UNIVERZITET U NOVOM SADU
MEDICINSKI FAKULTET
DOKTORSKE STUDIJE

KLINIČKI I PROGNOSTIČKI ZNAČAJ EKSPRESIJE GENA *EVI1* U AKUTNOJ MIJELOIDNOJ LEUKEMIJI

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor: Prof.dr Aleksandar Savić Kandidat: Borivoj Sekulić

Novi Sad, 2015. godine

UNIVERZITET U NOVOM SADU
MEDICINSKI FAKULTET

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Borivoj Sekulić
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	Prof. dr Aleksandar Savić
Naslov rada: NR	Klinički i prognostički značaj ekspresije gena EVI1 u akutnoj mijeloidnoj leukemiji
Jezik publikacije: JP	Srpski
Jezik izvoda: JI	srpski/engleski
Zemlja publikovanja: ZP	Srbija
Uže geografsko područje: UGP	Vojvodina
Godina: GO	2015.
Izdavač: IZ	autorski reprint
Mesto i adresa: MA	21000 Novi Sad, Hajduk Veljkova 3

Fizički opis rada: FO	(broj poglavlja 7/ stranica 114/ tabela 13/slika 3/grafikona 14/ referenci 265/ priloga -)

Naučna oblast: NO	Medicina
Naučna disciplina: ND	Hematologija
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	Akutna mijeloidna leukemija; Transkripcioni faktori; Genska ekspresija; Prognoza; Analiza preživljavanja; Virusna integracija; Proto-Onkogeni
UDK	**616.155.392:575.113**
Čuva se: ČU	U Biblioteci Medicinskog fakulteta u Novom Sadu, 21000 Novi Sad, Srbija, Hajduk Veljkova 3
Važna napomena: VN	

Izvod:
IZ

UVOD: Akutna mijeloidna leukemija (AML) predstavlja heterogenu grupu oboljenja u odnosu na morfologiju, citogenetiku, molekularnu genetiku, zbog čega se deli na različite kliničke i biološke entitete, sa različitim odgovorom na terapiju i ishodom lečenja. Humani EVI1 *(ecotropic virus integration-1)* gen ima ulogu multifunkcionalnog nuklearnog transkripcionog faktora, kako u normalnoj tako i u malignoj hematopoezi. Sve je više istraživanja koja ističu negativni prognostički značaj visoke ekspresije *(overexpression)* EVI1 gena u AML.

CILJEVI: Ciljevi ovog istraživanja su da se ispita klinički i prognostički značaj ekspresije gena EVI1 u AML, kao i da se utvrdi povezanost visoke ekspresije gena EVI1 sa nalazima citogenetskog ispitivanja i molekularnim markerima: FLT3 mutacijom i nukleofozmin 1 (NPM1) mutacijom.

MATERIJAL I METODE: Ovim prospektivnim istraživanjem je obuhvaćena grupa od 38 odraslih novodijagnostikovanih bolesnika sa *de novo,* non M3 AML, kod kojih je započeto standardno lečenje, a koji su dijagnostikovani i lečeni u Klinici za hematologiju Kliničkog centra Vojvodine u periodu od jula 2012. do marta 2014. Određivanje ekspresije gena EVI1 je vršeno pomoću *real time* kvantitativne *PCR (qPCR)* metode, tehnikom TaqMan, a relativna ekspresija EVI1 gena je određena primenom ΔΔCt metode.

REZULTATI: Medijana starosti bolesnika pri postavljanju dijagnoze AML je bila 52 godine (23-80). Ustanovljena je statistički značajna razlika između ekspresije gena EVI1 kod zdravih osoba (kontrolna grupa) i obolelih od akutne mijeloidne leukemije (p=0.008). Računajući relativnu ekspresiju, 13,2 % bolesnika je imalo visoku ekspresiju (*overexpression*) gena EVI1. U odnosu na kliničke i laboratorijske karakteristike bolesnika (kao što su pol, starost, parametri krvne slike, nivo laktat dehidrogenaze, procenat blasta u perifernoj krvi i koštanoj srži, potom tip akutne mijeloidne leukemije, performans status, komorbiditetni indeks) nije ustanovljena statistički značajna razlika između bolesnika sa visokom ekspresijom EVI1 gena i ostalih bolesnika. Postoji statistički značajna povezanost visoke ekspresije EVI1 gena i nepostojanja NPM1 mutacije (p=0,031), kao i između visoke ekspresije EVI1 gena i prisustva monozomije 7 (p=0,047). Visoka ekspresija EVI1 gena je povezana sa

kraćim preživaljvanjem bez događaja (p=0,004), kao i sa kraćim ukupnim preživljavanjem (p=0,025). **ZAKLJUČCI:** Postoji značajno povećana ekspresija gena EVI1 kod obolelih od AML u odnosu na zdrave kontrole. Visoka ekspresija EVI1 gena je faktor loše prognoze kod obolelih od akutne mijeloidne leukemije i u kombinaciji sa drugim prognostičkim markerima, doprinosi boljoj risk stratifikaciji ovih bolesnika.	
Datum prihvatanja teme od strane NN veća: DP	24.4.2013.
Datum odbrane: DO	
Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status) KO	predsednik: član: član:

University of Novi Sad

Faculty

Key word documentation

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	Ph.D. Thesis
Author: AU	Borivoj Sekulić

Mentor: MN	Prof. Aleksandar Savić, MD, PhD
Title: TI	Clinical and Prognostic Significance of EVI1 Expression in Acute Myeloid Leukaemia
Language of text: LT	Serbian
Language of abstract: LA	english/serbian.
Country of publication: CP	Serbia
Locality of publication: LP	Vojvodina
Publication year: PY	2015
Publisher: PU	Author reprint
Publication place: PP	21000 Novi Sad, Srbija, Hajduk Veljkova 3

Physical description: PD	Chapters 7/pages 114/tables 13/figures 14/pictures 3/reference 265/annex-
Scientific field SF	Medicine
Scientific discipline SD	Haematology
Subject, Key words SKW	Leukemia, Myeloid, Acute; Transcription Factors; Gene Expression; Prognosis; Survival Analysis; Virus Integration; Proto-Oncogenes
UC	**616.155.392:575.113**
Holding data: HD	Library of Faculty of Medicine Novi Sad, 21000 Novi Sad, Serbia, Hajduk Veljkova 3
Note: N	None

Abstract:
AB
INTRODUCTION: Acute myeloid leukaemia (AML) represents a heterogenous group of diseases in terms of morphology, cytogenetics, molecular genetics, so it can

be divided into distinct clinical and biological entities, with variable responsiveness to therapy and different treatment outcome. Human EVI1 *(ecotropic virus integration-1)* gene plays a role of multifunctional nuclear transcriptional factor, not only in normal, but also in malignant haematopoiesis. There are more and more investigations indicating high EVI1 expression (EVI1 overexpression) as a negative prognostic marker in AML.

PURPOSES: The main goal of this investigation was to examine the clinical and prognostic significance of EVI1 expression in AML, as well as to investigate whether there was any association of EVI1 overexpression with cytogenetic abnormalities and other standard molecular prognostic factors, such as FLT3 mutation and nucleophosmin 1 (NPM1) mutation.

PATIENTS AND METHODS: This prospective study included 38 adult newly diagnosed patients with *de novo* nonM3 AML, in whom a standard treatment was started at Clinic of Haematology, Clinical center of Vojvodina in the period from July 2012 to March 2014. EVI1 expression was analyzed by real-time quantitative polymerase chain reaction using TaqMan, and relative EVI1 expression was determined by ΔΔCt method.

RESULTS: Median age of patients at diagnosis was 52 (aged 23-80). There has been determined statistically higher EVI1 expression in our AML patients than in healthy volunteers (control group) (p=0.008). The relative EVI1 overexpression was observed in 13.2% of the patients. No significant differences in clinical and laboratory patient data (including sex, age, whole blood counts, lactate dehydrogenase level, peripheral and bone marrow blast percentages, type of AML, performance status, comorbidity index) were observed between patients with high EVI1 expression and patients without high EVI1 expression. Our investigation revealed inverse correlation of high EVI1 expression and nucleophosmin 1 mutation (p=0,031). Also high EVI1 expression was significantly associated with monosomy 7 (p=0,047). Survival analysis revealed significantly inferior event free survival (p=0,004) and overall survival (p=0,025) for patients with high EVI1 expression compared to the other patients.

CONCLUSION: EVI1 expression is significantly higher in AML patients compared to healthy controls. High EVI1 expression is a poor prognostic marker for patients with AML, and in combination with other well established prognostic markers, contributes to better risk stratification of these patients.

Accepted on Scientific Board on: AS	24/04/2013
Defended: DE	
Thesis Defend Board: DB	president: member: member:

SADRŽAJ

I UVOD……...1

1.AKUTNA MIJELOIDNA LEUKEMIJA……..1

1.1 Definicija akutne mijeloidne leukemije……1
1.2. Epidemiologija akutne mijeloidne leukemije…….....1
1.3. Etiologija akutne mijeloidne leukemije……2
1.4. Leukemogeneza……...3
1.5. Klinička slika akutne mijeloidne leukemije……7
1.6. Dijagnoza i klasifikacija akutne mijeloidne leukemije……..13
1.7. Terapija i odgovor na terapiju……16
1.7.1. Indukciona terapija……16
1.7.2. Postremisiona terapija…….....18
1.7.3. Inovativni lekovi u terapiji akutne mijeloidne leukemije……..20
1.7.4. Odgovor na terapiju……...21
1.8. Prognostički faktori od značaja u akutnoj mijeloidnoj leukemiji……22
1.8.1. Standardni prognostički faktori od značaja u akutnoj mijeloidnoj leukemiji…23
1.8.2. Molekularni markeri i prognoza u akutnoj mijeloidnoj leukemiji…….24
1.8.3. Prognostički modeli u akutnoj mijeloidnoj leukemiji……28
1.8.4. Postindukcioni faktori značajni za prognozu u akutnoj mijeloidnoj leukemiji.30

2. EVI 1 GEN I AKUTNA MIJELOIDNA LEUKEMIJA……31

2.1. EVI1 gen……31
2.2. EVI1 gen i leukemogeneza……...32
2.3. EVI1 i povezanost sa određenim tipovima akutne mijeloidne leukemije……36
2.4. Nivo ekspresije EVI1 gena i prognoza u akutnoj mijeloidnoj leukemiji……39

II PROBLEM, PREDMET I CILJEVI ISTRAŽIVANJA……40

III MATERIJAL I METODE……..41

1.MATERIJAL……41

1.1. Način izbora, veličina i konstrukcija uzorka……41
1.2. Mesto eksperimentalnog istraživanja……42

2.METODE……42

2.1 Klinička i laboratorijska ispitivanja……42
2.2. Molekularna genetska ispitivanja……43
2.2.1. Izolacija mononuklearnih ćelija iz periferne krvi/koštane srži……43
2.2.2. Izolacija DNK iz periferne krvi/koštane srži……44
2.2.3. Izolacija RNK iz mononuklearnih ćelija……..45

2.2.4. Reverzna transkripcija……..**46**
2.2.5. Reakcija lančanog umnožavanja DNK (PCR)…….**47**
2.2.6. Detekcija FLT3-ITD mutacije……..**48**
2.2.7. Detekcija FLT3-D835 mutacije……**49**
2.2.8. Detekcija mutacije u nukleofozmin 1 genu…….**50**
2.2.9. Određivanje ekspresije EVI1 gena kvantitativnom ("real time") PCR metodom (q-PCR)……**51**
2.2.9.1. Načelo metode kvantitativnog ("real time") PCR……**51**
2.2.9.2. Određivanje ekspresije EVI1 gena komparativnim ddCt metodom…….**54**

IV METODE STATISTIČKE OBRADE…..……...**55**

V REZULTATI……**57**

1. Demografski podaci……**57**

2. Kliničko laboratorijski podaci……**58**

3. Podela akutnih mijeloidnih leukemija……**58**

4. Citogenetske i molekularne karakteristike AML i podela u odnosu na rizik……**59**

5. Terapija i odgovor na terapiju……**61**

6. Rana smrtnost……**62**

7. Relativna ekspresija gena EVI1 u kontrolnoj grupi (zdravi) i kod ispitivane grupe bolesnika…**62**

8. Visoka ekspresija EVI1 gena u našem uzorku bolesnika……..**62**

9. Povezanost visoke ekspresije EVI1 gena sa demografskim, kliničko-laboratorijskim, molekularnim karakteristikama……..**63**

10. Uticaj nivoa ekspresije EVI1 gena na ukupno preživljavanje……**66**

11. Uticaj visoke ekspresije EVI1 gena na preživljavanje kod naših bolesnika.....67

12. Uticaj molekularnih markera na preživljavanje kod naših bolesnika……**68**

13. Ispitivanje kliničkih, laboratorijskih i molekularnih prognostičkih faktora na preživljavanje..72

14. Nezavisni prognostički markeri za kraće ukupno preživljavanje u našem istraživanju…….....**75**

VI DISKUSIJA……...**77**

VII ZAKLJUČCI……..**93**

Reference……**95**

I UVOD

1 Akutna mijeloidna leukemija

1.1. Definicija akutne mijeloidne leukemije

Akutna mijeloidna leukemija (AML) predstavlja maligni, klonski poremećaj na nivou hematopoezne matične/progenitorne ćelije, u kome dolazi do nakupljanja stečenih genetskih i epigenetskih promena, što menja normalne mehanizme ćelijskog rasta, proliferacije i diferencijacije [1]. AML je u osnovi veoma heterogeno oboljenje, sa različitim citogenetskim i molekularnim promenama, zbog čega se deli u različite kliničke i biološke entitete [2].

1.2. Epidemiologija akutne mijeloidne leukemije

Učestalost AML iznosi 3-4 slučaja na 100.000 stanovnika, sa eksponencijalnim porastom incidence nakon 50. godine života [3]. Medijana životnog doba obolelih od AML je 66 godina, s tim da više od polovine obolelih, u momentu postavljanja dijagnoze, ima preko 65 godina [4]. Prema podacima iz švedskog populacionog registra, medijana životnog doba obolelih od AML je 72 godine [5]. Nešto češće oboljevaju muškarci, dok AML predstavlja vodeći uzrok smrti od kancera kod muškaraca mlađih od 40 godina [5].

1.3. Etiologija akutne mijeloidne leukemije

Etiologija AML nije u potpunosti razjašnjena. Prepoznati su određeni faktori rizika, koji predisponiraju razvoju AML, a mogu se podeliti na urođene genetske poremećaje, kao i faktore spoljašnje sredine (fizičke i hemijske) [3].

Urođeni oblici insuficijencije koštane srži, kao što su Shwachmann Diamond sindrom, dyskeratosis congenita, Fankonijeva anemija, Daunov sindrom i drugi, predisponiraju razvoju AML [6-8]. Iako retke, opisane su i familijarne AML, koje nastaju kao posledica nasleđenih, germinalnih mutacija gena, koji imaju ulogu transkripcionih faktora u normalnoj hematopoezi (CEBPA, RUNX1 i GATA2) [9-12]. Ipak, velike populacione studije nisu pokazale da, među bliskim srodnicima obolelih od AML, postoji značajniji porast oboljevanja od AML [13].

Od faktora spoljašnje sredine za razvoj AML navodi se nesumnjiva povezanost sa jonizujućim zračenjem, kao i sa izlaganjem benzenu, pri čemu je ta veza dozno zavisna [14,15]. Slabija veza je pronađena između drugih faktora spoljašnje sredine (pušenje, izlaganje pesticidima/herbicidima) i razvoja AML [16]. Ranija istorija autoimunih bolesti (npr. reumatoidni artritis, autoimuna hemolizna anemija i dr.) povećava rizik za razvoj AML, obično nakon latentnog perioda od preko tri godine [17,18]. Gojaznost (indeks telesne mase preko 30 kg/m^2) se takođe povezuje sa AML, čak i sa određenim citogenetskim riziko grupama AML [19]. Iako gojazni oboleli od AML imaju bolji odgovor na primenjenu terapiju, ukupno preživljavanje je isto kao i kod obolelih koji nisu gojazni [20].

Kod većine obolelih od AML ne postoji jasan uzrok i tada govorimo o primarnim ili *de novo* AML. Drugu grupu čine tzv. sekundarne AML, koje nastaju na terenu prethodne hematološke bolesti (uključujući mijelodisplastične sindrome (MDS), pojedine

mijeloproliferativne neoplazme, mijeloproliferativno/mijelodisplastične neoplazme, aplastičnu anemiju, paroksizmalnu noćnu hemoglobinuriju), odnosno nakon prethodne hemioterapije i/ili radioterapije (*therapy-related myeloid neoplasm*, odnosno *therapy related AML (t-AML)*) [21]. Postoji nekoliko grupa citostatika, koji mogu dovesti do sekundarne AML, među kojima se izdvajaju: alkilirajući agensi (melfalan, ciklofosfamid, nitrogen mustard i drugi) i topoizomeraza II inhibiotori (npr.etopozid). Za prvu grupu je karakterističan duži latentni period do razvoja AML, sa citopeničnom, MDS fazom, kompleksnim kariogramom (koji često uključuje i -5/del(5q), -7/del(7q)) i lošom prognozom, dok je za drugu grupu karakterističan kraći latentni period do pojave, uglavnom, monoblastne leukemije sa rearanžmanom koji uključuje MLL (11q23), ali su moguće i druge hromozomske aberacije (uključujući t (8;21), inv(16) i t (15;17)), kada se može postići dobar odgovor na terapiju [22]. Bolesnici koji su primili visokodoznu hemioterapiju praćenu autologom transplantacijom matičnih ćelija (posebno u okviru lečenja limfoma, ali i drugih hematoloških i solidnih maligniteta) imaju povećan rizik za razvoj t-AML [23]. Značaj ovih posebnih bioloških entiteta (*AML with MDS related changes i therapy related myeloid neoplasm*) sa, po pravilu, lošijim terapijskim odgovorom, prepoznat je i u klasifikaciji mijeloidnih neoplazmi Svetske zdravstvene organizacije iz 2008. godine [24].

1.4. Leukemogeneza

Leukemogeneza predstavlja višestepeni proces, koji i pored mogućnosti šireg sagledavanja genomike AML, upotrebom uznapredovale tehnologije sekvencioniranja sledeće generacije *(next generation sequencing NGS)*, ostaje u velikoj meri nerazjašnjen.

Pretpostavlja se da leukemijska transformacija (tzv. leukemijska matična ćelija) nastaje na nivou hematopoezne matične (stem) ćelije ili progenitorne ćelije hematopoeze, koja je ponovo stekla stem ćelijske karakteristike (mogućnost samoobnavljanja) [25]. Ukupan broj mutacija u hematopoeznim matičnim/progenitornim ćelijama raste u funkciji vremena [26]. Na tom terenu, slučajno nastalih somatskih mutacija (*background* mutacije), dolazi do pojave inicirajuće mutacije, koja u kooperaciji sa još minimum jednom mutacijom (*two hit* teorija), dovodi do formiranja "osnivačkog" leukemijskog klona [27]. Na prezentaciji, AML se sastoji iz više različitih malignih subklonova, koji su nastali evolucijom iz osnivačkog klona i koji se dalje razvijaju (granaju) kao rezultat prirodne progresije bolesti, odnosno pod selektivnim pritiskom hemioterapije [28]. Relaps bolesti nastaje ili klonskom evolucijom osnivačkog klona ili, možda i češće, iz jednog od subklonova sa početka bolesti [26,29].

U maligno transformisanoj matičnoj/progenitornoj ćeliji, na temelju različitih genetskih i epigenetskih promena, dolazi do poremećaja u transkripciji i ekspresiji gena, što konsekutivno dovodi do kompleksnih poremećaja u signalnoj transdukciji, kao i u procesima proliferacije, diferencijacije, samoobnavljanja, programiranoj ćelijskoj smrti (apoptozi). AML predstavlja jedan od maligniteta sa najmanjim brojem mutacija po individualnom slučaju [30]. Prosečan broj kodirajućih mutacija po bolesniku je 13, od kojih je samo 5 koje se ponavljaju u svakom genomu [31]. Malo je dokaza o genskoj nestabilnosti u većini AML genoma [27]. Desetak godina ranije bile su opisivane samo dve klase mutacija, koje kooperiraraju u nastanku AML: klasa I (koja dovodi do poremećaja proliferacije) i klasa II (koja dovodi do poremećaja diferencijacije) [32]. Širim sagledavanjem genomike AML, izdvaja se 9 funkcionalnih kategorija mutiranih gena, koje, pored navedenih, uključuju i mutacije gena značajnih u epigenetici (i to onih koji učestvuju u metilaciji DNK i onih koji učetvuju u posttranslacionoj modifikaciji histona), kao i mutacije

tumor supresor gena, mutacije gena za proteine kohezin i splajsozom kompleksa [31, 33, 34] (videti tabelu 1).

Tabela 1. Podela mutacija u AML

POREMEĆAJ PROLIFERACIJE	**aktivacija signalnih puteva**	**FLT3 mutacija** **KIT mutacija** **RAS mutacija**
NUKLEOFOZMIN 1 MUTACIJA		**NPM1 mutacija**
POREMEĆAJ DIFERENCIJACIJE	translokacije koje pogađaju transkripcione faktore	**PML-RARA** **MYH11-CBFB** **RUNX1-RUNX1T1**
	tačkaste mutacije u transkripcionim faktorima	**RUNX1 (AML1)** **CEBPA** **PU.1**
EPIGENETSKE PROMENE	DNK metilacija	**DNMT3A** **IDH 1 i 2** **TET**
	modifikacija histona	**MLL-X fuzija** **MLL-PTD** **ASXL1** **EZH2**
OSTALE KATEGORIJE	tumor supresor geni	**TP53, WT1, PHF6**
	kohezin kompleks geni *(eng.cohesin)*	**STAG1, STAG2, SMC3**
	splajsozom kompleks geni *(eng.spliceosome)*	**SF3B1, U2AF1, SRSF2**

Legenda: **FLT3** *(Fms-like tyrosine kinasa 3)*, **RAS** *(Rat Sarcoma viral oncogene homolog)*, **NPM1** *(Nucleophosmin/nucleoplasmin family, member 1)*, **PML** *(Promyelocytic Leukaemia)*, **RARA** *(Retinoic Acid Receptor Alpha)*, **MYH11** *(Myosin Heavy chain gene 11)*, **CBFB** *(Core Binding Factor Beta)*, **RUNX1** *(runt related transcription factor 1)*, **AML1** *(Acute Myeloid Leukaemia1)*, **CEBPA** *(CCAAT/Enhancer-Binding Protein gene α)*, **DNMT3A** (DNK metiltransferaza 3 A), **IDH** (izocitrat dehidrogenaza), **TET** *(Ten-eleven translocation)*, **MLL** *(Mixed Lineage Leukaemia ili Myeloid-Lymphoid Leukaemia)*, **PTD** *(partial tandem duplication)*, **ASXL1** *(additional sex combs like transcriptional regulator 1)*, **EZH2** *(enhancer of zeste homolog 2)*, **TP53** *(Tumour Protein p53)*, **WT1** *(Wilms Tumour 1)*, **PHF6** *(planthomeodomain finger protein 6)*, **STAG** *(stromal antigen)*, **SMC3** *(Structural maintenance of chromosomes 3)*, **SF3B1***(Splicing factor 3B subunit 1)*, **U2AF1***(U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1)*, **SRSF2** *(serine/arginine-rich splicing factor 2).*

Poslednjih godina velika pažnja je usmerena na otkrivanju inicirajućih mutacija, kao i otkrivanju sekvencijalnih događaja u patogenezi AML. Mutacije koje su česte u AML (DNMT3A, NPM1, CEBPA, IDH1/2), se po pravilu ne javljaju sa translokacijama koje pogađaju transkripcione faktore (i koje se smatraju inicirajućim događajima u patogenezi AML), te se pretpostavlja da i one mogu imati ulogu inicirajućih mutacija [27,31]. Takođe, meta analizom rezultata istraživanja, koja su se bavila prisustvom/odsustvom određenih mutacija kod istog bolesnika u momentu dijaganoze i u relapsu, utvrđeno je da su FLT3, KIT, RAS, WT1 mutacije, najčešće mutacije koje se dobiju/izgube u relapsu, dok su najpostojanije DNMT3A, IDH1/2, TET2 [35]. Nukleofozmin 1 mutacija spada u postojane mutacije (samo u oko 10% dolazi do gubitka mutacije u relapsu), te je smatrana inicirajućom mutacijom [36,37].

Noviji radovi, koji se bave biologijom tzv. preleukemijske hematopoezne matične ćelije, izdvajaju mutacije u genima koje dovode do epigenetskih promena (DNMT3A, IDH1/2, TET2), kao rane događaje u leukemogenezi, dok mutacije u genima koje dovode do poremećaja proliferacije (FLT3, RAS mutacije), kao kasne događaje [38,39,40]. Savremena terapija bi svakako trebala da bude usmerena na eradikaciju ovih preleukemijskih matičnih ćelija, koje su obično rezistentne na konvencionalnu terapiju, i predstavljaju rezervoar za potencijalni relaps bolesti [41].

S obzirom na moguću ulogu u leukemogenezi i prognozi obolelih od AML, velika pažnja se pridaje i disregulaciji mikroRNK (miRNK) u leukemijama, pa i u AML [42]. Mikro RNK predstavljaju nekodirajuće RNK, koje na posttranskripcionom nivou (vezujući se za informacionu RNK) regulišu ekspresiju gena, te mogu igrati ulogu onkogena (*miR-155* i *miR-196a)* ili tumor supresor gena (*miR-29, miR-181a, miR-223* i *miR-29b)* u AML [43]. Određeni obrasci ekspresije miRNA su povezani sa određenim citogenetskim grupama i molekularnim

markerima AML [44]. Tako je, na primer, visoka ekspresija *miR-155*, koja dovodi do poremećaja regulacije gena uključenih u procese antiapoptoze i ćelijske proliferacije, često povezana sa FLT3-ITD mutacijom [45]. S druge strane, nivo ekspresije *miR-181a*, koja može imati dodatni prognozni značaj u FLT3 pozitivnoj AML, negativno korelira sa ekspresijom *homebox* (HOX) gena, čija preterana ekspresija igra važnu ulogu u samoobnavljanju hematopoezne (i leukemijske) matične ćelije, a samim tim i u procesu leukemogeneze [46].

1.5. Klinička slika akutne mijeloidne leukemije

Inicijalni klinički simptomi i znaci akutne mijeloidne leukemije su nespecifični, a javljaju se kao posledica insuficijencije koštane srži, koja nastaje usled potiskivanja normalne hematopoeze od strane leukemijskih ćelija, a sa druge strane dolazi do leukemijske infiltracije različitih tkiva i organa. Tako na primer u oko 50% slučajeva postoji umerena splenomegalija, može biti prisutna hepatomegalija, dok je limfadenopatija, za razliku od akutne limfoblastne leukemije, retka. Infiltracija gingive je posebno česta u monoblastnim leukemijama, ali se može javiti i u drugim tipovima AML. Takođe, usled leukemijske ekspanzije, ali i dejstva citotoksične terapije, dolazi i do niza metaboličkih komplikacija (posebno hiperurikemije i uratne nefropatije) i elektrolitskih poremećaja (obično hipokalemije, hipomagnezemije sa posledičnom hipokalcemijom), koje zahtevaju redovno praćenje i adekvatnu korekciju [47].

Poseban problem može predstavljati razvoj sindroma tumorske lize (TLS), kao posledica brzog raspadanja leukemijskih ćelija i naglog oslobađanja intracelularnog fosfata, kalijuma, nukleinskih kiselina i citokina [47]. Kod izrazito agresivnih limfoma/leukemija, može se javiti kao primarni TLS (pre započinjanja terapije), a češće se javlja nakon započinjanja hemioterapije,

kao sekundarni sindrom tumorske lize [48]. Predisponirajući faktori za razvoj TLS su inicijalno visok broj leukocita, visoke vrednosti laktat dehidrogenaze (LDH), visok nivo mokraćne kiseline u serumu, odnosno preegzistirajuće bubrežno oštećenje, oligurija, hipotenzija [49]. Sindrom tumorske lize se može javiti samo u vidu laboratorijskog TLS, ako su prisutna minimum dva od četiri karakteristična laboratorijska poremećaja (hiperurikemija, hiperkalemija, hiperfosfatemija i hipokalcemija) [50]. Klinički manifestan TLS nastaje kao posledica navedenih metaboličkih poremećaja, a manifestuje se u vidu akutne bubrežne insuficijencije, tonično-kloničkih grčeva, poremećaja srčanog ritma i iznenadne srčane smrti. Zato je izuzetno bitno sprovoditi mere prevencije i adekvatno lečenje TLS, a koje se sastoje od intenzivne hidracije, stimulacije diureze, korekcije elektrolitskog disbalansa, primene alopurinola (inhibicijom ksantin oksidaze sprečava se formiranje mokraćne kiseline) i razburikaze (rekombinantna uratna oksidaza, kojom se snižava nivo mokraćne kiseline). Alkalizacija urina se više standardno ne preporučuje u terapiji TLS, s obzirom na mogućnost precipitacije ksantina i kalcijum fosfata u bubrežnim tubulima [51].

Hiperleukocitoza se javlja u 10-20% novodijagnostikovanih slučajeva obolelih od AML, posebno u AML M4 i M5 po FAB, kao i varijantnom obliku akutne promijelocitne leukemije (M3v po FAB). Za non-M3 AML, arbitrarna granica hiperleukocitoze je 50-100x10^9/l, a simptomi leukostaze su dominantno respiratorni (dispnea, znaci hipoksemije, difuzne alveolarne hemoragije, respiratorne insuficijencije) i od strane centralnog nervnog sistema (glavobolja, konfuzija, poremećaj stanja svesti, neurološki ispadi, smetnje vida, retinalna hemoragija i drugi). Leukostaza dovodi do poremećaja mikrocirkulacije, koja nastaje kao posledica povećane viskoznosti krvi usled visokog broja leukocita (blasta), ali i povećane endotelijalne adhezije blasta. Blasti, produkujući citokine (Il-1 i TNF, *tumor necrosis factor*) dovode do povećane

ekspresije integrina i adhezivnih proteina (ICAM-1 i VCAM-1) na endotelijalnim ćelijama, što za posledicu ima slepljivanje i taloženje (eng.*sludging*) leukocita, oštećenje endotela i mikrovaskularnu trombozu, odnosno hemoragiju [52]. Hiperleukocitoza je po život ugrožavajuće stanje, sa visokom stopom rane smrtnosti (oko 20%), uzrokovane leukostazom, sindromom tumorske lize i krvarenjem (obično u centralni nervni sistem) [53]. Pored visoke stope rane smrtnosti, hiperleukocitoza je povezana sa manjom stopom kompletnih remisija, visokom stopom relapsa i kraćim sveukupnim preživljavanjem [54]. Od kliničkog značaja je rano prepoznavanje simptoma leukostaze i diferencijalna dijagnoza (posebno u odnosu na plućnu infekciju i transfuzijom uzrokovano akutno oštećenje pluća), sa ciljem brzog snižavanja broja leukocita, pre svega hemioterapijom (hidroksiureom ili malim dozama citozin arabinozida) i leukocitaferezom. Indikacija za sprovođenje leukocitafereze je simptomatska hiperleukocitoza [48]. Iako je česta praksa sprovođenja leukocitafereze kod asimptomatskih bolesnika sa leukocitima iznad $100x10^9$/l, nije dokazan značaj profilaktične primene leukocitafereze, pre pojave znakova leukostaze [55]. Terapijska leukocitafereza može imati izvesni povoljan uticaj na rani morbiditet i mortalitet kod simptomatske leukostaze, ali je bez uticaja na sveukupno preživljavanje kod ovih bolesnika [56].

Ekstramedularne manifestacije akutne mijeloidne leukemije su relativno retke, a od kliničkog značaja izdvajaju se mijeloidni granulocitni sarkom (hlorom) i zahvaćenost centralnog nervnog sistema.

