

Акутна монобластна/моноцитна леукемија

Акутна еритроидна леукемија

Акутна мегакариобластна леукемија

Акутна базофилна леукемија

Акутна панмијелоза са мијелофиброзом

Бластна плазмоцитоидна неоплазма дендритских ћелија

1.1.2. Етиологија АМЛ

Инциденца АМЛ дечје доби не показује велике географске, полне или етничке варијације и креће се од 5 до 7 оболелих на милион становника годишње (Rubnitz и сар., 2008). Највећа учесталост обољевања од АМЛ бележи се током прве две године живота, затим следи постепени пад учесталости све до девете године, а затим поново пораст у адолесценцији. Код далеко највећег броја деце оболеле од АМЛ није могуће идентификовати ниједан конкретан чинилац ризика који би објаснио настанак болести. Ипак, постоје докази да излагање цитостатицима из групе алкилирајућих агенаса и инхибитора ензима топоизомеразе, јонизујућем зрачењу, органским растварачима, нафтним дериватима и пестицидима из групе органофосфата повлачи одређени ризик настанка АМЛ (Deschler и Lübbert, 2006). Такође је документовано да излагање детета дуванском диму (пре и након рођења) представља чинилац ризика за настанак леукемије, како за АМЛ, тако и за АЛЛ (Metayer и сар., 2013), што није изненађујуће када се узме у обзир велики број канцерогених супстанци присутних у дуванском катрану. Предиспозиција за појаву АМЛ постоји и код урођених обољења праћених дисфункцијом коштане сржи, као што су Даунов синдром, Клинефелтеров синдром, Фанконијева анемија, тешки облици конгениталне неутропеније (Костманов синдром), Швахман-Дајмондов синдром, Блекфан-Дајмондова анемија, неурофиброматоза типа I, Нунанов синдром, Ли-Фрауменијев синдром, Блумов синдром, конгенитална дискератоза, конгенитална амегакариоцитна тромбоцитопенија и синдром атаксија-телангиектазија (Krstovski, 2012). Поред тога, и неке друге групе поремећаја коштане сржи, које и саме настају кроз сложену интеракцију урођених и стечених чинилаца (апластична анемија, мијелодиспластични синдроми, пароксизмална ноћна хемоглобинурија), такође доводе до извесног увећања ризика појаве АМЛ (Yu и сар., 2014). Свеукупна сума досадашњих истраживања сведочи о томе да само једна генска аномалија није довољна да узрокује настанак АМЛ, већ је за неопластичну трансформацију неопходно да се у истој прогениторској ћелији одиграју две или више генских промена са синергијским дејством. Притом се ове промене могу грубо поделити на мутације прве класе, које превасходно утичу на ћелијску пролиферацију и преживљавање, и мутације друге класе, које утичу на

ћелијску диференцијацију и апоптозу. За настанак леукемије неопходна је најмање по једна мутација из сваке од класа (Balgobind и сар., 2011).

1.1.3. Клиничка слика дечје АМЛ

Симптоми и знаци АМЛ су превасходно резултат оштећења хематопоезе услед инфилтрације коштане сржи малигним ћелијским клоно(ви)м(а), али могу да настану и услед леукемијске инфилтрације различитих ткива и органа (Wei и сар., 2008). Страдање хематопоеетских прекурсорских ћелија може да има за последицу анемију, неутропенију и/или тромбоцитопенију, те се болест најчешће манифестује симптоматологијом која одговара овим поремећајима (бледило, брзо замарање, крварења, инфекције), уз опште симптоме и знаке као што су малаксалост, губитак у телесној маси и повишена телесна температура. Могуће је и масивно крварење са дисеминованом интраваскуларном коагулацијом (ДИК), што се најчешће среће код акутне промијелоцитне леукемије (Lee и сар., 2015). Услед екстремедуларног накупљања леукемијских бласта, по правилу су присутне лимфаденопатија и хепатоспленомегалија. Неретко се јављају и кожне лезије, хиперплазија десни и накупине леукемијских ћелија у различитим ткивима које одају утисак солидних тумора (хлороми). Најчешћа локализација хлорома је у костима и меким ткивима главе (често је захваћена орбита); могу да се јаве и интракранијално (5-15%), када непосредно угрожавају живот детета. Важно је бити свестан да се хлороми могу јавити и недељама и месецима пре појаве других указатеља да је реч о леукемији (укључујући и присуство бласта у коштаној сржи) (Ohanian и сар., 2013). Екстремедуларне манифестације су најчешће код типова ФАБ М4 и М5 у одојчади и мале деце (Kobayashi и сар., 2007).

Мада је леукемија централног нервног система често асимптоматска, може се манифестовати и главобољом, повраћањем, папиледемом или испадима функције кранијалних живаца (пре свега *n. facialis*) (Takhenchangbam и сар., 2013). Пошто број леукемијских ћелија у периферној крви може да буде велики, неопходно је разликовати симптоме и знаке леукемије ЦНС од симптома и знакова леукостазе, као што су поремећај свести и конвулзије; неуролошки испади код детета са АМЛ могу да буду и весници интракранијалног крварења или možданог инфаркта. Стога се присуство леукемијске инфилтрације ЦНС

рутински испитује цитолошким прегледом цереброспиналне течности (Laningham et al., 2007).

1.1.4. Хромозомске аберације код АМЛ

Хромозомске аберације које се могу открити цитогенетичком анализом присутне су код значајног броја деце са АМЛ (Braoudaki и Tzortzatos-Stathopoulou, 2012; Manola и сар., 2013). Оне претежно обухватају балансиране транслокације, делеције и инверзије. Осетљивост цитогенетичких испитивања и лепеза детектабилних хромозомских аберација могу се значајно увећати уколико се, поред класичне цитогенетичке анализе, примени и метода флуоресцентне *in situ* хибридизације (енг. *fluorescence in situ hybridization, FISH*) (Mir Mazloumi и сар., 2013). Увид у биолошку функцију многих од гена који бивају захваћени тачкама прекида (која је, по правилу, повезана са физиолошком хематопоезом) снажно сугерише да хромозомске аберације, када су присутне, играју једну од главних улога у леукемогенези. Многе од хромозомских аберација имају и истакнут прогностички значај. Већина описаних хромозомских аберација није строго повезана са одређеним узрастом. Изузетак је $t(1;22)(p13;q13)$, која се среће искључиво код одојчади са АМЛ М7 (Mercher и сар., 2002). Најчешћа хромозомска аберација код дечје АМЛ је $t(8;21)$, која доводи до генског реаранжмана *AML1/ETO* и среће се код око 12% дечјих АМЛ (Nucifora и Rowley, 1994). Будући да ген *AML1* кодира једну од подјединица важног протеина – транскрипционог фактора генске експресије названог „средишњи чинилац везивања“ (енг. *core binding factor, CBF*), стварање фузионог протеина са продуктом гена *ETO* има за последицу репресију транскрипције гена који се налазе под његовом контролом и следствено заустављање диференцијације и патолошко, неконтролисано самообнављање мијелоидних прекурсорских ћелија (Hart и Foroni, 2002; Li и сар., 2016).

Код око 5% дечјих АМЛ, леукемијске ћелије носе неку од аберација које захватају хромозом број 16: $inv(16)(p13;q22)$ или $t(16;16)(p13;q22)$ (Deschler и Lübbert, 2006). Ове аберације су, по правилу, удружене са карактеристичним морфолошким типом леукемије – ФАБ М4е, који се одликује присуством диспластичних еозинофилних гранулоцита са крупним тамнољубичастим

гранулама. Код ових аберација, долази до стварања фузионог гена *CBF β /MYH11*. Тиме је ген за β -субјединицу средишњег чиниоца везивања стопљен са геном за тешки ланац глаткомишићног миозина број 11, што има за резултат онемогућавање физиолошке улоге CBF и прекид ћелијске диференцијације (Reilly, 2005). По правилу постоје и удружене мутације у генима одговорним за контролу ћелијске пролиферације, које са описаним фузионим геном испољавају синергијски ефекат (Hsiao и сар., 2015). Описане аберације које захватају хромозом број 16 удружене су са повољнијим исходом лечења.

Аберације које захватају хромозом број 11, тачније локус 11q23, честе су код одојчади и мале деце оболеле од леукемије подтипа ФАБ М4 или М5, као и код секундарних леукемија изазваних применом инхибитора ензима топоизомеразе II. Ове аберације доводе до дисрегулације гена *MLL* (енг. *mixed lineage leukemia*). Овај ген кодира протеин који има ензимску активност хистон-метилтрансферазе, чиме регулише експресију гена из породице *HOX* који играју значајну улогу у хематопоези (Li и сар., 2016). Најчешће аберације које укључују хромозом број 11 које се срећу код дечјих АМЛ су t(9;11)(p21;q23), t(11;19)(q23;p13.1) и t(10;11)(p12;q23) (Sorensen и сар., 1994). Познато је, међутим, више од 50 различитих гена који могу да буду фузиони партнери гену *MLL* (Marshalek и сар., 2016), а поред фузије, леукемогени ефекат има и интерна тандем дупликација гена *MLL* (Lavallée и сар., 2015). Занимљиво је да аберације које захватају овај ген могу да доведу како до АМЛ, тако и до АЛЛ, у зависности од тога о којој је аберацији реч и којег је типа ћелија у којој се промена одиграла (Slany, 2016).

Хромозомска аберација t(15;17) јавља се искључиво код акутне промијелоцитне леукемије. Она подразумева генски реаранжман *PML/RAR α* , који доводи до конститутивне активiranости алфа-рецептора за ретиноичну киселину. Овај рецептор делује као транскрипциони фактор који контролише мијелоидну ћелијску диференцијацију. Описани су и други реаранжмани који укључују ген *RAR α* – t(11;17) и t(5;17), а у ретким случајевима реаранжман може да буде и криптичан (Adams и Nasiri, 2015; Tang и сар., 2015). У фузионој форми, *RAR α* задржава способност везивања за ДНК, али више није у стању да интерагује са физиолошким концентрацијама свог природног лиганда - ретиноичне киселине.

Стога се, услед одсуства стимулишућих сигнала, ћелијско сазревање прекида у стадијуму промијелоцита, а уз то долази и до поремећаја апоптозе. Поремећај, како сазревања тако и апоптозе, може се превладати високим дозама *all-trans*-ретиноичне киселине (ATRA), што представља основу специфичне терапије овог типа леукемије (Sanz и сар., 2010).

1.1.5. Мутације које утичу на прогнозу АМЛ

Важећа класификација АМЛ не обухвата бројне генетичке и друге биолошке чиниоце за које се зна да имају утицај на ток болести. Увођењем савремене технологије и методологије, као што је секвенцирање комплетног генома методом секвенцирања нове генерације, број различитих генских аберација за које се може показати да су од утицаја на ток и исход АМЛ нараста из дана у дан (Glumac и сар., 2015). Такве информације се у великој мери допуњују са онима које пружају класична цитогенетичка испитивања. Поред тога, на хоризонту је и испитивање стања фосфорилације интрацелуларних протеина који играју кључну улогу у леукемогенези, чиме се могу издвојити подтипови АМЛ са специфичним биолошким понашањем. Ово се изводи уз помоћ одговарајућих моноклонских антитела обележених флуорохромима и проточне цитометрије, тј. представља напредан вид имунофенотипизације (Ross и сар., 2004). Показано је да су мутације у гену *FLT3*, који кодира тирозин-киназу налик на FMS (енг. *FMS-like tyrosine kinase*) ако се јаве у незрелим мијелоидним ћелијама, повезане са мањим изгледима повољног исхода лечења АМЛ. Описане су две мутације *FLT3* од прогностичког значаја: интерна тандем-дупликација (*FLT3-ITD*) и тачкаста мутација D835 (Karabacak и сар., 2010; Liang и сар., 2003). Насупрот томе, мутације гена за нуклеофозмин (*NPM1*), које су код деце, додуше, знатно ређе него код одраслих, повезане су са повољном прогнозом (Brown и сар., 2007; Yatsenko и сар., 2013). Мутације гена *CEBPA* (енг. *CCAAT-enhancer protein alpha*) такође повлаче повољнију прогнозу код деце са АМЛ (Mizushima и сар., 2010; Wen и сар., 2014). Слично је нађено и код одраслих (Fasan и сар., 2014). Од нарочитог је значаја да систематско испитивање описаних мутација може да се користи у стратификацији ризика и код пацијената са АМЛ са нормалним кариотипом (Zhang и сар., 2013). Свакако се може очекивати да ће дијагностичка

обрада у будућности бити проширена укључивањем резултата секвенцирања комплетног генома, који пристижу ([Oghami и сар., 2015](#)). Међу потенцијалне генске прогностичке чиниоце спада и статус гена WT1, који је предмет овог истраживања (видети одељак 1.3.).

1.1.6. Лабораторијска дијагностика дечје АМЛ

Мање од 20% деце оболеле од АМЛ има при постављању дијагнозе број леукоцита у периферној крви изнад 100 000/ μ l. Број леукемијских ћелија на периферији има тенденцију да буде већи код типова ФАБ М4 и М5, док је код акутне промијелоцитне леукемије, по правилу, значајно мањи. Код око 10% деце са АМЛ, не уочавају се бласти у периферној крви. Као и проценат бласта, апсолутни број неутрофила је варијабилан и неретко износи мање од 1000/ μ l.

Код највећег броја деце оболеле од АМЛ констатује се анемија нормоцитног типа. Хемоглобин се у просеку креће око 8 g/l, али може да буде и врло низак, до 3 g/l. Уколико се развија ДИК, није редак ни налаз секундарне хемолитичке анемије микроангиопатске генезе. Преко половине све деце са АМЛ на презентацији има број тромбоцита у периферној крви испод 50 000/ μ l. Крварење се, међутим, ретко јавља уколико број тромбоцита није испод 20 000/ μ l, осим у случају удружене коагулопатије. У дијагностичкој обради детета са АМЛ обавезно је извођење основних тестова згрушавања крви (протромбинско време, активирано парцијално тромбoplastинско време, фибриноген, Д-димер) ([Chojnowski и сар., 1999](#)).

Основна дијагноза АМЛ поставља се морфолошким прегледом коштане сржи, уз цитохемијско бојење на мијелопероксидазу (критеријум је присуство у коштаном сржи >20% бласта неке не-лимфобластне лозе). Биолошка субкласификација леукемије занима се на имунофенотипизацији леукемијских ћелија мултипараметарском проточном цитометријом, уз цитогенетичка и молекуларно-генетичка испитивања ([Buga Corbu и сар., 2013](#)). Имунофенотипизација може да буде од посебног значаја у случајевима где морфолошке одлике нису довољно јасне. Мада се панел антигена од значаја за одређивање лозе и степена сазревања леукемијских ћелија (имунофенотипских маркера) разликује од лабораторије до лабораторије (и делимично „кроји“ према

иницијално нађеним оријентационим маркерима), језгро практично свих панела за имунофенотипизацију АМЛ представљају антигени CD34, CD38, CD117, HLA-DR, CD13, CD33, CD11b, CD11c, CD14, CD64, CD36, CD71, CD4 и CD24, али и превасходно лимфобластни маркери CD19, CD10, CD3, CD7, CD2 и CD5, који су важни за утврђивање аберантне експресије карактеристичне за неке типове леукемије, као и дијагностиковање ретких акутних леукемија мешовите лозе.

Примери имунофенотипских маркера који могу да буду пресудна помоћ у класификацији АМЛ укључују: HLA-DR, који је најчешће одсутан код акутне промијелоцитне леукемије, а присутан у другим типовима АМЛ; маркере моноцитне лозе (CD11c, CD14, CD64, CD4) који су веома важни у диференцирању акутне монобластне и акутне мијеломоноцитне леукемије; и маркере незрелих хематопоетских ћелија (CD34, CD38, CD117) који могу да буду од велике помоћи у одређивању степена сазревања датог подтипа леукемије и разграничењу различитих субпопулација бласта.