Mijeloidni sarkom se javlja u 2,5-9% obolelih od AML, predstavlja ektramedularni tumor nezrelih mijeloidnih ćelija, a može prethoditi, javiti se konkomitantno sa leukemijom u srži, odnosno javiti se u relapsu AML. Najčešće lokalizacije mijeloidnog sarkoma su meka tkiva, kost, limfni čvorovi, genitourinarni trakt, ali i brojne druge lokalizacije. Mijeloidni sarkom je

povezan sa određenim citogenetskim promenama: t (8;21), inv(16), abnormalnostima hromozoma 8 i drugim [57]. Iako nije u potpunosti razjašnjen prognozni značaj mijeloidnog sarkoma, generalno se smatra kao dodatno loš prognozni faktor u AML. Kao izolovan, mijeloidni sarkom je vesnik sistemske bolesti i zahvatanja koštane srži, te se u njegovom lečenju koriste protokoli za lečenje AML, sa ili bez radioterapije [58].

Zahvatanje centralnog nervnog sistema (CNS) u AML je, za razliku od akutne limfoblastne leukemije, retko (oko 5-7% AML), a češće se javlja u relapsu, nego na prezentaciji bolesti [47]. Pregled likvora se ne radi rutinski kod svih bolesnika sa AML, osim u slučaju prisustva CNS simptoma (meningealni znaci, znaci povišenog intrakranijalnog pritiska, ispadi u funkciji kranijalnih nerava) i kod visoko rizičnih bolesnika. U velikim centrima se rutinski radi pregled cerebrospinalne tečnosti i u okviru pripreme za alogenu transplantaciju matične ćelije hematopoeze [59]. Pod visokim rizikom za razvoj CNS leukemije su mlađi bolesnici sa AML, koji imaju visok broj leukocita, visok procenat blasta u koštanoj srži, visok nivo laktat dehidrogenaze (LDH), AML M4/M5, CD56 pozitivna AML, kao i oni sa FLT3-ITD mutacijom [60].

Bolesnici sa AML su posebno skloni razvoju infekcija, koje su vodeći uzrok morbiditeta i mortaliteta kod ovih bolesnika. Pneumonija se javlja u oko petine obolelih od AML, kod kojih je započeta indukciona terapija, i predstavlja najvažniju determinantu rane smrtnosti (pored starosne dobi i performans statusa) [61]. Faktori koji utiču na razvoj infekcije su dubina i dužina trajanja neutropenije, komorbiditeti, komplikacije (krvarenje, dehidratacija, jetrena lezija,…), prisustvo centralnog venskog katetera i dr. Povišena telesna temperatura, kao glavni znak infekcije, se javlja u više od 80% obolelih od hematoloških maligniteta nakon hemioterapije. Bakterijemija je prisutna u oko 10-25% febrilnih epizoda kod bolesnika sa febrilnom

neutropenijom [62,63]. Poslednjih par decenija je došlo do promene u glavnim bakterijskim uzročnicima infekcija, tzv. šift sa gram negativnih na gram pozitivne uzročnike. U zemljama u razvoju, gram negativne bakterije su i dalje vodeći uzročnici infekcija, s obzirom na ređu upotrebu antibiotske profilakse fluorohinolonima i ređu upotrebu centralnih venskih katetera [64]. Poslednjih godina se posebna pažnja pridaje multirezistentnim bakterijama (ESBL *(extended-spectrum β-lactamase)* ili karbapenemaza-produkujuće *Enterobacteriaceae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa, Stenotrophomonas maltophilia, methicilin-resistan S.aureus (MRSA), vancomycin-resistant enterococci (VRE)* i dr.), kao uzročnicima potencijalno fatalnih intrahospitalnih infekcija kod obolelih od AML [65]. Klinička prezentacija (komplikovana/nekomplikovana), poznata kolonizacija/prethodna infekcija rezistentnim bakterijama, kao i lokalna bakteriološka epidemiološka situacija, u velikoj meri diktiraju izbor i pristup (eskalacioni/deeskalacioni) inicijalnoj antibiotskoj terapiji [66]. Pored bakterijskih, među infektivnim agensima, značajno mesto zauzimaju i invazivne gljivične infekcije (najčešći uzročnici su iz roda *Candida* i *Aspergillus*). Na gljivičnu infekciju treba posumnjati kod neutropeničnog bolesnika kod koga temperatura ne prolazi ni posle četiri do sedam dana upotrebe širokospektralnih antibiotika (perzistentna temperatura) [67]. Individualni pristup, u odnosu na rizik od razvoja invazivne gljivične infekcije, uz upotrebu empirijske i preemptivne antigljivične terapije (ukoliko je pozitivan nalaz na CT-u grudnog koša i/ili galactomannan test), značajno su poboljšale ishod gljivičnih infekcija kod AML [68]. Iako su virusne infekcije od manjeg značaja kod obolelih od AML, poslednjih godina se ističe i značaj pandemijskih sojeva virusa gripe (tipa Influenza A H1N1), kao potencijalno fatalnih za ove, imunokompromitovane bolesnike [69,70,71]. Preporuka je da se sprovode preventivne mere, ne samo kod

transplantiranih i kod onih bolesnika sa AML koji se leče samo hemioterapijom, već i kod medicinskog osoblja, odnosno članova domaćinstava obolelih [72].

Krvarenje, pre svega intrakranijalno, predstavlja drugi vodeći uzrok smrti kod obolelih od AML. Učestalost intrakranijalne hemoragije u AML je veća u odnosu na druge hematološke malignitete i iznosi oko 6%, s tim da bolesnici sa akutnom promijelocitnom leukemijom (M3 po FAB) imaju značajno viši rizik za razvoj ove, po pravilu, fatalne komplikacije [73]. Klinički se intrakranijalna krvarenja najčešće prezentuju promenama mentalnog statusa i glavoboljom, a prema lokalizaciji su najčešća intraparenhimalna krvarenja [74]. Krvarenje u AML je uzrokovano hemoragijskom dijatezom, tako da su glavni predisponirajući faktori za razvoj intrakranijalne hemoragije trombocitopenija, sepsa, produženje protrombinskog vremena, diseminovana intravaskularna koagulacija, visok broj leukocita i cirkulišućih blasta, toksičnost hemioterapije. Rana fatalna intrakranijalna hemoragija (koja se javlja do sedam dana od postavljanja dijagnoze AML) u odnosu na kasnu fatalnu intrakranijalnu hemoragiju, je povezana sa višim brojem leukocita, tj. cirkulišućih blasta, dužim protrombinskim vremenom i nižim nivoom fibrinogena [74]. Nakon doživljene intrakranijalne hemoragije u AML, nekoliko laboratorijskih i kliničkih parametara (nizak albumin, visok LDH u momentu krvarenja, starija dob, više od jedne primenjene hemioterapije), mogu poslužiti za procenu mortaliteta i shodno tome, potrebe za agresivnijim pristupom (neurohirurška intervencija) u tretiranju onih bolesnika sa proračunatim nižim mortalitetom [74]. Bolesnici sa subarahnoidalnom hemoragijom imaju ekstremno visoku stopu mortaliteta, u odnosu na bolesnike sa subduralnom hemoragijom. S obzirom na lošu prognozu kod bolesnika sa intrakranijalnom hemoragijom, izuzetno je bitno sprovoditi preventivne mere, a pre svega korekciju trombocitopenije, hipoprotrombinemije,

hipofibrinogenemije, redukciju hiperleukocitoze, lečenje infekcije, kao i ranu primenu *all* trans retinoične kiseline (ATRA) u akutnoj promijelocitnoj leukemiji.

1.6. Dijagnoza i klasifikacija akutne mijeloidne leukemije

Definitivna dijagnoza AML se postavlja na osnovu citomorfološke, citohemijske analize, analize imunofenotipa blasta putem multiparametarske protočne citometrije (ili, u slučaju suve punkcije, imunohistohemijskom analizom bioptata koštane srži), uz citogenetsku (konvencionalna citogenetska analiza i FISH-fluorescentna *in situ* hibridizacija) i molekularno genetsku analizu uzorka koštane srži [76]. Sve navedene analize su međusobno komplementarne, s tim da je citomorfološka analiza ćelija periferne krvi i aspirata koštane srži temelj postavljanja dijagnoze. Za postavljanje dijagnoze AML neophodno je prisustvo 20% ili više blasta u koštanoj srži (pri brojanju na 500 ćelija sa jedrom u razmazu koštane srži), izuzev za AML sa t (15;17), t (8;21), inv(16) ili t (16;16), kada se dijagnoza postavlja i pri manjem stepenu infiltracije koštane srži, kao i u nekim slučajevima eritroleukemija (gde se procenat blasta od 20% i više, računa u odnosu na neeritroidne ćelije, uz uslov da u koštanoj srži eritroblasti čine više od 50% ćelija) [22,24,76,77]. Kod postavljanja dijagnoze AML, u blaste se ubrajaju mijeloblasti, monoblasti i megakarioblasti, kao i promonociti (ekvivalenti blasta u svim tipovima AML), odnosno promijelociti (ekvivalenti blasta samo u akutnoj promijelocitnoj leukemiji) [76,24]. Eritroblasti se ubrajaju u računanje procenta blasta samo u slučaju čiste (eng. *pure*) akutne eritroleukemije, kada čine ≥80% svih ćelija sa jedrom u koštanoj srži [77]. Za određivanje linijske pripadnosti blasta koriste se citohemijska bojenja (MPO-mijeloperoksidaza ili SBB-*Sudan black B*, NSE-nespecifična esteraza i PAS-*periodic acid Schiff*) i imunofenotipizacija. Imunofenotipizacija

protočnom citometrijom ne može da zameni citomorfološku evaluaciju u utvrđivanju procenta blasta, ali je neophodna kod postavljanja dijagnoze određenih tipova (mijeloperoksidaza negativnih) AML: AML sa minimalnom diferencijacijom (M0) i akutne megakarioblastne leukemije (M7), odnosno u diferencijalnoj dijagnozi AML sa koekspresijom limfoidnih markera i akutne leukemije neutvrđene linije (akutne nediferentovane i akutne leukemije mešanog fenotipa) [78].

AML je, u osnovi, veoma heterogeno oboljenje, sa različitim citogenetskim i molekularnim promenama, zbog čega se deli u različite kliničke i biološke entitete, sa različitim tokom, odgovorom na terapiju i sveukupnim preživljavanjem [79]. Decenijama unazad u širokoj upotrebi je klasifikacija akutnih mijeloidnih leukemija prema FAB (francusko-američko-britanska grupa autora) [80]. Prema FAB klasifikaciji, koja se temelji na citomorfološkim i citohemijskim karakteristikama blasta, izvršena je podela na osam tipova AML, od M0 do M7. Međutim, aktuelna podela AML, koju je predložila i prihvatila Svetska zdravstvena organizacija (SZO) 2008. godine, deli AML u određene biološke kategorije, prevashodno na osnovu genetskih (citogenetskih i molekularno genetskih) i kliničkih podataka (prethodna hemioterapija, prethodna dijagnoza mijelodisplastičnog sindroma, Down-ov sindrom) (tabela 2) [24].

Sa ciljem što preciznijeg kategorisanja AML i sužavanja kruga AML koje nisu na drugi način definisane (AML, NOS), a koje i dalje čine oko 25-30% svih AML, u novoj klasifikaciji SZO su izdvojena i tri nova citogenetska entiteta: AML sa t(6;9)(p23;q34); DEK-NUP214, AML sa inv(3)(q21q26.2) ili t(3;3)(q21;q26.2); RPN1-EVI1, AML (megakarioblastna) sa t(1;22)(p13;q13); RBM15-MKL1. Takođe, izdvajaju se i dva proviziona entiteta: AML sa nukleofozmin 1 mutacijom i AML sa mutiranim CEBPA, s obzirom na prognostički značaj, posebno u AML sa normalnim kariogramom [24].

Tabela 2. Podela AML prema Svetskoj zdravstvenoj organizaciji iz 2008.

AML sa rekurentnim citogenetskim abnormalnostima
AML sa t(8;21)(q22;q22); RUNX1-RUNX1T1
AML sa inv(16)(p13.1q22) ili t(16;16)(p13.1;q22); CBFB-MYH11
APL sa t(15;17)(q22;q12); PML-RARA
AML sa t(9;11)(p22;q23); MLLT3-MLL
AML sa t(6;9)(p23;q34); DEK-NUP214
AML sa inv(3)(q21q26.2) ili t(3;3)(q21;q26.2); RPN1-EVI1
AML (megakarioblastna) sa t(1;22)(p13;q13); RBM15-MKL1
Provizioni entitet: AML sa mutiranim NPM1
Provizioni entitet: AML sa mutiranim CEBPA
AML sa promenama koje su u vezi sa mijelodisplazijom
Prisustvo ≥20% blasta i podatak o prethodnom MDS ili MDS/MPN, ili
prisustvo citogenetskih abnormalnosti povezanih sa MDS * ili
prisustvo multilinijske displazije (u minimum dve linije, najmanje 50% ćelija displastično) uz odsustvo podatka o ranije primljenoj citotoksičnoj terapiji, odnosno u odsustvu rekurentnih citogenetskih abnormalnosti.
AML koje nisu na drugi način definisane *(NOS-not otherwise specified)*
AML sa minimalnom diferencijacijom (M0 prema FAB)
AML bez sazrevanja (M1 prema FAB)
AML sa sazrevanjem (M2 prema FAB)
Akutna mijelomonoblastna leukemija (M4 prema FAB)
Akutna monoblastna/monocitna leukemija (M5a/M5b)
Akutna eritroidna leukemija (M6 prema FAB)
Akutna megakarioblastna leukemija (M7 prema FAB)
Akutna bazofilna leukemija
Akutna panmijeloza sa mijelofibrozom
Mijeloidni sarkom
AML u vezi sa Down-ovim sindromom
Neoplazma blastnih plazmocitoidnih dendritičnih ćelija

***** -kompleksni kariotip (definisan kao tri ili više hromozomskih abnormalnosti, koje ne uključuju rekurentne hromozomske abnormalnosti)- nebalansirane promene: -7 or del(7q); -5 or del(5q); i(17q) or t(17p); -13 or del(13q); del(11q); del(12p) or t(12p); del(9q); idic(X)(q13); - balansirane translokacije: t(11;16)(q23;p13.3); t(3;21)(q26.2;q22.1); t(1;3)(p36.3;q21.1); t(2;11)(p21;q23); t(5;12)(q33;p12); t(5;7)(q33;q11.2); t(5;17)(q33;p13); t(5;10)(q33;q21); t(3;5)(q25;q34)

1.7 Terapija i odgovor na terapiju

Standardna šema lečenja kod bolesnika sa non-M3 AML obuhvata uvodnu (indukcionu) terapiju sa ciljem postizanja kompletne remisije, na koju se nadovezuje postremisiona (konsolidaciona) terapija u vidu intenzivne hemioterapije i/ili autologe, odnosno alogene transplantacije matične ćelije hematopoeze (MĆH). Cilj konsolidacione terapije je prevencija relapsa, kao najčešće manifestacije rezistencije na terapiju i posledičnog neuspeha terapije. Verovatnoća rezistencije na terapiju se može predvideti na osnovu tipa AML (de novo *versus* sekundarna), citogenetsko/molekularnih karakteristika blasta, kao i procene odgovora na terapiju (vreme, odnosno broj ciklusa do postizanja remisije, praćenje minimalne rezidualne bolesti i dr.). Drugi bitan uzrok neuspeha terapije je mortalitet vezan za terapiju (*treatment-related mortality*), na koga uglavnom utiče dob bolesnika, ali se poslednjih godina ističu i druge bitne kovarijable, pre svega performans status i komorbiditet [81]. Savremeni pristup izboru terapije kod AML se bazira, pre svega, na proceni prognoze (*risk adapted therapy*), uzimajući u obzir faktore koji utiču na rezistenciju na terapiju i mortalitet vezan za terapiju [82]. Detaljnije o stratifikaciji obolelih od AML u odnosu na prognozu videti u narednom poglavlju (1.8. Prognostički faktori od značaja u AML).

1.7.1 Indukciona terapija

Odluke o inicijalnom lečenju kod AML se uglavnom donose u odnosu na kliničke podatke, kao što su životna dob, performans status, tip AML (de novo/sekundarna), s obzirom da nalazi bitnih prognoznih markera (citogenetika i molekularni markeri) uglavnom nisu dostupni

pre započinjanja indukcije. Kod planiranja lečenja, za arbitrarnu granicu životne dobi uzima se 60 godina, mada hronološka starost nije presudna, jer i stariji bolesnici, bez većih komorbiditeta, uz očuvani funkcionalni (perfomans) status, mogu imati benefita od standardne (intenzivne) indukcione terapije, pogotovu kada se radi o citogenetski/molekularno povoljnoj grupi. Pod standardnom indukcionom terapijom se, decenijama unazad, smatra kombinacija antraciklina (daunorubicina ili idarubicina) i citarabina ("3+7" protokol). Iako se pokušalo sa modifikacijama standardnog indukcionog protokola (korišćenjem visokih doza citarabina u indukciji, dodavanje etopozida i slično), nije se mogla dokazati prednost u preživljavanju u odnosu na zlatni standard "3+7" protokol [83-85]. Poslednjih godina se, u okviru standardnog indukcionog protokola, preporučuje eskalacija doze daunorubicina sa standardnih 45 mg/m^2 na 60 do 90 mg/m^2 tri dana, što bi odgovaralo ekvivalentnim dozama idarubicina od 12 mg/m^2 tri dana, uz kontinuiranu infuziju citarabina u dozama od 100-200 mg/m^2 u trajanju od sedam dana [86]. Pokazano je da eskalacija doze daunorubicina dovodi do povećane stope remisija i utiče na ukupno preživljavanje, posebno kod mlađih bolesnika sa povoljnom i intermedijarnom citogenetikom [87,88]. Mutacioni profil kod bolesnika mlađih od 60 godina, može izdvojiti grupu (oni sa DNMT3a ili NPM1 mutacijom ili MLL translokacijom), kod koje će eskalacija doze daunorubicina dovesti do poboljšanja preživljavanja [89]. Poljska grupa za adultnu leukemiju je pokazala da dodatak kladribina standardnoj indukcionoj terapiji ipak može poboljšati stopu kompletnih remisija i sveukupno preživljavanje kod mlađih bolesnika, te je protokol sa daunorubicinom, citarabinom i kladribinom uvršten kao kategorija 1 prema NCCN (*National Comprehensive Cancer Network*) preporukama iz 2013. godine [86,90]. S druge strane, kod starijih bolesnika sa nelečenom AML, dodatak gemtuzumab ozogamicina standardnim indukcionim režimima poboljšava sveukupno preživljavanje, bez dodatne toksičnosti [91,92].

Stariji bolesnici, koji nisu kandidati za standardnu indukciju (loš perfomans, komorbiditeti), mogu se lečiti niskim dozama subkutanog citozara (20 mg citarabina dva puta dnevno subkutano deset dana na 4-6 nedelja), hipometilirajućim agensima (posebno oni sa 20-30% blasta u koštanoj srži), monoterapijom klofarabinom, ili su pak kandidati za palijativno zbrinjavanje (transfuziona podrška, prevencija i lečenje infekcije, hidroksiurea za kontrolu leukocitoze) [93]. Bolesnici kod kojih je dijagnoza visokorizične AML (uključujući citogenetsko/molekularne markere) postavljena pre započinjanja indukcije, su kandidati za eksperimentalnu terapiju (kliničke studije) i ranu HLA tipizaciju i potragu za davaocem matičnih ćelija hematopoeze (MĆH), jer se standardnom indukcijom ne postižu zadovoljavajući rezultati [94].

1.7.2. Postremisiona terapija

Posle postizanja kompletne remisije, neophodno je lečenje nastaviti konsolidacijom, sa ciljem prevencije relapsa. U ovom trenutku lečenja su pristigli svi inicijalno uzeti nalazi, koji će omogućiti adekvatnu risk stratifikaciju bolesnika, na osnovu koje će se bazirati izbor postremisione terapije (videti poglavlje 1.8.).

Za bolesnike sa dobrom prognozom (CBF AML, kao i NK AML sa NPM1 mutacijom i bez FLT3 ITD mutacije, odnosno $CEBPA^{double\ mut}$) preporuka je intenzivna hemioterapija visokim dozama citarabina (2-3 g/m^2, dva puta dnevno, 1, 3. i 5. dana), tri do četiri konsolidaciona ciklusa [95]. Međutim, postoje indicije i da su manje doze citarabina (1,0 do 1,5 g/m^2 na 12h, 6 dana) jednako efikasne kao standardne visoke doze [96]. Alternativa za bolesnike iz grupe sa dobrom prognozom, i selektovanih bolesnika iz grupe sa intermedijarnom prognozom, je i visokodozna terapija praćena autologom transplantacijom MĆH, obično nakon

1-2 ciklusa standardne konsolidacije [76]. Alogena transplantacija nije indikovana u prvoj remisiji kod bolesnika sa dobrom prognozom (iako se dugogodišnje preživljavanje kod CBF AML postiže samo u oko 50%), već je rezervisana za slučaj relapsa bolesti (u drugoj kompletnoj remisiji) [97]. Ako se izuzme grupa sa povoljnom prognozom, alogena transplantacija MĆH je predložena kao odgovarajući oblik postremisione terapije, u prvoj kompletnoj remisiji, praktično za sve ostale riziko grupe, a posebno kod bolesnika sa visokim rizikom od relapsa, a relativno niskim ili intermedijarnim rizikom od transplantacije, tzv. nerelapsni mortalitet [76]. Alogena transplantacija je modalitet lečenja AML, povezan sa najmanjom stopom relapsa, što se pripisuje ne samo dejstvu visokodozne terapije, već i T ćelijama posredovanom *graft versus leukemia* efektu. Upotrebom HLA tipizacije visoke rezolucije, omogućeno je pronalaženje visoko podudarnog nesrodnog davaoca (*fully matched unrelated donor*) za većinu bolesnika, a rezultati transplantacije u smislu sveukupnog preživljavanja su komparabilni sa rezultatima transplantacije od srodnog podudarnog davaoca [98,99]. S druge strane, postoje i alternativni izvori za transplantaciju, kao što su matične ćelije porekla pupčanika i haploidentične srodne transplantacije, potonje se sprovode obično kod mlađih, visokorizičnih bolesnika, koji nemaju vremena za pretragu za nesrodnog, odnosno nemaju srodnog podudarnog davaoca [100].

Nema standardnog pristupa postremisionoj terapiji kod starijih bolesnika sa AML, niti postoje randomizovane studije koje su potvrdile korist postremisione terapije u ovoj grupi bolesnika. Oni koji su dobrog performansa, bez komorbiditeta, sa normalnim ili niskorizičnim kariogramom, mogu primiti 1-2 ciklusa konsolidacije, obično monoterapijom citarabinom (1,0-1,5g/m^2/d x 4-6 doza) [86,93]. Ostale opcije su kliničke studije, kombinacija antraciklina i citarabina (npr. "2+5"), alogena transplantacija uz primenu režima redukovanog intenziteta kondicioniranja (RIC) [86].

Poseban klinički problem predstavljaju primarno refrakterne i AML u relapsu bolesti, gde jedino alogena transplantacija daje izgleda za višegodišnje preživljavanje. Iako postoje brojna otvorena pitanja u vezi sa transplantacijom u relapsu bolesti (da li primeniti reindukciju pre transplantacije ili ne, primena *kombo* režima (kombinacija lekova koji se koriste u reindukciji i u okviru kondicionih režima), broj ciklusa terapije pre transplantacije, preemptivna primena *salvage* protokola na osnovu nalaza pozitivne minimalne rezidualne bolesti, itd.), jedno je izvesno - ako bolesnik postigne sekundarnu remisiju i ako ima odgovarajućeg donora, apsolutno je indikovana alogena transplantacija MĆH [101]. Ishod terapije u relapsu se može predvideti na osnovu: dužine trajanja prve remisije (rani relaps podrazumeva trajanje remisije manje od šest meseci), starosne dobi u vreme relapsa, citogenetsko/molekularne riziko kategorije na prezentaciji, i da li je već primenjena transplantacija u prvoj remisiji ili ne [102]. Standardni *salvage* protokoli za reindukciju su protokoli koji sadrže purinske analoge, npr. fludarabin (protokol FLAG-Ida), potom visoke doze citarabina sa/bez antraciklina, kao i kombinacija mitoksantrona i vepezida, i slični, a sa druge strane su eksperimentalni *salvage* protokoli (kliničke studije), koje se preporučuju uglavnom bolesnicima sa nepovoljnim prognoznim indeksom (kojih je i najviše, oko 2/3 bolesnika u prvom relapsu).

1.7.3. Inovativni lekovi

Upotrebom visoke tehnologije sekvencioniranja DNK, došlo je do otkrivanja novih mehanizama u procesu leukemogeneze, a samim tim i potencijalnih mesta za ciljano delovanje hemioterapeuticima, što daje nadu za dalju individualizaciju terapije AML. U toku su brojna klinička ispitivanja lekova iz grupe kinaznih inhibitora (FLT3 inhibitori, cKIT inhibitori,

inhibitori Aurora i polo-like kinaza, i dr.), potom epigenetska terapija (hipometilirajući agensi, inhibitori histondeacetilaze, DOT1l inhibitori,…), hemosenzitirajući agensi (CXCR4 inhibitori), kao i brojni imunoterapeutici u razvoju [103].

1.7.4. Odgovor na terapiju

Procena odgovora na primenjenu terapiju, kod konvencionalne indukcione terapije, vrši se 28.dana indukcije, s tim da se procena vrši na 200 ćelija sa jedrom u aspiratu koštane srži sa spikulama. Cheson i sararadnici su definisali kriterijume odgovora na primenjenu hemioterapiju (tabela 3) [104]. Kod onih koji primaju intenzivnu hemioterapiju, većina studija navodi da je stopa kompletnih remisija kod mlađih bolesnika oko 70%, dok je kod starijih (preko 60 godina) između 40% i 60% [95]. Godine 2003. uvode se i kategorije odgovora koje ne ispunjavaju stroge kriterijume kompletne remisije (CR), tzv. CRi (kompletna remisija sa nepotpunim oporavkom), odnosno CRp (ako uz ostale kriterijume kompletne remisije, nije došlo do oporavka trombocita (trombociti ispod $100x10^9$/l), a pri tome ne postoji potreba za transfuzijama koncentrata trombocita). Walter i saradnici su istakli klinički značaj "odgovora manjih od kompletne remisije" na preživljavanje, koje je lošije od onih koji su postigli kompletnu remisiju, ali ipak bolje od onih koji nisu uspeli da postignu CR ili CRi [105]. Kod upotrebe novijih lekova, npr. hipometilacionih agenasa (azacitidin), akcenat je na preživljavanju, a ne na postizanju kompletne remisije, s obzirom da se efekat ove terapije očekuje tek posle nekoliko (4 do 6) ciklusa terapije [106,107]. Citogenetska kompletna remisija podrazumeva reverziju normalnog kariograma kod onih koji su u CR/CRi, a koji su inicijalno imali abnormalni kariogram. Za sada ne postoji standardna definicija molekularne kompletne remisije.

Tabela 3. Procena odgovora na terapiju (prema referenci br.104)

Kategorija	Definicija
Kompletna remisija **(CR)**	Blasti u KS ≤5%, odsustvo Auerovih štapića u blastima; odsustvo ekstramedularne bolesti; neutrofili ≥1,0x10^9/l, tombociti ≥100 x10^9/l, transfuziona nezavisnost
Kompletna remisija sa nepotpunim odgovorom **(CRi)**	Svi kriterijumi za CR, izuzev rezidualne neutropenije (ispod 1,0 x10^9/l) ili trombocitopenije (ispod 100 x10^9/l)
Parcijalna remisija **(PR)**	Smanjenje blasta u KS na 5-25% ili za najmanje 50%, uz uslov da su neutrofili ≥1,0x10^9/l, trombociti ≥100 x10^9/l.
Citogenetska kompletna remisija	Reverzija inicijalno abnormalnog kariotipa u normalan, kod bolesnika koji je postigao CR/CRi
Molekularna kompletna remisija	Nema standardne definicije
Neuspeh terapije	
Rezistentna bolest	Nepostizanje CR, CRi ili PR kod bolesnika koji su preživeli više od 7 dana od završetka indukcije (dokaz perzistentne leukemije u krvi ili KS)
Smrtni ishod u aplaziji	Smrtni ishod nakon 7 dana od završetka indukcije, sa citopenijom u krvi; aplastičnom/hipoplastičnom KS analiziranom unutar sedam dana pre smrti, bez znakova perzistentne leukemije
Smrtni ishod usled drugog uzroka	Smrtni ishod pre završetka, odnosno manje od 7 dana nakon završetka indukcije ili više od 7 dana od završetka terapije, bez blasta u krvi
Relaps	Ponovna pojava blasta u krvi ili u KS (više od 5%) ili nastanak ekstramedularne bolesti

1.8. Prognostički faktori od značaja u akutnoj mijeloidnoj leukemiji

Prognoza obolelih od AML, na osnovu koje se temelji i odluka o načinu lečenja, je određena brojnim faktorima, od kojih su neki u vezi sa bolesnikom (kao što su dob, performans status, komorbiditeti), a neki u vezi sa samom bolesti (inicijalni broj leukocita, postojanje prethodne mijelodisplazije ili primena citotoksične terapije, citogenetske i molekularne promene u leukemijskim ćelijama pri postavljanju dijagnoze) [76].

1.8.1. Standardni prognostički faktori od značaja u akutnoj mijeloidnoj leukemiji

Starija životna dob (arbitrarna granica, za obolele od AML, je 60 godina) predstavlja nepovoljan prognostički činilac. Sa godinama raste broj komorbiditeta, takođe je lošiji i performans status, a sa druge strane menja se i biologija leukemije (veća je učestalost sekundarnih leukemija, nepovoljnih citogenetskih abnormalnosti (uključujući kompleksni kariotip), kao i ekspresije MDR (*multidrug resistance*) gena [108]. Starija dob nije sama za sebe kontraindikacija za primenu intenzivne terapije u standardnim dozama, već u razmatranje svakako treba uzeti performans status, komorbiditetni indeks, de novo/sekundarna AML [81,109,110]. Samo prisustvo nepovoljne citogenetike ne bi trebalo da utiče na odluku da se kod starijih bolesnika inicijalno ne pokuša postizanje kompletne remisije (kompletnu remisiju postigne oko 25-30% onih sa nepovoljnom citogenetikom) [110].

Inicijalno visok broj leukocita (iznad 100 x 10^9/L, u slučaju M3 iznad 10 x 10^9/L), kao indirektni pokazatelj veličine tumorske mase, predstavlja loš prognostički faktor [54,111]. U tradicionalno loše prognostičke faktore spada i sekundarna AML, nastala iz prethodne klonske hematološke bolesti (MDS ili mijeloproliferativna neoplazma) [111-113]. I dalje ostaje diskutabilno pitanje da li je prognozni uticaj multilinijske displazije posledica češće udruženosti ovog tipa AML sa nepovoljnim citogenetskim promenama i starijom životnom dobi, ili sama za sebe predstavlja nezavisni prognostički faktor [113,114].

Konvencionalna citogenetska analiza blasta, sprovedena na početku bolesti, je najznačajniji nezavisni prognostički faktor u predviđanju ishoda oboleleih od AML [115-119]. Na osnovu citogenetike, izvršena je podela u tri grupe bolesnika (povoljna, intermedijarna, nepovoljna) u odnosu na prognozu [76,120]. Grupu sa povoljnom prognozom čine *core binding*

factor (CBF) AML: AML sa t (8;21) i AML sa inv(16) ili t(16;16), kao i akutna promijelocitna leukemija, u čijoj osnovi je t(15;17). Uticaj sekundarnih citogenetskih abnormalnosti na prognozu CBF AML nije u potpunosti definisan, osim prisustva trizomije 22, koja predstavlja povoljan prognostički faktor u AML sa inv (16) [97]. Većina studija se slaže da grupu sa nepovoljnom prognozom čine monozomije hromozoma 5 i 7, del (5q), abn (3q), AML sa MLL (mixed lineage leukemia) rearanžmanom (11q23) izuzev t (9;11), potom t (6;9), abn (17p), kao i kompleksni kariotip (sa tri i više hromozomskih aberacija). Prisustvo monozomalnog kariotipa (MK) (dve ili više autozomalne monozomije, odnosno jedna autozomalna monozomija sa dodatnom strukturnom abnormalnošću) predstavlja grupu sa veoma lošom prognozom [121,116,122]. Učestalost monozomalnog kariotipa raste sa godinama (20% obolelih preko 60 godina ima MK), i negativno utiče na već lošu prognozu obolelih sa kompleksnim kariotipom [123]. AML sa normalnim kariotipom, potom AML sa t (9;11), kao i ostale citogenetske promene koje nisu kvalifikovane kao povoljne ili nepovoljne, čine veliku grupu sa nedovoljno definisanom-intermedijarnom prognozom. Iako nezaobilazna u risk stratifikaciji obolelih od AML, konvencionalna citogenetika ima i nekoliko svojih ograničenja: oko 40-50% AML ima normalan kariotip, takođe postoje i skriveni hromozomski rearanžmani, kao i mogućnost neuspelih citogenetskih analiza [123].