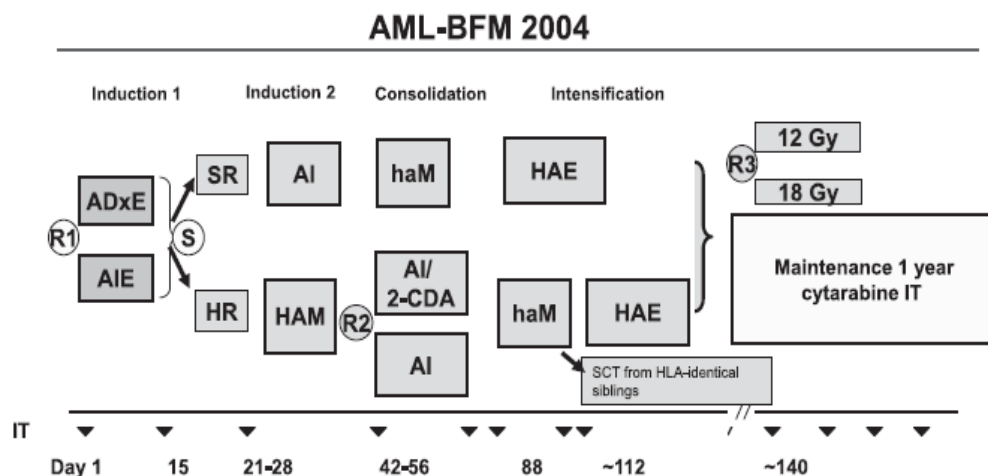
У нашој земљи се, поред стандардног кариотипа, код деце са АМЛ рутински испитују генски реаранжмани *AML1/ETO*, *PML/RAR α* и *CBFB/MYH11*, који збирно обухватају око 25% популације деце са АМЛ у Србији (Krstic и сар., 2010; Lazic и сар., 2010). Збирна учесталост је слична и у Турској и износи 20-25% (Kömür и сар., 2010). Најупадљивије корелације између ФАБ типа, имунофенотипа и генетичког налаза код АМЛ обухватају *CBFB/MYH11* код акутне мијеломоноцитне леукемије (M4), *PML/RAR α* код акутне промијелоцитне леукемије (M3) и *AML1/ETO* код акутне мијелоидне леукемије у ужем смислу (Krstovski, 2012).

У диференцијалној дијагнози АМЛ неопходно је обратити пажњу на мијелопролиферативне поремећаје, мијелодиспластичне синдроме, као и тешке бактеријске инфекције (септикемија) праћене „леукемоидном реакцијом“ или неутропенијом. Такође, вирусне инфекције код новорођенчета (цитомегаловирус, вирус херпес симплекс, вирус имунодефицијенције човека) могу да створе слику у коштаном сржи која наводи на погрешан закључак да је реч о АМЛ (Krstovski, 2012).

1.1.7. Лечење децје АМЛ

Током последњих деценија, изгледи излечења деце са АМЛ драматично су се увећали. Са савременим хемиотерапијским протоколима, 80-90% лечене деце улази у ремисију болести, док око 60% постиже дугорочно преживљавање (излечење). Овај успех у великој је мери последица увођења интензивне индукционе хемиотерапије која подразумева примену високих доза цитарабина, уз додатак антрациклина. Према важећим протоколима (у нашој земљи користи се протокол VFM-AML-2004), стратификација ризика остварује се на основу подтипа леукемије, броја бласта на периферији, цитогенетичког и молекуларно-генетичког налаза, присуства или не захваћености ЦНС, као и раног одговора на терапију. Лечење се састоји од фаза индукције, консолидације, ре-индукције и одржавања и збирно траје око две године. Код деце са леукемијом која, према горе наведеним параметрима, припада групи високог ризика, прибегава се алогеној трансплантацији матичне ћелије хематопоезе (ТМЋХ) за време трајања прве ремисије болести (Shenoy и Smith, 2008). За донора се, уколико је могуће, бира сродна HLA-подударна особа. Иако је скопчана са озбиљним компликацијама и ризицима (међу којима најзначајније место заузимају последице режима мијелоаблације и болест калем-против-домаћина), ТМЋХ има потенцијал да излечи и децу са АМЛ којој хемиотерапија није у стању да помогне. Једна од предности ТМЋХ је и цитотоксично деловање лимфоцита донора на леукемијске ћелије примаоца (ефекат калем-против-леукемије).

Схематски приказ протокола лечења VFM-AML-2004 дат је на слици 1.



Слика 1. Протокол BFM-AML-2004. Преузето из [Creutzig и сар., 2013.](#)

1.2. Акутна лимфобластна леукемија

АЛЛ је најчешће малигно обољење дечјег узраста и чини око 30% свих малигнитета код деце ([Janic, 2012](#)). Највероватније настаје малигном трансформацијом лимфоидних прогениторских ћелија ([Bernt и Armstrong, 2009](#)).

1.2.1. Епидемиологија и етиологија дечје АЛЛ

Дечја АЛЛ преставља хетерогено обољење. Неопходно је имати на уму да ова хетерогеност вероватно обухвата и етиологију. Инциденца дечје АЛЛ износи око 40 на милион и нешто је већа у високоиндустријализованим земљама. У највећем броју случајева, болест почиње између 2. и 5. године живота. Дечаци оболевају нешто чешће од девојчица, изузев у првој години, када је однос полова обрнут.

Генски поремећаји који стварају услове за настанак АЛЛ чешће су стечени него урођени, тј. реч је, по правилу, о соматским мутацијама. Велики број генских полиморфизама, међутим, такође може да допринесе ризику оболевања од АЛЛ. Повећан ризик развоја АЛЛ постоји и код деце са Дауновим синдромом, Блумовим синдромом, неурофиброматозом типа I, атаксијом-телангиектазијом и нијмегенским синдромом хромозомских прекида ([Janic, 2012](#)).

Етиологија АЛЛ још увек није разјашњена. Сматра се да је, као и код АМЛ, неопходно више од једног догађаја (генских мутација) да би дошло до неопластичне трансформације матичне ћелије хематопоезе. Постоје докази да, барем у неким случајевима, први од ових догађаја може да се одигра интраутерино (Ford и сар., 1998; Wiemels и сар., 1999). Томе у прилог говори и већи степен подударања појаве АЛЛ код једнојајчаних близанаца у поређењу са двојајчаним близанцима или браћом и сестрама. Молекуларно-генетичким испитивањима је документован трансплацентарни прелазак малигног ћелијског клона са оболелог на здравог близанца (Teuffel и сар., 2004). Међутим, пут од генетичке предиспозиције до појаве леукемије је неизванан и сложен и подразумева процесе клонске селекције која следи опште принципе теорије еволуције. Један од најзначајнијих аутора на пољу етиопатогенезе неопластичних процеса, Мел Гривс, упоредио је развој прелеукемијских и леукемијских субклонова путем акумулирања случајних мутација, и њихово потоње нестајање или умножавање у зависности од чинилаца природне селекције, са славним дијаграмом Чарлса Дарвина из 1837. године који приказује начин гранања „дрвета живота“ (Greaves, 2009). У крајње спекулативном, али и узбудљивом и подстицајном разматрању корена неоплазије у живом свету, Пол Дејвис и Чарлс Лајнвивер су преложили могућност да је реч о филогенетском атавизму који води порекло од путативних примордијалних вишећелијских организама („ур-метазоа“), чија је генетичка регулација ћелијског раста и пролиферације била суштински другачија него код данашњих метазоа (Davies и Lineweaver, 2011). Постављена је и хипотеза да је реч о филогенетски старом систему опште регулације ћелијских функција и међућелијске комуникације који није карактеристичан за неопластичне ћелије *per se*, већ за својство „матичности“ (енг. *stemness*), тј. за све популације самообнављајућих, недиференцираних ћелија које постоје унутар сложених вишећелијских организама и превасходно се одликују преференцом ка ниској концентрацији кисеоника (Ivanović и Vlaski-Lafarge, 2015).

У сваком случају, налаз да је генски реаранжман *TEL/AML1*, по правилу, присутан још пре рођења, иако леукемија настаје више година касније, уз чињеницу да је овај реаранжман око 100 пута чешћи од леукемије која се развија на његовој подлози, наглашава велики значај чинилаца спољашње средине у

леукемогенези (McHale и Smith, 2004). Зна се, на пример, да излагање јонизујућем зрачењу повећава ризик настанка АЛЛ. Ово је, пре свега, показано код особа озрачених током експлозија нуклеарних фисионих бомби над Хирошимом и Нагасакијем 1945, мада је веза недвосмислено потврђена само код постнаталног излагања зрачењу, а доза која је узроковала статистички уочљив ефекат (релативни ризик ~ 7) износила је око 1 Gy. Леукемогени потенцијал хроничног излагања малим дозама јонизујућег зрачења је и даље споран, превасходно стога што у већини студија није нађено статистички значајно повећање учесталости дечје АЛЛ у популацијама изложеним након катастрофе у Чернобилу 1986. Слично томе, у већини студија није констатована повећана учесталост АЛЛ код деце која живе у близини нуклеарних електрана (Pui, 2006). Већина стручњака се слаже да дозе које се користе у рутинској радиолошкој дијагностици не носе мерљив ризик, осим за особе са поремећајима механизма поправке ДНК, код којих је и најмање излагање јонизујућем зрачењу контраиндиковано (Rogers и сар., 2000).

За поједине хемијске супстанце је показано да, уколико доспеју у организам мајке, могу да повећају ризик настанка АЛЛ код детета. Ту спадају анти-запаљењски лек дипирон и многобројни пестициди. Веза је превасходно уочена код леукемије у узрасту одојчета, а као чинилац ризика издвојени су и одређени полиморфизми гена који кодира цитохром P450, који су од знатног утицаја на метаболизам поменутих токсичних супстанци (Infante-Rivard и сар., 1999; Bailey и сар., 2015).

Постоје посредни показатељи да би у настанку АЛЛ могле да играју улогу и неке инфекције, мада за сада не постоји ни један инфективни агенс за који је нађена јасна корелација са оболевањем од леукемије. Такође није нађена веза између похађања предшколских установа (и следствено чешћих убиквитарних зараза) и ризика настанка АЛЛ; штавише, показано је да рано излагање инфекцијама распрострањеним у колективу има изванредан заштитни учинак (Urayama и сар., 2011). Међутим, показано је да дојење такође има заштитни учинак, чији је тачан механизам, за сада, непознат (Greenop и сар., 2015). У прилог могућој улози неке инфекције говори и већи удео носилаца HLA-DRB4*01 међу децом оболелом од АЛЛ, на основу претпоставке о диференцијалној

способности презентације одређених антигена (Dorak и сар., 1999). Најснажнија назнака да би излагање одређеним инфекцијама могло да има удела у етиологији дечје АЛЛ ипак потиче од епидемиолошких студија у којима је нађено да се учесталост дечје АЛЛ повећава након мешања популација које раније нису биле у додиру (McNally и Eden, 2004), премда овај закључак није доследно подржан свим расположивим анализама (Law и сар., 2003). Уколико је стваран, ефекат мешања популација на ризик настанка дечје акутне лимфобластне леукемије могао би да буде повезан са првим излагањем неком микроорганизму који је у другој популацији био убиквитаран, а који има потенцијал да покрене след догађаја у правцу развоја леукемије (Pui, 2012). Како би тај след догађаја текао, међутим, ни приближно није разјашњено.

1.2.2. Клиничка слика дечје АЛЛ

Као и код АМЛ, симптоми и знаци АЛЛ зависе од инфилтрације коштане сржи леукемијским ћелијама и захваћености екстрамедуларних ткива и органа. Стога не постоје патогномонични симптоми или знаци. Болест најчешће отпочиње неспецифичним симптомима као што су убрзано замарање, малаксалост, губитак апетита и повишена телесна температура нејасног узрока. Код готово трећине деце оболеле од АЛЛ, присутни су болови у костима, нарочито у дугим костима доњих екстремитета, што се може запазити по начину на који дете хода. Честе знаке представљају и бледило и крварења у кожи и слузницама, док је лимфаденопатија ређе присутна. Неретко се јављају симптоми ЦНС – главобоља, повраћање, летаргија, раздражљивост, едем папиле очног живца, конвулзије – који се превасходно јављају услед повишеног интракранијалног притиска. Некада се може констатовати и безболно увећање тестиса услед леукемијске инфилтрације овог органа (Janić, 2012).

У диференцијалној дијагнози ваља мислити на апластичну анемију, имунску тромбоцитопенијску пурпуру, јувенилни хронични артритис, а нарочито инфективну моноклеозу, која понекад зна да наведе и искусне лекаре на погрешну помисао, услед присуства лимфаденопатије и атипичних лимфоцита у периферној крви (Зверкова и сар., 1988).

1.2.3. Дијагностика дечје АЛЛ

Сумња на дечју АЛЛ најчешће се поставља на основу клиничког утиска, након прегледа комплетне крвне слике. Број леукоцита је неретко већи од 10 000/ μl , а код око 15% деце и изнад 50 000/ μl . Анемија је присутна код готово свих пацијената. По правилу је нормохромног, нормоцитног типа, без увећаног броја ретикулоцита. Код око 80% деце број тромбоцита је испод 100 000/ μl . Неретко се нађу повишене вредности ензима лактат-дехидрогеназе у крви, као и повишене концентрације мокраћне киселине, која потиче од распадања леукемијских ћелија. Уколико је број леукемијских ћелија у периферној крви екстремно велики, ово може да доведе до синдрома лизе тумора који подразумева акутно отказивање бубрега и непосредно угрожава живот пацијента, захтевајући неодложне супортивне мере. Некада се клиничка слика дечје АЛЛ компликује и хиперкалцемијом, било услед леукемијске инфилтрације кости или аберантног лучења супстанце са дејством налик на паратхормон.

Код АЛЛ Т-ћелијског фенотипа често се среће предња медијастинална маса која може да врши притисак на душник, отежавајући дисање. Због ризика крварења и/или тромбозе, код све деце са АЛЛ је, као и код АМЛ, пре почетка лечења неопходно спровести основне тестове згрушавања крви (протромбинско време, активирано парцијално тромбопластинско време, фибриноген, Д-димер, антиромбин III). Осим тога, обавезан је и преглед цереброспиналне течности, иако се иницијална захваћеност ЦНС среће код <5% деце са АЛЛ.

Дијагноза АЛЛ се поставља налазом најмање 20% лимфобласта на размазу коштане сржи. ФАБ класификација на типове Л1 и Л2 данас је лишена значаја, али је тип Л3, који се одликује тамноплавом цитоплазмом и бројним вакуолама, веома значајан јер је углавном удружен са зрелом Б-ћелијском леукемијом, која је биолошки еквивалентна Буркитовом лимфому. Имунофенотипизацијом помоћу мултипараметарске проточне цитометрије разликују се Б-ћелијске од Т-ћелијских леукемија. Прве се, на основу присуства или одсуства експресије молекула CD10 и цитоплазматског μ -ланца молекула имуноглобулина, деле на про-Б (CD10⁻cyIg⁻), обичну („*common*”) Б (CD10⁺cyIg⁻) и пре-Б (CD10⁺cyIg⁺) АЛЛ. Први од ових подтипова, који грубо одговарају степену на којем је заустављено сазревање малигних ћелија, има за нијансу лошију прогнозу него потоња два. Практично све

Б-прекурсорске леукемије испољавају молекуле CD79а, CD19, CD38 и HLA-DR, а многе и CD34. Није ретка аберантна експресија мијелоидних маркера CD13 и CD33, која представља аберантан образац удружен са леукемијом и, у овом случају, не означава леукемију мешовите лозе, нити утиче на ток болести и прогнозу исхода. Главни антигени који се срећу у имунофенотипу леукемија Т-лимфобластне лозе су CD7, CD5, CD2, CD4, CD8 и CD1а. По правилу, Т-леукемије испољавају молекулу CD3 у цитоплазми, али не и на површини ћелија, осим уколико би била реч о зрелој Т-ћелијској леукемији, која је код деце екстремно ретка. И код леукемија Т-ћелијске лозе могуће је донекле проценити степен зрелости на основу обрасца експресије маркера, па тако постоји подела на рану, средњу и касну Т-прекурсорску леукемију; ова подела, међутим, нема готово никакав прогностички значај (Ratei и сар., 2013).

Стандардним цитогенетичким испитивањем се хромозомске аберације откривају код 60-85% деце оболеле од АЛЛ (Harrison, 2001). Употребом методе *FISH* осетљивост се и овде може значајно повећати. Хипердиплоидија од 47 до 50 хромозома среће се код 10-15% пацијената. Вишак може да се односи на готово сваки хромозом, али су најчешће тризомије хромозома број 21, 8 и 10. Често се срећу и структурне аберације које захватају краке појединих хромозома: 1q, 6q, 12p и 19p. Ова група аберација удружена је са повољнијом прогнозом (Moorman и сар., 2010). Изузетак је тризомија 8, која се јавља код око 1% деце са АЛЛ, удружена је са Т-ћелијским фенотипом и њен прогностички значај још увек није јасан (Valind и сар., 2014).

Хипердиплоидија са преко 50 хромозома јавља се код 25-30% деце са АЛЛ и удружена је са повољним дијагностичким параметрима, као што су рани пре-Б имунофенотип, невелики број леукоцита и узраст између 2 и 10 година. Вероватноћа излечења већа је него у другим подгрупама, нарочито када је хипердиплоидија удружена са тризомијом хромозома број 4, 10 или 17.

Хиподиплоидија (≤ 45 хромозома) обухвата хетерогену групу која обухвата 7-8% деце са АЛЛ. Четири петине пацијената у овој групи има 45 хромозома, услед неке небалансиране транслокације, делеције или формирања дицентричног хромозома. Код више од половине деце са хиподиплоидијом изгубљен је један од полних хромозома. Монозомија хромозома број 7, као једина

аберација у овој групи, виђа се ретко, али је удружена са t(9;22) и веома лошом прогнозом. Лошу прогнозу повлачи и број хромозома близак хаплоидном (енг. *near-haploid*, 24-34, најчешће 26-28), што се јавља ретко.

Транслокације / генски реаранжмани који се рутински испитују код Б-прекурсорске АЛЛ обухватају t(12;21) (*TEL/AML1*), t(4;11) (*MLL/AF4*), t(1;19) (*E2A/PBX*) и t(9;22) (*BCR/ABL*) (Krstic и сар., 2010; Mullighan, 2012). Фузија *TEL/AML1* је најчешћа (око 25% АЛЛ) и удружена је са повољном прогнозом (Rubnitz и сар., 2008). Јавља се код АЛЛ са пре-Б фенотипом, претежно код деце узраста 1-10 година. По правилу је реч о криптичној транслокацији, те се открива молекуларно-генетичким методама (ланчана реакција полимеразе), а не кариотипом. Реаранжмани *MLL/AF4* и *BCR/ABL* удружени су са неповољном прогнозом. Код деце са АЛЛ, фузија *BCR/ABL* најчешће настаје са тачкама прекида које дају фузиони протеин p190, док се p210, који је карактеристичан за хроничну мијелоидну леукемију, код педијатријске АЛЛ среће веома ретко. Учесталост фузије *BCR/ABL* у дечјој АЛЛ износи 3-5%. Њено присуство је рационална основа за генски циљану терапију специфичним инхибиторима тирозин-киназе (иматиниб, нилотиниб) (Leoni и Biondi, 2015). Прогностички значај фузије *E2A/PBX* је недовољно разјашњен (Janić, 2012).

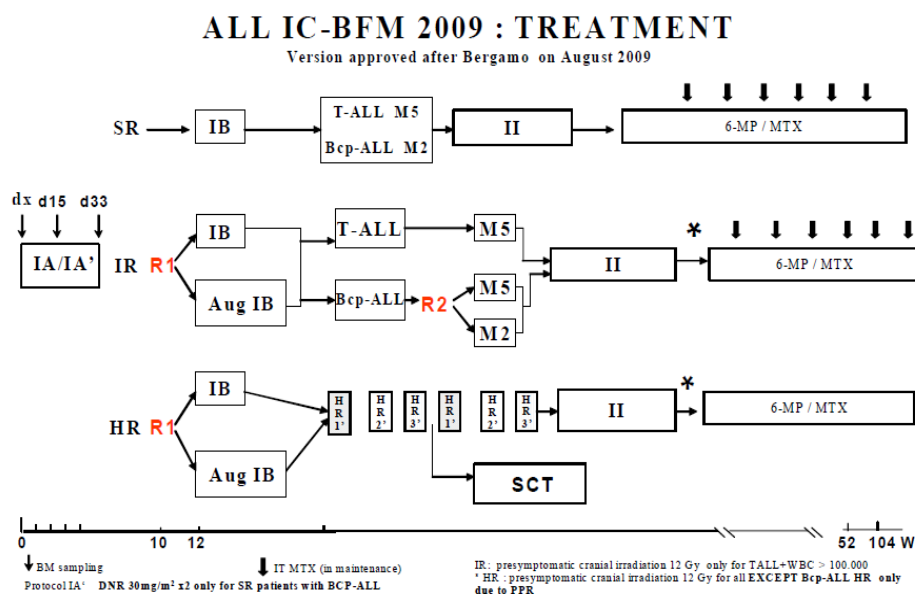
У АЛЛ Т-ћелијског фенотипа, као лош прогностички знак издваја се стање блиско тетраплоидији (енг. *near-tetraploidy*). Код Т-ћелијске АЛЛ се налази и генски реаранжман *SIL/TAL1* који одговара t(1;14), као и реаранжман *HOX11/TCRδ* који одговара t(10;14). Први је, колико је познато, прогностички неутралан, а други вероватно означава повољнију прогнозу (Armstrong и Look, 2005).

Као и код АМЛ, и код АЛЛ постоји тежња да се секвенцирањем комплетног генома идентификују и укључе у процену ризика и следствену стратификацију пацијената и друге, ретке генске промене за које се може показати да утичу на ток болести и прогнозу њеног исхода (Hunger и Mullighan, 2015).

1.2.4. Лечење дечје АЛЛ

Дечја АЛЛ је малигна болест у чијем лечењу је остварен највећи успех. Стопе излечења у свету већ увелико прелазе 80%, а код АЛЛ са повољним

прогностичким чиниоцима и 90%. Овај успех омогућен је применом комбинације лекова са различитим механизмом дејства, будући да се на појединачни лек неминовно развија резистенција леукемијских ћелија. Као и код АМЛ, терапија АЛЛ подељена је на фазе индукције, консолидације, ре-индукције и одржавања и свеукупно траје око две године. У нашој земљи, лечење АЛЛ се врши по међународном протоколу BFM-ALL-IC-2009 (слика 2).



Слика 2. Протокол ALL IC-BFM 2009.

1.2.5. Минимална резидуална болест

Брзина којом малигне ћелије ишчезавају из организма детета представља најважнији прогностички параметар, будући да је она збирни исход деловања великог броја познатих и непознатих биолошких чинилаца. Будући да је праг осетљивости морфолошког праћења броја бласта при контролним аспирацијама коштане сржи ограничен на око 5%, развијена су три осетљивија и прецизнија начина да се процени заступљеност леукемијских ћелија, што се назива минималном резидуалном болешћу (МРБ). То су имунофенотипизација мултипараметарском проточном цитометријом, детекција клонски реаранжираног гена за антигенске рецепторе (уколико постоји у леукемијским ћелијама) и детекција фузионог гена карактеристичног за леукемијске ћелије (уколико

постоји). Последње две методе ослањају се на ланчану реакцију полимеразе и одликују се великом осетљивошћу (1:10⁶) (van Dongen и сар., 2015).

Мултипараметарска проточна цитометрија је мање осетљива (1:10⁴), али има предност услед брзине и лакоће извођења, могућности да се примени и код пацијената који немају фузионе гене нити реаранжирани антигенске рецептори и, изнад свега, чињенице да се ток болести и лечења прати на ћелијском нивоу, где се сви биолошки процеси интегришу. Према важећем протоколу (BFM-ALL-IC-2009), МРБ оцењена мултипараметарском цитометријом 15. дана лечења представља важан параметар у стратификацији пацијената према ризику (Gaipa и сар., 2013).

Детекција фузионих gena може да се примени као метод за испитивање МРБ и код пацијената са АМЛ. Други начин испитивања МРБ код АМЛ могло би да буде мерење експресије gena *WT1* квантитативном ланчаном реакцијом полимеразе са реверзном транскрипцијом, о чему ће бити више речи у наставку.

1.3. Транскрипциони фактор Вилсов тумор (*WT1*)

Вилсов тумор (*WT1*) је транскрипциони фактор који игра значајну улогу у регулацији ћелијског раста и диференцијације (Yang и сар., 2007). Експресија gena *WT1* показује наглашену ткивну специфичност. Током ембрионалног развића, улога *WT1* је превасходно усредсређена у уrogenиталном систему. У одраслом организму су, поред поменутог, веома значајна места физиолошке експресије *WT1* централни нервни систем и имунохематопоезска ткива, укључујући коштану срж и лимфне чворове. Ген *WT1* се налази на хромозомском локусу 11p13. Његова секвенца одређена је 1990. године. Сачињен је од десет егзона, чијом транскрипцијом настаје информациона РНК дужине 3 kb. Забележена је могућност настанка неколицине пост-транскрипционих модификација, међу којима доминирају два начина алтернативне обраде („сплајсинга“) РНК транскрипта: први обухвата запис који кодира 17 аминокиселина у егзону 5, а други девет нуклеотида (што одговара трима аминокиселинама – лизину, треонину и серину) на 3' крају егзона 9. Алтернативном обрадом ова два места стварају се четири изоформе *WT1* које се означавају словима абетеде (A, B, C, D).

Мада је првобитно откривен код Вилмсовог тумора, ретке неоплазме ембрионалних ћелија која превасходно захвата бубрег, нађено је да WT1 игра улогу у патогенези широког спектра малигних процеса (Sugiyama, 2001). Занимљиво је да WT1, под различитим околностима, може да игра како улогу онкогена, тако и улогу тумор-супресорског гена (Sugiyama, 2010). Такође је добро позната улога WT1 у регулацији апоптозе (Yang и сар., 2007). WT1 је укључен како у нормалну хематопоезу, тако и у малигну трансформацију овог процеса (Ariyaratana и Loeb, 2007). У коштаном сржи пацијената са АМЛ, често постоји повећана експресија *WT1* (Bergmann и сар., 1997), што је показано као негативан прогностички чинилац, како код одраслих, тако и код деце (Trka и сар., 2002; Garg и сар., 2003; Rodrigues и сар., 2007; Lyu и сар., 2014). Међутим, у појединим истраживањима корелација између експресије *WT1* у коштаном сржи при дијагнози и прогнозе исхода обољења није нађена (Barragan и сар., 2004; Noronha и сар., 2009). У једном истраживању код одраслих нађено је да је висока експресија *WT1* удружена са повољном прогнозом код не-М3 АМЛ (Miglino и сар., 2011). У једној студији Јапанске кооперативне групе за проучавање дечјих леукемија није нађен прогностички значај нивоа експресије *WT1* при дијагнози, након што је извршена математичка корекција за присуство мутација у гену *FLT3*; међутим, ниво експресије *WT1* у коштаном сржи након фазе индукције био је у корелацији са изгледима успешног лечења (Shimada и сар., 2012).

За разлику од АМЛ, експресија *WT1* код АЛЛ је најчешће блиска оној код здравих особа. Ипак, поједини пацијенти са АЛЛ показују и нешто вишу експресију *WT1* (Zhang и сар., 2015).

У току су и бројне експерименталне студије у којима је *WT1* полазна основа за нове видове лечења леукемије, превасходно АМЛ. Поред истраживања могућности фармаколошке инхибиције експресије *WT1* (Anuchapreeda и сар., 2006; Xiang и сар., 2016), перспективну стратегију представљају „туморске вакцине“ које садрже WT1 или његове кључне епитопе, чиме се настоји покренути антитуморски имунски одговор (Sawada и сар., 2016).

2. Циљеви истраживања

На основу горе изнетих сазнања о улози транскрипционог фактора WT1 код дечјих леукемија и њеној потенцијалној повезаности са током болести и исходом лечења, постављени су следећи циљеви истраживања:

1. Испитати разлике у експресији гена *WT1* у коштаном сржи при дијагнози између пацијената са АМЛ, Б- и Т-ћелијске АЛЛ, и контролне групе (пацијената са ИТП).

2. Испитати разлике у експресији протеина WT1 у леукемијским ћелијама у коштаном сржи при дијагнози између пацијената са АМЛ, Б- и Т-ћелијске АЛЛ, и контролне групе (пацијената са ИТП).

3. Испитати разлике у експресији гена *WT1* у коштаном сржи при дијагнози између пацијената са различитим типовима АМЛ према класификацији ФАБ.

4. Испитати разлике у експресији протеина WT1 у коштаном сржи при дијагнози између пацијената са различитим типовима АМЛ према класификацији ФАБ.

5. Испитати разлике у експресији гена *WT1* у коштаном сржи при дијагнози између пацијената са АМЛ удруженом са различитим генетичким налазима.

6. Испитати разлике у експресији протеина WT1 у коштаном сржи при дијагнози између пацијената са АМЛ удруженом са различитим генетичким налазима.

7. Испитати разлике у експресији гена и протеина WT1 у коштаном сржи при дијагнози у односу на достизање пуне ремисије болести код пацијената са АМЛ, Б- и Т-ћелијске АЛЛ.

8. Испитати разлике у експресији гена и протеина WT1 у коштаном сржи при дијагнози у односу на исход лечења код пацијената са АМЛ.

9. Испитати разлике у експресији гена и протеина WT1 у коштаном сржи при контролним аспирацијама код пацијената са АМЛ у односу на исход лечења.

3. Пацијенти и методе

3.1. Пацијенти

У истраживање је укључено 20 деце оболеле од АМЛ (12 дечака и 8 девојчица), узраста од 3 до 16 година (медијана 9½ година) и 20 деце са АЛЛ (11

дечака и 9 девојчица) узраста од 6 месеци до 17 година (медијана 5 година). Контролна група је формирана од 15 деце усклађеног пола и узраста која су подвргнута аспирацији коштане сржи због имунске тромбоцитопенијске пурпуре (ИТП). Овај избор контролне групе диктиран је чињеницом да се здрава деца не подвргавају аспирацији коштане сржи, као и тиме што се ово обољење одликује нормалним налазом у коштаном сржи. Пацијенти са АМЛ подељени су на подгрупе према класификацији ФАБ (М1/М2 5, М3 6, М4 2 и М5 7). Пацијенти са АЛЛ подељени су на подгрупе са Б-ћелијском АЛЛ (16) и Т-ћелијском АЛЛ (4). Родитељи све деце дали су писани пристајак за учешће детета у истраживању у пуној обавештености. Дијагноза је код све деце постављена у Универзитетској дечјој клиници у периоду од априла 2011. до фебруара 2016. Деца са АМЛ лечена су по протоколу VFM-AML-2004, а деца са АЛЛ по протоколу VFM-ALL-IC-2009.