1.8.2. Molekularni markeri i prognoza u akutnoj mijeloidnoj leukemiji

Poslednjih desetak godina, otkrivena je čitava paleta molekularnih markera u AML (mutacije različitih gena i poremećaja ekspresije gena), koji su delom doprineli razjašnjenju leukemogeneze, a delom proceni prognoze AML, posebno unutar grupe sa normalnim

kariotipom (CN AML) [124]. Od molekularnih markera-NPM1 mutacija, FLT3 ITD (unutrašnja tandem duplikacija) mutacija i CEBPA imaju već potvrđeni prognostički značaj, posebno u okviru CN AML i zajedno sa citogenetikom, predstavljaju osnov za podelu u određene prognostičke grupe [76,125,126].

Mutacija FLT3 gena spada u jednu od najčešćih mutacija u AML (25-35% bolesnika), a postoje dve klase aktivirajućih FLT3 mutacija: unutrašnja tandemska duplikacija (ITD-*internal tandem duplication*) u kodirajućoj sekvenci za jukstamembranski domen receptora i tačkasta mutacija (obično D835) unutar aktivacione petlje tirozin kinaznog domena (TKD-*tyrosine kinase domain*). FLT3-ITD mutacija je prisutna u oko 30% CN AML i potvrđen je njen negativni prognostički uticaj kod ovih bolesnika [127-129]. Na prezentaciji, bolesnici sa FLT3-ITD mutacijom, tipično imaju veliku tumorsku masu (visok procenat blasta u koštanoj srži i perifernoj krvi, praćen leukocitozom) i obično de novo AML. Iako je stopa remisija kod FLT3-ITD pozitivnih i FLT3-ITD negativnih AML na približno istom nivou, FLT3-ITD pozitivne AML su sklone brzim relapsima (unutar 6-7 meseci), a u relapsu po pravilu ne reaguju na primenjenu konvencionalnu *salvage* terapiju [130]. FLT3-ITD mutacija je često udružena sa NPM 1 mutacijom i/ili DNMT3a mutacijom. Ne samo prisustvo/odsustvo FLT-ITD mutacije, već i visok odnos mutiranog FLT3-ITD/*wild type* alela ima negativan prognostički značaj [131-133]. U relapsu FLT3-ITD pozitivne AML, često dolazi do gubitka FLT3 *wild type* alela mehanizmom stečene uniparenteralne dizomije hromozoma 13q, što dovodi do homozigotne FLT3 mutacije i delom objašnjava mehanizam progresije bolesti [134,135]. Za razliku od FLT3-ITD mutacije, FLT3-TKD se ređe javlja (oko 7% CN AML) i nije potvrđen njen nezavisni prognostički značaj [136].

AML sa nukleofozmin 1 (NPM1) mutacijom predstavlja zaseban entitet, što je prepoznato i u klasifikaciji SZO iz 2008. godine [137]. NPM1 mutacija je najčešća mutacija u AML sa normalnim kariotipom (učestalost oko 50%) i relativno je specifična za AML. U 85% AML sa NPM1 mutacijom je prisutan normalan kariogram, a NPM1 mutacija je udružena i sa leukocitozom, AML M4/M5, CD34 negativnim AML i obično dobrim odgovorom na indukcionu terapiju [36]. Neretko je NMP1 mutacija udružena sa drugim molekularnim markerima, posebno FLT3-ITD mutacijom (u oko 40% slučajeva) [138]. Prisustvo invaginacija jedra u blastima (tzv. *cup like* nukleusi) predstavljaju citološki znak, koji može da ukaže na prisustvo NPM1 i/ili FLT3-ITD mutacije [139,140]. Prognoza AML sa NPM1 mutacijom, ali bez prisustva FLT3-ITD mutacije, je slična prognozi koju imaju CBF AML [127,141].

AML sa mutiranim CEBPA genom (*CCAAT/Enhancer-Binding Protein gene α*), genom odgovornim za granulocitnu diferencijaciju, predstavlja još jedan provizioni entitet u klasifikaciji mijeloidnih neoplazmi SZO. Učestalost CEBPA mutacije u AML je između 5% i 14% [142]. Većina CEBPA mutacija su dvostruke alelske mutacije ($CEBPA^{double\text{-}mut}$) i samo kao takva predstavlja povoljni prognostički marker kod CN AML [143]. $CEBPA^{double\text{-}mut}$ se, po pravilu, ne javlja udružena sa NPM1 mutacijom, a vrlo retko je udružena sa FLT3-ITD mutacijom.

Mutacija u genu za c KIT (stem ćelijski faktor receptor), koja dovodi do ligand nezavisne aktivacije receptorske tirozin kinaze, prisutna je u oko trećine CBF AML i predstavlja faktor loše prognoze (veća incidenca relapsa i kraće preživljavanje) kod ove grupe bolesnika [144]. RAS mutacije su relativno česte u CBF AML (u 10-20% AML sa t(8;21) i 35-50% AML sa inv(16)), ali nije utvrđen njihov prognostički značaj [97].

Pored navedenih molekularnih markera, postoji čitav niz molekularnih markera sa još nepotvrđenim prognoznim značajem, koji se za sada ne preporučuju u rutinskoj kliničkoj praksi (tabela 4).

Tabela 4. Mutacije od prognostičkog značaja za AML (modifikovano iz reference 145)

Mutacija	Učestalost u CN AML (%)	Uticaj na prognozu
FLT3 ITD	25-35	nepovoljan (posebno ako je visok odnos mut/*wild type* alela)
FLT3 TKD	5-10	kontraverzno
NPM1	45-60	povoljan, ukoliko je FLT3 ITD neg.
CEBPA	10-15	povoljan (posebno ako su oba alela mutirana)
DNMT3A	27,2-33,7	nepovoljan (zavisno od uzrasta i tipa mutacije)
IDH1	7,6-13,6	nepovoljan u CN AML, kontraverzno
IDH2	8,7-19	nepovoljan kod starijih (posebno R172), kontraverzno
TET2	23	nepovoljan u okviru ELN povoljne risk grupe, kontraverzno
ASXL1	10,4	nepovoljan u okviru ELN povoljne risk grupe
RUNX1	6,3-13,2	nepovoljan, i dalje se ispituje prognozni uticaj
WT1	10-13	nepovoljan, kontraverzno
MLL-PTD	11	nepovoljan

Među molekularnim markerima, posebnu grupu čine mutacije, koje učestvuju u epigenetskim promenama u AML, a prema učestalosti i značaju ističe se mutacija u DNA metiltransferazi 3A (DNMT3A). DNMT3A mutacija je jedna od najčešćih mutacija u CN AML sa učestalošću oko jedne trećine slučajeva [146]. U većini istraživanja, DNMT3A mutacija je loš prognozni marker kod AML sa intermedijarnom prognozom [147-149]. Prema pojedinim istraživanjima, prognozni značaj DNMT3A mutacije zavisi od starosne dobi i tipa mutacije (R-882 vs non-R882) [146]. DNMT3A mutacija je često udružena sa NPM1 i/ili FLT3 mutacijom, a na dominantno negativan uticaj DNMT3A mutacije na prognozu CN AML ne utiču prisustvo NPM1 i FLT3 mutacije [31,150]. Za razliku od DNMT3A mutacije, čija uloga u patogenezi AML nije u potpunosti razjašnjena, uloga i mesto mutacije gena za IDH 1 i 2 (izocitrat

dehidrogenaza 1 i 2), kao i TET 2 (*ten-eleven translocation 2*) u leukemogenezi su relativno jasni (ove mutacije se međusobno isključuju, s obzirom na preklapajuće biološke efekte), ali o prognostičkom značaju ovih markera i dalje postoje kontradiktorni podaci [151,152].

1.8.3. Prognostički modeli u akutnoj mijeloidnoj leukemiji

S obzirom na heterogenost AML (posebno CN AML) i veliki broj citogenetskih/molekularnih markera, postoje različiti prognostički modeli, koji se, većinom, baziraju na kombinaciji citogenetskih i nekoliko molekularnih markera. Aktuelne risk stratifikacije predložene od strane ELN (*European LeukemiaNet*) i NCCN (*National Comprehensive Cancer Network*), temelje se na citogenetskim/molekularnim markerima sa već potvrđenim značajem (tabele 5 i 6) [76,153].

Tabela 5. Prognostičke grupe AML prema NCCN vodiču

Risk grupa	Citogenetika	molekularni markeri
povoljna	inv (16) ili t(16;16) t(8;21) t (15;17)	normalna citogenetika: NPM1 mutacija u odsustvu FLT-ITD ili izolovana bialelska CEBPA mut
intermedijarna	normalna citogenetika +8 izolovana t (9;11), druge nedefinisane	t(8;21), inv (16), t(16;16): sa c-KIT mutacijom
nepovoljna	kompleksni kariotip (≥3 klonske hromozomske abnormalnosti) monozomalni kariotip -5,5q-,-7,7q- 11q23 abn (osim t 9;11) inv 3, t (3;3) t (6;9), t (9;22)	normalna citogenetika: sa FLT3-ITD mutacijom

Tabela 6. Prognostičke grupe AML prema ELN

Risk grupa	citogenetske/molekularne kategorije
povoljna	t(8;21)(q22;q22); RUNX1-RUNX1T1 inv(16)(p13.1q22) ili t(16;16)(p13.1;q22); CBFB-MYH11 NPM1 mut bez FLT3-ITD (normalan kariotip) CEBPA mut (normalan kariotip)
intermedijarna I	NPM1 mut i FLT3-ITD (normalan kariotip) *Wild-type* NPM1 i FLT3-ITD (normalan kariotip) *Wild-type* NPM1 bez FLT3-ITD (normalan kariotip)
intermedijarna II	t(9;11)(p22;q23); MLLT3-MLL citogenetske promene koje nisu klasifikovane kao povoljne/nepovoljne
Nepovoljna	inv(3)(q21q26.2) ili t(3;3)(q21;q26.2); RPN1-EVI1 t(6;9)(p23;q34); DEK-NUP214 t(v;11)(v;q23); MLL rearanžman 5 ili del(5q); -7; abn (17p); kompleksni kariotip

Sve je više prognostičkih modela, koji uključuju novije (posebno DNMT3A, ali i IDH1/2, TET2, ASXL1,…), ali i starije molekularne markere, sa uglavnom lošim prognostičkim karakteristikama (MLL-PTD, mutacija p53) [89,141,154]. Integracijom većeg broja molekularnih markera, posebno unutar grupe sa intermedijarnom prognozom (gde spada i CN AML), moguće je ovu relativno heterogenu grupu dodatno stratifikovati u odnosu na rizik [155, 156].

1.8.4. Postindukcioni faktori značajni za prognozu u akutnoj mijeloidnoj leukemiji

Pored navedenih, inicijalnih prognostičkih faktora, od postindukcionih faktora značajnih za prognozu obolelih od AML navodi se brzina klirensa blasta iz periferne krvi i koštane srži (pregled koštane srži se radi 7-10 dana nakon završetka indukcije). Rani klirens blasta predstavlja in vivo pokazatelj hemiosenzitivnosti blasta na primenjenu terapiju i nezavisni je prognozni marker u AML [157-159]. Međutim, bolesnici koji nakon indukcione terapije 14.dana u koštanoj srži imaju rezidualnu leukemiju, potom odmah prime još jedan ciklus hemioterapije i postignu kompletan odgovor, imaju prognozu sličnu onima koji su kompletnu remisiju postigli nakon samo jednog indukcionog ciklusa [160]. S druge strane, odgovor na indukcionu terapiju (procenjen 28.dana indukcije) i vreme do postizanja kompletne remisije (kada se druga indukcija primeni nakon završenog prvog ciklusa), predstavljaju snažne prognostičke faktore [161]. Procena minimalne rezidualne bolesti kod bolesnika u morfološki kompletnoj remisiji (metodom protočne citometrije-na osnovu leukemija specifičnog fenotipa, odnosno kvantitativnom PCR metodom) ima sve veći značaj u predviđanju relapsa, a samim tim i ishoda obolelih od AML [162].

Savremeni pristup stratifikaciji bolesnika u odnosu na rizik i izboru postindukcione terapije (da li se odlučiti za alogenu transplantaciju matične ćelije hematopoeze ili ne) zahteva integrativni pristup svih navedenih prognostičkih faktora [101]. Iako citogenetika i molekularni markeri čine osnov podele u određene riziko grupe, novije preporuke (*European LeukemiaNet* 2012) uzimaju u obzir i dob, inicijalni broj leukocita, odgovor na indukcionu terapiju i vreme do postizanja kompletne remisije, prisustvo/odsustvo minimalne rezidualne bolesti, ali i komorbiditetni indeks (koji predviđa nerelapsni mortalitet nakon transplantacije) [125].

Ne samo prisustvo/odsustvo mutacija gena, već i nivoi ekspresije (nizak nivo ekspresije ili visoka ekspresija) određenih gena, predstavljaju potencijalne prognozne markere. Visoka ekpresija BAALC (*brain and acute leukemia gene, cytoplasmic*), kao i ERG (*Ets related gene*) i MN1 (*meningioma 1*) gena, povezana je obično sa lošom prognozom u AML [145,163-167]. Pored navedenih, i poremećaj ekspresije EVI1 *(ecotropic virus integration-1)* gena u AML je predmet mnogobrojnih istraživanja, kako uticaja u patogenezi leukemije, tako i prognoznog značaja, kao pojedinačnog odnosno u kombinaciji sa drugim molekularnim markerima.

2. EVI 1 gen i akutna mijeloidna leukemija

2.1. EVI1 gen

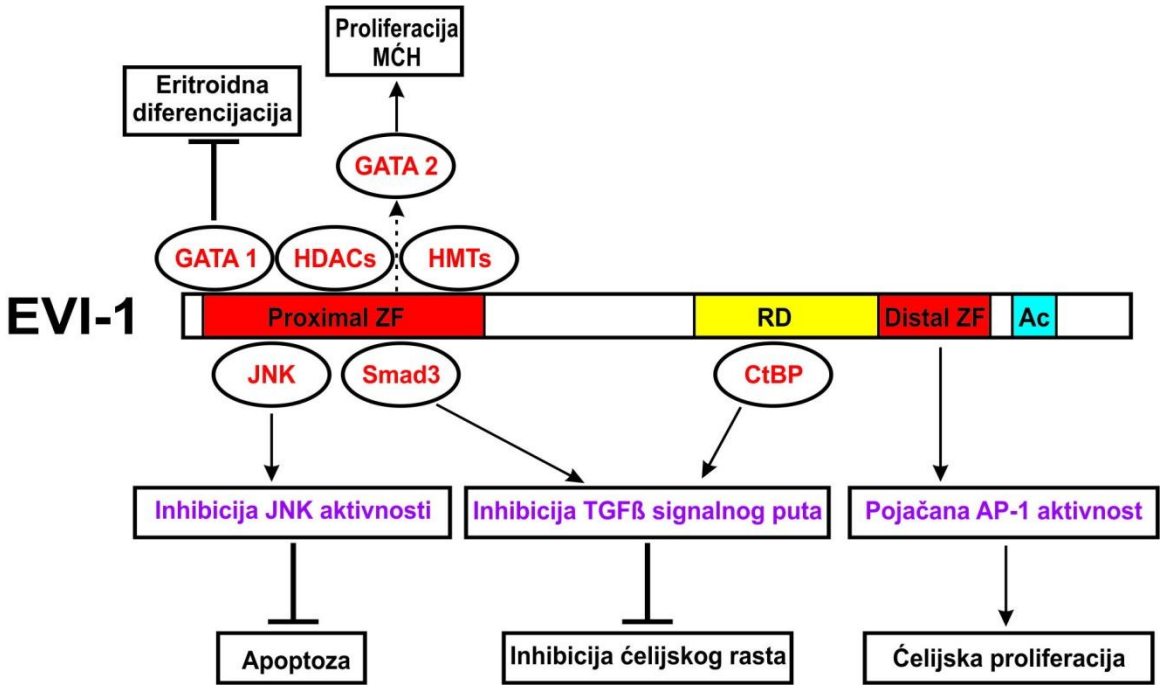
Humani EVI1 *(ecotropic virus integration-1)* gen je lokalizovan na hromozomu 3q26.2 i sastoji se od 16 egzona, a ima dva *zinc finger (ZF)* domena (proksimalni, na N terminalnom kraju sa 7 zinc fingera i distalni, na C terminalnom kraju, sa 3 zinc fingera), kao i represivni domen (RD) i region bogat kiselim aminokiselinama (Ac-acidic region) (slika 1) [168]. Postoji nekoliko splajs (eng. *splice*) varijanti EVI1 iRNK, koje se razlikuju u svom 5' netranslacionom regionu, a svaka daje isti EVI1 protein. Intergenskim *in frame* splajsingom između MDS1 (myelodysplasia syndrome 1) gena i drugog egzona EVI1 gena nastaje MDS/EVI1 (ME) transkript [142]. EVI1 gen kodira protein molekulske mase 145 kDa, koji se sastoji od 1051 aminokiseline i lokalizovan je u jedru. EVI1 gen je otkriven još 1988.godine, kao zajedničko

mesto integracije retrovirusa koji uzrokuje mijeloidnu leukemiju u mišijim modelima, ali mesto i uloga ovog gena u embriogenezi, normalnoj i malignoj hemato/onkogenezi se i dalje ispituje [169,170].

2.2. EVI1 gen i leukemogeneza

Leukemijske matične ćelije (LSC-*leukemic stem cell*) dele određene mehanizme regulacije samoobnavljanja, mirovanja, proliferacije i dugovečnosti sa normalnim hematopoeznim matičnim ćelijama [25]. EVI1 igra jednu od ključnih uloga u transkripcionoj regulaciji navedenih procesa, kako u normalnoj, tako i malignoj hematopoezi. EVI1 se predominantno eksprimira u dugotrajnim repopulišućim matičnim ćelijama hematopoeze, ćelijama sposobnim za neograničenu samoobnovu. Kao takav, EVI1 može poslužiti kao marker funkcionalnih MĆH i u kombinaciji sa određenim površinskim antigenima doprineti izolaciji i izučavanju biologije matične ćelije [171]. Za razliku od normalne hematopoeze, gde EVI1 isključivo doprinosi održavanju samoobnavljanja matičnih ćelija (ali nije neophodan za diferencijaciju), visoka EVI1 ekspresija u AML dovodi i do blokade granulocitne i eritroidne diferencijacije (delujući na trankripcione faktore hematopoeze- PU.1, Cebpα, Runx1, GATA1), a indukuje megakariocitnu (što objašnjava trombocitozu u 3q21q26 sindromu) [172]. Eppert i saradnici su u svom istraživanju pokazali da tzv. "besmrtni" transkripcioni profil, koji dele leukemijske i hematopozne matične ćelije, doprinosi lošoj prognozi u AML [173]. Analizom genske ekspresije, utvđeno je da EVI1 pozitivne leukemije imaju upravo stem ćelijski fenotip, što delom objašnjava lošu prognozu kod AML sa visokom EVI1 ekspresijom [174].

EVI1 protein ima sposobnost vezivanja za specifične DNK sekvence preko jednog od svoja dva *zinc finger* domena (proksimalni i distalni), te ima ulogu multifunkcionalnog nuklearnog transkripcionog faktora, sa mogućnošću aktivacije i represije transkripcije ciljnih gena, uključenih u procese samoobnavljanja MĆH i leukemogeneze (slika 1) [168].



Slika 1. Shema EVI1 gena i potencijalni target geni (modifikovano iz reference 168)
Legenda:HDACs-histon deacetilaze, **HMTs-**histon metiltransferaze, **JNK**-c-Jun N-terminalna kinaza, **SMAD3**-*SMAD family member 3*, **CtBP**-C-terminalni vezujući protein, **TGFβ**-transformišući faktor rasta beta, **ZF**-*zinc finger*, **RD**-represioni domen, **Ac**-*acidic region* (region bogat kiselim aminokiselinama).

EVI1 se direktno vezuje za GATA2 promoter i ima ulogu njegovog pojačivača. GATA2 ima ključnu ulogu u održavanju i proliferaciji HMĆ. Takođe direktno, EVI1 dovodi do pojačane transkripcije Pbx1, još jednog transkripcionog faktora bitnog u regulaciji samoobnavljanja i održavanja HMĆ u stanju relativnog mirovanja. Za razliku od prethodnih, EVI1 preko svog distalnog *zing finger* domena pojačava aktivnost AP-1 transkripcionog faktora (JunB) i to čini transaktivacijom c-fos promotera, čime pojačava ćelijsku proliferaciju. EVI1 reguliše ekspresiju

ciljnih gena ne samo vezujući se direktno za DNK, već i interreakcijom sa transkripcionim regulatorima, korepresorima, kao što je CtBP *(C-terminal-binding protein 1),* koji dovodi do utišavanja ciljnih gena [175]. Takođe preko CtBP, ali i fizičkom interreakcijom sa SMAD3, EVI1 inhibiše TGF-β (*transforming growth factor beta*) signalni put, koji je uključen u kontrolu ćelijske proliferacije i diferencijacije. EVI1 je uključen i u procese inhibicije apoptoze i to interreakcijom sa JNK (c-Jun N-terminalne kinaze, grupa MAP kinaza značajnih u započinjanju apoptoze), tako što suprimira JNK1 posredovnu fosforilaciju c-Jun transkripcionog faktora (tabela 7)[176-194].

Tabela 7. Molekularni mehanizmi EVI1 leukemogeneze

Mesto/mehanizam delovanja	Naziv gena/signalnog puta/proteina	Uloga	Reference
target geni	GATA2	proliferacija MĆH	[176,177]
	PBX1	održavanje samoobnavljanja MĆH	[178,179]
	PU.1, Cebpα, Runx1	mijeloidna diferencijacija	[180,181,182]
	GATA1	eritroidna diferencijacija	[183]
	Aktivator protein (AP)-1	ćelijska proliferacija	[184]
singnalni putevi	TGF beta	ćelijska proliferacija i diferencijacija	[185,186]
	JNK MAP kinaza	Apoptoza	[187]
	PI3K/PTEN/AKT/mTOR	ćelijska proliferacija	[188]
	JAK/STAT	ćeijska proliferacija/diferencijacija	[182]
modifikacija histona	Histon metiltransferaze: SUV39H1 i G9a EZH2, EED, SUZ12	epigenetsko utišavanje (H3K9) epigenetsko utišavanje ($H3K27m^3$)	[189;190] [188]
	Histon acetiltransferaze: CBP i P/CAF	epigenetsko pojačavanje	[191]
hromatin remodeling kompleks	BRG 1 (SWI/SNF)	epigenetsko pojačavanje	[192]
	NuRD (HDAC i MBD3)	epigenetsko utišavanje	[193]
DNK metilacija	DNMT3A, DNMT3B	epigenetsko utišavanje	[194]

Fosfatidil inozitol 3' kinazni put (PI3K/AKT/mTOR) je često aktiviran u AML, iako je mehanizam aktivacije uglavnom nepoznat. PTEN (phosphatase and tensin homolog) je tumor supresor, koji negativno reguliše PI3K/AKT/mTOR signalni put. U EVI1 posredovanoj leukemogenezi, dolazi do transkripcione represije PTEN i, samim tim, aktivacije PI3K/AKT/mTOR signalnog puta. EVI1 angažuje PcG (*polycomb group*) proteine (EZH2 je histon metiltransferaza iz *polycomb repressive complex 2*) i putem trimetilacije histon 3 rezidue 27 ($H3K27m^3$) dovodi do epigenetskog utišavanja PTEN. Angažovanjem drugih histon metiltransferaza, histon acetiltransferaza, kao i proteina hromatin remodeling kompleksa, EVI1, posledičnom modifikacijom strukture hromatina, dovodi do epigenetskog utišavanja/pojačavanja ciljnih gena. EVI1 je uključen u epigenetsku regulaciju ciljnih gena i putem DNK metilacije i to interreakcijom sa DNK metiltransferazom 3A i DNK metiltransferazom 3B, pri čemu AML sa visokom EVI1 ekspresijom ima specifični, aberantni DNK metilacioni profil [194]. Nivo ekspresije EVI1 korelira i sa ekspresijom pojedinih mikroRNK (miR-1-2 i miR133a-1), tako da EVI1, menjajući ekpresiju miR-1-2, utiče na proliferaciju u AML [195] (tabela 7).

Poznavajući mehanizme leukemogeneze sa aktivacijom EVI1, otvaraju se potencijalni molekularni targeti za ciljanu terapiju, a uključuju: inhibitore PI3K/AKT/mTOR signalnog puta, inhibitore epigenetskih targeta (inhibitori metiltransferaza, inhibitori histondeacetilaza), monoklonska antitela (antiCD52, s obzirom na visoku ekspresiju u EVI1 pozitivnim leukemijama), arsentrioksid (degradacija EVI1 putem ubikvitin-proteazoma puta) [171].

Eksperimentalni modeli na miševima su pokazali da preterana ekspresija EVI1 dovodi do klonske ekspanzije i displastične hematopoeze (mijelodisplaznog sindroma), ali da bi se razvila akutna leukemija, neophodna je pojava bar još jednog dodatnog genetskog događaja (tzv. *two hit* model) [196]. Od dodatnih genetskih događaja za razvoj akutne leukemije, navode se

rearanžman koji uključuje MLL gen, 7q delecija, preterana ekpresija HoxA9/Meis1, Runx1 mutacija, N ras mutacije i druge [197,198]. Svoj uticaj na ćelijsku proliferaciju i diferencijaciju, EVI1 vrši na dozno zavisan način, što znači da efekat ovoga gena direktno zavisi od nivoa njegove ekspresije [168].

2.3. EVI1 i povezanost sa određenim tipovima akutne mijeloidne leukemije

Visoka ekspresija i poremećaj ekspresije EVI1 gena je povezana sa hematološkim malignitetima (akutna mijeloidna leukemija, mijelodisplastični sindromi, hronična mijeloidna leukemija-blastna transformacija), ali i sa nehematološkim, solidnim malignitetima (kolorektalni karcinom, ovarijalni karcinom, karcinom dojke, nazofaringealni karcinom,…) [199-202].

Prototip AML sa povećanom ekspresijom EVI1 gena je AML sa inv (3)(q21q26,2)/t(3;3)(q21;q26.2), koja predstavlja zaseban entitet u klasifikaciji mijeloidnih neoplazmi SZO iz 2008. AML sa inv(3)/t(3;3) predstavlja poseban klinički, citogenetski i molekularni entitet povezan sa nepovoljnom prognozom [203]. Retko se javlja (1-2% svih AML) i može nastati kao *de novo* ili iz prethodnog mijelodisplastičnog sindroma, a na prezentaciji je broj trombocita u više od 50% bolesnika veći od 100 x 10^9/L (neretko je prisutna i trombocitoza) [204]. Za 3q21q26 sindrom je karakteristična multilinijska displazija i umnoženi atipični megakariociti (mali, mono/bilobarni megakariociti). Mijeloperoksidaza (citohemijski/floucitometrijski) je negativna u oko 60% bolesnika sa EVI1 rearanžmanom [205]. Imunofenotipski, AML sa inv(3)/t(3;3) ekspimiraju rane mijeloidne markere (CD13, CD33, CD117), kao i markere progenitornih (stem) ćelija (CD34, HLA-DR) [206]. AML i mijelodisplastični sindrom sa inv (3)(q21q26,2)/t(3;3)(q21;q26.2) imaju slične kliničke i

patološke karakteristike i bez obzira na procenat blasta, sveukupno preživljavanje se značajnije ne razlikuje [207]. Mehanizam leukemogeneze u AML sa rekurentnom hromozomskom aberacijom koja uključuje 3q26 i posledičnom visokom ekspresijom EVI1 gena, nije u potpunosti razjažnjen. Navedenim hromozomskim rearanžmanom ne nastaje fuzioni gen, već dolazi do fuzije pojačivača (RPN1) i EVI1 promotera, što dovodi do transaktivacije EVI1 ekpresije [142]. Prema novijim radovima, identifikovan je GATA2 distalni hematopoezni pojačivač (G2DHE) koji, kada dođe u neposrednu blizinu proksimalno od EVI1 promotera, dovodi do deregulacije EVI1 ekspresije i leukemogeneze [208,209]. Delom su razjašnjeni EVI1 *target* geni, ali ostaje nerazjašnjeno pitanje transkripcionih faktora, koji dovode do deregulacije EVI gena. Maicas i sar. [210] su u svom istraživanju dokazali da RUNX1 i ELK1 (član ETS familije transkipcionih faktora) direktno regulišu transkripciju EVI1 gena. RUNX1 to čini epigenetskim mehanizmima, acetilacijom histona H3 u regiji promotera.

EVI1 je visoko eksprimiran i u slučajevima obolelih od akutne mijeloidne leukemije i bez 3q26 rearanžmana, kada se radi ili o skrivenim rearanžmanima ili do aktivacije ovog gena dolazi alternativnim mehanizmima [211-214]. Osim AML sa inv(3)/t(3;3), utvđena je povezanost visoke ekspresije EVI1 i sa drugim citogenetskim/molekularnim grupama: monozomijom 7, translokacijama koje uključuju 11q23 (MLL translokacije), kao i AML sa normalnim kariotipom, koje su $NPM1^{wt}$/FLT3-ITD^{neg}/$CEBPA^{wt}$ [215,216]. Među AML sa dobrom prognozom, uključujući i $NPM1^{mut}$AML, praktično nema bolesnika sa visokom ekspresijom EVI1. Monozomija 7 je najčešća sekundarna hromozomska aberacija u AML sa inv(3)/t(3;3) (javlja se u oko 50% slučajeva) i praktično svi ovi slučajevi imaju visoku ekpresiju EVI1 i posledičnu lošu prognozu. Međutim, i bolesnici sa monozomijom 7 i visokom EVI1 ekspresijom, koji nemaju 3q26 abnormalnost, takođe imaju lošu prognozu [215]. Konvencionalna

hromozomska analiza metodom pruganja je standardna u identifikaciji 3q26 rearanžmana. Međutim, standardni kariogram, posebno ako je lošije rezolucije, može i da previdi ovu hromozomsku abnormalnost. Za otkrivanje ovih kriptičnih rearanžmana koristi se ciljane, FISH (fluorescentna in situ hibridizacija), tzv. *dual color, double fusion* tehnike [217]. Uzimajući u obzir gore navedeno, kao skrining metoda za 3q26 rearanžman, FISH se koristi u slučajevima visoke ekspresije EVI1 gena, ali i u slučajevima monozomije 7, kao i AML sa normalnim kariogramom (i bez NPM1 mutacije), posebno u slučajevima AML i MDS sa megakariocitnom displazijom i normalnim ili povišenim brojem trombocitima [217,213].

Drugi poznati mehanizam EVI1 aktivacije (pored 3q26 rearanžmana) je MLL rearanžman (translokacija koja uključuje 11q23). U ovim slučajevima, pored visoke EVI1 ekspresije, beleži se i visoka ekspresija MDS1/EVI1 transkripta. MLL rearanžmanom posredovana aktivacija EVI1 gena se dešava isključivo u hematopoeznoj matičnoj ćeliji, ali ne i u opredeljenim ćelijama hematopoeze [218]. Bindels i saradnici su na mišijim modelima za MLL-AF9 leukemiju, pokazali da MLL-AF9 fuzioni gen uzrokuje da ne dođe do "gašenja" ekspresije EVI1 gena u matičnoj ćeliji hematopoeze i da visoka ekspresija EVI1, kao ključna u patogenezi ovog tipa leukemija, predstavlja potencijalnu metu terapije [219]. Oko 45% bolesnika sa AML koji imaju MLL rearanžman (11q23), imaju i visoku ekspresiju EVI1, što predstavlja nezavisni loš prognostički faktor unutar AML sa t(11q23) i AML sa (9;11)(p22;q23) [220,221].

2.4. Nivo ekspresije EVI1 gena i prognoza u akutnoj mijeloidnoj leukemiji

U različitim istraživanjima beleži se različita učestalost visoke ekspresije EVI1 gena u akutnoj mijeloidnoj leukemiji, što u velikoj meri zavisi i od različitih *cut off*-ova, a kreće se u rasponu od 10-25% [212, 215, 216, 222-226]. Langabeer i sar. [224] nisu uspeli da dokažu da visoka ekspresija EVI1 gena bitno utiče na prognozu obolelih od AML (osim ako se ne radi o rearanžmanu koji ukljujuje 3q26), a sličnog su stanovišta i Haferlach i sar. [212], koji smatraju da je prognozni značaj visoke EVI1 ekspresije posledica bliske povezanosti sa EVI1 i MLL-rearanžmanom, koji mogu biti i kriptični u određenom procentu bolesnika. Ipak, većina drugih istraživanja ističe negativan prognostički uticaj visoke EVI1 ekpresije u AML, posebno u mlađih bolesnika (ispod 60 odnosno 65 godina) [215, 216, 223, 225, 226,]. Prevalenca visoke EVI1 ekspresije se razlikuje u odnosu na citogenetske risk grupe, sa najvećom učestalošću (oko trećine svih sa visokom EVI1 ekpresijom) u grupi sa lošom prognozom [225, 215, 216]. U zdravoj populaciji, ekspresija EVI1 gena je niska, ali detektabilna [218, 227]. U istraživanju Vazquez-a i saradnika [216] ističe se prognozni značaj nivoa ekspresije EVI1 gena i to ne samo da je visoka ekspresija ovog gena povezana sa lošom prognozom, već i da oboleli od AML bez bazalne ekspresije EVI1 imaju bolje preživljavanje.

II PROBLEM, PREDMET I CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Akutna mijaloida leukemija predstavlja heterogenu grupu oboljenja u odnosu na morfologiju, citogenetiku, molekularnu genetiku, zbog čega se deli u različite kliničke i biološke entitete, sa različitim odgovorom na terapiju i različitim ishodom terapije. Na osnovu procene prognoze se temelji savremeni, individualni pristup u postremisionoj terapiji obolelih od AML, pre svega odluka da li i u kojim slučajevima primeniti alogenu transplantaciju matičnih ćelija hematopoeze. Sadašnje preporuke za terapiju AML se temelje na standarnim kliničkim, citogenetskim i molekularnim markerima sa već potvrđenim prognostičkim značajem. Od molekularnih markera sa već potvrđenim prognoznim značajem su FLT3-IDT mutacija, nukleofozmin 1 mutacija, kao i CEBPA dvostruka (bialelska) mutacija.

Imajući u vidu da grupa sa intermedijarnom prognozom (gde spada i AML sa normalnim kariogramom) nema jasno definisanu prognozu, a samim tim ne postoje ni jasne preporuke za izbor postremisione terapije, istraživanje obuhvaćeno ovom doktorskom disertacijom ima za cilj dobijanje podataka koji bi doprineli boljem definisanju prognoznog značaja ekspresije EVI1 gena u akutnoj mijeloidnoj leukemiji, kao još jednog markera prognoze, koji će, u kombinaciji sa drugim, doprineti boljoj risk stratifikaciji obolelih od AML.

Ciljevi istraživanja su:

1) Da se ispita prognostički značaj ekspresije gena EVI1 (ecotropic virus integration 1) kod odraslih obolelih od akutne mijeloidne leukemije.
2) Da se utvrdi povezanost ekspresije gena EVI1 sa nalazima citogenetskog ispitivanja i drugim molekularnim markerima: FLT3 mutacija i nukleofozmin 1 mutacija.

Hipoteze:

1) Visoka ekspresija gena EVI1 ima nepovoljan prognostički značaj u akutnoj mijeloidnoj leukemiji.
2) Postoji statistički značajna negativna korelacija visoke ekspresije gena EVI1 sa povoljnim molekularnim markerom: nukleofozmin 1 mutacijom.

III MATERIJAL I METODE

1. MATERIJAL

1.1. Način izbora, veličina i konstrukcija uzorka

Istraživanjem je obuhvaćena grupa od 38 odraslih bolesnika, oba pola, obolelih od akutne mijeloidne leukemije, koji su dijagnostikovani i lečeni u Klinici za hematologiju, Kliničkog centra Vojvodine u Novom Sadu.

Kriterijumi za uključivanje u istraživanje su bili novodijagnostikovani bolesnici od *de novo* AML, kod kojih je započeta indukciona terapija. Kriterijumi za neuključivanje su bili oboleli od akutne promijelocitne leukemije (AML M3 po FAB klasifikaciji), oboleli od sekundarne AML (prethodno dijagnostikovan poremećaj u koštanoj srži) i oboleli od AML kod kojih se ne planira primena intenzivne hemioterapije. Kriterijum za isključenje iz istraživanja je odluka bolesnika da samovoljno istupi iz istraživanja.

Ispitivanje je bilo prospektivno, a uključivani su bolesnici, prema gore navedenim kriterijumima, koji su dijagnostikovani u Klinici za hematologiju, Kliničkog centra Vojvodine u periodu od jula 2012. do marta 2014. godine. Kontrolnu grupu za ispitivanje nivoa ekspresije EVI1 gena činilo je 10 zdravih osoba, približne starosne i polne strukture kao i ispitivana grupa.

1.2. Mesto eksperimentalnog istraživanja

Mesto eksperimentalnog istraživanja su bili Klinika za hematologiju, Kliničkog centra Vojvodine u Novom Sadu i Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, u Beogradu.

Sprovođenje ovog istraživanja odobrio je Etički komitet Kliničkog centra Vojvodine i Etički komitet Medicinskog fakulteta u Novom Sadu.

2 METODE

2.1. Klinička i laboratorijska ispitivanja

Dijagnoza bolesti (AML) je postavljana na osnovu anamneze, kliničkog pregleda, standardnih laboratorijskih i dopunskih hematoloških ispitivanja, koji su obuhvatali kompletnu krvnu sliku, diferencijalnu krvnu sliku, analizu koštane srži (mijelogram, citohemijska bojenja-PAS, Sudan BB, Alfa naftil esteraza, imunofenotipsko ispitivanje, upotrebom protočne citometrije ili imunohistohemijskim pregledom bioptata koštane srži). Citogenetski pregled koštane srži (kariogram) je rađen iz aspirata koštane srži, klasičnom tehnikom G pruganja (*G banding*), koristeći međunarodnu nomenklaturu ISCN 2009 (*International System for Human*

Cytogenetic Nomenclature). Citogenetska ispitivanja su vršena u citogenetskoj laboratoriji Instituta za zdravstvenu zaštitu dece i omladine Vojvodine u Novom Sadu. Na prezentaciji bolesti prikupljani su demografski podaci (pol, životna dob), vršena je procena opšteg funkcionalnog stanja prema ECOG skali (*Eastern Cooperative Oncology Group)* i određivan je komorbiditetni indeks (*Hematopoietic cell transplantation-comorbidity index)* [228,229]. Dijagnoza, vrsta terapije i odgovor na terapiju su određivani u odnosu na ELN (*European LeukemiaNet*) kriterijume [76], a određivan je tip akutne mijeloidne leukemije prema FAB (*French American Bitish*) klasifikaciji [80] i klasifikaciji Svetske zdravstvene organizacije (*WHO classification*) iz 2008. godine [24]. Pratili su se vreme postizanja kompletne remisije, dužina trajanja remisije i vreme nastanka relapsa bolesti.

2.2. Molekularna genetska ispitivanja

Nakon potpisivanja informisanog pristanka od strane bolesnika, u okviru inicijalne obrade bolesnika (u toku postavljanja dijagnoze AML) uziman je i materijal (periferna krv i aspirat koštane srži) za dopunske molekularne analize (sa ciljem određivanja FLT3 mutacije, nukleofozmin 1 mutacije, određivanje ekspresije EVI1 gena), koje su vršene u Institutu za molekularnu genetiku i genetsko inženjerstvo u Beogradu. Molekularna genetska ispitivanja su vršena na izolovanim mononuklearnim ćelijama periferne krvi i/ili koštane srži.

2.2.1 Izolacija mononuklearnih ćelija

Izolacija mononuklearnih ćelija iz aspirata koštane srži/periferne krvi, je vršena prema sledećem protokolu:

- na dno sterilne epruvete zapremine 10 ml sipati 3 ml Ficoll-Plaque PLUS (GE Healthcare), a zatim na ovaj gradijent naneti 4 ml razblaženog uzorka (1:1, uzorak:fiziološki rastvor)

- centrifugirati na 1 500 g/25 min na sobnoj temperaturi, u kliničkoj centrifugi, bez kočenja

- nakon centrifugiranja, pipetom prebaciti „buffy coat“ interfazu koja je sastavljena od mononuklearnih ćelija u novu sterilnu epruvetu

- isprati dva puta u PBS-u (phosphate-buffered saline). Nakon svakog ispiranja sledi centrifugiranje na 1 500 g/15 min

- talog resuspendovati u TRIzol®-u (Invitrogen).

2.2.2. Izolacija DNK iz periferne krvi i/ili koštane srži

Za izolaciju DNK iz periferne krvi odnosno koštane srži korišćen je QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Germany), a vršena je prema sledećem protokolu:

- na dno tube sipati 20 µl proteinaze K (20 mg/ml), dodati 200 µl uzorka, 200 µl pufera AL i promešati vorteksovanjem

- inkubirati u vodenom kupatilu 10 min/56°C

- dodati 200 µl 96-100% etanola i promešati vorteksovanjem

- ovako pripremljen uzorak naneti na QIAamp Mini spin kolonicu i centrifugirati na 8 000 rpm/1 min
- kolonicu isprati sa 500 µl pufera AW1, centrifugirati na 8 000 rpm/1 min
- kolonicu isprati sa 500 µl pufera AW2, centrifugirati na 13 000 rpm/3 min
- na kraju prebaciti kolonicu u čistu tubu, dodati 200 µl pufera AE i centrifugirati na 8 000 rpm/1 min

2.2.3. Izolacija RNK iz mononuklearnih ćelija

Za izolaciju RNK iz mononuklearnih ćelija je korišćen TRIzol® (Invitrogen). TRIzol® predstavlja monofazni rastvor fenola i guanidin-izotiocijanata, a sam proces izolacije pretstavlja unapređen klasični metod izolacije RNK definisan od strane *Chomczynski* i *Sacchi* [230]. Izolacija RNK iz mononuklearnih ćelija je vršena prema sledećem protokolu:

- u 1 ml TRIzol®-a resuspendovano je maksimalno $1x10^7$ćelija i lizirano provlačenjem kroz iglu promera 0,7 mm
- liziran uzorak se ostavi da stoji na sobnoj temperaturi 5-10 min
- dodaje se 200 µl hloroforma, snažno promućka, a zatim uzorak ostavi da stoji 5-15 min na sobnoj temperaturi
- nakon centrifugiranja na 12 000rcf/15 min/+4°C pojavljuju se jasno odvojene faze; gornja vodena faza u kojoj se nalazi RNK, interfaza i donja, crvena, organska faza u kojoj se nalazi DNK i proteini

- gornja vodena faza se prebacije u novu tubu i dodaje se 0,5 ml izopropanola. Promešati invertovanjem tube i ostaviti da stoji 10-15 min na sobnoj temperaturi (precipitacija RNK)
- centrifugirati na 12 000rcf/15 min/+4°C, a zatim ukloniti supernatant dekantovanjem i oprati talog sa 1 ml hladnog 70% etanola
- centrifugirati na 12 000rcf/10 min/+4°C, ukloniti pažljivo etanol i talog osušiti na sobnoj temperaturi
- talog RNK rastvoriti u „RNAse-free“ vodi, a koncentraciju i čistoću RNK odrediti merenjem A_{260}/A_{280} na spektrofotometru

Po izolaciji RNK se čuvala na -80 °C do sprovođenja molekularno genetskog ispitivanja.

2.2.4. Reverzna transkripcija

Iz RNK se, metodom reverzne transkripcije, vršila sinteza komplementarne DNK (cDNK). Reverzna transkripcija se vršila prema sledećem protokolu:

- smešu finalnog volumena 11, 5 µl koja sadrži 2 µg RNK i 100 pmol

„random-hexamer“ prajmera inkubirati 5 min na 70°C, a zatim ohladiti na ledu

- dodati smešu finalnog volumena 8,5 µl koja sadrži 4 µl 5x RT-pufera, 20U RNase-inhobitora, 2 µl dNTP (10 mM) i 40 U M-MuLV reverzne transkriptaze (Fermentas)
- inkubirati 10 min na 25°C, a zatim 1h na 42°C
- reakcija se zaustavlja inkubacijom od 10 min na 70°C.

2.2.5 Reakcija lančanog umnožavanja DNK

U cilju utvrđivanja najčešćih mutacija u FLT3 genu, FLT3-ITD i FLT3-TKD (D835) mutacije, rađena je reakcija lančanog umnožavanja DNK *(polymerase chain reaction-PCR),* odnosno PCR-RFLP *(PCR-restriction fragment length polimorphysm)* metoda.

Lančana reakcija polimerazom *(PCR-polymerase chain reaction)* je u osnovi tehnika *in vitro* umnožavanja definisane DNK sekvence i predstavlja imitaciju procesa DNK replikacije. Reakcija koristi dva oligonukleotida, komplementarna krajevima sekvence koja se umnožava (prajmeri), koji su međusobno suprotno orijentisani i dugački 15-20 nukleotida. Sinteza DNK katalizovana je termostabilnom DNK polimerazom. Ponavljanje ciklusa, od kojih se svaki sastoji od denaturacije DNK, hibridizacije prajmera (aniling) i ekstenzije hibridizovanih prajmera od strane termostabilne DNK polimeraze, za rezultat ima eksponencijalnu amplifikaciju specifičnog DNK fragmenta. Krajevi amplifikovanog fragmenta su definisani 5' krajevima prajmera, a njihova veličina određena je rastojanjem između sekvenci koje prajmeri prepoznaju. PCR reakciona smeša mora sadržati u sebi komponente potrebne za *in vitro* sintezu DNK: matrica (DNK koja se kopira), prajmeri (oligonukleotidi komplementarni krajevima sekvence koja se kopira), nukleotidi (gradivni elementi DNK), Taq polimeraza (termostabilna DNK polimeraza koja katalizuje ugradnju nukleotida po principu komplementarnosti sa matricom), joni magnezijuma i pufer (neophodni za optimalni rad Taq polimeraze) [231].

PCR-RFLP *(Polimerase chain reaction - Restriction fragment length polymorphism)* je metoda koja se koristi za direktnu detekciju mutacije koja menja, kreira novo ili ukida postojeće mesto prepoznavanja nekog restrikcionog enzima.

2.2.6. Detekcija FLT3/ITD mutacije

Reakciona smeša zapremine 30 µl, sastojala se od sledećih elemenata; 100 – 300 ng DNK, 1x PCR pufer, 1x Q-solution, dNTP (2 mM finalno), $MgCl_2$ (2,75 mM finalno), prajmeri 14F i 15R (Tabela 8) (350 mM finalno) i 2U HotStarTaq®DNA Polimerase (Qiagen, Nemačka).

Tabela 8. Sekvence prajmera za detekciju i sekvenciranje FLT3/ITD, FLT3/D835 i NPM1 mutacija.

Prajmer	**sekvenca (5'-3')**
14F	GCA ATT TAG GTA TGA AAG CCA GC
15R	CTT TCA GCA TTT TGA CGG CAA CC
21F	CCG CCA GGA ACG TGC TTG
21R	GCA GCC TCA CAT TGC CCC
NPM1-F	TTA ACT CTC TGG TGG TAG AAT GAA
NPM1-R	CAA GAC TAT TTG CCA TTC CTA AC
NPM1_1112R	CCT GGA CAA CAT TTA TCA AAC ACG GTA

Temperaturni profil PCR reakcije

1. 15 min/95°C – akctivacija HotStarTaq polimeraze
2. 35 ciklusa;
    - 1 min/95°C – denaturacija
    - 1 min/60°C – aniling
    - 2 min/72°C – elongacija
3. 10 min/72°C – finalna elongacija.

Analiza dobijenih PCR produkata je vršena elektroforezom na horizontalnom agaroznom gelu odgovarajuće koncentracije (4%). U gelove je pre polimerizacije dodavan etidijum bromid (5µg/ml). Elektroforeza je tekla u 1XTAE puferu (40mM Tris, 20 mM Na-acetat, 1mM

Na2EDTA), pri voltaži od 4-7 V/cm. DNK je vizuelizovana osvetljavanjem gela UV svetlom talasne dužine 266 nm. Trajni zapis rezultata dobija se fotografisanjem gela CCD kamerom integrisanom u sistem za automatsku digitalnu akviziciju slike, BioDocAnalyze sistemom. Veličina fragmenata DNK određuje se pomoću adekvatnih komercijalnih markera (Fermentas). Očekivana dužina wild type PCR pordukta je 325 bp. Postojanje *FLT3-ITD* mutacije je praćeno prisustvom dodatnog PCR produkta veće dužine. Kod *FLT3-ITD* pozitivnog nalaza, vršeno je isecanje dužeg PCR produkta sa agaroznog gela, a nakon prečišćavanja je izvršeno sekvenciranje upotrebom prajmera koji su korišćeni za PCR apmlifikaciju.

2.2.7. Detekcija FLT3/D835 mutacije

Reakciona smeša zapremine 30 µl, sastojala se od sledećih elemenata; 100 – 300 ng DNK, 1xPCR pufer, 1x Q-solution, dNTP (2 mM finalno), $MgCl_2$ (2,75 mM finalno), prajmeri 21F i 21R (Tabela 8) (350 mM finalno) i 2U HotStarTaq® DNA Polimerase (Qiagen, Nemačka).

Temperaturni profil PCR reakcije

1. 15 min/95°C – akctivacija HotStarTaq polimeraze
2. 35 ciklusa;
    - 1 min/95°C – denaturacija
    - 1 min/58°C – aniling
    - 2 min/72°C – elongacija
3. 10 min/72°C – finalna elongacija

Produkt PCR reakcije za *FLT3/D835* je 114 bp. Detekcija mutacije se vrši digestijom ovako dobijenog PCR fragmenta restrikcionim enzimom *Eco*RV (Fermentas). Prisustvo mutacije narušava restrikciono mesto za ovaj enzim, tako da će se seći samo nemutirani fragmenti. U slučaju digestije dobijamo produkte dužina 68 bp i 46 bp.

Smeša za digestiju sadrži sledeće komponente:

- 10 µl PCR produkta
- 1 x pufer R
- 20U *Eco*RV (Fermentas)

Uslovi digestije su 12 sati na 37°C. Analiza fragmenata se vrši na 8% poliakrilamidnom gelu. Fragmenti DNK su razdvajani na nedenaturišućem 8% poliakrilamidnom gelu (Akrilamid: N,N-metilenbisakrilamid (29:1) (30% w/v), 100mM Tris, 83mM borna kiselina, 1mM EDTA pH 8; 0,1% (w/v) amonijumpersulfat, 0,01% (v/v) TEMED). Elektroforeza je tekla pri naponu od 10 V/cm u 1xTBE puferu (100mM Tris, 83 mM borna kiselina, 1mM EDTA pH 8). Po završetku elektroforeze, gelovi su bojeni srebronitratom, radi vizualiacije DNK.

2.2.8. Detekcija mutacije u nukleofozmin 1 genu

Reakciona smeša zapremine 50 µl, sastojala se od sledećih elemenata; 100 – 300 ng DNK, 1x PCR pufer, 1x Q-solution, dNTP (0,3 mM finalno), MgCl2 (2,25 mM finalno), prajmeri NPM1-F i NPM1-R (Tabela 8) (500 mM finalno) i 2U HotStarTaq®DNA Polimerase (Qiagen, Nemačka).

Temperaturni profil PCR reakcije

4. 15 min/95^{0}C – akctivacija HotStarTaq polimeraze

5. 35 ciklusa;
    - 1 min/95°C – denaturacija
    - 1 min/60°C – aniling
    - 2 min/72°C – elongacija
6. 10 min/72°C – finalna elongacija

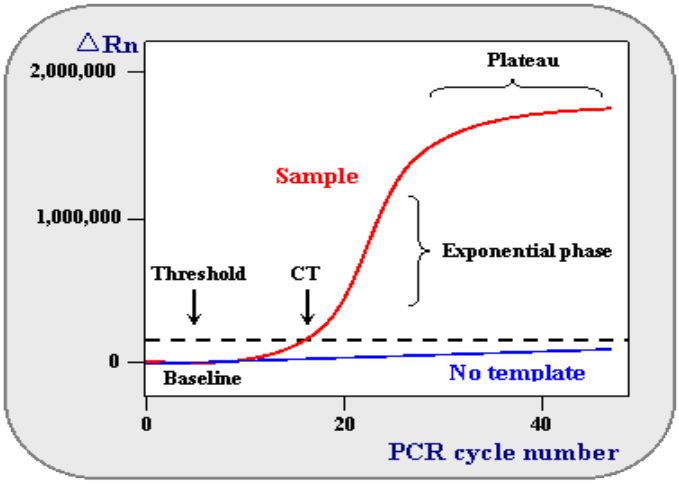
Nakon PCR amplifikacije izvršeno je prečišćavanje na koloni (QIAquick PCR Purification kit, Qiagen) prema uputstvu proizvođača. Nakon toga je izvršena reakcija sekvenciranja upotrebom NPM1_1112R prajmera (Tabela 8). Sekvenciranje DNK je rađeno BigDyeTM Terminators Version 3.1 Ready Reaction Kit-om (Applied Biosystems) kapilarnom elektroforezom na automatskom sekvenceru (3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems).

2.2.9. **Određivanje ekpresije EVI1 gena kvantitativnom ("real-time") PCR metodom (q-PCR)**

2.2.9.1. Princip metode kvantitativnog ("real-time") PCR

„Real-time" PCR ili kvantitativni PCR (q-PCR) jeste metod koji omogućava tačnu kvantifikaciju količine PCR produkta u toku svakog PCR ciklusa, tj. u realnom vremenu („real-time"). U qPCR meri se fluorescentni signal koji se emituje u toku PCR reakcije, koji je direktno proporcionalan količini PCR produkta u datom ciklusu [232]. Za razliku od „klasičnog" PCR, gde se količina produkta može meriti samo na kraju PCR reakcije, ovde se kvantifikacija odvija

u toku eksponencijalne faze reakcije, u toku koje dolazi do udvostručavanja PCR produkta prilikom svakog PCR ciklusa (Slika 2).

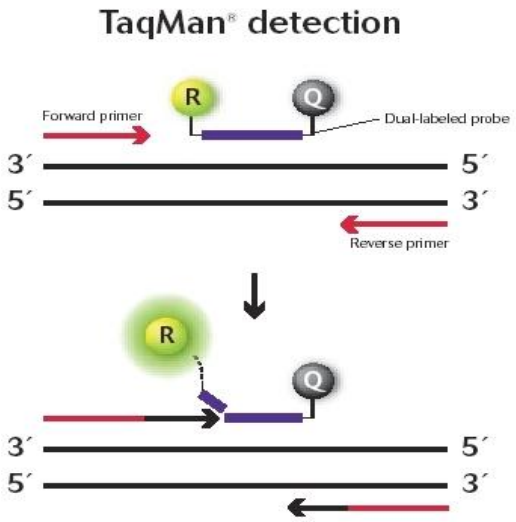


Slika 2. Faze PCR amplifikacije. Rn predstavlja vrednost fluorescencije reporterske boje, a ΔRn predstavlja razliku Rn vrednosti između uzorka i kontrole („no template control“). Slika preuzeta sa sajta:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techqpcr/

U početnim ciklusima intenzitet fluorescencije ne prelazi bazalni nivo („baseline“). Ciklus u kome je fluorescentni signal uzorka značajno viši od bazalnog signala, naziva se „treshold cycle“ – Ct. Vrednost Ct je direktno proporcionalna količini target sekvence u uzorku. Što je veći početni broj kopija target sekvence, Ct je niži, i obratno, Ct je viši u uzorcima sa manjom početnom količinom target sekvence.

TaqMan tehnika koristi 5’→3’egzonukleaznu aktivnost Taq polimeraze za specifičnu detekciju PCR produkata. TaqMan proba je dvostuko obeležena oligo-nukleotidna proba; na 5’kraju je fluorescentna, reporter boja-R (slika 3) (najčešće FAM, VIC ili JOE), a na 3’kraju se nalazi kvenčer-Q. Sve dok se reporter i kvenčer boja nalaze „blizu“ jedna drugoj, tj. dok je TaqMan proba intaktna, nema emitovanja fluorescencije, jer fluorescencija koju emituje repoter biva „apsorbovana“ od strane kvenčera. Međutim, u toku PCR amplifikacije

5’→3’egzonukleazna aktivnost Taq polimeraze izmešta probu i uklanja je sa DNK lanca, što rezultira u emitovanju detektabilne fluorescencije od strane reporter boje. U toku svakog novog ciklusa PCR reakcije, fluorescencija će rasti kao posledica akumulacije „slobodnih“ reportera.



Slika 3 Princip rada Taqman tehnike

(slika preuzeta sa sajta http://dyes.gene-quantification.info/)

Kvantifikacija qPCR podataka može biti:

1. Apsolutna kvantifikacija, gde je rezultat izražen kao apsolutni broj kopija target sekvence. Tačna kvantifikacija target sekvence se dobija poređenjem sa standardnom krivom izrađenom od uzoraka poznate koncentracije i

2. Relativna kvantifikacija, gde je rezultat predstavljen kao relativni odnos reference (kalibrator) i merenog uzorka.

U oba pristupa kvantifikaciji, veoma je važno izvršiti normalizaciju dobijenih podataka [233]. Kako je količina dobijenih PCR produkata direktno zavisna od početne količine matrice da bi se izbegle greške nastale prilikom postavke eksperimenta, uporedo sa umnožavanjem target sekvence vrši se i umnožavanje takozvane endogene kontrole. Endogena kontrola je obično *housekeeping* gen, čija je ekspresija stabilana u svim uzorcima koji se kvantifikuju, odnosno čija se eksperesija ne menja prilikom eksperimentalnih tretmana. U toku ovog istraživanja ekpresija EVI1 gena je određivana komparativnim ddCt metodom, koja je opisana u nastavku.

2.2.9.2. Određivanje ekspresije EVI1 gena komparativnim ddCt metodom

Ekspresija EVI1 gena je praćena primenom „real-rime“ PCR metode na 7900HT Real-time PCR aparatu (Applied Biosystems), upotrebom TaqMan hemije. Kao endogena kontrola korišćen je ABL gen. Prajmeri i probe za ABL i EVI1 gen kao i njihove sekvence su navedeni u tabeli 9, a sastav finalnog volumena PCR reakcije je prikazan u tabeli 10.

Tabela 9. Sekvence prajmera i probe za „real-time“ PCR kvantifikaciju gena za ABL i EVI1.

Prajmeri	**sekvenca (5’-3’)**
ABL – F	TGG AGA TAA CAC TCT AAG CAT AAC T AA AGG T
ABL – R	GAR GTA GTT GCT TGG GAC CCA
EVI1 – F	AGT GCC CTG GAGT ATG AGT TG
EVI1 - R	TTT GAG GCT ATC TGT GAA GTG C
Probe	**sekvenca (5’-3’)**
ABL – P	(FAM) – CCA TTT TTG GTT TGG GCT TCA CAC CAT T – (TAMRA)
EVI1 – P	(FAM) – CCC CAG TGA GGT ATA AAG AGG A – (TAMRA)

Tabela 10. Finalni volumen PCR reakcije je bio 10 µl sledećeg sastava:

prajmeri	**sekvenca (5'-3')**
ABL - F	TGG AGA TAA CAC TCT AAG CAT AAC T AA AGG T
ABL – R	GAR GTA GTT GCT TGG GAC CCA
EVI1 – F	AGT GCC CTG GAGT ATG AGT TG
EVI1 - R	TTT GAG GCT ATC TGT GAA GTG C
probe	**sekvenca (5'-3')**
ABL – P	(FAM) – CCA TTT TTG GTT TGG GCT TCA CAC CAT T – (TAMRA)
EVI1 – P	(FAM) – CCC CAG TGA GGT ATA AAG AGG A – (TAMRA)

Termperaturni profil za sve PCR reakcije je bio:

1. 2 min/50°C

2. 10 min/95°C

3. 50 ciklusa;

    - 15 sec/95°C

    - 1 min/60°C

Obrada rezultata je izvršena primenom komparativnog ddCt metoda, a kao kalibrator je korišćena medijana dCt vrednosti nađena kod analiziranih zdravih kontrola;$Q = 2^{-ddCt}$; gde je ddCt = dCtuzorak - dCtKALIBRATOR = dCtuzorak – dCtzdrave kontrole(medijana).

IV METODE STATISTIČKE OBRADE

U radu su korišćeni sledeće statističke metode: osnovne metode deskriptivne statistike, u slučaju da distribucija vrednosti za određene varijable odgovara normalnoj distribuciji, upotrebljena je aritmetička sredina, koeficijent varijacije, standardna devijacija. U slučaju kada se nije radilo o normalnoj distribuciji koristila se medijana, interkvartalni opseg (raspon).

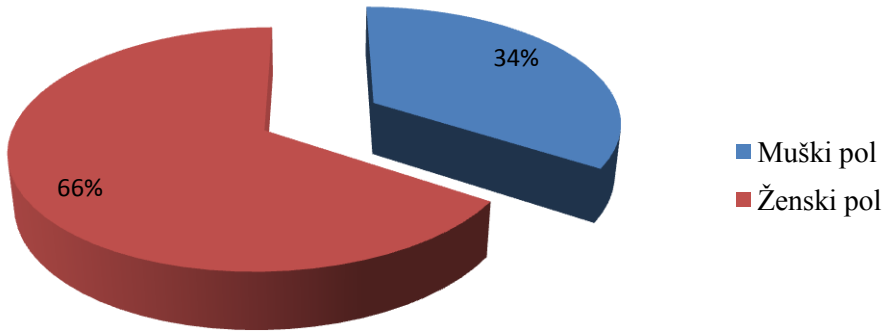
Rezultati su prikazani tekstualno, grafikonima i tabelarno. Kategorijalne varijable su ispitivane primenom **Fišerovog egzaktnog testa i χ^2testa**. U cilju utvrđivanja razlike između grupa korišćen je **Mann-Whitney „U“ test.** Statistička značajnost je definisana nivoom od $p<0,05$. Ispitivanje verovatnoće preživljavanja je utvrđeno primenom **Kaplan-Meirovog testa.** Poređenje preživljavanja među različitim grupama je sprovođeno primenom ***log rank* testa.** U multivarijantnoj analizi uticaja pojedinih faktora na ukupno preživljavanje, koristili smo **Cox regresionu analizu**. Statistička obrada podataka je rađena uz upotrebu SPSS i Stata (verzija 12) programa.

Merenje preživljavanja je vršeno u skladu sa ELN preporukama, a izražavano u mesecima [76]. Sveukupno preživljavanje ***(overall survival, OS)*** je definisano za sve bolesnike, a mereno je od datuma dijagnoze bolesti do datuma smrti od bilo kog uzroka. Za bolesnike koji su bili izgubljeni u praćenju, vreme sveukupnog preživljavanja je cenzurisano na poslednji datum kada se zna da su bili živi. Preživljavanje bez relapsa bolesti ***(relapse-free survival, RFS)*** je mereno samo za bolesnike koji su postigli kompletni odgovor (CR/CRi) i to od datuma postizanja remisije do datuma relapsa ili smrti od bilo kog uzroka. Preživljavanje bez relapsa bolesti i preživaljanje bez bolesti ***(disease free survival, DFS)*** su definisane na isti način. Preživljavanje bez događaja ***(event-free survival, EFS)*** je mereno je od datuma postavljanja dijagnoze bolesti do događaja (datuma neuspeha indukcione terapije, tj. nepostizanja CR, datuma relapsa nakon postignute remisije (CR/CRi), odnosno do datuma smrti iz bilo kog uzroka). Za bolesnike za koje se ne zna da li su imali bilo koja od navedena tri događaja, EFS je cenzurisan na datum poslednje kontrole.