3.2. Дијагностичке лабораторијске анализе

У оквиру редовне дијагностике и праћења, код све деце су извршени морфолошки преглед коштане сржи (при чему је код пацијената са АМЛ одређен тип према ФАБ класификацији, имунофенотипизација леукемијских ћелија проточном цитометријом, цитогенетичко испитивање културе ћелија коштане сржи и молекуларно-генетичке анализе узорка коштане сржи (ланчана реакција полимеразе са реверзном транскрипцијом) за детекцију најчешћих генских реаранжмана удружених са акутном мијелоидном леукемијом (*PML/RAR α* , *AML1/ETO*, *CBFB/MYH11* и *FLT3-ITD*), односно акутном лимфобластном леукемијом (*TEL/AML1*, *MLL/AF4*, *BCR/ABL* и *PBX2/E2A*). Карактеристике пацијената су приказане на табели 3.1.

Табела 3.1А. Карактеристике пацијената са АМЛ укључених у истраживање

Редни број	Пол	Узраст при дг.	ФАБ	Имунофенотип	Кариотип	Молекуларно- генетички налаз
1	м	14 г.	М3	АПЛ	46, XY	<i>PML/RARα</i>
2	ж	8 г.	М5	АЛМЛ (Мо/Б)	Није рађено	Her.
3	м	10 г.	М5	АЛМЛ (Мо/Б)	46,XY/47,XY+C	Her.
4	м	8 г.	М3	АПЛ	46,XY/46,XY, +17q-	<i>PML/RARα</i>
5	м	10 г.	М2	АЛМЛ (М/Т)	Није рађено	Her.
6	ж	9 г.	М4	АММоЛ	46,XX	Inv(16)
7	м	19 мес.	М5	АМоЛ	48,XY, +8, +21/46,XY	Her.
8	м	9 г.	М2	АМЛ	46, XY	<i>AML1/ETO</i>
9	м	12 г.	М2	АМЛ	46, XY	Her.
10	ж	5 г.	М5	АМоЛ	46, XY	Her.
11	ж	8 г.	М5	АМоЛ	46, XX	<i>FLT3-ITD</i>
12	ж	15 г.	М3	АПЛ	t (15:17)	<i>PML/RARα</i>
13	м	15 г.	М4	АММоЛ	46, XY	Her.
14	м	9 мес.	М5	АМоЛ	46, XY	Her.
15	м	13 г.	М3	АПЛ	t (15:17)	<i>PML/RARα, FLT3-ITD</i>
16	ж	16 г.	М5	АМоЛ	46, XX	Her.; <i>MOZ/CBB*</i>
17	м	9 г.	М1	АМЛ	t (7;8)	<i>AML1/ETO</i>
18	ж	16 г.	М3	АПЛ	t (15:17)	<i>PML/RARα</i>
19	м	15 г.	М1	АМЛ	46, XY	Her.
20	ж	3 мес.	М3	АПЛ	t (15:17)	<i>PML/RARα</i>

АПЛ, акутна промијелоцитна леукемија; АЛМЛ, акутна леукемија мешовите лозе; АММоЛ, акутна мијеломоноцитна леукемија; АМоЛ, акутна моноцитна леукемија; АМЛ, акутна мијелоидна леукемија (*sensu stricto*); Пацијенти код којих није нађена ниједна од рутински испитиваних генских аберација означени су “Her.”.

* Ова аберација није део уобичајене дијагностичке обраде; откривена је кстензивним испитивањем у другој установи.

Табела 3.1Б. Карактеристике пацијената са АЈЛ укључених у истраживање.

Редни број	Пол	Узраст при дг.	Имунофенотип	Кариотип	Молекуларно-генетички налаз
1	ж	2 год.	Пре-Б	t(9;22)	<i>BCR/ABL</i>
2	м	3 год.	Пре-Б	Није рађено	Нег.
3	м	2 год.	<i>Common</i> Б	46, XY	Нег.
4	м	6 мес.	<i>Common</i> Б	46, XY	Нег.
5	ж	7 год.	Пре-Б	46, XX	<i>PBX1/E2A</i>
6	ж	16 год.	Про-Б	46, XX	Нег.
7	ж	3 год.	Пре-Б	46, XX + 21	Нег.
8	ж	5 год.	<i>Common</i> Б	46, XX	Нег.
9	ж	5 год.	Пре-Б	t(12;21)	<i>TEL/AML1</i>
10	м	5 год.	<i>Common</i> Б	46, XY	Нег.
11	м	4 год.	<i>Common</i> Б	46, XY	Нег.
12	м	22 мо	<i>Common</i> Б	45, XY -7	Нег.
13	ж	3 год.	<i>Common</i> Б	Није рађено	Нег.
14	м	23 мес.	Пре-Б	46XY	Нег.
15	ж	10 год.	<i>Common</i> Б	46XX	Нег.
16	ж	15 год.	Пре-Б	t(9;22)	<i>BCR/ABL</i>
17	м	17 год.	Т	46, XY	Нег.
18	м	14 год.	Т	47,XY,+mar/66-68,XXY/46,XY	Нег.
19	м	5 год.	Т	46, XY	Нег.
20	м	5 год.	Т	46, XY	Нег.

Пацијенти код којих није нађена ниједна од рутински испитиваних генских аберација означени су “Нег.”.

3.3. Анализа експресије гена *WT1*

Анализа експресије гена *WT1* вршена је у Лабораторији за молекуларну биомедицину Института за молекуларну генетику и генетичко инжињерство у Београду. Мононуклеарне ћелије коштане сржи (МЋКС) пацијената изоловане су помоћу густинског сепарационог медијума (Ficoll-PaqueTM Plus, GE Healthcare), а затим суспендоване у реакционој смеси заснованој на тризолу (TRI Reagent, Ambion). Укупна РНК је изолована стандардним поступком. По 1 µg РНК употребљен је као матрица за синтезу комплементарне ДНК (кДНК). Ова реакција изведена је у запремини од 20 µl користећи ензим реверзну транскриптазу RevertAid (Thermo Scientific). Затим је по 1 µl кДНК подвргнут ланчаној реакцији полимеразе у реакционој запремини од 20 µl, користећи TaqMan® Universal Master Mix II (Applied Biosystems), TaqMan® Gene Expression Assay за *WT1* (Hs01103751_m1), као и одговарајуће прајмере и генске пробе за испитивање гена

ABL (унутрашња контрола). Сви узорци су обрађени у дупликату. Релативна квантитативна анализа је извршена компаративном методом ddCt, уз калибрацију на основу експресије *WT1* код деце у контролној групи, ради дефинисања физиолошког опсега експресије *WT1* код здравих особа.

3.4. *Анализа експресије протеина WT1*

Анализа експресије протеина *WT1* вршена је у Имунолошкој лабораторији Службе за дечју хематологију и онкологију Универзитетске дечје клинике у Београду. Експресија протеина *WT1* анализирана је проточном цитометријом у узорцима коштане сржи пацијената, након индиректног флуоресцентног обележавања. Анализа је вршена на комплетној ћелијској популацији коштане сржи (без издвајања популација помоћу густинског сепарационог медијума). Ћелије коштане сржи су пре и током анализе пермеабилеизоване користећи комплет Cytofix/Cytoperm (Beckton Dickinson). Као примарно антителио је коришћено козје антителио класе имуноглобулин G (IgG) AF5729 (R&D Systems), а као секундарно антителио антителио кунића на козји IgG Star 122F конјуговано флуоресцеин-изотиоцијанатом (Serotec). Критеријум за детекцију протеина *WT1* у ћелијама у узорку био је количник (логаритамски забележеног) флуоресцентног сигнала обележеног антителиа и изотипске контроле од најмање 1.33. Ћелијска популација од интереса одређивана је електронским граничником постављеним на основу интензитета експресија молекула CD45 и бочног расејања ласерског светлосног снопа и у свим случајевима се у преко 95% састојала од леукемијских ћелија.

3.5. *Статистичка анализа*

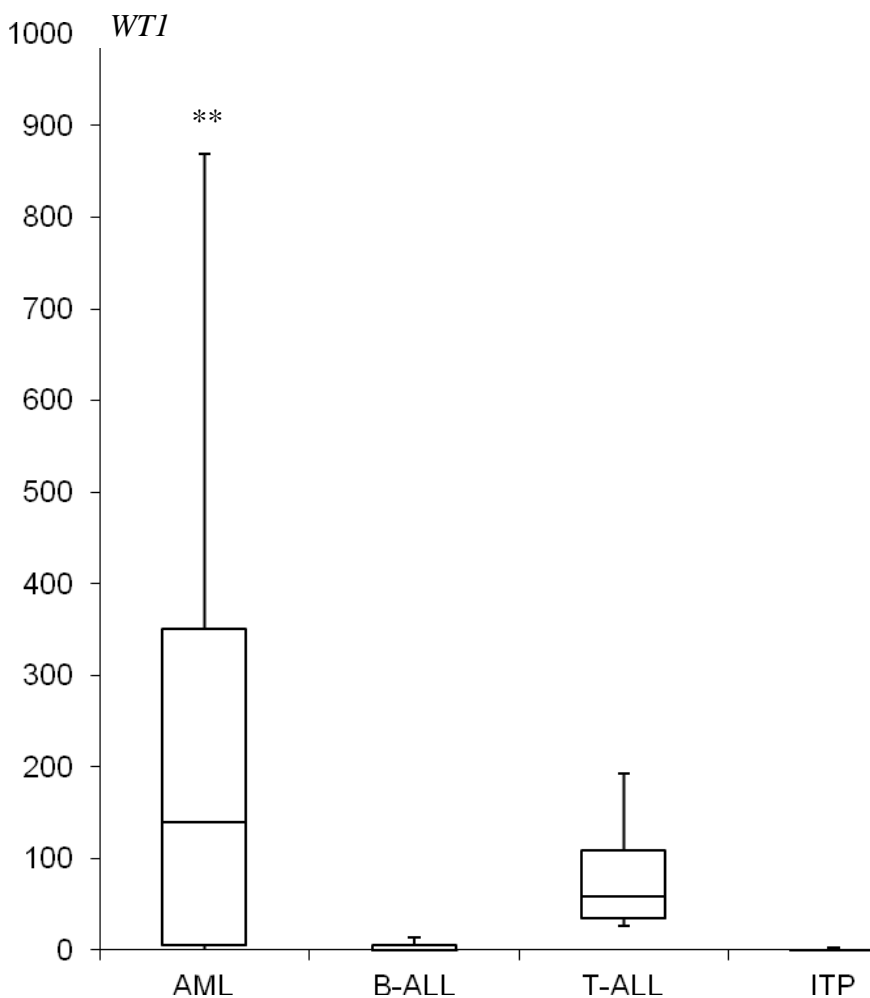
Експресија *WT1* у свакој групи приказана је медијаном и стандардном девијацијом. У случајевима где су за то били испуњени услови, разлике између група су анализирани Ман-Витнијевим U тестом или Фишовим тестом тачне вероватноће (избор теста је био диктиран великом разноликошћу клиничких карактеристика и лабораторијских параметара код пацијената у свим групама, што не допушта употребу тестова заснованих на Гаусовој расподели).

4. Резултати

4.1. Експресија гена *WT1* у главним групама

Код пацијената са АМЛ забележена је значајно већа експресија гена *WT1* ($139,42 \pm 244,03$) него код пацијената са АЛЛ ($1,18 \pm 54,37$; $U=82$; $p<0,01$) или у контролној групи пацијената са ИТП ($0,76 \pm 1,01$; $U=32$; $p<0,01$). Експресија гена *WT1* код пацијената са АЛЛ није се статистички значајно разликовала од оне код пацијената са ИТП ($U=105,5$; $p>0,05$) (графикон 1).

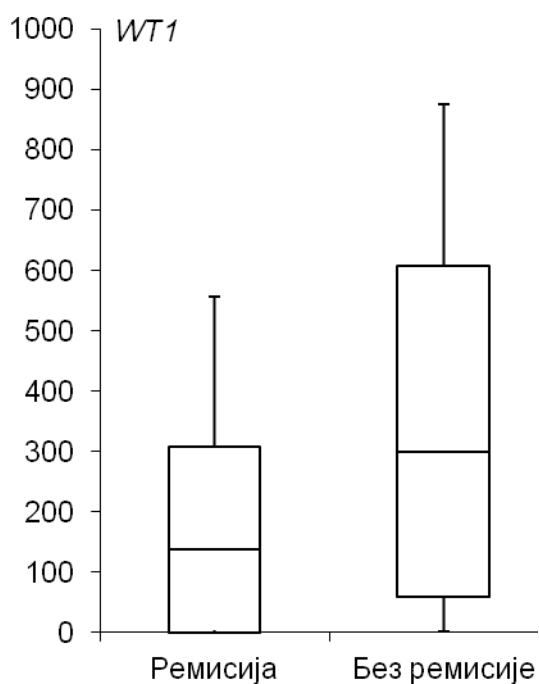
Графикон 1. Експресије гена *WT1* при дијагнози код главних типова леукемије у поређењу са контролном групом (ИТП) (бокс-дијаграм); ** $p<0,01$.



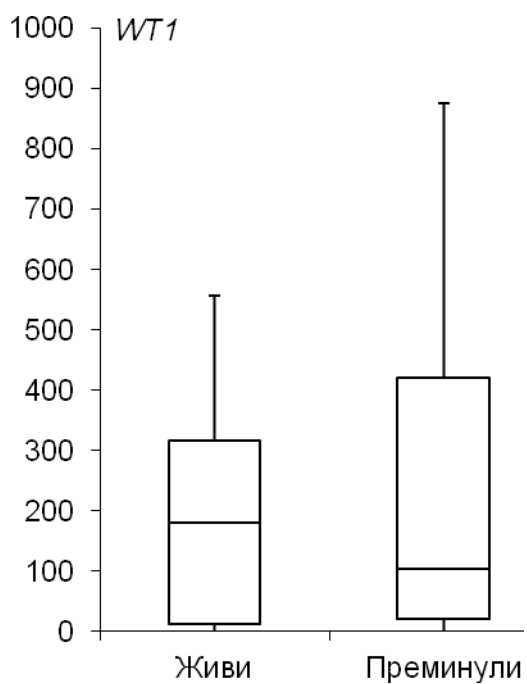
4.2 Експресија гена *WT1* у односу на достизање ремисије/преживљавање пацијената са АМЛ

Експресија гена *WT1* при дијагнози код 16 деце која су ушла у пуну ремисију болести била је $139,42 \pm 186,51$, док је експресија гена *WT1* при дијагнози код четворо деце која су преминула не ушавши у ремисију износила $300,80 \pm 407,01$ (графикон 2). У време анализирања (медијана праћења 1½ година), 14 деце је и даље било у животу, а њихова експресија гена *WT1* при дијагнози износила је $181,42 \pm 192,52$ (графикон 3). Код укупно шесторо деце која су до тренутка анализирања подлегла болести (четворо без уласка у ремисију, једно услед релапса и једно услед фаталне инфективне компликације) експресија гена *WT1* при дијагнози је износила $104,29 \pm 354,87$. Разлика између наведене две групе није била статистички значајна ($U=41$, $p>0,05$). Међу 14 деце која су још била жива, једно је такође претрпело релапс (експресија *WT1* при дијагнози 305,91) и у тренутку анализе је било лечено на одговарајући начин према протоколу. У групи деце чија је експресија гена *WT1* при дијагнози била у четвртом квантилу ($>350,10$), петоро од седморо (71,4%) је остало у животу, у поређењу са деветоро од тринаесторо (69,2%) са експресијом гена *WT1* при дијагнози у прва три квантила. Ова разлика није била статистички значајна према Фишеровом тесту тачне вероватноће.

Графикон 2. Експресија *WT1* у групама деце са АМЛ формираним у зависности од постизања ремисије



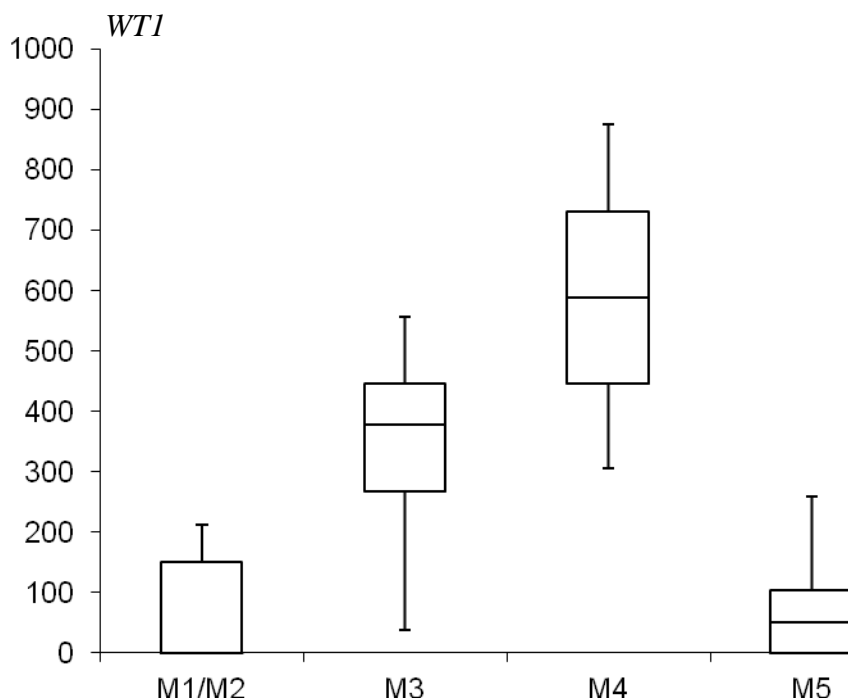
Графикон 3. Експресија *WT1* у групама деце са АМЛ формираним у односу на укупно преживљавање до краја периода праћења



4.3 Експресија гена *WT1* при дијагнози у подгрупама деце са АМЛ

У групи од шесторо пацијената са акутном промијелоцитном леукемијом (која је код свих потврђена доказаним присуством генског реаранжмана *PML/RAR α* , експресија гена *WT1* при дијагнози је била $379,53 \pm 183,52$. Ако би се из ове групе искључио један пацијент код којег је такође пронађена интерна тандем дупликација гена *FLT3*, експресија гена *WT1* при дијагнози за преосталих петоро износила би $320,68 \pm 196,53$. Ман-Витнијевим U тестом није добијена статистичка значајност разлике између пацијената са промијелоцитном леукемијом и оних са другим ФАБ типовима ($U=18$, $p>0,05$; графикон 4), што се може објаснити малобројношћу подгрупе. Експресија гена *WT1* при дијагнози код петоро деце са ФАБ типом М1 или М2 износила је $5,20 \pm 100,7$ ($U=22$, $p>0,05$), а код седморо деце са ФАБ типом М5 $51,02 \pm 186,66$ ($U=24$, $p>0,05$). Код једног од два детета са леукемијом ФАБ типа М4 забележена је највећа вредност експресије гена *WT1* при дијагнози у читавој серији пацијената (874,92), док је код другог детета са овим типом леукемије износила 305,91. Значајно је приметити да је само код последњег детета нађен генски реаранжман *CBFB/MYH11*.

Графикон 4. Експресија гена *WT1* при дијагнози код деце са АМЛ различитих ФАБ типова (бокс-дијаграм).



4.4. Експресија гена *WT1* при дијагнози код пацијената са АЛЛ

Мали број деце са Т-АЛЛ укључене у истраживање онемогућио је статистичко поређење експресија гена *WT1* при дијагнози у односу на друге типове или подтипове леукемије. Међутим, код свих четворо је експресија гена *WT1* при дијагнози премашила медијану код здравих контрола (ИТП) за више од 3 стандардне девијације. Исто важи за четворо од шеснаесторо пацијената са Б-АЛЛ (25%). Троје од ових четворо деце имали су леукемију имунофенотипа *common* Б, док је једно имало про-Б имунофенотип. Код свих четворо, кариотип је био нормалан, а рутински испитивани генски реаранжмани нису нађени. Са друге стране, код двоје деце са генским реаранжманом *BCR/ABL* и по једног детета са реаранжманима *PBX/E2A* и *TEL/AML1* није нађена експресија гена *WT1* при дијагнози изнад нивоа у контролној групи. До времена анализирања, двоје деце је изгубљено за праћење услед превођења у другу здравствену установу, док су преосталих 14 деце са Б-АЛЛ била жива и без знакова болести (двоје након успешне ТМЋХ). Троје од четворо деце са Т-АЛЛ су такође била жива и без

знакова болести. Медијана праћења у групи пацијената са АЛЛ износила је 2,0 године.

4.5. Експресија гена *WT1* при контролним аспирацијама коштане сржи

Резултати испитивања експресије гена *WT1* при контролним прегледима коштане сржи приказани су у табели 4.1. Код већине пацијената, прво контролно испитивање спроведено је месец дана након постављања дијагнозе; даља контролна испитивања су предузимана по потреби, у различитим интервалима. Подаци контролног испитивања након месец дана добијени су код 15 деце. Свега двоје од петоро деце код које се експресија гена *WT1* месец дана по дијагнози налазила у четвртој квинтили било је живо у време анализирања, док су сва деца (10 од 10) са експресијом у прва три квинтила била жива (табела 4.2). Ова разлика ипак није статистички значајна на основу Фишеровог теста тачне вероватноће ($p=0,0952$), што је вероватно превасходно последица малог броја испитаника.

Табела 4.1. Експресија гена *WT1* у коштаном сржи при контролним аспирацијама коштане сржи

Пац. бр.	Пол	Узраст (дг.)	ФАБ	Имунофенотип	Кариотип	Молекуларна генетика
1	м	14 г.	М3	APL	46,XY	PML/RAR α
Презентац.	11 м.	1 г. 5 м.	2 г. 8 м.		Релапс	Исход
556,41	0	0	0,43		Не	Жив након 4 г. 8 м.

Пац. бр.	Пол	Узраст (дг.)	ФАБ	Имунофенотип	Кариотип	Молекуларна генетика
2	ж	8 г.	М5	ALML (Mo/B)	Н.р.	Нег.
Презентац.	1 м.				Релапс	Исход
520,59	47,05				Не	<i>Exitus lethalis</i> након 1 1/2 м.

Пац. бр.	Пол	Узраст (дг.)	ФАБ	Имунофенотип	Кариотип	Молекуларна генетика
4	м	8 г.	М3	APL	46,XY/46,XY, +17q-	PML/RAR α
Презентац.	1 м.				Релапс	Исход
37,71	0				Не	Жив након 2 г. 9 м.

Пац. бр.	Пол	Узраст (дг.)	ФАБ	Имунофенотип	Кариотип	Молекуларна генетика
6	ж	9 г.	M4	AMMoL	46,XX	Inv(16)
Презентац.	1 м.	2 м.	3 м.	4 м.	1 г. 10 м. (релапс)	1 г. 11 м.
305,91	0	0,32	0	1.34	180,39	330,38
					Релапс	Исход
					Да	Жива након 2 г.

Пац. бр.	Пол	Узраст (дг.)	ФАБ	Имунофенотип	Кариотип	Молекуларна генетика
8	м	9 г.	M2	AML	46, XY	AML1/ETO
Презентац.	1 м.	2 м.	3 м.	1 г. 9 м.	Релапс	Исход
151,27	2,01	0,09	0,36	1,55	Не	Жив након 1 г. 4 м.

Пац. бр.	Пол	Узраст (дг.)	ФАБ	Имунофенотип	Кариотип	Молекуларна генетика
9	м	12 г.	M2	AML	46, XY	Нег.
Презентац.	1 м.				Релапс	Исход
5,2	0,45				Не	Жив након 1 г. 11 м.

Пац. бр.	Пол	Узраст (дг.)	ФАБ	Имунофенотип	Кариотип	Молекуларна генетика
10	ж	5 г.	M5	AMoL	46, XY	Нег.
Презентац.	1 м.				Релапс	Исход
51,02	0,22				Не	Жива након 1 г. 10 м.

Пац. бр.	Пол	Узраст (дг.)	ФАБ	Имунофенотип	Кариотип	Молекуларна генетика
11	ж	8 г.	M5	AMoL	46, XX	Нег, FLT3-ITD
Презентац.	4 м.	6 м. (релапс)			Релапс	Исход
127,56	8,75	260,47			Да (6 м.)	<i>Exitus lethalis</i> након 6 1/2 м.

Пац. бр.	Пол	Узраст (дг.)	ФАБ	Имунофенотип	Кариотип	Молекуларна генетика
12	ж	15 г.	M3	APL	t(15;17)	PML/RAR α
Презентац.	1 м.	2 м.	5 м.		Релапс	Исход
320,68	37,48	11,24	39,89		Не	Жива након 1 г. 9 м.

Пац. бр.	Пол	Узраст (дг.)	ФАБ	Имунофенотип	Кариотип	Молекуларна генетика
13	м	15 г.	М4	АММoL	46, XY	Нег.
Презентац.	1 м.				Релапс	Исход
874,92	465,29				Не	<i>Exitus lethalis</i> након 1 1/2 м.

Пац. бр.	Пол	Узраст (дг.)	ФАБ	Имунофенотип	Кариотип	Молекуларна генетика
15	м	13 г.	М3	APL	t (15;17)	PML/RAR α , FLT3-ITD
Презентац.	1 м.	2 м.			Релапс	Исход
449,76	4,2	0,5			Не	Жив након 9 м.

Пац. бр.	Пол	Узраст (дг.)	ФАБ	Имунофенотип	Кариотип	Молекуларна генетика
16	ж	16 г.	М5	АМоL	46, XX	Нег; Moz/CBV (t16;18)
Презентац.	1 м.				Релапс	Исход
0,05	3,28				Не	Жив након 9 м.

Пац. бр.	Пол	Узраст (дг.)	ФАБ	Имунофенотип	Кариотип	Молекуларна генетика
17	м.	9 г.	М1	AML	t(7;8)	AML1/ETO
Презентац.	1 м.	4 1/2 м.			Релапс	Исход
211,57	12,07	0,22			Не	Жив након 8 м.

Пац. бр.	Пол	Узраст (дг.)	ФАБ	Имунофенотип	Кариотип	Молекуларна генетика
18	ж	16 г.	М3	APL	t(15;17)	PML/RAR α
Презентац.	1 м.				Релапс	Исход
438,37	74,85				Не	Жива након 5 м.

Пац. бр.	Пол	Узраст (дг.)	ФАБ	Имунофенотип	Кариотип	Молекуларна генетика
19	м	15 г.	M1	AML	46, XY	Нег.
Презентац.	1 м.				Релапс	Исход
2,17	4,37				Не	Жив након 3 м.

AML: акутна мијелоидна леукемија; AMoL: акутна монобластна леукемија; AMMoL: акутна мијеломоноцитна леукемија; APL: акутна промијелоцитна леукемија.

Табела 4.2. Преживљавање пацијената до краја периода праћења у односу на висину експресије *WT1* месец дана након постављања дијагнозе

Експресија <i>WT1</i>	Живи	Преминули	Укупно
Први-трећи квартил	10	0	10
Четврти квартил	2	3	5
Укупно	12	3	15

4.6. Детекција експресије протеина *WT1*

Примењеном методом индиректне флуоресценце/проточне цитометрије, молекула *WT1* је детектован при дијагнози у леукемијским ћелијама код 16 пацијената са АМЛ (табела 4.3) и свих четворо пацијената са Т-АЛЛ (табела 4.4). Код пацијената са Б-АЛЛ, *WT1* на протеинском нивоу није детектован. Ни у једном узорку добијеном контролним прегледима коштане сржи током лечења, експресија *WT1* није детектована на нивоу протеина.

Табела 4.3. Детекција експресије протеина WT1 проточном цитометријом код пацијената са АМЛ

Пацијент	Експресија WT1	Детекција WT1 проточном цитометријом
1	556,41	-
2	520,59	+
3	1,93	-
4	37,71	+
5	1,45	+
6	305,91	+
7	81,01	+
8	151,27	+
9	5,20	+
10	51,02	-
11	127,56	-
12	320,68	-
13	874,92	+
14	0,08	+
15	449,76	+
16	0,05	-
17	211,57	+
18	438,37	+
19	2,17	+
20	244,89	+

Табела 4.4. Детекција експресије протеина WT1 проточном цитометријом код пацијената са Т-ћелијском АЛЛ

Пацијент	Експресија WT1	Детекција WT1 проточном цитометријом
17	27,15	+
18	192,27	+
19	80,56	+
20	36,53	+

5. Дискусија

Резултати овог истраживања показују да, у популацији педијатријских пацијената у Србији, деца оболела од АМЛ имају знатно вишу експресију гена *WT1* него деца са АЛЛ или деца у контролној групи (са дијагнозом ИТП). У групи деце са АМЛ уочена је тенденција већег ризика релапса или раног леталног исхода код деце са вишим нивоом експресије гена *WT1* при дијагнози, што је већ показано и другде (Lyu и сар., 2014). Међутим, резултати овог истраживања нису достигли статистичку значајност услед малог броја пацијената и великог варирања експресије *WT1*. Осим тога, неопходно је имати у виду и утицај других, познатих или непознатих, чинилаца ризика, као и чињеницу да је у појединим објављеним студијама висока експресија *WT1* била, напротив, удружена са повољнијом прогнозом код дечје АМЛ (Rodriguez и сар., 2007).

Уочена је снажна тенденција вишег нивоа експресије гена *WT1* код деце са АМЛ М3, односно генским реаранжманом *PML/RAR α* , премда ни овде није досегнута статистичка значајност. Уочена тенденција је у сагласности са објављеним подацима о просечно вишој експресији *WT1* код ФАБ М3 АМЛ (Ho и сар., 2014). Такође је вредно помена да је пацијент у нашој серији код ког је (поред *PML/RAR α*) нађена и *FLT3-ITD* (пацијент број 15) имао експресију *WT1* при дијагнози 449,76, што је изнад медијане како за читаву групу са АМЛ, тако и за подгрупу са ФАБ М3. Показано је да је акутна промијелоцитна леукемија код деце (са реаранжманом *PML/RAR α*) чешће удружена са *FLT3-ITD*, као и да је истовремено присуство мутација *WT1* и *FLT3-ITD* удружено са мањим изгледима преживљавања (Balgobind и сар., 2011). Насупрот томе, пацијенткиња број 11, код које је нађена *FLT3-ITD* у одсуству других аберација, умрла је услед раног релапса, а експресија *WT1* при дијагнози била је умерено висока (127,56). Иако се на основу појединачних случајева не могу изводити општи закључци, може се приметити да је наш пацијент са *PML/RAR α* и *FLT3-ITD* био у ремисији на крају периода праћења, што би могло да се слаже са запажањима изнетим у неким серијама педијатријских пацијената, као што је она коју су, за турску популацију, објавили Coşkunpinar и сарадници 2012. Са друге стране, документовано је да

мутације *FLT3* повлаче висок ризик ране смрти код педијатријске акутне промијелоцитне леукемије (Kutny и сар., 2012). У популацији деце са АМЛ у Србији нађено је да су мутације *FLT3* и *NPM1* веома ретке и неповољне, с тим што број случајева у којима су се јавиле није био довољан за статистичко закључивање о прогностичким асоцијацијама (Krstovski и сар., 2010).