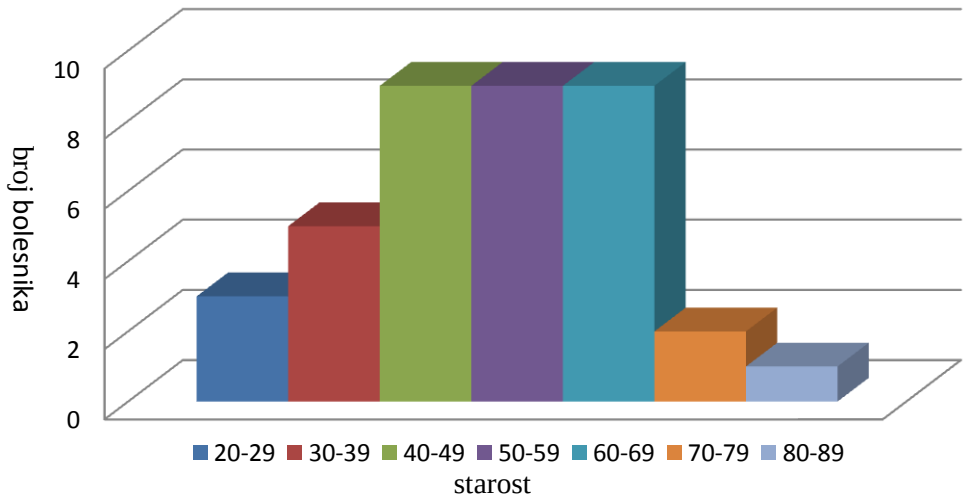
V REZULTATI

1. Demografski podaci

U istraživanje je uključeno ukupno 38 bolesnika (13 muškaraca, 25 žena) (grafikon 1). Medijana starosti bolesnika je 52 godine (23-80). Starosna struktura bolesnika je prikazana na grafikonu 2. Bilo je 68% mlađih od 60 godina, dok je starijih od 60 godina bilo 32%.



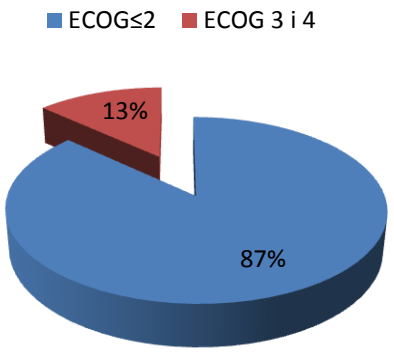
Grafikon 1. Polna struktura bolesnika



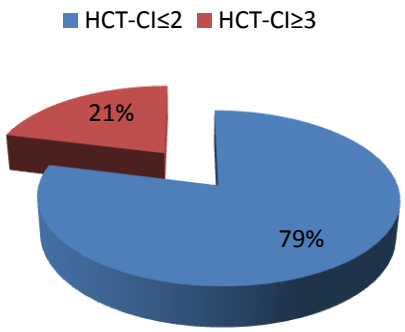
Grafikon 2. Starosna struktura bolesnika

2. Kliničko laboratorijski podaci

U momentu dijagnoze 87% bolesnika je imalo performans status ECOG≤2, dok je 13% imalo ECOG 3 i 4 (grafikon 3), dok je komorbiditetni indeks (HCT-CI) kod 79% bolesnika bio ≤2, a HCT-CI≥3 je imalo 21% bolesnika (grafikon 4). Medijana broja leukocita na prezentaciji je bila 27,56x10^9/l (0,5-247), tešku anemiju (≤80 g/l) je imalo 37% bolesnika (medijana nivoa hemoglobina je 87 g/l (41-123)). Medijana broja trombocita je bila 56x10^9/l (3-237). Klinički ispoljen izražen hemoragijski sindrom je bio prisutan u polovine bolesnika na prezentaciji, dok je znake infekcije imalo četvrtina bolesnika. Medijana nivoa laktat dehidrogenaze je bila 466,5 U/l (130-9009), što je dva puta iznad gornje granice normale. Medijana broja blasta u perifernoj krvi je bila 60% (0-98), dok je u koštanoj srži bila 80% (28-97).



Grafikon 3. Distribucija bolesnika u odnosu performans status

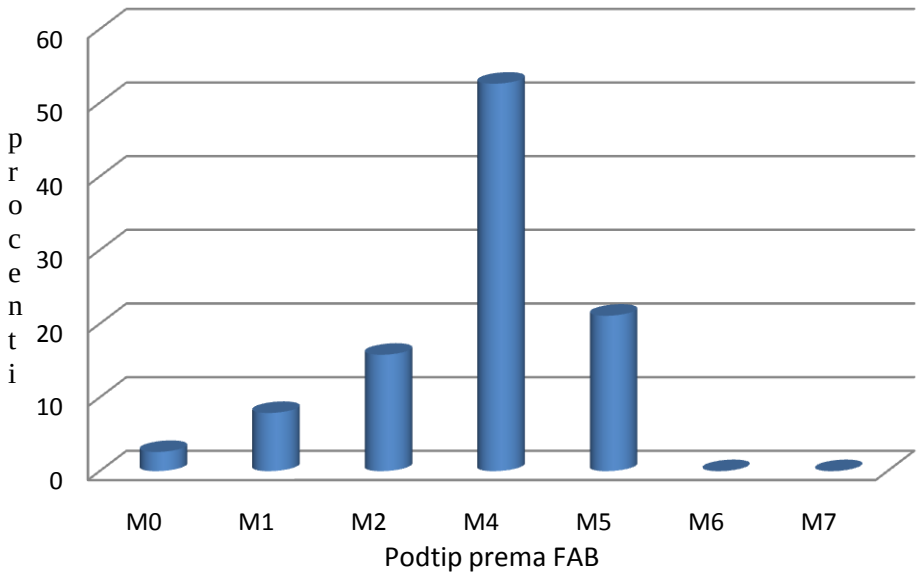


Grafikon 4. Distribucija bolesnika u odnosu na na komorbiditetni indeks

3. Podela akutnih mijeloidnih leukemija

Svi bolesnici su imali novootkivenu, *de novo* akutnu mijeloidnu leukemiju. Distribucija AML prema FAB klasifikaciji je prikazana na grafikonu 5. Većina bolesnika (52,63%) je imala dijagnostikovanu akutnu mijelomonoblastnu leukemiju (M4 po FAB). U našem uzorku bolesnika

nije bilo dijagnostikovanih bolesnika sa akutnom eritroblastnom leukemijom (M6) i akutnom megakarioblastnom leukemijom (M7). Prema klasifikaciji Svetske zdravstvene organizacije (SZO), sve dijagnostikovane AML, kod naših bolesnika, pripadaju grupi AML, koje nisu na drugi način definisane *(AML, not otherwised specified).* Provizioni entitet prema klasifikaciji SZO, AML sa $NPM1^{mut}$, čine 45% svih dijagnostikovanih bolesnika.



Grafikon 5. Distribucija bolesnika u odnosu na podtip AML prema FAB

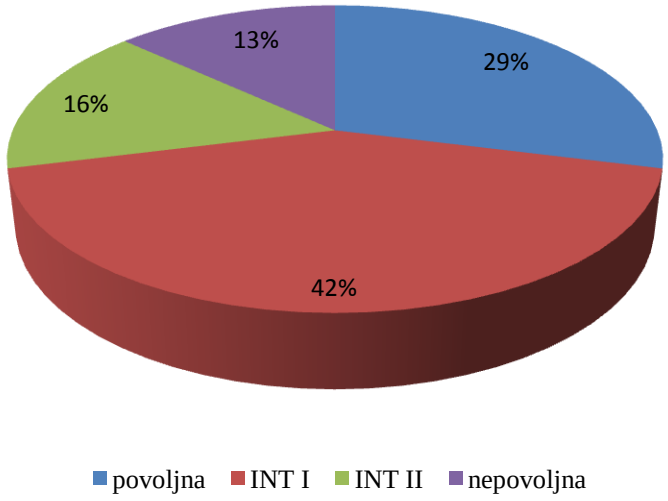
4. Citogenetske i molekularne karakteristike AML i podela u odnosu na rizik

Prema standardnim citogenetskim rizičnim kategorijama, većina bolesnika (60%) je imalo citogenetski normalnu (CN) AML, koja spada u intermedijarnu grupu rizika. Kod jednog bolesnika je uočen gubitak Y hromozoma (u 100% metafaza), a kod jedne žene gubitak X hromozoma (u 30% metafaza). Samo kod jedne bolesnice je dijagnostikovana povoljna citogenetska promena (t 15;17), ali je ona po postavljanju dijagnoze varijantnog oblika akutne promijelocitne leukemije (M3v), isključena iz istraživanja. Od izolovanih citogenetski

nepovoljnih aberacija, najučestalija je bila monozomija 7 (3/38 bolesnika), dok je kompleksni kariogram imalo takođe 3 bolesnika. Jedna bolesnica je imala *near*tetraploidni kariogram. Nije dobijen adekvatan materijal za citogenetsku analizu, odnosno nisu viđene metafaze kod tri bolesnika (7,9%).

Kod svih bolesnika je urađeno, sada već standardno, molekularno ispitivanje u smislu prisustva FLT3 mutacije i mutacije u genu za nukleofozmin 1. FLT3 mutacija je prisutna kod 13/38 bolesnika (34% od svih AML) i to, u glavnom, u vidu FLT3-ITD mutacija (u 85%), dok su ostali bolesnici (15%) imali FLT3-TKD(D835) mutaciju. Nukleofozmin 1 mutacija je bila prisutna u 45% bolesnika i praktično sve mutacije su bile A tipa (osim kod jednog bolesnika, koji je imao mutaciju B tipa). Od svih $NPM1^{mut}$ AML, 86% su imale normalan kariogram, a u oko 30% slučajeva je pored $NPM1^{mut}$ bila prisutna i FLT3-ITD ^{mut}.

U odnosu na ELN kategorije rizika, bolesnici su podeljeni u četiri grupe (grafikon 6).

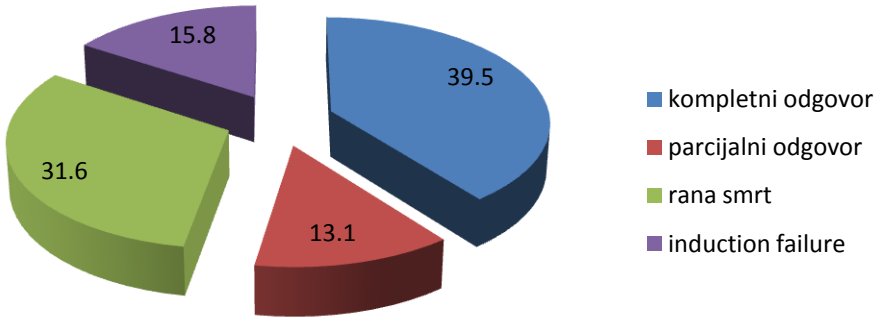


Grafikon 6. Distribucija bolesnika u odnosu na ELN prognozne grupe

(INT-intermedijarna grupa)

5. Terapija i odgovor na terapiju

Kod svih bolesnika je započeta terapija. Svi bolesnici su uniformno lečeni prema protokolu "3+7" (tri dana antraciklina i sedam dana citarabina u kontinuiranoj infuziji). Doza antraciklina je korigovana u odnosu na dob i performans status. Doza daunorubicina se kretala od 45 mg/m^2 do 60 mg/m^2, odnosno idarubicina 12 mg/m^2, dok je doza citarabina bila 100-200 mg/m^2. Kod bolesnika sa hiperleukocitozom, započinjalo se terapijom citarabinom, a poslednja tri dana su primili antraciklin. Na primenjenu terapiju kod više od polovine je postignut odgovor i to kao parcijalni odgvoror (PR) kod 13,1% bolesnika, kompletni odgovor (CR) kod 39,5% bolesnika, kod 15,8% nije postignut zadovoljavajući odgovor na primenjenu terapiju *(induction failure)*, dok je kod 31,6% bolesnika zabeležena rana smrtnost (grafikon 7).



Grafikon 7. Odgovor na primenjenu terapiju

6. Rana smrtnost

U našoj seriji bolesnika je zabeležena učestalost rane smrti (*early death*) u 31,6% bolesnika. Medijana životne dobi bolesnika je bila 61 godinu (37-74). Bolesnici lošijeg performans statusa (ECOG 3 i 4) sa pridruženim komorbiditetima su činili oko trećine bolesnika. Medijana broja leukocita, pri postavljanju dijagnoze, kod ove grupe bolesnike, je bila $95x10^9$/l (25,6-247), a aritmetička sredina (±SD) je 113,7±70,45. Inicijalni broj leukocita preko $50x10^9$/l je imalo 82% ovih bolesnika. Prema FAB kategoriji su sve, osim jedne, AML bile mijelomonoblastnog, odnosno monoblastnog tipa.

7. Relativna ekspresija gena EVI1 u kontrolnoj grupi (zdravi) i kod ispitivane grupe bolesnika

Zdrave kontrole su imale vrednost relativne ekspresije EVI1 gena 1,087±0,187 (aritmetička sredina±standarna devijacija), medijana 1,09 (0,06-2,18), dok je u ispitivanoj grupi naših bolesnika relativna ekspresija (računato na 30 bolesnika, s obzirom da je kod 8 bolesnika bilo odsustvo ekspresije) bila 8,33±4,04 (aritmetička sredina±standarna devijacija), medijana 0,05 (0,01-91,8). Dokazana je značajno povećana ekspresija EVI1 gena kod naših bolesnika sa AML u odnosu na zdrave kontrole (p=0,008, Man-Vitni "U"-test).

8. Visoka ekspresija EVI1 gena u našem uzorku bolesnika

Za graničnu vrednost *(cut off)* visoke ekspresije EVI1 gena, u ovom istraživanju, je uzeta srednja vrednost relativne ekspresije kod zdravih (kontrolna grupa) i na nju je dodato 3 puta

standardna devijacija (1,087+3x0,187=1,648). Sve vrednosti iznad 1,648 su smatrane visokom ekspresijom *(eng.overexpression)* EVI1 gena. Primenom ove vrednosti, u našem uzorku bolesnika imamo 5 bolesnika (13,2%) koji imaju visoku ekspresiju EVI1 gena (EVI1 pozitivni) i 33 bolesnika (86,8%) koji nemaju visoku ekspresiju EVI1 gena (EVI1 negativni).

9. Povezanost visoke ekspresije EVI1 gena sa demografskim, kliničko-laboratorijskim, molekularnim karakteristikama

Kada se uporede sledeće karakteristike: pol, starost, parametri krvne slike, nivo laktat dehidrogenaze, procenat blasta u perifernoj krvi i koštanoj srži, komorbiditetni indeks, performans status, ELN grupe rizika, tip akutne mijeloidne leukemije u odnosu na FAB klasifikaciju, procenat rane smrtnosti, ishod bolesti, nije ustanovljena statistički značajna razlika između EVI1 pozitivnih i EVI1 negativnih bolesnika (tabela 11).

Postoji statistički značajna povezanost između visoke ekspresije EVI1 i nepostojanja NPM1 mutacije (p=0,031), kao i između visoke ekspresije EVI1 gena i prisustva monozomije 7 (p=0,047) (tabela 12). Nije ustanovljena povezanost visoke ekspresije EVI1 gena sa neprisustvom FLT3-ITD mutacije (p=0.126). Nijedan od EVI1 pozitivnih bolesnika nije imao ove dve mutacije ($NPM1^{mut}$ i $FLT3\text{-}ITD^{mut}$). Citogenetski normalan kariogram je imalo 60% EVI1 pozitivnih bolesnika, dok je 40% imalo monozomiju 7 (grafikon 8).

Svih pet EVI1 pozitivnih bolesnika je imalo smrtni ishod i niko nije postigao kompletnu remisiju (p=0,053).

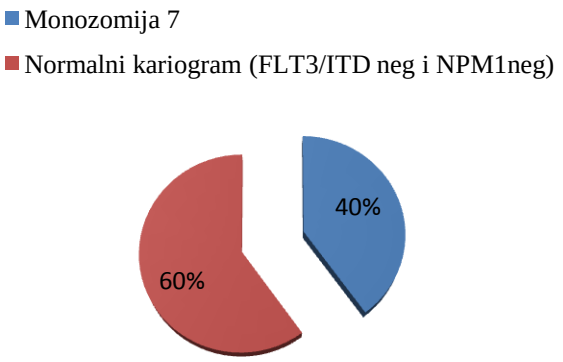
Tabela 11. Kliničke i laboratorijske karakteristike ispitivanog uzorka bolesnika i povezanost visoke ekspresije EVI1 gena sa kliničkim i laboratorijskim markerima

Parametar	Ukupno (n=38)	*EVI1*$^{+}$ (n=5)	*EVI1*$^{-}$ (n=33)	*p* vrednost
Pol				0.770
muški (%)	13 (34.2)	2	11	
ženski (%)	25 (65.8)	3	22	
Starost (godine)				0.529
medijana(opseg)	52(23-80)	52(26-62)	52(23-80)	
srednja vr.±SD	51.45±2.204			
Br.leukocita (x10^{9}/l)				0.424
medijana(opseg)	27.56(0.5-247)	26.6(0.5-68)	28.5(1.03-247)	
srednja vr.±SD	51.73±9.64			
Hemoglobin (g/l)				0.172
medijana(opseg)	87 (41-123)	75(64-98)	89(41-123)	
srednja vr.±SD	87±3.44			
Trombociti (x10^{9}/L)				0.102
medijana(opseg)	56 (3-237)	23(19-92)	63(3-237)	
srednja vr.±SD	72.32±8.82			
Eritrociti (x10^{12}/l)				0.235
medijana(opseg)	2.62(1.17-4.30)	0.21(1.98-3.19)	2.72(1.17-4.30)	
srednja vr.±SD	2.72±0.122			
Granulociti (x10^{9}/l)				0.252
medijana(opseg)	3.26(0-59.28)	1.08(0.2-6.04)	3.72(0-59-28)	
srednja vr.±SD	5.64±1.62			
LDH (U/L)				0.501
medijana(opseg)	466.5 (130-9009)	381(138-1301)	480(130-9009)	
srednja vr.±SD	919.61±248.31			
Blasti u perif.krvi (%)				0.529
medijana(opseg)	60 (0-98)	54(1-90)	60(0-98)	
srednja vr.±SD	59.16±4.68			
Blasti u koštanoj srži (%)				0.353
medijana(opseg)	80 (28-97)	70(60-95)	80(28-97)	
srednja vr.±SD	75.55±2.62			
HCT-CI				0.337
<2	24(63.26%)	2	22	
≥2	14(36.84%)	3	11	
Performance status				0.141
<2	22(57.89%)	1	21	
≥2	16(42.11%)	4	12	
ELN kategorije rizika				1.0
povoljna+intermedijerna I grupa rizika	16(42.11%)	2	14	
intermedijerna II + nepovoljna grupa rizika	22(57.89%)	3	19	
FAB (%)				0.814
M0	1(2.6)	0	1(100)	
M1	3(7.9)	0	3(100)	
M2	6(15.8)	1(16.7)	5(83.3)	
M4	20(52.6)	2(10)	18(90)	
M5	8(21.1)	2(25)	6(75)	

Nastavak tabele 11.				
Kompletna remisija				**0.053**
da (%)	15(39.5)	0(0)	15(45.5)	
ne (%)	23(60.5)	5(100)	18(54.5)	
Rana smrt				0.664
da (%)	12(31.6)	2(16.7)	10(83.3)	
ne (%)	24(68.4)	3(12.5)	23(95.8)	
Smrtni ishod				0.152
da (%)	28(73.7)	5(100)	23(69.7)	
ne (%)	10(26.3)	0	10(30.3)	

Tabela 12. Citogenetske i molekularne karakteristike ispitivanog uzorka bolesnika i povezanost visoke ekspresije EVI1 gena sa citogenetskim i molekularnim karakteristikama

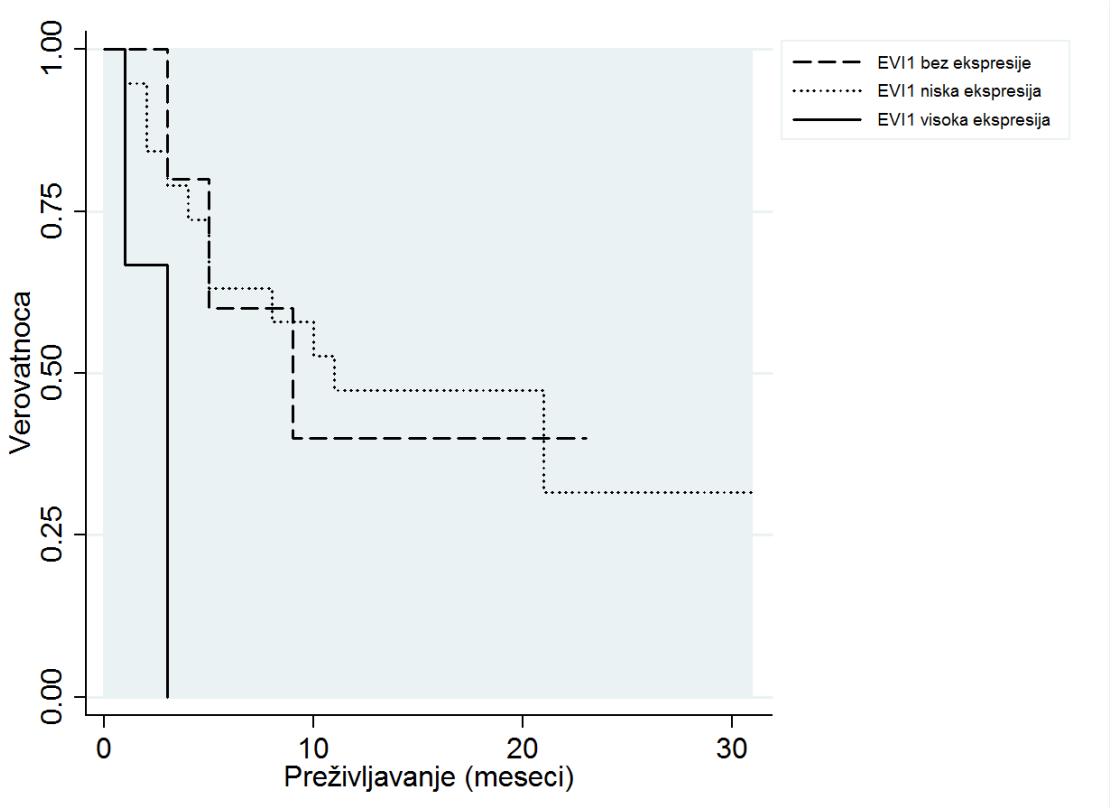
Parametar	**Ukupno (n=38)**	***EVI1*$^{+}$ (n=5)**	***EVI1*$^{-}$ (n=33)**	***p* vrednost**
AML normalni kariogram				0.68
da (%)	21(60)	3 (60)	18 (60)	
ne(%)	12 (40)	2 (40)	15 (40)	
Monozomija 7				**0.047**
prisutna (%)	3 (8,58)	2 (40)	1 (3,33)	
odsutna (%)	32 (91,42)	3 (60)	29 (96,6)	
FLT3/ITD				0.126
prisutna (%)	11(28.9)	0	11(100)	
odsutna (%)	27(71.1)	5(18.5)	22(81.5)	
NPM1mut				**0.031**
prisutna (%)	17(44.7)	0	17(100)	
odsutna (%)	21(55.3)	5(23.8)	16(76.2)	



Grafikon 8. AML sa visokom ekspresijom EVI1 gena i citogenetsko/molekularne karakteristike

10. Uticaj nivoa ekspresije gena EVI1 na ukupno preživljavanje

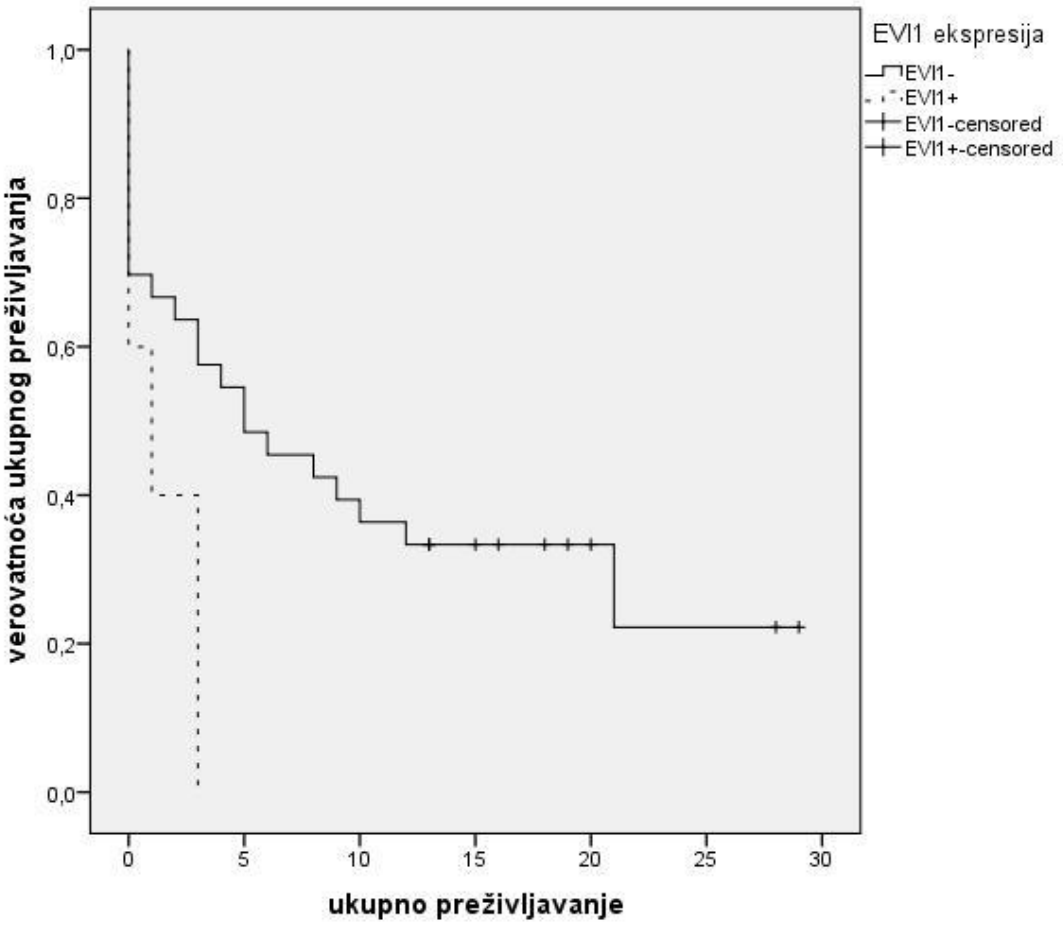
Najpre smo izvršili poređenje preživljavanja bolesnika sa različitim nivoom ekspresije gena EVI1, uključujući bolesnike sa odsustvom ekspresije (odnosno bez bazalne ekspresije), bolesnike sa niskom i bolesnike sa visokom ekspresijom EVI1 gena. Postoji statistički značajna razlika u ukupnom preživljavanju bolesnika sa odsustvom EVI1 ekspresije i bolesnika sa visokom EVI1 ekspresijom (p=0,0274). Poređenjem bolesnika sa niskom i visokom ekspresijom EVI1 gena, takođe smo dobili statistički značajnu razliku u odnosu na preživljavanje (p=0,0068). Međutim, ne postoji statistički značajna razlika u preživljavanju bolesnika sa odsustvom ekspresije i bolesnika sa niskom ekspresijom EVI1 gena (p >0,9) (grafikon 9).



Grafikon 9. Uticaj nivoa ekspresije gena EVI1 na ukupno preživljavanje

11. Uticaj visoke ekspresije EVI1 gena na preživljavanje kod naših bolesnika

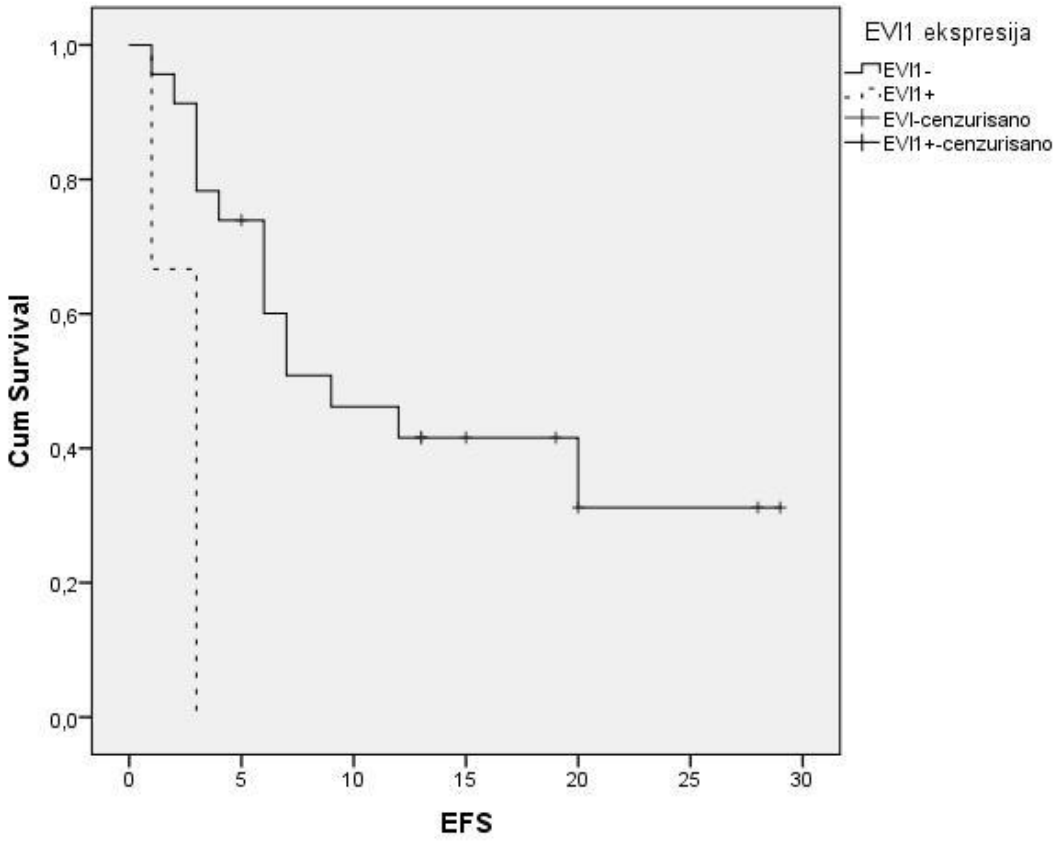
Visoka ekspresija EVI1 gena je povezana sa kraćim ukupnim preživljavanjem (p=0,025) (grafikon 10). EVI1 pozitivni bolesnici su imali medijanu ukupnog preživljavanja 1 mesec, dok su EVI1 negativni bolesnici imali 5 meseci (EVI1 pozitivni ukupno 5, 0 cenzurisano; EVI1 negativni ukupno 33, 10 cenzurisano).



Grafikon 10. Uticaj visoke ekspresije EVI1 na ukupno preživljavanje kod AML

Visoka ekspresija EVI1 gena je povezana i sa kraćim preživljavanjem bez događaja *(event free survival-EFS)*, što je prikazano na grafikonu 11 (p=0.004). EVI1 pozitivni bolesnici su imali medijanu EFS 3 meseca, dok su EVI1 negativni imali 9 meseci (EVI1 pozitivni ukupno

5, 0 cenzurisano; EVI1 negativni ukupno 23, 9 cenzurisano). Preživljavanje bez bolesti (*disease free survival-DFS*), odnosno preživljavanje bez relapsa bolesti *(relapse free survival-RFS*) nije računat, jer niko od EVI1 bolesnika nije postigao kompletnu remisiju i nije relapsirao.