Експресија *WT1* у групама ФАБ М1/М2 и М5 није показала статистички значајну разлику у односу на остатак пацијената са АМЛ.

Сво четворо деце са Т-ћелијском АЛЛ показало је релативно висок ниво експресије *WT1* (у поређењу са контролном групом деце са ИТП и већином деце са Б-ћелијском АЛЛ). Статистичка анализа није била изводљива услед малобројности подгрупе. Поред тога, од значаја је да се ток и исход болести код четворо деце са Б-ћелијском АЛЛ која су такође испољила значајну експресију *WT1* при дијагнози (>3 стандардне девијације већу од медијане у контролној групи) ни у једном уоченом биолошком параметру није разликовао од тока и исхода код осталих пацијената са Б-ћелијском АЛЛ. Ипак, овде је неопходан опрез у закључивању, с обзиром да постоје назнаке да би експресија *WT1* у коштаном сржи при дијагнози могла да буде прогностички чинилац и код дечје АЛЛ (Hagag и сар., 2016).

Нажалост, у нашем истраживању осетљивост детекције протеина *WT1* проточном цитометријом није била задовољавајућа, будући да је код неких пацијената са високом експресијом гена детекција одговарајућег протеина проточном цитометријом изостала. Поред техничких чинилаца (недовољно продирање обележеног антитела у пермеабелизоване ћелије, проблеми при везивању антиген-антитело, однос сигнала и шума, тј. аутофлуоресценце), узрок би се могао тражити и у чињеници да би неке од мутираних форми *WT1* могле да буду лишене епитопа за који се пробно антитело специфично везује. Разуме се, у одсуству могућности да испитамо постојање таквих мутација, ово потенцијално објашњење, за сада, остаје предмет спекулације. Ипак, наши резултати, у најмању руку, сугеришу да проточна цитометрија није оптималан метод за дијагностичко испитивање експресије *WT1* на нивоу протеина, те би можда било сврсисходније да се у будућим истраживањима то покуша на неки други начин, као што је техника *western blot*.

Иако у литератури, у границама нашег знања, нема података о истраживањима у којима би експресија *WT1* била испитивана проточном цитометријом, занимљиву аналогију представља покушај групе индијских аутора да квантификацијом експресије *FLT3* на нивоу протеинског продукта дођу до информације која је, поред потенцијалног прогностичког значаја, кадра и да понуди рационалну основу за лечење инхибиторима *FLT3* код пацијената са повећаном експресијом – покушај који је, за разлику од нашег, у извесној мери уродио плодом ([Vora и сар., 2010](#)).

У нашем истраживању, висок ниво експресије гена *WT1* при првој контролној пункцији (месец дана по постављању дијагнозе) код деце са АЛЛ био чешће повезан са лошим исходом, али без статистичке значајности. Висока експресија *WT1* при првој контроли највила је релапс код пацијената број 6 и 11; међутим, код пацијената број 12 и 18, који су такође имали високу експресију *WT1* при првој контролној пункцији, релапс није наступио током периода праћења. Могућност да се експресија *WT1* у коштаног сржи користи као маркер МРБ опсежно је испитивана ([Miyamura и сар., 2004](#); [Lapillonne и сар., 2006](#)). Чине се и покушаји да се развије стандардизовани протокол у том смислу ([Cilloni и сар., 2009](#)). Наше истраживање није имало довољну статистичку моћ да потврди или оповргне хипотезу да је праћење нивоа експресије *WT1* користан биомаркер МРБ у испитиваној популацији деце са АМЛ. У целини, наши резултати су у сагласности са студијама које су наговестиле да би испитивање експресије *WT1* могло да буде од користи као стратегија за испитивање МРБ код дечје АМЛ ([Willasch и сар., 2009](#); [Zhang и сар., 2015](#)). Објављено је и да је ниво експресије *WT1* пре ТМЋХ независни предиктивни чинилац ризика наступања релапса након ТМЋХ ([Woehlecke и сар., 2015a](#)), а испитивањем експресије *WT1* након ТМЋХ могуће је детектовати настанак релапса пре него што се јаве морфолошки уочљиве малигне ћелије ([Woehlecke и сар., 2015b](#)). И за дечју АЛЛ постоје наговештаји да би *WT1*, у неким случајевима, могао да буде маркер МРБ ([Boublikova и сар., 2006](#)).

Занимљиво је приметити да је двоје пацијената (бр. 16 и 19) имало нешто вишу експресију *WT1* при првој контролној аспирацији коштане сржи (након ~ месец дана) него при постављању дијагнозе, без за сада уочљивог ефекта на ток

болести. Ово би могло да се објасни разликама у временском интервалу који је потребан да би се постигла пуна молекуларна ремисија. Такође је занимљиво да је пацијенткиња број 18, адолесценткиња која је подвргнута ТМТХ зато што је при каснијем, екстензивнијем генетичком испитивању спроведеном у другој здравственој установи нађен редак генски реаранжман *MOZ/CBB* који повлачи висок ризик, имала при презентацији ниво експресије *WT1* близак нули. Тај налаз је у сагласности са студијама које су показале да, поред високе експресије, и изразито ниска експресија *WT1* може да буде предиктор високог ризика (Hecht и cap., 2015). У ширем контексту, тај налаз потврђује да није безбедно поистовећивати низак ниво експресије *WT1* са повољном прогнозом код деце са АМЛ, утолико пре што специфичне генетичке аберације, укључујући и ретке, које нису део рутинске дијагностичке обраде, могу да независно означе висок ризик.

Још један чинилац који би свакако могао да доведе до усложњавања анализе односа између нивоа експресије *WT1* и прогнозе исхода болести јесте диференцијална експресија изоформи *WT1*. Будући да су прајмери коришћени у нашем истраживању дизајнирани да подједнако ефикасно амплификују све изоформе *WT1*, разлике у диференцијалној заступљености четири изоформе могле би да замагле слику коју нам приказује укупан ниво експресије, будући да је показано да различите изоформе *WT1* имају различите физиолошке ефекте и потенцијално различиту улогу у неопластичном процесу (Luna и cap., 2013). Нажалост, у нашем истраживању није постојала ни могућност испитивања постојања полиморфизма rs16754 у гену *WT1*. За овај полиморфизам је показано да је удружен са повољном прогнозом код деце са АЛЛ (Junghanns и cap., 2015), али потенцијални прогностички значај постоји и код АМЛ (Luo и cap., 2014; Long и cap., 2016). Штавише, чини се да присуство полиморфизма rs16754 значајно утиче на прогностички ефекат високе експресије *WT1* (Ho и cap., 2014), те би у будућим истраживањима и потенцијалној примени испитивања експресије *WT1* у дијагностичкој обради деце са АМЛ било упутно рутински утврђивати и да ли постоји полиморфизам rs16754.

На сличан начин, могуће је да различите мутације у молекулу *WT1* модификују прогностички значај нивоа експресије *WT1*, будући да је разумно очекивати да би биолошки ефекти мутираних форми могли значајно да се

разликују од „вајлдтајп“ *WT1*. Овде, међутим, анализа садржи додатни аспект сложености стога што су мутације *WT1* вероватно чешће секундарни него примарни догађаји у развоју АМЛ ([Krauth et al., 2015](#)). Узастопно испитивање ових мутација је свакако важан део праћења клонске еволуције леукемије, заједно са испитивањем мутација у другим генима за које се зна да играју важне улоге у леукемогенези, као што су *FLT3*, *NPM1* и *CEBPA*. Такође се морају узети у обзир епистатички ефекти између ових (и других) гена, што намеће потребу за изградњом јединственог биоинформатичког модела еволуције леукемијског процеса. Такав модел би, на основу редовно уношених података при контролним аспирацијама коштане сржи, могао да оствари предиктивни потенцијал који је далеко изнад данашњих алгоритама за стратификацију пацијената по групама ризика. У том смислу, увелико се говори о геномском профилу и „мутационом пејсажу“ леукемије ([Farrar и сар., 2016](#)).

У циљу остваривања пуног потенцијала испитивања експресије *WT1* као маркера МРБ код деце са АМЛ, било би такође упутно идентификовати потенцијалне субпопулације пацијената, разграничене на основу одређених биолошких својстава леукемијских ћелија, код којих је предиктивна вредност експресије *WT1* већа него код осталих пацијената. Већ су предузети неки кораци у том правцу ([Park и сар., 2015](#); [Steinbach и сар., 2015](#)). Такође је могуће да би дефинисање одговарајуће граничне вредности нивоа експресије *WT1* као критеријума за повећану експресију било од веће помоћи него континуирана скала интензитета експресије *WT1* ([Ujj и сар., 2016](#)).

6. Закључци

1. Експресија гена *WT1* у коштаном сржи при дијагнози код пацијената са АМЛ у Србији је статистички значајно виша него код пацијената са АЛЛ и контролне групе (пацијенти са ИТП).

2. Експресија гена *WT1* у коштаном сржи при дијагнози код пацијената са Т-АЛЛ је виша него код оних са Б-АЛЛ и контролне групе (пацијенти са ИТП), али статистичка значајност није досегнута услед малобројности подгрупе.

3. Експресија гена *WT1* у коштаном сржи при дијагнози код пацијената са Б-АЛЛ није статистички значајно различита у односу на контролну групу (ИТП), с тим што појединачни пацијенти показују велика одступања.

4. Експресија гена *WT1* у коштаном сржи при дијагнози код пацијената са АМЛ која припада ФАБ типовима М3 и М5 показује тенденцију ка вишим вредностима, али без досезања статистичке значајности.

5. Висока експресија гена *WT1* у коштаном сржи при дијагнози код пацијената са АМЛ показује тенденцију ка удружености са неповољним исходом, али статистичка значајност није досегнута.

6. Висока експресија *WT1* (унутар четвртог квантила) у коштаном сржи при контролним аспирацијама била је удружена са неповољним исходом код троје од петоро пацијената, док је експресија *WT1* у прва три квантила била удружена са повољним исходом код 10 од 10 пацијената; међутим, ова разлика није статистички значајна.

7. Експресија протеина *WT1* мерена проточном цитометријом не показује добру корелацију са експресијом гена *WT1* ни у једној групи пацијената.

Свеукупно, резултати овог истраживања поткрепљују закључак да би испитивање нивоа експресије гена *WT1* могло да буде корисна допуна постојећим протоколима за дијагностику дечје АМЛ, Т-ћелијске АЛЛ, као и одређене подгрупе пацијената са Б-ћелијском АЛЛ. Наши резултати такође наглашавају значај тумачења података о експресији *WT1* у складу са сложеним и индивидуализованим контекстом.

7. Литература

Adams J, Nassiri M. Acute promyelocytic leukemia: A review and discussion of variant translocations. *Arch Pathol Lab Med* 2015; 139(10):1308-13.

Anuchapreeda S, Limtrakul P, Thannarattanakorn P, Sittipreechacharn S, Chanarat P. Inhibitory effect of curcumin on WT1 gene expression in patient leukemic cells. *Arch Pharm Res* 2006; 29(1):80-7.

Ariyaratana S, Loeb DM. The role of the Wilms tumour gene (WT1) in normal and malignant hematopoiesis. *Expert Rev Mol Med* 2007; 9:1-17.

Armstrong SA, Look AT. Molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 2005; 23:6306-15.

Bailey HD, Infante-Rivard C, Metayer C, Clavel J, Lightfoot T, Kaatsch P, Roman E, Magnani C, Spector LG, Th Petridou E, Milne E, Dockerty JD, Miligi L, Armstrong BK, Rudant J, Fritschi L, Simpson J, Zhang L, Rondelli R, Baka M, Orsi L, Moschovi M, Kang AY, Schüz J. Home pesticide exposure and risk of childhood leukemia: Finding from the childhood leukemia international consortium. *Int J Cancer* 2015; 137(11):2644-63.

Balgobind BV, Hollink IH, Arentsen-Peters ST, Zimmermann M, Harbott J, Beverloo HB, von Bergh AR, Cloos J, Kaspers GJ, de Haas V, Zemanova Z, Stary J, Cayuela JM, Baruchel A, Creutzig U, Reinhardt D, Pieters R, Zwaan CM, van den Heuvel-Eibrink MM. Integrative analysis of type-I and type-II aberrations underscores the genetic heterogeneity of pediatric acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2011; 96(10):1478-87.

Barragan E, Cervera J, Bolufer P, Ballester S, Martin G, Fernández P, Collado R, Sayas MJ, Sanz MA. Prognostic implications of Wilms' tumor gene (WT1) expression in patients with de novo acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2004; 89:926-33.

Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med* 1985; 103(4):620-5.

Bergmann L, Maurer U, Weidmann E. Wilms tumor gene expression in acute myeloid leukemias. *Leuk Lymphoma* 1997; 25:435–443.

Bernt KM, Armstrong SA. Leukemia stem cells and human acute lymphoblastic leukemia. *Semin Hematol* 2009; 46(1):33-8.

Boublikova L, Kalinova M, Ryan J, Quinn F, O’Marcaigh A, Smith O, Browne P, Stary J, McCann SR, Trka J, Lawler M. Wilms’ tumor gene 1 (WT1) expression in childhood lymphoblastic leukemia: a wide range of WT1 expression levels, its impact on prognosis and minimal residual disease monitoring. *Leukemia* 2006; 20(2):254-63.

Braoudaki M, Tzortzatou-Stathopoulou F. Clinical cytogenetics in pediatric acute leukemia: an update. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2012; 12(4):230-7.

Brisson GD, Alves LR, Pombo-de-Oliveira MS. Genetic susceptibility in childhood acute leukemias: a systematic review. *Ecancermedicalscience* 2015; 9:539.

Brown P, McIntyre E, Rau R, Meshinchi S, Lacayo N, Dahl G, Alonzo TA, Chang M, Arceci RJ, Small D. The incidence and clinical significance of nucleophosmin mutations in childhood AML. *Blood* 2007; 110(3):979-85.

Buga Corbu V, Glück A, Arion C. Actual biological diagnosis of acute myeloblastic leukemia in children. *J Med Life* 2014; 7(2):291-5.

Chojnowski K, Wawrzyniak E, Trelński J, Niewiarowska J, Cierniewski C. Assessment of coagulation disorders in patients with acute leukemia before and after cytostatic treatment. *Leuk Lymphoma* 1999; 36(1-2):77-84.

Cilloni D, Renneville A, Hermitte F, Hills RK, Daly S, Jovanovic JV, Gottardi E, Fava M, Schnittger S, Weiss T, Izzo B, Nomdedeu J, van der Heijden A, van der Reijden BA, Jansen JK, van der Velden VH, Ommen H, Preudhomme C, Saglio G, Grimwade D. Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction Detection of Minimal Residual Disease by Standardized WT1 Assay to Enhance Risk Stratification in Acute Myeloid Leukemia: A European LeukemiaNet Study. *J Clin Oncol* 2009; 27: 5195–5201.

Coşkunpinar E, Anak S, Ağaoğlu L, Unüvar A, Devecioğlu O, Avdoğan G, Timur C, Oner AF, Yildirimak Y, Celkan T, Yildiz I, Sarper N, Ozbek U. Analysis of chromosomal aberrations and FLT3 gene mutations in childhood acute myelogenous leukemia patients. *Turk J Haematol* 2012; 29(3):225-35.