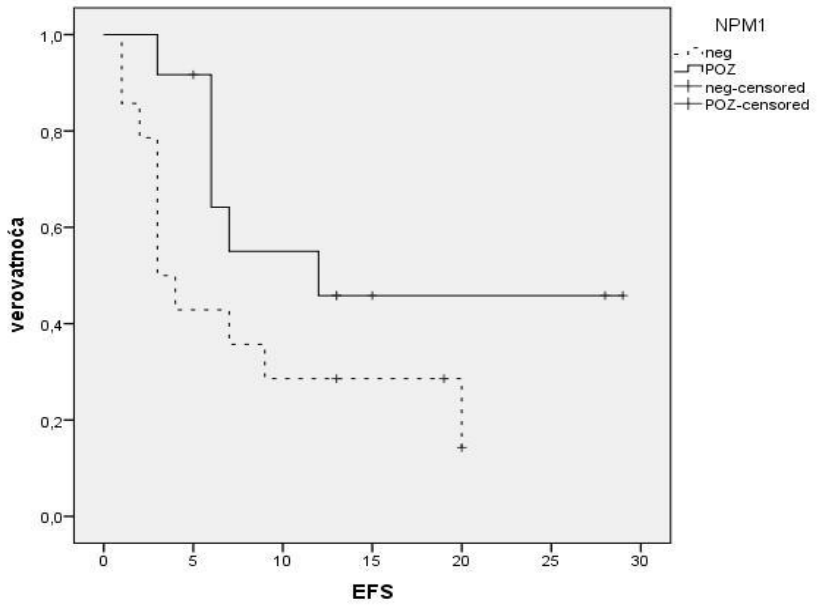


Grafikon 11. Uticaj visoke ekspresije EVI1 na preživljavanje bez događaja *(event free survival-EFS)*

12. Uticaj molekularnih markera na preživljavanje kod naših bolesnika

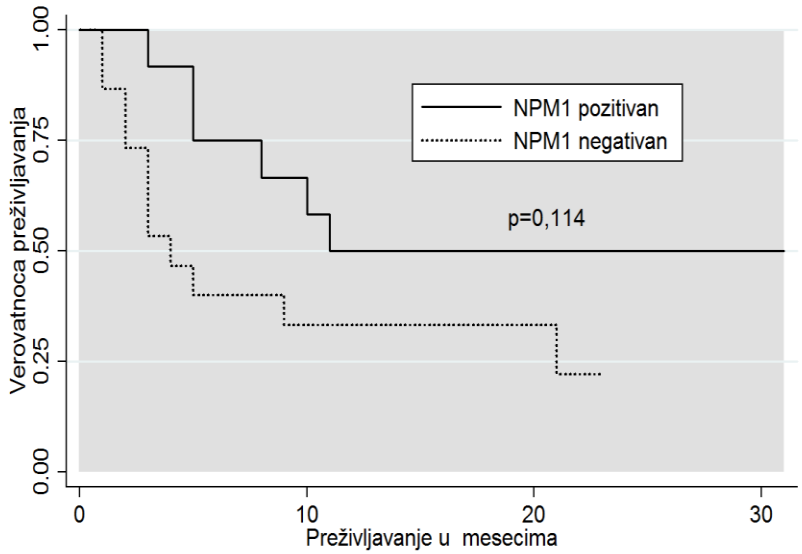
Kada se posmatra cela grupa bolesnika (svih 38), bolesnici sa nukleofozmin 1 mutacijom ($NPM1^{mut}$) su imali duže preživljavanje bez događaja (EFS) u odnosu na bolesnike bez nukleofozmin 1 mutacije ($NPM1^{nemut}$) (p=0.096) (grafikon 12). Bolesnici sa $NPM1^{mut}$ su imali

medijanu EFS 12 meseci, dok su NPM1^{nemut} imali tri meseca (NPM1^{mut} ukupno 12, 6 cenzurisano; NPM1^{nemut} ukupno 14, 3 cenzurisano).



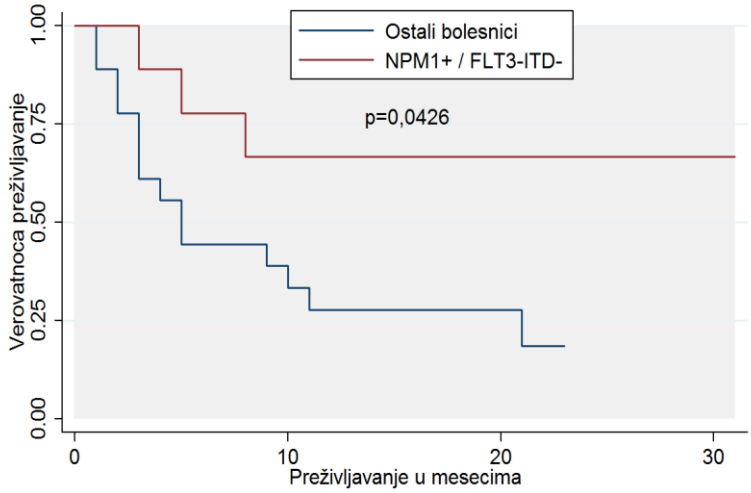
Grafikon 12. Uticaj NPM1^{mut} na preživljavanje bez događaja

Takođe, NPM1^{mut} bolesnici su imali i duže ukupno preživljavanje *(overall survival)*, međutim bez statističke značajnosti (p=0,114) (Grafikon 13). NPM1^{mut} su imali medijanu ukupnog preživljavanja 8 meseci, dok su NPM1^{nemut} imali tri meseca (NPM1^{mut}ukupno 17, 6 cenzurisano; NPM1^{nemut} ukupno 21, 4 cenzurisano). Šest bolesnika od ukupno sedamnaest bolesnika sa NPM1^{mut} nije postiglo CR (p=0,103). Prisustvo NPM1 mutacije bez FLT3-ITD mutacije pokazuje tendenciju ka statističkoj značajnosti u odnosu na ukupno preživljavanje u ukupnoj grupi bolesnika (p=0,0684, tabela 13).



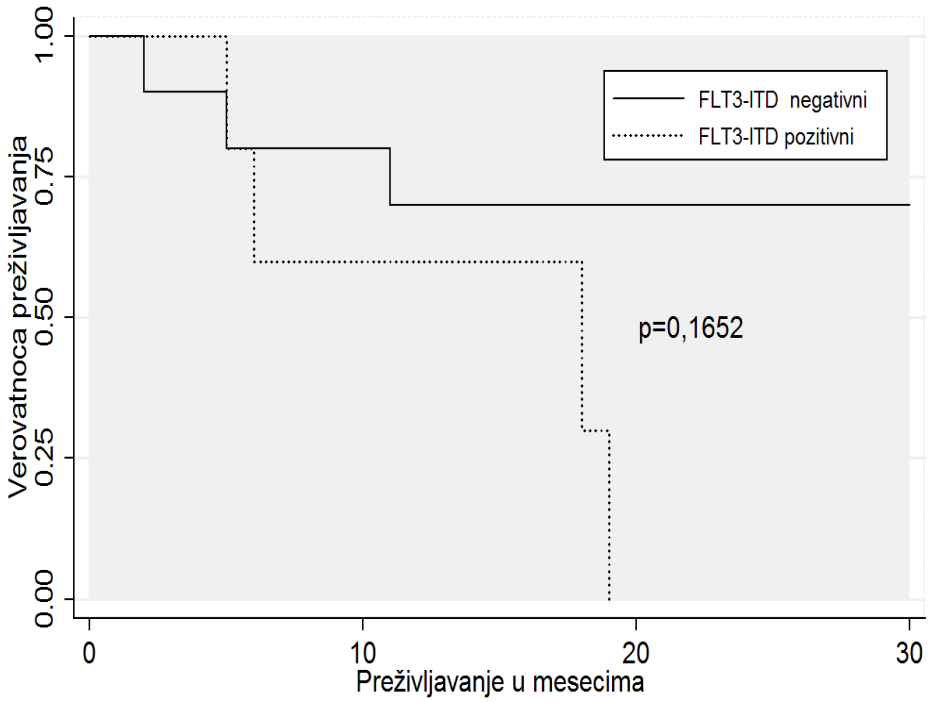
Grafikon 13. Uticaj NPM1^{mut} na ukupno preživljavanje u svih bolesnika

Međutim, ukoliko se isključe bolesnici koji su doživeli ranu smrt, bolesnici sa NPM1 mutacijom bez FLT3-ITD mutacije pokazuju statistički značajno duže ukupno preživljavanje u odnosu na ostale bolesnike (p= 0,0426) (grafikon 14).



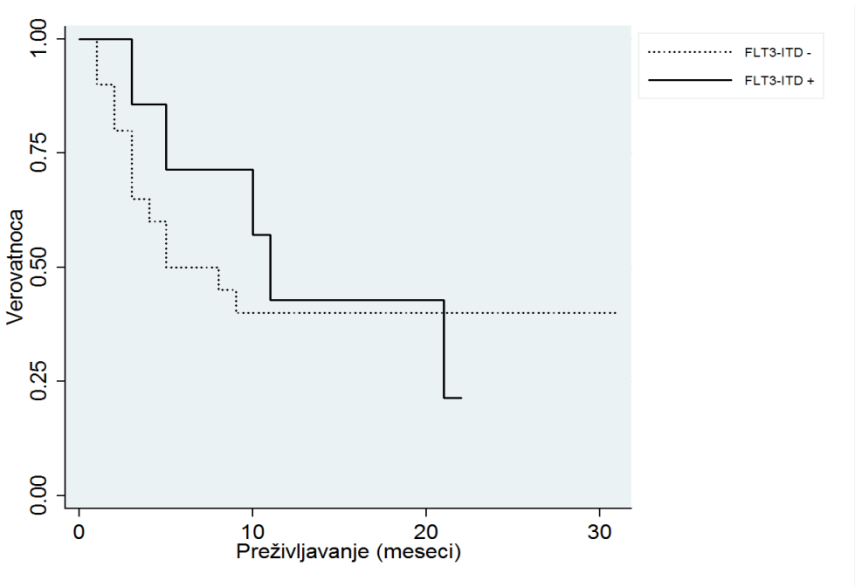
Grafikon 14. Uticaj NPM1+/FLT3-ITD- na ukupno preživljavanje (isključujući bolesnike sa ranom smrti)

Kada se posmatra prognozni značaj FLT3-ITD mutacije u našoj ispitivanoj grupi bolesnika, 4/5 FLT3-ITD bolesnika koji su postigli kompletnu remisiju su relapsirali (p=0,067). U odnosu na preživljavanje bez bolesti *(disease free survival-DFS)*, kod FLT3-ITD negativnih bolesnika medijana DFS nije dostignuta, dok je kod FLT3-ITD pozitivnih bolesnika medijana DFS bila 18 meseci (p=0,165) (grafikon 15).



Grafikon 15. Uticaj FLT3-ITD mutacije na preživljavanje bez bolesti (disease free survival-DFS)

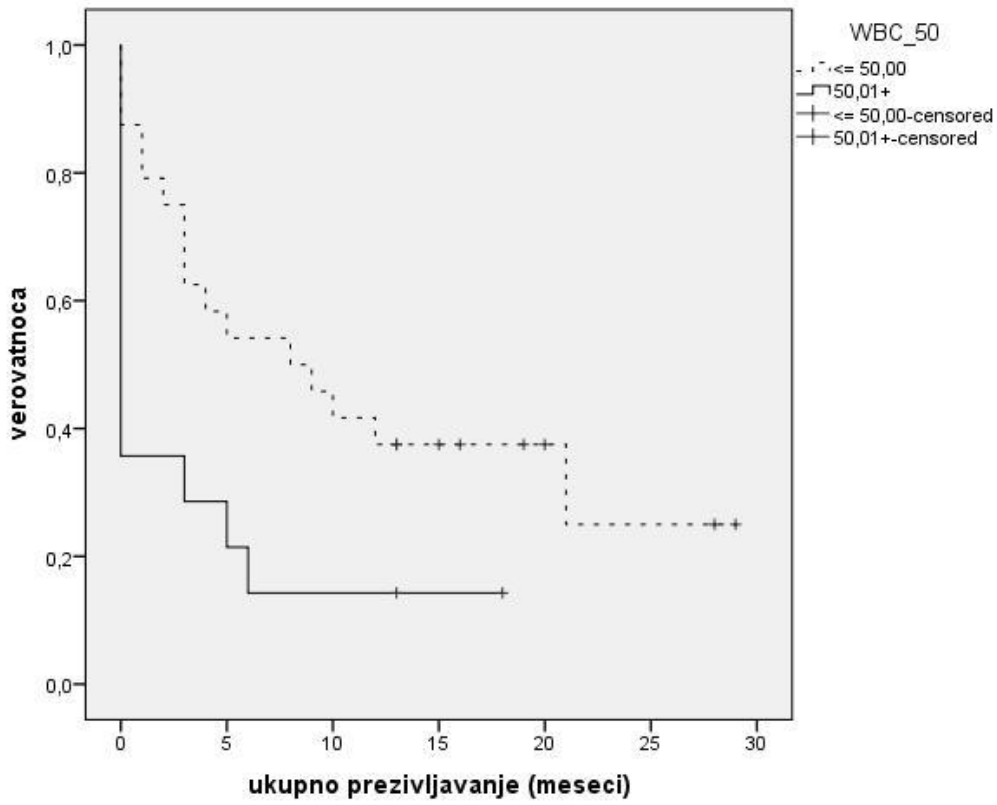
FLT3-ITD mutacija nije pokazala statistički značajan uticaj na ukupno preživljavanje (p=0,76) (grafikon 16).



Grafikon 16. Uticaj FLT3-ITD mutacije na ukupno preživljavanje

13. Ispitivanje kliničkih, laboratorijskih i molekularnih prognostičkih faktora na preživljavanje

Pored ranije opisanog značajnog uticaja visoke ekspresije EVI1 gena na ukupno preživljavanje i inicijalno visok broj leukocita pokazuje statistički značajan uticaj na ukupno preživljavanje. Dokazali smo da inicijalni broj leukocita iznad $50x10^9$/l ima negativan uticaj na ukupno preživljavanje *(overall survival)* (p=0,017) (grafikon 17). Bolesnici sa inicijalnim brojem leukocita preko $50x10^9$/l su imali medijanu ukupnog preživljavanja 0,2 meseca, dok su bolesnici sa leukocitima ispod $50x10^9$/l imali medijanu ukupnog preživljavanja 8 meseci (Lkci iznad 50 ukupno 14, 2 cenzurisano; leukociti ispod 50 ukupno 24, 8 cenzurisano).



Grafikon 17. Uticaj broja leukocita na ukupno preživljavanje

Tendenciju ka statistički značajnom uticaju na ukupno preživljavanje pokazali su procenat blasta u perifernoj krvi (p=0,076), HCT-CI (p=0,085) i prisutvo NPM1 mutacije u odsustvu FLT3-ITD mutacije (p=0,068) (tabela 13). Ni jedan od ispitivanih parametara nije pokazao statistički značajan uticaj na preživljavanje bez bolesti (tabela 13).

Tabela 13. Klinički, laboratorijski i molekularni prognostički markeri-uticaj na preživljavanje

Prognostički faktori#	Medijana ukupnog preživljavanja	Ukupno preživljavanje p-vrednost	Medijana *DFS*	Preživljavanje bez bolesti-*DFS* p-vrednost
Pol		p=0,315		p=0,351
Muški	3		5	
Ženski	4		18	
Životno doba		p=0,13		p=0,382
≥52	1		19	
<52	5		18	
Koncentracija Hb (g/L)		p=0,701		p=0,194
≥87	3		nije dostignuta	
<87	5		18	
Broj leukocita (x10^9/l)		**p=0,017**		p=0,769
≥50	0,2		11	
<50	8		19	
Trombociti (x10^9/L)		p=0,68		p=0,713
≥56	3		nije dostignuta	
<56	4		18	
% blasta u perifernoj krvi		**p=0,076**		p=0,52
≥60	0,75		18	
<60	8		19	
% blasta u kostnoj srži		p=0,379		p=0,21
≥80	3		11	
<80	4		nije dostignuta	
LDH (U/L)		p=0,356		p=0,364
≥466,5	3		18	
<466,5	5		nije dostignuta	
HCT-CI		**p=0,0856**		p=0,45
≥2	0,75		18	
<2	5		nije dostignuta	
***Perfomance* status**		p=0,15		p=0,325
≥2	5		18	
<2	0,75		19	
CN AML		p=0.88		p=0,262
Ne	3		18	
Da	5		nije dostignuta	
ELN kategorije rizika		p=0,116		p=0,164
ELN Povoljna + intermedijerna I grupa rizika	5		nije dostignuta	
ELN Intermedijerna II + nepovoljna grupa rizika	3		18	
Visoka ekspresija EVI1*		**p=0,0255**		-
Prisutna	1		-	
Odsutna	5		-	

FLT3-ITD mutacija		p=0,75		p=0,165
Prisutna	3		18	
Odsutna	5		nije dostignuta	
Mutacija Nukleofozmin-1 /isključujući FLT-3+/		**p=0,0684**		p=0,278
Prisutna	5		nije dostignuta	
Odsutna	3		18	

#Kontinuirane varijable su analizirana podelom bolesnika na osnovu medijane, osim broja leukocita gde je kao granična vrednost uzeta 50 x 10^9/L (kada se kao granična vrednost koristi medijana broja leukocita od 27 x 10^9/L p=0.0715)
*Niko od bolesnika sa visokom EVI1 ekspresijom nije postigao remisiju

Ukoliko se iz ispitivanja isključe bolesnici koji su rano umrli jedini činioci koji pokazuju nepovoljan prognostički uticaj na ukupno preživljavanje su EVI1 (p=0,022) i odsustvo NPM1+/FLT3-ITD- (p=0,0426). Svi ostali ispitivani parametri ne pokazuju statističku značajnost.

14. Nezavisni prognostički markeri za kraće ukupno preživljavanje u našem istraživanju

Kada se u multivarijantnu analizu ubace prognostički faktori sa statističom značajnosti u univarijantnoj analizi (p< 0.10): EVI1 status, NPM1 status, broj leukocita iznad 50x10^9/l, HCT-CI i procenat blasta u perifernoj krvi, dobija se da broj leukocita iznad 50x10^9/l i odsustvo NPM1+/FLT-ITD- predstavljaju nepovoljne prognostičke faktore za ukupno preživljavanje (OS) (tabela 14).

Tabela 14. Rezultati cox regresione analize EVI1 statusa, broja leukocita i NPM1 statusa i njihovog uticaja na ukupno preživljavanje

	ukupno preživljavanje *(overall survival)*		
parametar	Hazard ratio	*p* vrednost	95% interval poverenja (CI)
EVI1 pozitivni status	2.594605	0.111	0.8022256-8.391625
Broj leukocita≥50x10^{9}/l	4.74508	**0.012**	1.402885-16.04963
NPM1+/FLT3-ITD-	0.2428197	**0.009**	0.0840218 - 0.7017394
%blasta u perifernoj krvi	1.248234	0.693	0.4149593-3.754795
HCT-CI	1.443275	0.384	0.6319107 - 3.296418

Ukoliko se iz analize isključe bolesnici sa ranom smrti, a u multivarijantnu analizu ubace faktori koji su se u univarijantnoj analizi pokazali statistički značajnim (EVI1 pozitivnost i NPM1+/FLT3-ITD-), EVI1 pozitivni status se pokazao kao nezavisni činilac nepovoljne prognoze (p=0.045). (tabela 15).

Tabela 15. Rezultati cox regresione analize EVI1 statusa i NPM1+/FLT3-ITD-, ukoliko se isključe bolesnici sa ranom smrti

	ukupno preživljavanje *(overall survival)*		
parametar	Hazard ratio	*p* vrednost	95% interval poverenja (CI)
EVI1 pozitivni status	4.442476	**0.045**	1.035935-19.05098
NPM1+/FLT3-ITD-	0.3577793	0.115	0.0996428-1.284649

VI DISKUSIJA

Akutna mijeloidna leukemije je heterogena grupa oboljenja, unutar koje se nalaze entiteti koji se međusobno razlikuju u odnosu na kliničke, laboratorijske, morfološke, imunofenotipske, citogenetske, molekularne karakteristike, što za posledicu ima različit odgovor na terapiju i različito preživljavanje. Terapijski pristup obolelom od akutne mijeloidne leukemije se bazira u odnosu na prognostičke markere, od kojih su najvažniji oni vezani za samog bolesnika (kao što su dob, performans status, komorbiditeti), kao i oni vezani za samu bolest (inicijalni broj leukocita, de novo *versus* sekundarna leukemija, citogenetika i molekulrani markeri) [76]. Standardna citogenetska analiza leukemijskih ćelija predstavlja osnovni prognostički marker kod obolelih od AML [115-120]. Međutim, veliki deo AML (oko 40-50%) na prezentaciji ima normalan kariogram i samim tim pripada citogenetski intermedijarnoj, nedovoljno definisanoj prognostičkoj kategoriji. Poslednjih desetak godina, otkriveni su dopunski molekularni markeri sa, sada već potvrđenim, prognostičkim značajem [127,128,138,143]. Među njima se posebno ističu prisustvo mukleofozmin 1 mutacije, potom prisustvo FLT3-ITD mutacije, kao i CEBPA dvostruke mutacije. Pored navedenih, u toku su istraživanja u vezi sa prognostičkim značajem čitave palete drugih molekularnih markera (mutacije gena, poremećaja ekspresije gena), koji sami ili u kombinaciji, mogu doprineti boljoj stratifikaciji obolelih od AML u odnosu na rizik. Poslednjih godina se ističe značaj poremećene ekspresije gena EVI1 u akutnoj mijeloidnoj leukemiji i sve je više radova koji govore, u glavnom, u prilog negativnog prognostičkog značaja visoke ekspresije EVI1 gena [215,216,223,225,226]. U ovom prospektivnom istraživanju smo

potvrdili negativni prognostički značaj visoke ekspresije EVI1 gena u akutnoj mijeloidnoj leukemiji, na našem uzorku od 38 bolesnika.

U ovom prospektivnom istraživanju je obuhvaćeno 38 odraslih, novootkrivenih bolesnika sa *de novo* akutnom non-M3 mijeloidnom leukemijom, kod kojih je započeto standardno citostatsko lečenje. Bolesnici kod kojih je od momenta postavljanja dijagnoze bilo planirano palijativno lečenje (transfuzijama, hidroksiureom ili niskim dozama citozin arabinozida ili sl.), kao i oni kod kojih nije ni započeto lečenje, nisu bili uključeni u istraživanje. U našem uzorku, većina bolesnika su ženskog pola i to čak dve trećine (oko 66%) od ukupnog broja bolesnika. Nasuprot tome, prema literaturnim podacima, postoji blaga prevaga muškog pola [5]. Medijana starosti kod naših bolesnika je 52 godine, što je značajnije manje u odnosu na medijanu starosti obolelih od AML prema literaturi (gde je medijana starosti obolelih između 68 i 72 godine) [4,5]. Ova razlika u dobnoj strukturi je prvenstveno posledica kriterijuma za uključivanje u ovo istraživanje. Bolesnici sa sekundarnim leukemijama (AML sa promenama u vezi sa mijelodisplazijom), kao i većina starijih bolesnika, koji po pravilu imaju i veći broj komorbiditeta i koji nisu bili planirani za intenzivno lečenje, nisu uključivani u ovo istraživanje. Tako je, u našoj grupi bolesnika, bilo 68% mlađih od 60 godina, a većina bolesnika su bili dobrog performans statusa (87% bolesnika je imalo ECOG≤2) i bez većih komorbiditeta (79% bolesnika je imalo komorbiditetni indeks, HCT-CI≤2). U odnosu na distribuciju AML prema FAB tipu, većina obolelih u našem istraživanju pripada mijelomonoblastnim, odnosno monoblastnim leukemijama, dok ako se analiziraju velike nemačke i američke studije dominiraju AML M2, koje čine više od trećine svih slučajeva, dok AML M4/M5 čine samo oko četvrtinu slučajeva [118,234]. U odnosu na klasifikaciju Svetske zdravstvene organizacije (SZO) sve dijagnostikovane AML, u našem uzorku bolesnika, pripadaju AML koje nisu na drugi način

definisane (*AML, not otherwise specified)*. Ova se može objasniti činjenicom da je od rekurentnih citogenetskih abnormalnosti (translokacija/inverzija), koje klasifikacija SZO izdvaja u posebne kliničko-biološke entitete, u toku istraživanja detektovana samo jedna, i to t (15;17), koja je po postavljanju dijagnoze varijantnog oblika akutne promijelocitne leukemije (M3v po FAB), bila isključena iz istraživanja (videti kriterijume za isključivanje, u poglavlju materijal i metode). Akutna promijelocitna leukemija (AML M3, sa karakterističnom translokacijom (15;17) i rearanžmanom PML-RARα), spada u citogenetski povoljnu prognoznu grupu sa izuzetno dobrom prognozom, mogućnošću ciljane terapije all-trans retinoičnom kiselinom (ATRA) i/ili arsen-trioksidom (ATO) i mogućnošću praćenja minimalne rezidualne bolesti PCR metodom, zbog čega se po pravilu izdvaja od drugih tipova AML u ovakvom tipu istraživanja [235,236]. Razlog, zbog čega nisu detektovane druge rekurentne citogenetske abnormalnosti (od posebnog značaja su one koje spadaju u citogenetski dobru prognoznu grupu, kao što su t (8;21) i inv (16), odnosno t (16;16)), je relativno mala učestalost ovih citogenetskih abnormalnosti (svaka između 5-7%), ali sigurno i nedovoljna senzitivnost (odnosno rezolucija) pri detekciji ovih translokacija/inverzija, korišćenjem standardne tehnike pruganja kod analize kariograma [97]. Mogućnost prevazilaženja ovih nedostataka klasične citogenetike i otkrivanja ovih kriptičnih citogenetskih abnormalnosti, koje su od ogromnog prognostičkog značaja i značaja u planiranju postremisione terapije, ogleda se pre svega u uskoj saradnji kliničara, citologa, onoga koji radi imunofenotipizaciju i naravno citogenetičara, ali i upotrebom ciljanih tehnika, tipa fluorescentne *in situ* hibridizacije (FISH), kao komplementarne metode sa klasičnom citogenetikom ili upotrebom RT-PCR (*reverse transcriptase polymerase chain reaction*) za detekciju nastalog fuzionog gena [123,237,238,239]. Tako na primer, AML sa t (8;21) je često praćena citopenijama u krvnoj slici, ima relativno karakterističnu morforlogiju, obično je M2 tipa (AML

sa sazrevanjem), citoplazma blasta je sa abnormalnom granulacijom, karakteristične boje lososa, oivičena bazofilijom, dok su imunofenotipski blasti CD34 jasno pozitivni, u dve trećine slučajeva aberantno eksprimiraju CD19, dok je u polovini slučajeva prisutan CD56 antigen [240]. Istovremena ekspresija CD19 (iznad 10%) i CD34 (iznad 35%) je visoko prediktivna za postojanje ove hromozomske aberacije [78]. S druge strane, AML sa inverzijom 16 i translokacijom (16;16) je obično mijelomonoblastnog tipa (M4Eo po FAB) sa prisutnim abnormalnim eozinofilima koji imaju eozinofilne/bazofilne granule, a imunofenotipski blasti uglavnom eksprimiraju CD13 i CD34, dok je ekspresija drugih mijelo/monocitnih markera (CD11b, CD11c, CD14, CD33) različita [78]. Za ovu citogenetsku promenu, relativno je karakteristična i aberantna ekspresija CD2 [241].

U našem uzorku bolesnika prisustvo AML sa normalnim kariogramom (CN AML) je utvrđeno u oko 60% bolesnika, što je za 10-20% više u odnosu na literaturne podatke, prema kojim je učestalost AML sa normalnim kariogramom između 40-50% [118,242,243]. Ovo je još jedna činjenica, koja govori u prilog da se među ovim bolesnicima sa normalnim kariogramom, kriju i oni sa kriptičnim citogenetskim abnormalnostima, čija bi detekcija doprinela preciznijem definisanju prognoze, kod ove grupe sa inače citogenetski intermedijarnom prognoznom. Od izolovanih citogenetskih abnormalnosti kod tri naša bolesnika (8,6%) je detektovana monozomija 7, kao izolovana abnormalnost, koja spada u grupu sa nepovoljnom prognozom. Prisustvo izolovane monozomije je relativno često u AML, a monozomija 7 je jedna od najučestalijih (učestalost oko 7%). Monozomija i delecija hromozoma 7 (-7/7q-) je samo u trećini slučajeva izolovana, a mnogo češće se javlja zajedno sa drugim hromozomskim aberacijama, često u okviru kompleksnog kariograma [244]. Prisustvo izolovane monozomije (ako se isključi gubitak polnog hromozoma) je povezano sa lošim ishodom. Prisustvo dve ili više

monozomija, ili jedne monozomije u kombinaciji sa nekom strukturnom abnormalnosti, predstavlja tzv.monozomalni kariotip, koji ima još lošiju prognozu [122]. U odnosu na ELN citogenetsko-molekularne prognostičke kategorije, u ispitivanoj grupi bolesnika, grupu sa povoljnom prognozom čini 29% bolesnika, intermedijarnu I čak 42% bolesnika, intermedijernu II 16% bolesnika, dok bolesnici sa nepovoljnom prognozom čine 13% bolesnika. Prema literaturnim podacima [245], kada se posmatra cela grupa bolesnika (svih starosnih kategorija) povoljnu grupu čini 31%, intermedijarnu I-18%, intermedijarnu II 24%, a nepovoljnu 26% bolesnika, dok se distribucija u odeđene riziko kategorije znatno razlikuje u odnosu na starosnu grupu bolesnika. U našoj grupi bolesnika (gde su dve trećine mlađi od 60 godina) je manji procenat bolesnika sa nepovoljnom prognozom, s obzirom da su isključene sekundarne AML, te je i manji procenat kompleksnih kariograma, koji i kod mlađih bolesnika čine oko 65% onih sa nepovoljnom prognozom. Među našim bolesnicima, dijagnostikovana je i jedna AML (M2 tipa) sa *near*tetraploidnim kariotipom (89-91 XXXX), koji nije karakterističan za AML, ali se opisuju pojedinačni prikazi slučajeva, čak i manje serije bolesnika sa tetraploidnim i *near*tetraploidnim kariotipom [246]. Blasti u ovim leukemija sadrže od 80 do 104 hromozoma, a zbog povećane količine genetskog materijala su uglavnom veliki, bizarnog izgleda. Prognoza ovih bolesnika je nedovoljno definisana, s obzirom na mali broj opisanih slučajeva [247]. Kod naše bolesnice je postignuta kompletna morfološka remisija primenom standardne indukcione terapije (“3+7”) uz tri konsolidacione terapije intermedijarnim dozama citarabina, čime se remisija održava više od godinu dana.

U odnosu na molekularne karakteristike kod naših bolesnika, FLT3 mutacija je detektovana u 34% bolesnika, predominantno u vidu FLT3-ITD mutacije (85%), a kod dva bolesnika je bila prisutna FLT3-TKD (D835). Nukleofozmin 1 mutacija je detektovana kod 45%

bolesnika, a većina bolesnika sa nukleofozmin 1 mutacijom je imala normalni kariogram, što je u skladu sa literaturnim podacima [36]. U oko 30% bolesnika su istovremeno bile prisutne i FLT3-ITD i $NPM1^{mut}$, što je u skladu sa literaturnim podacima (prema Gale i saradnici 17% bolesnika je imalo obe mutacije, dok Falini i saradnici navode da čak u oko 40% slučajeva AML sa $NPM1^{mut}$ ima i konkomitantnu FLT3-ITD mutaciju) [132,138]. Nešto veća učestalost FLT3 mutacije i $NPM1^{mut}$, kada se posmatraju svi naši bolesnici u ispitivanom uzorku, se može objasniti većom učestalosti CN AML kod naših bolesnika.