Creutzig U, Zimmermann M, Borquin JP, Dworzak MN, Fleischhack G, Graf N, Klingebiel T, Kremens B, Lehrnbecher T, von Neuhoff C, Ritter J, Sander A, Schrauder A, von Stackelberg A, Stary J, Reinhardt D. Randomized trial comparing liposomal daunorubicin with idarubicin as induction for pediatric acute myeloid leukemia: results from study AML-BFM 2004.

Davies PC, Lineweaver CH. Cancer tumors as Metazoa 1.0: tapping genes of ancient ancestors. *Phys Biol* 2011; 8(1):015001.

Deschler B, Lübbert M. Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology. *Cancer* 2006; 107(9):2099-107.

Dorak MT, Lawson T, Machulla HK, Darke C, Mills KI, Burnett AK. Unravelling and HLA-DR association in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1999; 94(2):694-700.

Farrar JE, Schuback HL, Ries RE, Wai D, Hampton OA, Trevino LR, Alonzo TA, Guidry Auvil JM, Davidsen TM, Gesuwan P, Hermida L, Muzny DM, Dewal N, Rustagi N, Lewis LR, Gamis AS, Wheeler DA, Smith MA, Gerhard DS, Meshinchi S.

Genomic profiling of acute myeloid leukemia reveals a changing mutational landscape from disease diagnosis to relapse. *Cancer Res* 2016; pii: canres.1015.2015. (in press).

Fasan A, Haferlach C, Alpermann T, Jeromin S, Grossmann V, Eder C, Weissmann S, Dicker F, Kohlmann A, Schindela S, Kern W, Haferlach T, Schnittger S. The role of different genetic subtypes of CEBPA mutated AML. *Leukemia* 2014; 28(4):794-803.

Ford AM, Bennett CA, Price CM, Bruin MC, Van Wering ER, Greaves M. Fetal origins of the TEL-AML1 fusion gene in identical twins with leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95(8):4584-8.

Gaipa G, Basso G, Biondi A, Campana D. Detection of minimal residual disease in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Cytometry B Clin Cytom* 2013; 84(6):359-69.

Garg M, Moore H, Tobal K, Liu Jin JA. Prognostic significance of quantitative analysis of WT1 gene transcripts by competitive reverse transcription polymerase chain reaction in acute leukaemia. *Br J Haematol* 2003; 123:49-59.

Glumac I, Kostić J, Stanić B, Pejanović N, Lučić B, Karan Djurasević T, Janić D, Dokmanović L, Janković S, Suvajdzic Vuković N, Tomin D, Popović M, Bogičević I, Pavlović S, Tošić N. Targeted Next Generation Sequencing (NGS) in parallel analyses of childhood (cAML) and adult acute myeloid leukemia (aAML) patients. European Hematology Association 20th Congress, Vienna, 2015; 99789.

Greaves M. Darwin and evolutionary tales in leukemia. The Ham-Wasserman lecture. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2009; 3-12.

Greenop KR, Bailey HD, Miller M, Scott RJ, Attia J, Ashton LJ, Downie P, Armstrong BK, Milne E. Breastfeeding and nutrition to 2 years of age and risk of childhood acute lymphoblastic leukemia and brain tumors. *Nutr Cancer* 2015; 67(3):431-41.

Hagag AA, Badraia IM, Hassan SM, Abd-el Lateef AE. Prognostic impact of WT-1 gene expression in Egyptian children with acute lymphoblastic leukemia. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2016; 8(1):e2016008.

Harrison CJ. The detection and significance of chromosomal abnormalities in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood Rev* 2001; 15(1):49-59.

Hart SM, Foroni J. Core binding factor genes and human leukemia. *Haematologica* 2002; 87(12):1307-23.

Hecht A, Nolte F, Nowak D, Nowak V, Reinwald M, Hanfstein B, Faldum A, Büchner T, Spiekermann K, Sauerland C, Weiss C, Hofmann WK, Lengfelder E. Prognostic importance of the expression of the Wilms' tumor 1 gene in newly diagnosed acute promyelocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2015; 56(8): 2289-95.

Ho PA, Alonzo TA, Gerbing RB, Kuhn J, Pollard JA, Hirsch B, Raimondi SC, Gamis AS, Meshinchi S. The prognostic effect of high diagnostic WT1 gene expression in pediatric AML depends on WT1 SNP rs16754 status; report from the Children's Oncology Group. *Pediatr Blood Cancer* 2014; 61(1): 81-8.

Hsiao HH, Liu YC, Wang HC, Tsai YF, Wu CH, Cho SF, Hsu JF, Huang CT, Hsiao SY, Lee CP, Chang CS, Lin SF, Liu TC. Additional chromosomal abnormalities in core-binding factor acute myeloid leukemia. *Genet Mol Res* 2015; 14(4): 17028-33.

Hunger SP, Mullighan CG. Redefining ALL classification: toward detecting high-risk ALL and implementing precision medicine. *Blood* 2015; 125(26):3977-87.

Infante-Rivard C, Labuda D, Krajinovic M, Sinnott D. Risk of childhood leukemia associated with exposure to pesticides and to gene polymorphisms. *Epidemiology* 1999; 10(5):481-7.

Ivanovic Z, Vlaski-Lafarge M. Anaerobiosis and stemness: An evolutionary paradigm for therapeutic applications. 1st edition. Academic Press, 2015.

Janić D. Akutna limfoblastna leukemija. U: Marisavljević D, Mihaljević B, Elezović I, Popović S, Suvajdžić-Vuković N, Vujić D, Janić D, Milenković P, Mostarica M, Bogdanović G (Urednici). Klinička hematologija. Zavod za udžbenike, Beograd 2012.

Junghanns AS, Wittig S, Woehlecke S, Lehman T, Arndt C, Gruhn B. Wilms tumor gene single nucleotide polymorphism rs16754 predicts a favorable outcome in children with acute lymphoblastic leukemia. *J Cancer Res Clin Oncol* 2015; 141(12):2221-8.

Karabacak BH, Erbey F, Bayram I, Yilmaz S, Acipayam C, Kiliç Y, Tanyeli A. Fms-like tyrosine kinase 3 mutations in childhood acute leukemias and their association with prognosis. *Asian Pac J Cancer Prev* 2010; 11(4):923-7.

Kobayashi R, Tawa A, Hanada R, Horibe K, Tsuchida M, Tsukimoto I; Japanese Childhood AML Cooperative Study Group. Extramedullary infiltration at diagnosis and prognosis in children with acute myelogenous leukemia. *Pediatr Blood Cancer* 2007; 48(4):393-8.

Kömür M, Erbey F, Bayram I, Tanyeli A. Incidence and prognostic importance of molecular genetic defects in children with acute myeloblastic leukemia. *Asian Pac J Cancer Prev* 2010; 11(5):1393-5.

Krauth MT, Alpermann T, Bacher U, Eder C, Dicker F, Ulke M, Kuznia S, Nadarajah N, Kern W, Haferlach S, Haferlach T, Schnittger S WT1 mutations are secondary events in AML, show varying frequencies and impact on prognosis between genetic subgroups. *Leukemia* 2015; 29:660-7.

Krstic AD, Micic D, Lakic N, Guc-Scekic M, Janic D. Molecular diagnosis of childhood acute leukemia: Serbian experience. *Pediatr Blood Cancer* 2010; 55(2):394-5.

Krstovski N. Akutna mijeloidna leukemija kod dece. U: Marisavljević D, Mihaljević B, Elezović I, Popović S, Suvajdžić-Vuković N, Vujić D, Janić D, Milenković P, Mostarica M, Bogdanović G (Urednici). Klinička hematologija. Zavod za udžbenike, Beograd 2012.

Krstovski N, Tosic N, Janic D, Dokmanovic L, Kuzmanovic M, Spasovski V, Pavlovic S. Incidence of FLT3 and nucleophosmin gene mutations in childhood acute myeloid leukemia: Serbian experience and the review of the literature. *Med Oncol* 2010; 27(3):640-5.

Kutny MA, Moser BK, Laumann K, Feusner JH, Gamis A, Gregory J, Larson RA, Powell BL, Stock W, Willman CL, Woods WG, Meshinchi S. FLT3 mutation status is a predictor of early death in pediatric acute promyelocytic leukemia: a report from the Children's Oncology Group. *Pediatr Blood Cancer* 2012; 59(4):662-7.

Lanningham FH, Kun LE, Reddick WE, Ogg RJ, Morris EB, Pui CH. Childhood central nervous system leukemia: historical perspectives, current therapy, and acute neurological sequelae. *Neuroradiology* 2007; 49(11):873-86.

Lapillone H, Renneville A, Auvrignon A, Flamant C, Blaise A, Perot C, Lai JL, Ballerini P, Mazingue F, Fasola S, Dehée A, Bellman F, Adam M, Labopin M, Douay L, Leverger G, Preudhomme C, Landman-Parker J. High WT1 expression after induction therapy predicts high risk of relapse and death in pediatric acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2006; 24(10): 1507-15.

Lavallée VP, Baccelli I, Kros J, Wilhelm B, Barabé F, Gendron P, Boucher G, Lemieux S, Marinier A, Meloche S, Hébert J, Sauvageau G. The transcriptomic landscape and directed chemical interrogation of MLL-rearranged acute myeloid leukemias. *Nat Genet* 2015; 47(9):1030-7.

Lazic J, Tosic N, Dokmanovic L, Krstovski N, Rodic P, Pavlovic S, Janic D. Clinical features of the most common fusion genes in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Med Oncol* 2010; 27(2):449-53.

Law GR, Parslow RC, Roman E; United Kingdom Childhood Cancer Study Investigators. *Am J Epidemiol* 2003; 158(4):328-36.

Lee HJ, Kim DH, Lee S, Koh MS, Kim SY, Lee JH, Lee S, Oh SY, Han JY, Kim HJ, Kim SH. Analysis of factors affecting hemorrhagic diathesis and overall survival in patients with acute promyelocytic leukemia. *Korean J Intern Med* 2015; 30(6):884-90.

Leoni V, Biondi A. Tyrosine kinase inhibitors in BCR-ABL positive acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2015; 100(3):295-9.

Li Y, Wang H, Wang X, Jin W, Tan Y, Fang H, Chen S, Chen Z, Wang K. Genome-wide studies indentify a novel interplay between AML1 and AML1/ETO in t(8;21) acute myeloid leukemia. *Blood* 2016; 127(2):233-42.

Li Y, Han J, Zhang Y, Cao F, Liu Z, Li S, Wu J, Hu C, Wang Y, Shuai J, Chen J, Cao L, Li D, Shi P, Tian C, Zhang J, Dou Y, Li G, Chen Y, Lei M. Structural basis for activity regulation of MLL family methyltransferases. *Nature* 2016; 530(7591):447-52.

Liang DC, Shih LY, Hung IJ, Yang CP, Chen SH, Jaing TH, Liu HC, Wang LY, Chang WH. FLT3-TKD mutation in childhood acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2003; 17(5):883-6.

Long J, Fang S, Dai Q, Liu X, Zhu W, Wang S. The Wilms tumor-1 (WT1) polymorphism is a prognostic factor in acute myeloid leukemia (AML): a meta-analysis. *Oncotarget* 2016; doi: 10.18632/oncotarget.8117. (in press).

Luna I, Such E, Cervera H, Barragán E, Ibañez M, Gómez-Seguí I, López-Pavía M, Llop M, Fuster O, Dolz S, Oltra S, Alonso C, Vera B, Lorenzo I, Martínez-Quadrón D,

Montesinos P, Senent ML, Moscardó F, Bolufer P, Sanz MA. WT1 isoform expression pattern in acute myeloid leukemia. *Leukemia Res* 2013; 37: 1744-49.

Luo S, Yu K, Yan QX, Shen ZJ, Wu JB, Chen HM, Gao SM. Analysis of WT1 mutations, expression levels and single nucleotide polymorphism rs16754 in de novo non-M3 acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* 2014; 55(2): 349-57.

Lyu X, Xin Y, Mi R, Ding J, Wang X, Hu J, Fan R, Wei X, Song Y, Zhao RY. Overexpression of Wilms tumor 1 gene as a negative prognostic indicator in acute myeloid leukemia. *PLOS One* 2014; 9(3):e92470

Manola KN, Panitsas F, Polychondropoulou S, Daraki A, Karakosta M, Stavropoulou C, Avgerinou G, Hatzipantelis E, Pantelias G, Sambani C, Pagoni M. Cytogenetic abnormalities and monosomal karyotypes in children and adolescents with acute myeloid leukemia: correlations with clinical characteristics and outcome. *Cancer Genet* 2013; 206(3):63-72.

Marshalek R. Systematic classification of mixed-lineage leukemia fusion partners predicts additional cancer pathways. *Ann Lab Med* 2016; 36(2):85-100.

McHale CM, Smith MT. Prenatal origin of chromosomal translocations in acute childhood leukemia: implications and future directions. *Am J Hematol* 2004; 75(4):254-7.

McNally RJ, Eden TO. An infectious aetiology for childhood acute leukaemia: a review of the evidence. *Br J Haematol* 2004; 127(3):243-63.

Metayer C, Zhang L, Wiemels JL, Bartley K, Schiffman J, Ma X, Aldrich MC, Chang JS, Selvin S, Fu CH, Ducore J, Smith MT, Buffer PA. Tobacco smoke exposure and the risk of childhood acute lymphoblastic and myeloid leukemias by cytogenetic subtype. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2013; 22(9):1600-11.

Mercher T, Busson-Le Coniat M, Nguyen Khac F, Ballerini P, Mauchauffé M, Bui H, Pellegrino B, Radford I, Valensi F, Mugneret F, Dastugue N, Bernard OA, Berger R. Recurrence of OTT-MAL fusion in t(1;22) of infant AML-M7.

Miglino M, Colombo N, Pica G, Grasso R, Clavio M, Bergamaschi M, Ballerini F, Ghiso A, Ghiggi C, Mitscheunig L, Beltrami G, Cagnetta A, Vignolo L, Luccheti MV, Aguiño S, Pierri I, Sessarego M, Carella AM, Gobbi M. WT1 overexpression at diagnosis may predict favorable outcome in patients with de novo-M3 acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* 2011; 52(10):1961-9.

Mir Mazloumi SH, Appaji L, Madhumathi DS, Prasannakumari. G-banding and fluorescence in situ hybridization in childhood acute myeloid leukemia from South India. *Arch Iran Med* 2013; 16(8):459-62.

Miyamura T, Sakata N, Okamura T, Yasui M, Inoue M, Yagi K, Sako M, Komada Y, Matsuyama T, Oda M, Park YT, Kawa K. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute myeloid leukemia. *Int J Hematol* 2004; 79(3): 243-9.

Mizushima Y, Taki T, Shimada A, Yui Y, Hiraumi Y, Matsubara H, Watanabe M, Watanabe K, Kamitsuji Y, Hayashi Y, Tsukimoto I, Kobayashi R, Horibe K, Tawa A, Nakahata T, Adachi S. Prognostic significance of the BAALC isoform pattern and CEBPA mutations in pediatric acute myeloid leukemia with normal karyotype: a study by the Japanese Childhood AML Cooperative Study Group. *Int J Hematol* 2010; 91(5):831-7.

Moorman AV, Ensor HM, Richards SM, Chilton L, Schwab C, Kinsey SE, Vora A, Mitchell CD, Harrison CJ. Prognostic effect of chromosomal abnormalities in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: results from the UK Medical Research Council ALL97/99 randomised trial. *Lancet Oncol* 2010; 11(5):429-38.

Mullighan CG. Molecular genetics of B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Invest* 2012; 122(10):3407-15.

Noronha SA, Farrar JE, Alonzo TA, Gerbing RB, Lacayo NJ, Dahl GV, Ravindranathy, Arceci RJ, Loeb DM. WT1 expression at diagnosis does not predict survival in pediatric AML: a report from the Children's Oncology Group. *Pediatr Blood Cancer* 2009; 53:1136-9.