Svi bolesnici u ispitivanoj grupi su lečeni na isti način, standarnim "3+7" protokolom, uz izbor i prilagođavanje doze antraciklina u zavisnosti od starosne dobi, performans statusa i prisutnih komorbiditeta. Kod preko 50% bolesnika je postignut odgovor na primenjeno lečenje (minimum parcijalni odgovor, odnosno kod samo oko 40% bolesnika je postignuta kompletna remisija nakon jedne, odnosno dve indukcione terapije). Prema literaturnim podacima, stopa kompletnih remisija je značajno veća (preko 60-70%), ovakva diskrepanca se donekle može objasniti visokom stopom rane smrtnosti (preko 30%), kao i činjenicom da nisu svi bolesnici lečeni u uslovima izolacije (samo deo bolesnika je lečeno u uslovima sterilnog bloka sa zaštitnim HEPA filterima). Ovako visok procenat rane smrtnosti (skoro trećina bolesnika) se može objasniti činjenicom da bolesnici do nas dolaze sa relativno visokim brojem leukocita (kasno javljanje lekaru, mnogi bolesnici se inicijalno javljaju u regionalne centre), kao i činjenicom da su među njima (trećina bolesnika sa ranom smrti) bolesnici lošijeg performans statusa sa prisutnim komorbiditetima. Prema literaturnim podacima procenat rane smrtnosti (odnosno eng. *treatment related mortality-TRM*) je oko 10%, kada se posmatraju učesnici u kliničkim studijama, s tim da je taj procenat aktuelno niži nego što je bio početkom devedesetih (kada je iznosio do 18%), što se objašnjava poboljšanjem suportivnih

mera, uključujući i poboljšanje antifungalne terapije [248]. Kreiran je i TRM skor, koji, u svojoj uprošćenoj verziji, uzima u obzir dob, performans status, *de novo versus* sekundarna AML, kreatinin, inicijalni broj leukocita, procenat blasta u razmazu periferne krvi, broj trombocita i nivo albumina [81]. Ovaj skor je kreiran sa ciljem odabira bolesnika podobnih za intenzivnu terapiju, ali je pokazano da oni sa višim TRM skorom imaju ne samo veći rizik od fatalnih komplikacija nakon intenzivne terapije, već i veći rizik za razvoj ranih, nefatalnih komplikacija-infekcije i premeštaja u intenzivnu jedinicu [249].

U ovom prospektivnom istraživanju je akcenat stavljen na kliničkom i prognostičkom značaju ekspresije gena EVI1 u akutnoj mijeloidnoj leukemiji. Ekspresija EVI1 gena je kod zdravih osoba niska i mi smo uspeli da dokažemo da postoji statistički značajna razlika između ekspresije gena EVI1 kod zdravih osoba (kontrolna grupa) i obolelih od akutne mijeloidne leukemije [218,227,250,251]. Računajući relativnu ekspresiju, u našem uzorku bolesnika, dobili smo da 13,2 % bolesnika ima visoku ekspresiju EVI1 gena, što je u skladu sa literaturnim podacima. Različita je učestalost visoke ekspresije EVI1 gena u AML u različitim istraživanjima, takođe je različit i način računanja relativne ekspresije (u odnosu na ekspresiju kod zdravih ili u odnosu na ćelijske linije sa visokom EVI1 ekspresijom, kao što je npr. SKOV3-ćelijska linija ovarijalnog karcinoma). Bez obzira na ove metodološke razlike u kvantifikaciji ekspresije gena (uglavnom se koristi tzv. delta-delta CT metod, s tim da je različit kalibrator, uz obavezno korišćenje endogene kontrole-*housekeeping* gen), učestalost visoke ekspresije EVI1 gena u AML se kreće u rasponu 10% do najviše 25% [212, 215, 216, 222-226].

Pri analiziranju kliničkih karakteristika bolesnika sa visokom EVI1 ekspresijom i poređenjem sa bolesnicima koji nemaju visoku EVI1 ekspresiju, nije ustanovljena statistički značajna razlika u odnosu na dob, pol, parametre krvne slike, procenat blasta u koštanoj srži i

perifernoj krvi, tip AML u odnosu na FAB, ELN grupe rizika, nivo laktat dehidrogenaze, komorbiditetni indeks, performans status, što je u skladu sa literaturnim podacima [215]. Visoka ekspresija EVI1 gena je češća kod sekundarnih AML i AML povezanih sa terapijom (t-AML), međutim ovi tipovi AML i inače imaju lošiju prognozu u odnosu na *de novo* leukemije, te bolesnici sa ovim tipovima leukemija nisu bili ni uključuvani u ovo istraživanje. S obzirom na činjenicu da EVI1 proto-onkoprotein blokira endomitozu u megakariocitima i da je odgovoran za normalan ili povišen broj trombocita kod određenog broja AML sa 3q26 sindromom, očekivali smo da će i medijana broja trombocita kod EVI1 pozitivnih bolesnika biti veća nego kod EVI1 negativnih bolesnika, međutim ne postoji statistički značajna razlika u broju trombocita između ove dve grupe naših bolesnika [172]. Langabeer i saradnici su takođe pokazali da bolesnici sa AML koji imaju visoku ekspresiju EVI1, ali u odsustvu 3q26 rearanžmana, nemaju karakterističnu dismegakariopoezu i povišen broj trombocita [224].

Visoka ekspresija EVI1 u AML je povezana sa određenim citogenetskim grupama, a posebno sa inv(3)(q21q26.2)/t(3;3)(q21;q26.2) i sa MLL rearanžmanom (rearanžmanom koji obuhvata 11q23), kao i sa monozomijom 7 [142]. U našoj grupi bolesnika nismo detektovali ni jednu 3q26 abnormalnost (tzv. EVI1 rearanžman sa posledičnom RPN1/EVI1 fuzijom), kao ni MLL rearanžman (11q23 abnormalnost), dok smo uspeli sa dokažemo statistički značajnu povezanost monozomije 7 sa EVI1 pozitivnim AML u odnosu na EVI1 negativne. AML sa inv(3)/t(3;3) je prototip leukemije sa visokom ekspresijom EVI1 (koja se javlja u 95% slučajeva), veoma se retko javlja i čini samo 1-2,5% svih AML, a neretko se javlja u vidu citogenetski kriptičnih rearanžmana zbog ograničene rezolucije standardnih citogenetskih tehnika [204]. Upotrebom FISH tehnike, potrebno je raditi skrining na EVI1 rearanžman kod CN AML sa visokom EVI1 ekspresijom, odnosno kod MDS/AML sa monozomijom 7, a s obzriom

da AML sa inv(3)/t(3;3) predstavlja zaseban kliničko-biološki entitet sa izuzetno lošom prognozom, prepoznat i izdvojen u klasifikaciji mijeloidnih neoplazmi SZO iz 2008. godine [213]. Monozomija 7 je najčešća sekundarna citogenetska abnormalnost kod AML sa inv(3)/t(3;3) i detektuje se u oko dve trećine slučajeva, a predstavlja dodatni nepovoljni faktor za, i ovako loše, preživljavanje u ovoj grupi bolesnika [203]. Postoji mišljenje da EVI1 dovodi do genomske nestabilnosti i posledične monozomije 7, koja je tzv. "drugi udarac" koji dovodi do pojave AML [252]. Gröschel i sararadnici su pokazali da skoro 90% bolesnika sa AML i monozomijom 7 ima visoku ekspresiju EVI1, od kojih je deo udružen sa 3q26 abnormalnosti, a deo se javlja u vidu izolovane monozomije 7 [215]. Prognoza AML sa -7/EVI1+, je izuzetno loša (dvogodišnje preživljavanje 0%), bez obzira na prisustvo ili odsustvo inv(3)/t(3;3) [215]. U našem uzorku bolesnika, od tri bolesnice sa monozomijom 7 (sve su bile izolovane citogenetske abnormalnosti) dve bolesnice su imale i visoku ekspresiju EVI1, a sve tri su imale izuzetno lošu prognozu (nisu živele duže od dva meseca od postavljanja dijagnoze bolesti). Preostali bolesnici sa visokom EVI1 ekspresijom su imali citogenetski normalnu AML, bez prisutne NPM1 mutacije i bez FLT3-ITD mutacije. Pored 3q26 abnormalnosti i monozomije 7, visoka ekspresija EVI1 gena je povezana i sa MLL rearanžmanom (rearanžman koji uključuje hromozom 11q23). MLL rearanžman se javlja u 4-10% bolesnika sa AML, s tim da se češće javlja u sekundarnim AML (nakon terapije topoizomeraza II inhibitorima), a ređe (oko 5%) kod odraslih bolesnika sa *de novo* AML [117,118]. U našoj grupi bolesnika nije identifikovana ni jedna 11q23 abnormalnost, s obzirom na mali broj bolesnika, da su uključivani bolesnici samo sa *de novo* AML, ali i činjenicom da je oko trećine MLL rearanžmana kriptično [253]. Oko 20% EVI1 pozitivnih AML ima MLL rearanžman i obrnuto, preko 40% onih sa MLL rearanžmanom ima visoku ekspresiju EVI1 gena [219]. Za razliku od 3q26 sindroma, gde postoji visoka ekspresija

samo EVI1 gena, kod MLL rearanžmana je prisutna visoka ekspresija i EVI1 i MDS1/EVI1 (ME) gena [225]. Postoji preko 70 fuzionih partner gena za MLL rearanžman, od kojih uglavnom zavisi i prognoza ovih bolesnika, te osim t (9;11), ostale translokacije koje uključuju hromozom 11q23 su loše prognoze. Kod AML sa MLL rearanžmanom, visoka ekspresija EVI1 gena predstavlja loš prognostički faktor za preživljavanje, kako kod odraslih, tako i kod dece [220,254]. MLL protein putem epigenetskih mehanizama (regrutovanjem DOT1l, DOT1-*like* histon H3 metiltransferaze) dovodi do aktivacije EVI1 gena, što je ključni momenat u patogenezi MLL-AF9 leukemija [255]. U eksperimentalnim uslovima su Bindels i sararadnici dokazali da tzv. *knock-down* EVI1 gena dovodi do proliferativnog aresta, što može predstavljati mehanizam i mesto delovanja potencijalnih lekova u ovom tipu leukemije [219,256].

U odnosu na molekularne karakteristike (prisustvo NPM1 i FLT3-ITD mutacije) niko od bolesnika sa visokom EVI1 ekspresijom nije imao ove dve mutacije, a postoji statistički značajna razlika u odnosu na neprisustvo NPM1 mutacije kod EVI pozitivnih u odnosu na EVI1 negativne bolesnike. Postojanje ove inverzne korelacije između visoke ekspresije EVI1 i NPM1 mutacije je u skladu sa literaturnim podacima, što je i za očekivati, s obzirom na dobru prognozu AML sa $NPM1^{mut}$ (u slučajevima kada nije prisutna FLT3-ITD mutacija) [215,216].

I u našoj ispitivanoj grupi bolesnika, AML sa visokom ekspresijom EVI1 gena predstavlja loš prognostički faktor, kako za odgovor na indukcionu terapiju, tako i za preživljavanje. Svih pet EVI pozitivnih bolesnika je imalo smrtni ishod i niko nije postigao kompletnu remisiju (što je na granici statističke značajnosti p=0,053). Takođe, EVI1 pozitivni bolesnici su, u našem ispitivanju, imali statistički značajno kraće ukupno preživljavanje i preživljavanje bez događaja *(event free survival),* u odnosu na EVI1 negativne bolesnike. Prema pojedinim autorima, prognostički značaj EVI1 ekspresije je u njenoj bliskoj povezanosti sa

rearanžmanima koji uključuju EVI1 (3q26 rearanžman) i MLL (translokacija koja uključuje 11q23) rearanžman, odnosno nisu mogli da dokažu prognostički značaj (uticaj na ukupno preživljavanje i preživljavanje bez događaja/bolesti) visoke ekspresije EVI1 gena, ako ona nije bila posledica rearanžmana koji uključuje 3q26 (bilo da je detektovan klasičnom citogenetikom ili sofisticiranijim metodama, u slučaju skrivenih rearanžmana) [212,224]. S druge strane, visoka EVI1 ekspresija se javlja i u slučajevima AML bez 3q26 abnormalnosti i kao takva predstavlja nezavisni loš prognostički marker. Tako su, na primer, Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani i sararadnici, univarijantnom i multivarijantnom analizom, dokazali da je visoka EVI1 (ne i MDS1-EVI1) ekspresija, nezavisni loš prognostički marker kod AML bolesnika, posebno unutar citogenetski intermedijarne prognostičke grupe [223]. Prema Haas i sararadnici, visoka ekspresija EVI1 (bez obzira o kojoj splajs (eng.*splice*) varijanti se radi) je loš prognostički faktor kod *de novo* AML bez 3q26 abnormalnosti [226]. I Lugthart i saradnici su pokazali da bolesnici sa EVI1 pozitivnim AML ređe postižu kompletnu remisiju, kao i da imaju statistički značajnije kraće ukupno preživljavanje, preživljavanje bez događaja/bolesti, u odnosu na EVI1 negativne bolesnike [225]. U istom istraživanju, ali i prethodnim radovima Lugthart i sar. su pokazali i da su među $EVI1^{poz}$/MDS1-EVI1(ME)^{neg} AML česte skrivene 3q26 lezije, međutim u nekoliko $EVI1^{poz}$/ME^{neg} AML nisu uspeli ni FISH metodom da dokažu ovu kriptičnu leziju, te se pretpostavlja da postoji i drugi mehanizam deregulacije EVI1 ekspresije [257]. U istraživanju Gröschel i saradnika, korišćen je RQ-PCR koji pokriva različite EVI1 splajs varijante, i pokazano je da je EVI1 nezavisni prognostički marker kod odraslih obolelih od AML mlađih od 60 godina, a istaknut je i prognostički značaj unutar intermedijarne citogenetske grupe rizika, kao i unutar grupe sa 11q23 abnormalnosti [215]. Takođe, istaknut je značaj alogene transplantacije matičnih ćelija kod EVI1 pozitivnih bolesnika i značajna korist u ukupnom

preživljavanju i preživljavanju bez relapsa kod onih EVI1 pozitivnih AML bolesnika, kojima je urađena alogena transplantacija matičnih ćelija hematopoeze u prvoj kompletnoj remisiji u poređenju sa EVI1 pozitivnim AML lečenih intenzivnom hemioterapijom i autologom transplantacijom MĆH. I Vázquez i saradnici su u svom istraživanju potvrdili negativni prognostički značaj visoke ekspresije EVI1 kod bolesnika mlađih od 65 godina, koji nije uvek povezan sa 3q26 abnormalnosti, ali su istakli i značaj odsustva bazalne ekspresije EVI1 gena kod AML (verovatno putem epigenetskog utišavanja) u odnosu na one sa ekspresijom i visokom ekspresijom EVI1 gena i značajno bolji ishod kod takvih bolesnika [216]. U našem istraživanju deo bolesnika (8/38, 21%) sa AML takođe nije imalo bazalnu ekspresiju EVI1 gena (bila je prisutna ekspresija kontrolnog, *housekeeping*, abl gena, što govori u prilog validnosti analize), ali nije utvrđen značaj ovakve ekspresije u odnosu na preživljavanje.

Citogenetska ispitivanja i dalje predstavljaju osnov za stratifikaciju u odnosu na rizik i planiranje postremisione terapije kod obolelih od akutne mijeloidne leukemije. I pored otkrića čitavog niza molekularnih markera od potencijalnog prognostičkog značaja, aktuelno se standardno rade samo tri molekularna markera, sa sada već potvrđenim prognostičkim značajem, a to su nukleofozmin 1 mutacija, FLT3-ITD mutacija i CEBPA mutacija. AML sa nukleofozmin 1 mutacijom predstavlja provizioni entitet u klasifikaciji mijeloidnih neoplazmi SZO iz 2008. godine [24]. I prema Haferlach i saradnici, $NPM1^{mut}$ AML predstavljaju zaseban entitet, bez obzira da li imaju normalan ili abnormalan kariotip, odnosno da li je ili nije prisutna mijelodisplazija [36,137]. Prisustvo nukleofozmin 1 mutacije, posebno ako nije udružena sa FLT3-ITD mutacijom, je faktor dobre prognoze u smislu dobrog odgovora na indukcionu terapiju, brzog klirensa blasta, bolje stope kompletnih remisija, kao i u smislu preživljavanja [258,259]. Prema istraživanju Schlenk i saradnika, bolesnici sa ovom konstelacijom mutacija

nemaju benefita od alogene transplantacije u prvoj kompletnoj remisiji, već se preporučuje standardna hemioterapija sa ili bez autologe transplantacije matičnih ćelija hematopoeze [127]. I u našem istraživanju, kada se posmatra cela grupa (38 bolesnika), prisustvo nukleofozmin 1 mutacije je faktor dobre prognoze. Šest od ukupno 17 bolesnika koji su imali NPM1 mutaciju nije postiglo kompletnu remisiju, što se nije pokazalo statistički značajno (p=0.103). U odnosu na preživljavanje, NPM1 pozitivni bolesnici su imali duže preživljavanje bez događaja (*event free survival*), sa medijanom od 12 meseci, dok su NPM1 negativni imali 3 meseca (p=0,096). Takođe, NPM1 pozitivni bolesnici su imali duže ukupno preživljavanje (*overall survival*), u odnosu na bolesnike koji nisu imali NPM1 mutaciju, što nije statistički značajno (p=0,165). Nepostizanje statističke značajnosti u našoj grupi bolesnika se može objasniti relativno malim uzorkom bolesnika, ali i velikom ranom smrtnosti. Kada smo isključili bolesnike koji su imali ranu smrt, bolesnici sa NPM1 mutacijom i bez FLT3-ITD mutacije, pokazuju statistički značajno duže ukupno preživljavanje u odnosu na ostale bolesnike (p=0,0426). Drugi molekularni marker sa već potvrđenim prognoznim značajem, koji se preporučuje u rutinskoj inicijalnoj obradi kod bolesnika sa AML je prisustvo FLT3-ITD mutacije. Za razliku od NPM1 mutacije, FLT3-ITD mutacija ima negativan prognostički uticaj unutar CN AML, kako na preživljavanje bez događaja, tako i na ukupno preživljavanje [129]. Ne samo prisustvo/odsustvo FLT3-ITD mutacije, već je od prognostičkog značaja i odnos mutiranog i *wild type* gena, posebno unutar grupe sa $NPM1^{mut}$ [260]. Iako je stopa kompletnih remisija kod FLT3 pozitivnih u odnosu na FLT3 negativne bolesnike na približno istom nivou (osim kod onih sa visokim FLT3/*wild type* odnosom), FLT3 pozitivni bolesnici su skloniji (brzom) relapsu, zbog čega se kod ove grupe bolesnika što pre treba krenuti sa traženjem podudarnog donora matičnih ćelija [130]. Mogućnost primene FLT3 kinaznih inhibitora, kao ciljane terapije, je veoma atraktivna ideja. U

našem uzorku bolesnika, nismo uspeli da prisustvo FLT3 mutacije povežemo sa lošom prognozom, mada tendencija svakako postoji. Četiri od pet FLT3-ITD pozitivnih bolesnika je relapsiralo (p=0,067), a takođe je preživljavanje bez bolesti (*disease free survival*) kod FLT3-ITD pozitivnih bolesnika bilo kraće u odnosu na FLT3-ITD negativne (p=0,165). Nepostojanje statističke značajnosti u smislu loše prognoze kod naših FLT3-ITD pozitivnih bolesnika, se može objasniti da kod skoro polovine FLT3-ITD pozitivnih bolesnika bila prisutna i nukleofozmin 1 mutacija, čime je ublažen negativan uticaj FLT3-ITD mutacije.

Visoka ekspresija EVI1 gena predstavlja samo jedan od faktora loše prognoze kod obolelih od AML, tako da pravi značaj ne samo ovog markera, već i ostalih markera (kliničkih, laboratorijskih, citogenetskih, molekularnih), se ogleda u njihovoj međusobnoj integraciji. U istraživanju, koje su sproveli Santamaria i saradnici, najpre su analizirani klinički, laboratorijski i molekularni markeri (mutacije i ekspresije gena), a potom je napravljen i skor, koji je uključio ekspresije tri različita gena (EVI1, ERG i PRAME), koji je omogućio precizniju stratifikaciju bolesnika sa citogenetski normalnom akutnom mijeloidnom leukemijom [222]. Na našem uzorku bolesnika, cox regresionom analizom (kada se analiziraju EVI1, nukleofozmin 1 status, broj leukocita iznad 50 i procenat blasta u koštanoj srži) dobili smo da su broj leukocita iznad $50x10^9/l$ i odsustvo NPM1+/FLT3-ITD nezavisni prognostički faktori za kraće ukupno preživljavanje (*overall survival*). Ne postizanje statističke značajnosti za visoku ekspresiju EVI1 gena u odnosu na ukupno preživljavanje u multivarijantnoj analizi se može objasniti relativno malim uzorkom bolesnika uključenih u ovo istraživanje, kao i velikim procentom rane smrtnosti. Kada se isključe bolesnici sa ranom smrti, a u multivarijantnu analizu ubace EVI1 pozitivnost i NPM1+/FLT3-ITD-, EVI1 pozitivni status se pokazao kao nezavisan činilac nepovoljne prognoze. U nastavku ovog istraživanja, kada bude uključen veći broj bolesnika, planiramo

kreiranje prognostičkog skora, koji bi činio integraciju standardnih prognostičkih markera, ali i molekularnih markera, uključujići i ekspresiju gena. Koliko god da je neki pojedinačni faktor od velikog prognostičkog značaja, kao sam nije dovoljan za procenu prognoze i donošenja odluke o modalitetu lečenja ove, veoma heterogene, grupe oboljenja. Poslednjih godina, upotrebom savremenih tehnika sekvenciranja genoma AML (*next generation sequencing*), proširena je paleta molekularnih prognostičkih markera i otkrivene su potencijalne nove mete za ciljanu terapiju, takođe se dublje ušlo u sam proces leukemogeneze [261]. Ono što sledi je klinička upotreba ovih metoda, kojom ćemo praktično za svakog bolesnika imati genom njegove leukemije sa kombincijom različitih molekularnih markera, čime će se omogućiti i individualni terapijski pristup [262].

Prognozni značaj povećane ekspresije EVI1 gena istaknut je i od strane *ELN*ove (Evropska mreža za leukemiju) radne grupe, koja je u okviru konsenzusa u vezi sa indikacijama za alogenu transplantaciju kod bolesnika sa AML mlađih od 60 godina, pojačanu ekspresiju EVI1 gena svrstala u veoma lošu grupu rizika, zajedno sa monozomalnim kariotipom i abnormalnosti 3q26 [125]. U ovoj grupi rizika, šanse za izlečenje samo hemioterapijom su minimalne, a alogenom transplantacijom se može smanjiti rizik od relapsa na 40-50%, te je ona indikovana kod bolesnika kod kojih je nerelapsni mortalitet manji od 40% (što odgovara komorbiditetnom indeksu-HCT-CI 5 i manje) [101]. Ove indikacije za alogenu transplantaciju iz 2012. godine su tipa konsenzus preporuka (nisu utemeljene u prospektivnim studijama), imaju integrativni pristup, a na tas stavljaju rizik od relapsa nakon hemioterapije, sa jedne strane i rizik od relapsa i nerelapsni mortalitet nakon alogene transplantacije, sa druge strane.

Iako je sada već nesumnjiv značaj visoke ekspresije EVI1 gena i dalje ostaje nerazjašnjena sama uloga ovoga gena, odnosno EVI1 proteina i njegova interreakcija sa drugim

ciljnim genima, proteinima, signalnim putevima u patogenezi AML. Jedan od svakako mogućih objašnjenja za ovako lošu prognozu EVI1 pozitivnih akutnih mijeloidnih leukemija, stoji u činjenici da pojačana ekspresija EVI1 gena ne samo da dovodi do pojačane proliferacije i/ili preživljavanja leukemijskih matičnih ćelija, već ih održava i u stanju relativnog mirovanja, čime one ne reaguju na konvencionalnu hemioterapiju [171]. S obzirom na kompleksnost patogeneze EVI1 pozitivnih leukemija i brojne, nedovoljno poznate puteve na genetskom, epigenetskom i protein-protein nivou, u kojima učestvuje EVI1, još uvek ne postoji ciljana terapija kod ovog tipa AML [170]. Postoje, ipak, pokušaji ciljane supresije ekspresije EVI1 gena upotrebom pirol-imidazol poliamida, malih molekula koji se specifično vezuju za određene DNK senkvence promotora i na taj način suprimiraju ekspresiju ovog onkogena [263,264]. S obzirom na činjenicu da EVI1 predstavlja svojevrsnu vezu između epigenetike i signalnih puteva, postoje brojne potencijalne mete za terapiju (od PTEN/PI3K/AKT/mTOR signalnog puta, preko EVI degradacionog-ubikvitin puta, do epigenetskih regulatora) [171,265]. Rano prepoznavanje ovog tipa AML sa izuzetno lošom prognozom, upotrebom kvantitativnog PCR-a pri inicijalnoj obradi bolesnika sa AML, nametnulo bi potrebu za ranom pretragom za davaocem matičnih ćelija hematopoeze, jer aktuelno jedino alogena transplantacija MĆH može dati šansu za duže preživljavanje u ovoj grupi bolesnika.

VII ZAKLJUČCI

- Postoji značajno povećana ekspresija gena EVI1 kod obolelih od akutne mijeloidne leukemije u odnosu na zdravu kontrolnu grupu.

- Visoka ekspresija EVI1 gena je faktor loše prognoze kod obolelih od akutne mijeloidne leukemije i povezan je lošijim odgovorom na terapiju, kraćim preživljavanjem bez događaja *(event free survival)* i kraćim ukupnim preživljavanjem *(overall survival)*.

- Visoka ekspresija EVI1 gena je povezana sa nepostojanjem nukleofozmin 1 mutacije, a udružena je sa postojanjem monozomije 7.

- Ne postoji statistički značajna razlika u osnovnim demografskim (pol, dob), kliničko-laboratorijskim karakteristikama (parametri krvne slike, LDH, procenat blasta u perifernoj krvi i koštanoj srži, performans status, komorbiditetni indeks) između AML bolesnika sa visokom EVI1 ekspresijom i bolesnika bez visoke EVI1 ekspresije.

- U odnosu na druge molekularne markere, u ispitivanoj grupi bolesnika prisustvo nukleofozmin 1 mutacije je faktor dobre prognoze. Bolesnici koji su imali nukleofozmin 1 mutaciju ($NPM1^{mut}$) su pokazali tendenciju ka značajno dužem preživljavanju bez događaja *(event free survival)*. Takođe su bolesnici sa nukleofozmin 1 mutacijom ($NPM1^{mut}$) imali i duže ukupno preživljavanje *(overall survival)*, posebno u slučaju

odsustva FLT3-ITD mutacije i ukoliko se isključe bolesnici koji su doživeli ranu smrt. Prisustvo FLT3-ITD mutacije, u našoj grupi bolesnika, nije pokazalo statističku značajnost u smislu faktora nepovoljne prognoze, iako je postojala tendencija ka većoj stopi relapsa i kraćem periodu bez bolesti kod FLT3-ITD pozitivnih bolesnika.

- Visok inicijalni broj leukocita ($\geq 50x10^9/l$) i odsustvo nukleofozmin 1 mutacije udružene sa FLT3-ITD negativnošću predstavljaju nezavisne prognostičke faktore za kraće ukupno preživljavanje kod svih naših bolesnika sa akutnom mijeloidnom leukemijom. Ukoliko se isključe bolesnici sa ranom smrti u preostalih bolesnika visoka ekspresija EVI1 pokazuje nezavisni prognostički značaj za kraće ukupno preživljavanje.

Reference

1. Döhner H, Gaidzik V. Impact of genetic features on treatment decisions in AML. Hematology ASH Education Program 2008:1-11.
2. Löwemberg B. Acute myeloid leukemia: the challenge of capturing disease variety. Hematology ASH Education Program 2011:36-42.
3. Deschler B, Lübbert M. Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology. Cancer 2006; 107 (9): 2099-2107.
4. National Cancer Institute. SEER Stat Fact Sheets: Acute myeloid leukemia. Bethesda, MD:2012. http://seer.cancer.gov.
5. Juliusson G, Lazarevic V, Hörstedt A et al. Acute myeloid leukemia in the real world: why population-based registries are needed. Blood 2012; 119: 3890-3899.
6. Alter BP, Giri N, Savage SA, et al. Malignancies and survival patterns in the National Cancer Institute inherited bone marrow failure syndromes cohort study. *Br J Haematol*. 2010; 150(2):179-88.
7. Xavier AC, Ge Y and Taub JW. Down syndrome and malignancies: a uniqueclinical relationship. Journal of Molecular Diagnostics 2009; 11 (5): 371-80.
8. Ravindranath Y. Down Syndrome and Acute Myeloid Leukemia: The paradox of increased risk for leukemia and heightened sensitivity to chemotherapy. Journal of Clinical Oncology 2003; 21(18):3385-3387.
9. Owen C, Barnett M, Fitzgibbon J. Familial myelodysplasia and acute myeloid leukaemia: A review. Br J Haematol 2008; 140:123-132.
10. Klein RD, Marcucci G. Familial Acute Myeloid Leukemia (AML) with Mutated CEBPA. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, et al., editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2015. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK47457/.
11. Hahn CN, Chong CE, Carmichael C et al. Heritable GATA2 mutations associated with familial myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. Nat Genet. 2011; 43(10):1012-17.
12. Gao J, Gentzler R, Timms A et al. Heritable GATA2 mutations associated with familial AML-MDS: a case report and review of literature. Journal of Hematology & Oncology 2014; 7:36.
13. Goldin LR, Kristinsson SY, Liang XS et al. Familial aggregation of acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. J Clin Oncol. 2012; 30(2):179-83.

14. Khalade A, Jaakkola MS, Pukkala E et al. Exposure to benzene at work and the risk of leukemia: a systematic review and meta-analysis Environmental Health 2010; 9:31.
15. Austin H, Delzell E, Cole P. Benzene and leukemia: a review of the literature and a risk assessment. Am J Epidemiol. 1988;127:419.
16. Pagano L, Caira M, Fianchi L. Environmental risk factors for MDS/AML. Haematologica reports 2006; 2(15):42-45.
17. Kriosinsson S, Björkholm M, Hultcrantz M et al. Chronic Immune Stimulation Might Act As a Trigger for the Development of Acute Myeloid Leukemia or Myelodysplastic Syndromes. J Clin Oncol. 2011; 29(21):2897-2903.
18. Anderson LA, Pfeiffer RM, Landgren O, et al: Risks of myeloid malignancies in patients with autoimmune conditions. Br J Cancer 2009; 100:822-828.
19. Finn LE, Ostrosky Sproat L, Heckman M, et al. Association of obesity with cytogenetic risk in adult acute myeloid leukemia (AML). J Clin Oncol 2014; 32:5s (suppl; abstr 7055).
20. Medeiros BC, Othus M, Estey EH et al. Impact of body-mass index on the outcome of adult patients with acute myeloid leukemia. Haematologica 2012; 97(9):1401-04.
21. Leone G, Mele L, Pulsoni A et al. The incidence of secondary leukemias. Hematologica 1999; 84:937-945.
22. Foucar K, Reichard K, Czuchlewski D. Acute Myeloid leukemia. In: Foucar K, Reichard K, Czuchlewski D. Editors. Bone marrow pathology, 3rd edition. ASCP Press, Chicago 2010. p.377-431.
23. Hake CR, Graubert TA, Fenske TS. Does autologous transplantation directly increase the risk of secondary leukemia in lymphoma patients? Bone Marrow Transplantation 2007; 39: 59–70.
24. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, et al. 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.
25. Passeguė E, Jamieson CHM, Ailles LE, Weissman IL. Normal and leukemic hematopoesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? PNSA 2003; 100(1): 11842-11849.
26. Link DC. Molecular genetics of AML. Best Pract Res Clin Haematol. 2012; 25 (4): 409-414.
27. Welch JS, Ley TJ, Link DC, et al. The origin and evolution of mutations in acute myeloid leukemia. Cell 2012;150:264-78.