Nucifora G, Rowley JD. The AML1 and ETO genes in acute myeloid leukemia with a t(8;21). *Leuk Lymphoma* 1994; 14(5-6):353-62.

Oghami RS, Ma L, Merker JD, Gotlib JR, Schrijver I, Zehnder JL, Arber DA. Next-generation sequencing of acute myeloid leukemia identifies the significance of TP53, U2AF1, ASXL1, and TET2 mutations. *Mod Pathol* 2015; 28(5):706-14.

Ohanian M, Faderl S, Ravandi F, Pemmaraju N, Garcia-Manero G, Cortes J, Estrov Z. Is acute myeloid leukemia a liquid tumor? *Int J Cancer* 2013; 133(3):534-43.

Park SH, Lee HJ, Kim IS, Kang JE, Lee EY, Kim HJ, Kim YK, Won JH, Bang SM, Kim H, Song MK, Chung JS, Shin HJ. Incidences and prognostic impact of c-KIT, WT1, CEBPA and CBL mutations, and mutations associated with epigenetic modification in core binding factor acute myeloid leukemia: a multicenter study in a Korean population. *Ann Lab Med* 2015; 35:288-97.

Pui CH. Acute lymphoblastic leukemia. U: Lichtman MA, Beutler E, Kipps TJ (Urednici). *Williams Hematology*. 7th edition. McGraw-Hill Medical 2006; p. 1321-42.
Pui CH. *Childhood leukemias*. 3rd edition. Cambridge University Press, Cambridge, 2012.

Radhi M, Fulbright JM, Ginn KF, Guest EM. Childhood cancer for the primary care physician. *Prim Care* 2015; 42(1):43-55.

Ratei R, Schabath R, Karawajew L, Zimmermann M, Schrappe M, Ludwig WD. Lineage classification of childhood acute lymphoblastic leukemia according to the

EGIL recommendations: results of the ALL-BFM 2000 trial. *Klin Pediatr* 2013; 225 Suppl1:S34-9.

Reilly JT. Pathogenesis of acute myeloid leukemia and inv(16)(p13;q22): a paradigm for understanding leukaemogenesis? *Br J Haematol* 2005; 128(1):18-34.

Rodrigues PC, Oliveira SN, Viana MB, Matsuda EI, Nowill AE, Brandalise SR, Yunes JA. Prognostic significance of WT1 gene expression in pediatric acute myeloid leukemia. *Pediatr Blood Cancer* 2007; 49(2):133-8.

Rogers PB, Plowman PN, Harris SJ, Arlett CF. Four radiation hypersensitivity cases and their implications for clinical radiotherapy. *Radiother Oncol* 2000; 57(2):143-54.

Ross ME, Mahfouz R, Onciu M, Liu HC, Zhou X, Song G, Shurtlef SA, Pounds S, Cheng C, Ma J, Ribeiro RC, Rubnitz JE, Girtman K, Williams WK, Raimondi SC, Liang DC, Shih LY, Pui CH, Downing JR. Gene expression profiling of pediatric acute myelogenous leukemia. *Blood* 2004; 104(12):3679-87.

Rubnitz JE, Wichlan D, Devidas M, Shuster J, Linda SB, Kurtzberg J, Bell B, Hunger SP, Chauvenet A, Pui CH, Camitta B, Pullen J; Children's Oncology Group. Prospective analysis of TEL gene rearrangements in childhood acute lymphoblastic leukemia: a Children Oncology Group Study. *J Clin Oncol* 2008; 26(13):2186-91.

Rubnitz JE, Gibson B, Smith FO. Acute myeloid leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am* 2010; 24(1):35-63.

Rubnitz JE, Inaba H. Childhood acute myeloid leukemia. *Br J Haematol* 2012; 159(3):259-76.

Sanz MA, Montesinos P, Rayón C, Holowiecka A, de la Serna J, Milone G, de Lisa E, Brunet S, Rubio V, Ribera JM, Rivas C, Krsnik I, Bergua J, González J, Diaz-

Mediavilla J, Rojas R, Manso F, Ossenkoppele G, González JD, Lowenberg B; PETHEMA and HOVON groups. *Blood* 2010; 115(25):5137-46.

Sawada A, Inoue M, Kondo O, Yamada-Nakata K, Ishihara T, Kuwae Y, Nishikawa M, Ammori Y, Tsuboi A, Oji A, Koyama-Sato M, Oka Y, Yasui M, Sugiyama H, Kawa K. Feasibility of cancer immunotherapy with WT1 peptide vaccination for solid and hematological malignancies in children. *Pediatr Blood Cancer* 2016; 63(2):234-41.

Shenoy S, Smith FO. Hematopoietic stem cell transplantation for childhood malignancies of myeloid origin. *Bone Marrow Transplant* 2008; 41(2):141-8.

Shimada A, Taki T, Koga D, Tabuchi K, Tawa A, Hanada R, Tsuchida M, Horibe K, Tsukimoto I, Adachi S, Kojima S, Hayashi Y. High WT1 mRNA expression after induction chemotherapy and *FLT3*-ITD have prognostic impact in pediatric acute myeloid leukemia: a study of the Japanese Childhood AML Cooperative Study Group. *Int J Hematol* 2012; 96(4):469-76.

Sorensen PH, Chen CS, Smith FO, Arthur DS, Domer PH, Bernstein ID, Korsmeyer SJ, Hammond GD, Kersey JH. Molecular rearrangements of the MLL gene are present in most cases of infant acute myeloid leukemia and are strongly correlated with monocytic or myelomonocytic phenotypes. *J Clin Invest* 1994; 93(1):429-37.

Steinbach D, Bader P, Willasch A, Bartholomae S, Debatin KM, Zimmerman M, Creutzig U, Reinhardt D, Gruhn B. Prospective validation of a new method of monitoring minimal residual disease in childhood acute myelogenous leukemia. *Clin Cancer Res* 2015; 15: 21(6).

Sugiyama H. Wilms' tumor gene WT1. Its oncogenic function and clinical application. *Int J Hematol* 2001; 73:177-87.

Sugiyama H. WT1 (Wilms' tumor gene 1): biology and cancer immunotherapy. *Jpn J Clin Oncol* 2010; 40(5):377-87.

Slany RK. The molecular mechanics of mixed-lineage leukemia. *Oncogene* 2016; doi: 10.1038/onc.2016.30.

Tackenchangbam DS, Laishram RS, Thoudem TS, Sunita A, Imchen LT. Proptosis and facial palsy as an unusual clinical presentation of acute myeloid leukemia. *Iran J Cancer Prev* 2013; 6(1):52-4.

Tang Y, Wang Y, Hu L, Meng F, Xu D, Wan K, Huang L, Li C, Zhou J. Acute promyelocytic leukemia with cryptic t(15;17) on isochromosome 17: a case report and review of literature. *Int J Clin Exp Pathol* 2015; 8(11):15294-300.

Teuffel O, Betts DR, Dettling M, Schaub R, Schäfer BW, Niggli FK. Prenatal origin of separate evolution of leukemia in identical twins. *Leukemia* 2004; 18(10):1624-9.

Trka J, Kalinová M, Hrusák O, Zuna J, Krejčí O, Madzo J, Sedláček P, Vávra V, Michalová K, Jarosová M, Starý J; For Czech Paediatric Haematology Working Group. Real-time quantitative PCR detection of WT1 gene expression in children with AML: prognostic significance, correlation with disease status and residual disease detection by flow cytometry. *Leukemia* 2002; 16(7):1381-9.

Ujj Z, Buglyó G, Udvardy M, Beyer D, Vargha G, Biró S, Rejtő L. WT1 expression in adult acute myeloid leukemia: assessing its presence, magnitude, and temporal changes as prognostic factors. *Pathol Oncol Res* 2016; 22(1):217-21.

Urayama KY, Ma X, Selvin S, Metayer C, Chokkalingam AP, Wiemels JL, Does M, Chang J, Wong A, Trachtenberg E, Buffler PA. *Int J Cancer* 2011; 128(7):1632-43.

Valind A, Pal N, Asmundsson J, Gisselsson D, Holmquist Mengelbier L. Confined trisomy 8 mosaicism of meiotic origin: a rare cause of aneuploidy in childhood cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 2014; 53(7):634-8.

van Dongen JJ, van der Velden JH, Brüggemann M, Orfao A. Minimal residual disease diagnostics in acute lymphoblastic leukemia: need for sensitive, fast, and standardized technologies. *Blood* 2015; 125(26):3996-4009.

Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, Harris NL, Le Beau MM, Hellström-Lindberg E, Tefferi A, Bloomfield CD. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 2009; 114(5):937-51.

Vora HH, Shukla SN, Brahabhatt BV, Mehta SH, Patel NA, Parikh SK, Shah KN, Shah PM. Clinical relevance of FLT3 receptor protein expression in Indian patients with acute leukemia. *Asia Pac J Clin Oncol* 2010; 6(4):306-19.

Wei MC, Dahl GV, Weinstein HJ. Acute myeloid leukemia in children. U: Hoffman R (urednik). Hematology: Basic principles and practice. 5th ed. Philadelphia (USA): Churchill Livingstone, an imprint of Elsevier Inc; 2008; Ch. 62.

Wen XM, Lin J, Yang J, Yao DM, Deng ZQ, Tang CY, Xiao GF, Yang L, Ma JC, Hu JB, Quian W, Quian J. Double CEBPA mutations are prognostically favorable in non-M3 acute myeloid leukemia patients with wild-type NPM1 and FLT3-ITD. *Int J Clin Exp Pathol* 2014; 7(10):6832-40.

Wiemels JL, Ford AM, Van Wering ER, Postma A, Greaves M. Protracted and variable latency of acute lymphoblastic leukemia after TEL-AML1 gene fusion in utero. *Blood* 1999; 94(3):1057-62.

Willasch AM, Gruhn B, Coliva T, Kalinova M, Schneider G, Kreyenberg H, Steinbach D, Weber G, Hollink IH, Zwaan CM, Biondi A, van der Velden VH, Reinhardt D, Cazzaniga G, Bader P, Trka J; European Study Group on WT1 expression in childhood AML. *Leukemia* 2009; 1472-9.

Woehlecke C, Wittig S, Arndt C, Gruhn B. Prognostic impact of WT1 expression prior to hematopoietic stem cell transplantation in children with malignant hematological diseases. *J Cancer Res Clin Oncol* 2015(a); 141(3):523-9.

Woehlecke C, Wittig S, Sanft J, Kreyenberg H, Gruhn B. Detection of relapse after hematopoietic stem cell transplantation in childhood by monitoring of WT1 expression and chimerism. *J Cancer Res Clin Oncol* 2015(b); 141(7):1283-90.

Xiang L, Zhou J, Gu W, Wang R, Wei R, Qiu G, Cen J, Xie X, Chen Z. Changes in expression of WT1 during induced differentiation of the myeloid leukemia cell lines by 5-aza-2'-deoxycytidine and all-*trans*-retinoic acid. *Oncol Lett* 2016; 11(2):1521-1526.

Yang L, Han Y, Suarez Saiz F, Minden MD. A tumor suppressor and oncogene: the WT1 story. *Leukemia* 2007; 21: 868–876.

Yatsenko Y, Kalennik O, Maschan M, Kalinina I, Maschan A, Nasedkina T. NPM1, FLT3 and c-KIT mutations in pediatric acute myeloid leukemia in Russian population. *J Pediatr Hematol Oncol* 2013; 35(3):e100-8.

Ye M, Zhang H, Yang H, Koche R, Staber PB, Cusan M, Levantini E, Welner RS, Bach CS, Zhang J, Krivtsov AV, Armstrong SA, Tenen DG. Hematopoietic differentiation is required for initiation of acute myeloid leukemia. *Cell Stem Cell* 2015; 17(5):611-23.

Yu QH, Wang SY, Wu Z. Advances in genetic studies of inherited bone marrow failure syndromes and their associated malignancies. *Transl Pediatr* 2014; 3(4):305-9.

Zhang Q, Bai S, Vance GH. Molecular genetic tests for FLT3, NPM1 and CEBPA in acute myeloid leukemia. *Methods Mol Biol* 2013; 999:105-21.

Zhang R, Yang JY, Sun HQ, Jia H, Liao J, Shi YJ, Li G. Comparison of minimal residual disease (MRD) monitoring by WT1 quantification between childhood acute

myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2015; 19(14):2679-88.

Зверкова АС, Тришкова ЛА, Факторова ЕИ. Дифференциальная диагностика инфекционного мононуклеоза и лейкоза. *Врачеб дело* 1988; 10:С31-3.

Списак скраћеница коришћених у тексту

АЛЛ, акутна лимфобластна леукемија

АЛМЛ, акутна леукемија мешовите лозе

АМЛ, акутна мијелоидна леукемија

АММОЛ, акутна мијеломоноцитна леукемија

АМоЛ, акутна монобластна леукемија

АПЛ, акутна промијелоцитна леукемија

ДИК, дисеминована интраваскуларна коагулација

ДНК, деоксирибонуклеинска киселина

ИТП, имунска тромбоцитопенијска пурпура

МРБ, минимална резидуална болест

МЋКС, моноклеарне ћелије коштане сржи

РНК, рибонуклеинска киселина

СЗО, Светска здравствена организација

ТМЋХ, трансплантација матичне ћелије хематопоезе

ФАБ, француско-америчко-британска (класификација)

ЦНС, централни нервни систем

Биографија аутора

Срђа Јанковић је рођен 20. јуна 1972. године у Београду. Завршио је Медицински факултет Универзитета у Београду 2002. године са просечном оценом 9,67. Магистарску тезу под насловом „Системска запаљењска реакција изазвана акутном интоксикацијом кадмијумом код пацова сојева DA и AO: улога пола и соја“ под менторством проф. др Зорице Рамић и коменторством проф. др Милене Катарановски одбранио је на Медицинском факултету у Београду 2009. године. Од 2007. године запослен је у имунолошкој лабораторији Универзитетске дечје клинике, а специјализацију из имунологије стекао је на Медицинском факултету Универзитета у Београду 2015. године. Учествовао је као коаутор у 12 публикација у признатим међународним научним часописима.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani-a Срба Јанковић

broj upisa _____

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

Значај Експресије ГЕНА И ПРОТЕИНА ВилМСОБ ТУМОР (WT)1
КОЈ ПЕГНИАТРОНСКИХ ПАЦИЈЕНАТА СА АКТИВНОМ ДЕЖЕМИТОМ

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 14. 04. 2016.



Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Срба Јанковић

Broj upisa _____

Studijski program _____

Naslov rada ЗНАЧАЈ ЕКСПРЕСИЈЕ ГЕНА И ПРОТЕИНА ВИЛМСОВ ТУМОР (WT) 1
КОД ПЕДИЈАТРИЈСКИХ ПАЦИЈЕНАТА СА АКТИВНОМ ЛЕУКЕМИЈОМ

Mentor Проф. др Драгана Јанић

Potpisani Срба Јанковић


izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 14. 04. 2016.



Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

ЗНАЧАЈ ЕКСПРЕСИЈЕ ГЕНА И ПРОТЕИНА ВИСИМСОБ ТИМОР (WT) 1
КОД ПЕДИЈАТРИЈСКИХ ПАЦИЈЕНАТА СА АКУТНОМ ЛЕУКЕМИЈОМ

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo

2. Autorstvo - nekomercijalno

3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade

4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima


5. Autorstvo – bez prerade

6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poledini lista).

U Beogradu, 14. 04. 2016.

Potpis doktoranda



СРЂА ЈАНКОВИЋ