28. Graubert TA, Brunner AM and Fathi AT. New molecular abnormalities and clonal architecture in AML: from reciprocal translocations to whole-genome sequencing. ASCO Educationa Book 2014. pages e334-e340.
29. Ding L, Ley TJ, Larson DE, et al. Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukemia revealed by whole genome sequencing. Nature. 2012; 481(7382): 506–510.
30. Lawrence MS, Stojanov P, Polak P, et al. Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer genes.Nature. 2013; 499(7457): 214–218.
31. Cancer Genome Research Atlas Network. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. NEngl J Med. 2013; 368:2059-2074.
32. Kelly LM, Gilliland DG. Genetics of myeloid leukemias. Annu Rev Genomics Hum Genet. 2002;3:179-98.
33. Thol F, Bollin R, Gehlhaar M, et al. Mutations in the cohesin complex in acute myeloid leukemia: clinical and prognostic implications. Blood 2014; 123(6):914-920.
34. Makishima H, Visconte V, Sakaguchi H, et al. Mutations in the spliceosome machinery, a novel and ubiquitous pathway in leukemogenesis. Blood 2012;119:3203-3210.
35. Welch JS. Subclonal architecture in acute myeloid leukemia. EHA Edu program 2013;7:23-29.
36. Falini B,Martelli MP,Bolli N, et al. Acute myeloid leukemia with mutated nucleophosmin (NPM1): is it a distinct entity? Blood. 2011;117(4):1109-1120.
37. Krönke J, Bullinger L, Teleanu V, et al. Clonal evolution in relapsed NPM1-mutated acute myeloid leukemia. Blood 2013; 122 (1):100-108.
38. Jan M, Snyder TM, Corces-Zimmerman MR, et al. Clonal evolution of preleukemic hematopoietic stem cells precedeshuman acute myeloid leukemia. Sci Transl Med. 2012; 4(149):149ra118.
39. Corces-Zimmerman MR, Hong W-J, Weissman IL, et al. Preleukemic mutations in human acute myeloid leukemia affect epigenetic regulators and persist in remission. PNAS 2014;11(7):2548-2553.
40. Shlush Li, Zandi S, Mitchell A, et al. Identification of preleukaemic haematopoietic stem cells in acute leukaemia. Nature 2014;506:328-333.
41. Seton-Rogers S. Leukaemia: a pre-leukaemic reservoir. Nat Rev Cancer 2014;14(4):212.
42. Croce Carlo M. MicroRNA Dysregulation in acute myeloid leukemia. Journal of Clinical Oncology. 2013; 31(17):2065.
43. Marcucci G, Mrózek K, Radmacher MD, Garzon R, and Bloomfield CD. The prognostic and functional role of microRNAs in acute myeloid leukemia. Blood. 2011; 117(4): 1121–1129.
44. Li Z, Lu J, Sun M, et al: Distinct microRNA expression profiles in acute myeloid leukemia with common translocations. Proc Natl Acad SciUSA. 2008; 105:15535-40.

45. Marcucci G, Maharry KS, Metzeler KH, et al. Clinical role of microRNAs in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: miR-155 upregulation independently identifies high risk patients. Journal of Clinical Oncology. 2013; 31(17):2086-93.
46. Schwind S, Maharry K, Radmacher MD, et al. Prognostic significance of exspression of a single microRNA, mi-181a, in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B Study. Journal od Clinical Oncology 2010;28(36):5257-64.
47. Miller KB, Pihan G. Clinical manifestations of acute myeloid leukemia. In: Hoffman R, et al. (eds) Hematology: basic principles and practice. 5th ed. Philadelphia, PA: Churchill Livingstone Elsevier 2008.
48. Zuckerman T, Ganzel C, Tallman MS et Rowe JM. How I treat hematologic emergencies in adults with acute leukemia. Blood. 2012;120:1993-2002.
49. Howard SC, Jones DP, Pui CH. The tumor lysis syndrome. N Engl J Med 2011;364:1844-54.
50. Cairo MS, Bishop M. Tumour lysis syndrome: new therapeutic strategies and classification. Br J Haematol 2004;127:3-11.
51. Coiffier B, Altman A, PUI CH, Younes A, Cairo MS. Guidelines for the management of pediatric and adult tumor lysis syndrome: an evidence-based review. J Clin Oncol. 2008; 26(16):2767-2778.
52. Stucki A, Rivier AS, Gikic M, et al. Endothelial cell activation by myeloblasts: molecular mechanisms of leukostasis and leukemic cell dissemination. Blood 2001;97:2121-2129.
53. Oberoi S, Lehrnbecher T, Phillips R, et al. Leukapheresis and low-dose chemotherapy do not reduce early mortality in acute myeloid leukemia hyperleukocytosis: a systematic review and meta-analysis. Leuk Res. 2014;38(4):460-8.
54. De Jonge H, Valk P, De Bont E, et al. Prognostic impact of white blood cell count in intermediate risk acute myeloid leukemia: relevance of mutated NPM1 and FLT3-ITD. Haematologica. 2011; 96(9):1310-1317.
55. Pastore F, Pastore A, Wittmann G, et al. The role of therapeutic leukapheresis in hyperleukucytotic AML. PLOS ONE. 2014;9(4):e95062.
56. Hölig K, Moog R. Leukocyte depletion by therapeutic leukocytapheresis in patients with leukemia. Transfus Med Hemother. 2012;39:241-245.
57. Pileri SA, Ascani S, Cox MC, et al. Myeloid sarcoma: clinico-pathologic, phenotypic and cytogenetic analysis of 92 adult patients. Leukemia. 2007;21(2):340-50.
58. Bakst RL, Tallman MS, Douer D, et al. How I treat extramedullary acute myeloid leukemia. Blood. 2011;118(14):3785-3793.

59. Bar M, Tong W, Othus M, et al. Central nervous system involvement in acute myeloid leukemia patients undergoing hematopoietic cell transplantation. Biol Blood Marrow Transplant. 2015;21(3):546-51.
60. Abi Aad S, Daver NG, Strati P, et al. High prevalence of FLT3-ITD mutations in patients with AML who present with CNS relapse. J Clin Oncol. 2014;32:5s (suppl;abstr 7074)
61. Garcia JB, Lei X, Wierda W, et al. Pneumonia during remission induction chemotherapy in patients with acute leukemia. Ann Am Thorac Soc. 2013;10(5):432-440.
62. Lech-Maranda E, Seweryn M, Giebel S, et al. Infectious complications in patients with acute myeloid leukemia treated according to the protocol with daunorubicin and cytarabine with or without addition of cladribine. A multicenter study by the Polish Adult Leukemia Group (PALG).International Journal of Infectious Diseases 2010; 14: e132-e140.
63. Freifeld AG, Bow EJ, Sepkowitz KA, et al. Clinical Practice Guideline for the Use of Antimicrobial Agents in Neutropenic Patients with Cancer: 2010 Update by the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis 2011;52(4):427-31.
64. Feld R. Bloodstream infections in cancer patients with febrile neutropenia. Int J Antimicrob Agents. 2008;32 (1):S30-3.
65. Bassetti M, Righi E. Multidrug-resistant bacteria: what is the threat? ASH Education Book Hematology 2013: p428-432.
66. Averbuch D, Orasch C, Cordonnier C, et al. European guidelines for empirical antibacterial therapy for febrile neutropenic patients in the era of growing resistance:summary of the 2011 4th European Conference on Infections in Leukemia. Haematologica 2013;98(12):1826-1835.
67. Gea-Banacloche J. Evidence-based approach to treatment of febrile neutropenia in hematologic malignancies. ASH Education Book Hematology 2013:414-422.
68. Nucci M, Anaissie E. How we treat invasive fungal diseases in patients with acute leukemia: the importance of an individualized approach. Blood. 2014;124(26):3858-3869.
69. Garcia-Vidal C, Barba P, Arnan M, et al. Invasive aspergillosis complicating pandemic Influenza A (H1N1) infection in severely immunocompromised patients. Clin Infect Dis. 2011;53(6):e16-e19.
70. Tavil B, Azik F, Culha V, et al. Pandemic H1N1 influenza infection in children with acute leukemia: a single-center experience. J Pediatr Hematol Oncol. 2012;34(1):48-50.
71. Ergene U, Ozbalci D, Tunger O, et al. H1N1 as a causative agent in febrile neutropenia of an acute myeloid leukaemia (AML) patient. Transfus Apher Sci. 2012;46(1):65-6.
72. Engelhard D, Mohty B, de la Camara R, et al. European guidelines for prevention and management of influenza in hematopoietic stem cell transplantation and leukemia patients:

summary of ECIL-4 (2011), on behalf of ECIL, a joint venture of EBMT, EORTC, ICHS, and ELN. Transpl Infect Dis. 2013;15(3):219-32.

73. Chen CY, Tai CH, Cheng A, et al. Intracranial hemorrhage in adult patients with hematological malignancies. BMC Medicine. 2012;10:97.
74. Dayyani F, Mougalian SS, Naqvi K, et al. Prediction model for mortality after intracranial hemorrhage in patients with leukemia. Am J Hematol. 2011;86:546-549.
75. Kim H, Lee JH, Choi SJ, et al. Analysis of fatal intracranial hemorrhage in 792 acute leukemia patients. Haematologica 2004;89(5):622-624.
76. Döhner H, Estey E, Amadori S, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults:recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. Blood 2010;115:453-474.
77. Hasserjian R,Zuo Z, Garcia C, et al. Acute erythroid leukemia: a reassessment using criteria refined in the 2008 WHOclassification**.** Blood 2010; 115:1985-1992.
78. Craig F, Foon K. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. Blood. 2008; 111: 3941-3967.
79. Lowenberg B. Acute myeloid leukemia: the challenge of capturing disease variety. Hematology ASH Edu Program. 2008:1-11.
80. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia: a report of the FrenchAmerican-British Cooperative Group. Ann InternMed.1985;103(4):620-625.
81. Walter RB, Othus M, Borthakur G, et al. Prediction of early death after induction therapy for newly diagnosed acute myeloid leukemia with pretreatment risk scores:a novel paradigm for treatment assignment. J Clin Oncol. 2011;29(33):4417-4423.
82. Estey EH. Acute myeloid leukemia: 2013 update on risk-stratification and management. Am J Hematol. 2013;88:318-327.
83. Bishop JF, Matthews JP, Young GA, et al. Intensified induction chemotherapy with high dose cytarabine and etoposide for acute myeloid leukemia: a review and updated results of the Australian Leukemia Study Group. Leuk Lymphoma 1998;28:315-327.
84. Weick JK, Kopecky KJ, Appelbaum FR et al. A randomized investigation of high dose versus standard dose cytosine arabinoside with daunorubicin in patients with previously untreated acute myeloid leukemia: a SWOG study. Blood 1996;88:2841-2851.
85. Büchner T, Schlenk RF, Schaich M, et al. Acute Myeloid Leukemia (AML): different treatment strategies versus a common standard arm--combined prospective analysis by the German AML Intergroup. J Clin Oncol. 2012;30(29):3604-10.

86. O'Donnell MR, Abboud CN, Altman J, et al. Acute myeloid leukemia, Version 2.2013. J Natl Compr Canc Netw. 2013;11(9):1047-1055.
87. Fernandez HF, Sun Z, Yao X, et al. Anthracycline dose intensification in acute myeloid leukemia. N Engl J Med 2009;361:1249-59.
88. Lee JH, Joo YD, Kim H, et al. A randomized trial comparing standard versus high-dose daunorubicin induction in patients with acute myeloid leukemia. Blood 2011;118 (14) 3832-3841.
89. Patel JP, Gönen M, Figueroa ME, et al. Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. N Engl J Med 2012;366:1079-89.
90. Holowiecki J, Grosicki S, Giebel S, et al. Cladribine, but not fludarabine, added to daunorubicin and cytarabine during induction prolongs survival of patients with acute myeloid leukemia: a multicentric, randomized phase III study. J Clin Oncol 2012;30:2441-2448.
91. Burnett AK, Russell NH, Hills RK, et al. Addition of gemtuzumab ozogamicin to induction chemotherapy improves survival in older patients with acute myeloid leukemia. J Clon Oncol 2012;30:3924-3931.
92. Castaigne S, Pautas C, Terre C, et al. Fractionated doses of gemtuzumab ozogamicin (GO) combined to standard chemotherapy (CT) improve event-free and overall survival in newly-diagnosed de novo AML patients aged 50-70 years old: a prospective randomized phase 3 trial from the Acute Leukemia French Association (ALFA). Blood 2011;188:abstract 6.
93. Amadori S, Breccia M, Stasi R. Acute myeloid leukemia in older patients: conventional and new therapies. EHA Education Book 2013;7:41-48.
94. Schiller GJ. High risk acute myelogenous leukemia: treatment today...and tomorrow. Hematology Am Soc hematol Educ Program 2013;2013:201-8.
95. Schlenk RF. Post-remission therapy for acute myeloid leukemia. Hematologica 2014;99(11):1663-1670.
96. Löwenberg B, Pabst T, Vellenga E, et al. Cytarabine dose for acute myeloid leukemia. N Engl J Med 2011;364:1027-1036.
97. Paschka P, Döhner K. Core-binding factor acute myeloid leukemia:can we improve on HiDAC consolidation? Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2013;2013:209-19.
98. Walter RB, Pagel JM, Gooly TA, et al. Comparison of matched unrelated and matched related donor myeloablative hematopoietic cell transplantation for adults witha acute myeloid leukemia in first remission. Leukemia 2010;24:1276-1282.
99. Saber W, Opie S, Rizzo JD, et al. Outcomes after matched unrelated donor versus identical sibling hematopoietic cell transplantation in adults with acute myelogenous leukemia. Blood 2012;119:3908-3916.

100. Van Besien K. Advances in unrelated and alternative donor transplantation. ASCO Educational Book 2010:234-236.
101. Appelbaum FR. Indications for allogeneic hematopoietic cell transplantation for acute myeloid leukemia in the genomic era. ASCO Educational Book 2014:e327-e333.
102. Breems D, Van Putten WL, Huijegns PC, et al. Prognostic index for adult patients with acute myeloid leukemia in first relapse. J Clin Oncol. 2005;23:1969-1978.
103. Larkin K, Blum W. Novel therapies in AML: reason for hope or just hype? ASCO Educatinal Book 2014:e341-e351.
104. Cheson BD, Bennett JM, Kopecky KJ, et al. Revised recommendations of the International Working Group for diagnosis, standardization of response criteria, treatment outcomes, and reporting standards for therapeutic trials in acute myeloid leukemia. J Clin Oncol. 2003;21(24):4642-4649.
105. Walter RB, Kantarjian HM, Huang X, et al. Effect of complete remission and responses less than complete remission on survival in acute myeloid leukemia: a combined Eastern Cooperative Oncology Group, Southwest Oncology Group, and MD Anderson Cancer Center Study. J Clin Oncol 2010;28:1766-1771.
106. Fenaux P, Mufti GJ, Hellström-Lindberg E, et al. Azacitidine Prolongs Overall Survival Compared With Conventional Care Regimens in Elderly Patients With Low Bone Marrow Blast Count Acute Myeloid Leukemia. J Clin Oncol 2010; 28 (4):562-569.
107. Maurillo L, Venditti A, Spagnoli A, et al. Azacitidine for the treatment of patients with acute myeloid leukemia. Cancer 2012;118:1014-22.
108. Appelbaum FR, Gundacker H, Head DR, et al. Age and acute myeloid leukemia. Blood 2006; 107:3481-3485.
109. Juliusson G, Antunovic P, Derolf A, et al. Age and acute myeloid leukemia: real world data on decision to treat and outcomes from the Swedish Acute Leukemia Registry. Blood 2009;113:4179-4187.
110. Rowe J,Tallman MS. How I treat acute myeloid leukemia. Blood 2010;116(17):3147-3156)
111. Avivi I, Rowe JM. Prognostic factors in acute myeloid leukemia. Current Opinion in Hematology 2005, 12:62–67.
112. Bello C, Yu D, Komrokji RS, et al. Outcomes after induction chemotherapy in patients with acute myeloid leukemia arising from myelodysplastic syndrome. Cancer 2011;117(7):1463-1469.
113. Weinberg O, Seetharam M, Ren L, et al. Clinical characterization of acute myeloid leukemia with myelodysplasia-related changes as defined by the 2008 WHO classification system. Blood. 2009;113: 1906-1908.

114. Wandt H, Schäkel U, Kroschinsky F, et al. MLD according to the WHO classification in AML has no correlation with age and no independent prognostic relevance as analyzed in 1766 patients. Blood 2008; 111: 1855-1861.
115. Grimwade D, Walker H, Oliver F, et al. The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML10 trial. The Medical Research Council Adult and Childrens Leukaemia Working Parties. Blood 1998;92:2322-33.
116. Grimwade D, Hills RK, Moorman AV, et al. Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials.Blood. 2010;116(3):354-365.
117. Slovak ML, Kopecy KJ, Cassileth PA, et al. Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia. A Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group Study. Blood 2000;96:4075-83.
118. Byrd JC, Mrozek K, Dodge RK, et al. Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive ofinduction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemiaresults from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). Blood 2002; 100: 4325–4336.
119. Lazarevic V, Hörstedt AS, Johansson B, et al. Incidence and prognostic significance of karyotypic subgroups in older patients with acute myeloid leukemia: the Swedish population-based experience. Blood Cancer Journal 2014; 4: e188.
120. Grimwade D, Hills RK. Independent prognostic factors for AML outcome. Hematology ASH Education Program 2009:385-395.
121. Breems D, Van Putten WLJ, De Greef GE, et al. Monosomal karyotype in acute myeloid leukemia: a better indicator of poor prognosis than a complex karyotype. J Clin Oncol 2008;26:4791–7.
122. Medeiros BC, Othus M, Fang M, et al. Prognostic impact of monosomal karyotype in young adult and elderly acute myeloid leukemia: the Southwest Oncology Group (SWOG) experience. Blood. 2010;116(13):2224-2228.
123. Krauter J, Peter W, Pascheberg U, et al. Detection of karyotypic aberrations in acute myeloblastic leukaemia: a prospective comparison between PCR/FISH and standard cytogenetics in 140 patients with de novo AML. British Journal of Haematology 1998;103:72-78.
124. Mrózek K, Marcucci G, Paschka P, et al. Clinical relevance of mutations and gene-expression changes in adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics: are we ready for a prognostically prioritized molecular classification? Blood. 2007;109:431-448.

125. Cornelissen JJ, Gratwohl A, Schlenk RF, et al. The European LeukemiaNet AML Working Party consensus statement on allogeneic HSCT for patients with AML in remission: an integrated-risk adapted approach. Nat Rev Clin Oncol. 2012;9:579-590.
126. Estey EH. Acute myeloid leukemia: 2012 update on diagnosis, risk stratification, and management. Am.J. Hematol. 2012; 87:90-99.
127. Schlenk RF, Dőhner K, Krauter J, et al. Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. N Eng J med 2008;358:1909-18.
128. Fröhling S, Schlenk RF, Breitruck J, et al.Prognostic significance of activating FLT3 mutations in younger adults (16 to 60 years) with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the AML Study Group Ulm. Blood. 2002;100:4372-4380.
129. Santos F, Jones D, Qiao W, et al. Prognostic value of FLT3 mutations among different cytogenetic subgroups in acute myeloid leukemia. Cancer 2011;117(10):2145-2155.
130. Levis M. FLT3 mutations in acute myeloid leukemia: what is the best approach in 2013? Hematology ASH Education Program 2013:220-226.
131. Whitman SP, Archer KJ, Feng L, et al. Absence of the Wild-Type Allele Predicts Poor Prognosis in Adult de Novo Acute Myeloid Leukemia with Normal Cytogenetics and the Internal Tandem Duplication of FLT3: A Cancer and Leukemia Group B Study. Cancer Res. 2001; 61: 7233–7239.
132. Gale RE, Green C, Allen C, et al. The impact of FLT3 internal tandem duplication mutant level, number, size, and interaction with NPM1 mutations in a large cohort of young adult patients with acute myeloid leukemia. Blood 2008; 111:2776-2784.
133. Blau O, Berenstein R, Sindram A, Blau IW. Molecular analysis of different FLT3-ITD mutations in acute myeloid leukemia. Leuk Lymphoma. 2013 Jan;54(1):145-52.
134. Stirewalt DL, Pogosova-Agadjanyan EL, Tsuchiya K, et al. Copy-neutral loss of heterozygosity is prevalent and a late event in the pathogenesis of FLT3/ITD AML. Blood Cancer Journal 2014;4:e208.
135. Raghavan M, Smith LL, Lillington DM, et al. Segmental uniparental disomy is a commonly acquired genetic event in relapsed acute myeloid leukemia. Blood 2008;112:814-821.
136. Bacher U, Haferlach C, Kern W, Haferlach T, Schnittger S. Prognostic relevance of FLT3-TKD mutations in AML: the combination matters–an analysis of 3082 patients. Blood. 2008; 111(5): 2527–37.
137. Haferlach C, Mecucci C, Schnittger S, et al. AML with mutated NPM1 carrying a normal or aberrant karyotype show overlapping biological, pathological, immunophenotypic, and prognostic features. Blood. 2009;114(14):3024-3032.

138. Falini B, Mecucci C, Tiacci E, et al. Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. N Engl J Med. 2005; 352(3):254-266.
139. Park BG, Chi HS, Jang S, et al. Association of cup-like nuclei in blasts with FLT3 and NPM1 mutations in acute myeloid leukemia. Ann Hematol. 2013;92(4):451-7.
140. Chen W, Konoplev S, Medeiros LJ, et al. Cuplike nuclei (prominent nuclear invaginations) in acute myeloid leukemia are highly associated with FLT3-ITD and NPM1 mutations. Cancer. 2009; 115(23): 5481–5489.
141. Grossmann V, Schnittger S, Kohlmann A, et al. A novel hierarchical prognostic model of AML solely based on molecular mutations. Blood. 2012;120(15):2693-2972.
142. Delwel R. Molecular biology of acute myeloid leukemia. Hematology Education: the education programme for the annual congress of the EHA. 2012;6(1):23-32.
143. Dufour A, Schneider F, Metzeler KH, et al. Acute myeloid leukemia with biallelic CEBPA gene mutations and normal karyotype represents a distinct genetic entity associated with a favorable clinical outcome. J Clin Oncol. 2010; 28(4):570-577.
144. Paschka P, Marcucci G, Ruppert AS, et al. Adverse prognostic significance of KIT mutations in adult acute myeloid leukemia with inv(16) and t(8;21): A Cancer and Leukemia Group B Study. J Clin Oncol 2006;24:3904–3911.
145. Walker A, Marcucci G. Molecular prognostic factors in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. Expert Rev Hematol. 2012;5(5):547-558.
146. Marcucci G, Metzeler KH, Schwind S, et al. Age-related prognostic impact of different types of DNMT3a mutations in adults with primary cytogenetically normal acute myeloid leukemia. J Clin Oncol. 2012; 30(7):742-750.
147. Ribeiro AF, Pratcorona M, Erpelinck-Verschueren C, et al. Mutant DNMT3A: a marker of poor prognosis in acute myeloid leukemia. Blood. 2012;199(24):5824-5831.
148. Ley TJ, Ding L, Walter MJ, et al. DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. N Engl J Med. 2010; 363(25):2424-2433.
149. Marková J, Michková P, Burčková K, et al. Prognostic impact of DNMT3A mutations in patients with intermediate cytogenetic risk profile acute myeloid leukemia. European Journal of Haematology. 2012;88(2):128-135.
150. Loghavi S, Zuo Z, Ravandi F, et al. Clinical features of De Novo acute myeloid leukemia with concurrent DNMT3A, FLT3 and NPM1 mutations. Journal of Hematology & Oncology 2014;7:74
151. Figueroa ME, Abdel-Wahab O, Lu C, Ward PS, Patel J, Shih A, et al. Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. Cancer cell. 2010; 18:553–567.

152. Im AP, Sehgal AR, Carroll MP, et al. DNMT3A and IDH mutations in acute myeloid leukemia and other myeloid malignancies: associations with prognosis and potential treatment strategies. Leukemia. 2014; 28(9): 1774–1783.
153. O'Donnell MR, Abboud CN, Altman J, et al. Acute myeloid leukemia. J Natl Compr Canc Netw. 2012;10:984-1021.
154. Kihara R, Nagata Y, Kiyoi H, et al.Comprehensive analysis of genetic alterations and their prognostic impacts in adult acute myeloid leukemia patients. Leukemia. 2014;28(8):1586-95.
155. Shen Y, Zhu YM, Fan X, et al. Gene mutations patterns and their prognostic impact in a cohort of 1185 patients with acute myeloid leukemia. Blood 2011; 118(20):5593-5603.
156. Hou HA, Lin CC, Chou WC, et al. Integration of cytogenetic and molecular alterations in risk stratification of 318 patients with de novo non-M3 acute myeloid leukemia. Leukemia. 2014;28: 50-58.
157. Popović Stevan L. Kompleksna prognoza toka i ishoda akutne leukoze kao osnova za individualno prilagođavanje antileukozne terapije. Doktorska disertacija. Medicinski fakultet Novi Sad, 1990.
158. Kern W, Haferlach T, Schoch C, et al. Early blast clearance by remission induction therapy is a major independent prognostic factor for both achievement of complete remission and long-term outcome in acute myeloid leukemia: data from the German AML Cooperative Group (AMLCG) 1992 Trial. Blood. 2003;101:64-70.
159. Arellano M, Pakkala S, Langston A, et al. Early Clearance of Peripheral Blood Blasts Predicts Response to Induction Chemotherapy in Acute Myeloid Leukemia. Cancer 2012;118:5278-82.
160. Rowe JM, Kim HT, Cassileth PA, et al. Adult patients with acute myeloid leukemia who achieve complete remission after 1 or 2 cycles of induction have a similar prognosis: a report on 1980 patients registered to 6 studies conducted by the Eastern Cooperative Oncology Group. Cancer. 2010;116(21):5012-21.
161. Wheatley K, Burnett AK, Goldstone AH, et al. A simple, robust, validated and highly predictive index for the determination of risk-directed therapy in acute myeloid leukaemia derived from the MRC AML 10 trial. United Kingdom Medical Research Council's Adult and Childhood Leukaemia Working Parties. Br J Haematol. 1999;107(1):69-79.
162. Buccisano F, Maurillo L, Del Principe MI, et al. Prognostic and therapeutic implications of minimal residual disease detection in acute myeloid leukemia. Blood 2012;119(2):332-341.
163. Langer C, Radmacher MD, Ruppert AS, et al. High BAALC expression associates with other molecular prognostic markers, poor outcome, and a distinct gene-expression signature in

cytogenetically normal patients younger than 60 years with acute myeloid leukemia: A Cancer and Leukemia Group B (CALGB) study. Blood 2008;111:5371-5379.

164. Santamaria C, Chillon MC, Garcia-Sanz R, et al. BAALC in an important predictor of refractoriness to chrmotherapy and poor survival in intermediate-risk acute myeloid leukemia (AML). Ann Hematol 2010; 89:453-458.
165. Marcucci G, Maharry K, Whitman P, et al. High expression levels of the ETS-related gene, ERG, predict adverse outcome and improve molecular risk-based classification of cytogenetically normal acute myeloid leukemia: A Cancer and Leukemia Group B study. J Clin Oncol 2007;25:3337–3343.
166. Langer C, Marcucci G, Holland KB, et al. Prognostic importance of MN1 transcript levels, and biologic insights from MN1-associated gene and microRNA expression signatures in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: A cancer and leukemia group B study. J Clin Oncol 2009;27:3198–3204.
167. Samra EB, Klein B, Commes T. And Moreaux J. Development of gene expression-based risk score in cytogenetically normal acute myeloid leukemia patients. Oncotarget 2012;3:824-831.
168. Goyama S, Kurokawa M. Pathogenetic significance of ecotropic viral integration site-1 in hematological malignancies. Cancer Sci. 2009;100(6):990-995.
169. Morishita K, Parker DS, Mucenski ML, Jenkins NA, Copeland NG, Ihle JN: Retroviral activation of a novel gene encoding a zinc finger protein in IL-3-dependent myeloid leukemia cell lines, Cell 1988, 54:831-840.
170. Bard-Chapeau EA, Gunaratne J, Kumar P, et al. EVI1 oncoprotein interacts with a large and complex network of proteins and integrates signals through protein phosphorylation. PNAS 2013: E2885–E2894.
171. Kataoka K, Kurokawa M. Ecotropic viral integration site 1, stem cell self-renewal and leukemogenesis. Cancer Sci. 2012; 103(8): 1371-1377.
172. Kilbey A, Alzuherri H, McColl J, et al. The EVI1 proto-oncoprotein blocks endomitosis in megakaryocytes by inhibiting sustained cyclin-dependent kinase 2 cytalytic activity. Br J Haematol. 2005;130(6):902-11.
173. Eppert K, Takenaka K, Lechman ER et al. Stem cell gene expression programs influence clinical outcome in human leukemia. Nat Med 2011; 171086–93.
174. Valk PJ, Verhaak RG, Beijen MA et al. Prognostically useful gene-expression profiles in acute myeloid leukemia. N Engl J Med 2004; 350: 1617–28.
175. Palmer S, Brouillet JP, Kilbey A, et al. Evi1 transforming and repressor activities are mediated by CtBP co-repressor proteins. J Biol Chem 2001;276(25):834-40.

176. Yuasa H, Oike Y, Iwama A et al. Oncogenic transcription factor Evi1 regulates hematopoietic stem cell proliferation through GATA-2 expression. EMBO J 2005; 24: 1976–87.
177. Sato T, Goyama S, Nitta E et al. Evi-1 promotes para-aortic splanchnopleural hematopoiesis throug up-regulation of GATA-2 expression. EMBO J 2005;24:1976-87.
178. Shimabe M, Goyama S, Watanabe-Okochi N et al. Pbx1 is downstream target of Evi-1 in hematopoietic stem/progenitors and leukemic cells. Oncogene 2009;28:4364-74.
179. Ficara F, Murphy MJ, Lin M, Cleary ML. Pbx1 regulates self-renewal of long-term hematopoietic stem cells by maintaining their quiescence. Cell Stem Cell 2008; 2: 484–96.
180. Senyuk V, Sinha KK, Li D, et al. Repression of RUNX1 activity by EVI1: a new role of EVI1 in leukemogensis. Cancer res 2007;67:5658-66.
181. Laricchia-Robbio L, Premanand K, Rinaldi CR, Nucifora G. EVI1 Impairs myelopoiesis by deregulation of PU.1 function. Cancer Res 2009; 69: 1633–42.
182. Glass C, Wuertzer C, Cui X, et al. Global identification of EVI1 target genes in acute myeloid leukemia. PLoS ONE 2013;8(6):e67134.
183. Laricchia-Robbio L, Fazzina R, Li D et al. Point mutations in two EVI1 Zn fingers abolish EVI1-GATA1 interaction and allow erythroid differentiation of murine bone marrow cells. Mol Cell Biol 2006; 26: 7658–66.
184. Tanaka T, Nishida J, Mitani K, et al. Evi-1 raises AP-1 activity and stimulates c-fos promoter transactivation with dependence on the second zinc finger domain. J Biol Chem. 1994;269(39):24020-24026.
185. Izutsu K, Kurokawa M, Imai Y, Maki K, Mitani K, Hirai H. The corepressor CtBP interacts with Evi-1 to repress transforming growth factor beta signaling. Blood 2001; 97: 2815–22.
186. Kurokawa M, Mitani K, Irie K et al. The oncoprotein Evi-1 represses TGFbeta signalling by inhibiting Smad3. Nature 1998; 394:92–6.
187. Kurokawa M, Mitani K, Yamagata T et al. The evi-1 oncoprotein inhibits cJun N-terminal kinase and prevents stress-induced cell death. EMBO J 2000; 19:2958–68.
188. Yoshimi A, Goyama S, Watanabe-Okochi N et al. Evi1 represses PTEN expression and activates PI3K/AKT/mTOR via interactions with polycomb proteins. Blood 2011; 117: 3617–28.
189. Goyama S, Nitta E, Yoshino T et al. EVI-1 interacts with histone methyltransferases SUV39H1 and G9a for transcriptional repression and bone marrow immortalization. Leukemia 2010; 24:81–82.
190. Cattaneo F, Nucifora G. EVI1 recruits the histone methyltransferase SUV39H1 for transcription repression. J Cell Biochem 2008; 105: 344–52.

191. Chakraborty S, Senyuk V, Sitailo S, et al. Interaction of EVI1 with cAMP-responsive element-binding protein-binding protein (CBP) and p300/CBP-associated factor (P/CAF) results in reversible acetylation of EVI1 and in co-localization in nuclear speckles. J Biol Chem 2001;276(48):44936-44943.
192. Chi Y, Senyuk V, Chakraborty S, Nucifora G. EVI1 promotes cell proliferation by interacting with BRG1 and blocking the repression of BRG1 on E2F1 activity. J Biol Chem 2003; 278: 49806–11.
193. Spensberger D, Vermeulen M, Le Guezennec X, et al. Myeloid transforming protein Evi1 interacts with methyl-CpG binding domain protein 3 and inhibits in vitro histone deacetylation by Mbd3/Mi-2/NuRD. Biochemistry 2008;47:6418-26.
194. Lugthart S, Figueroa ME, Bindels E et al. Aberrant DNA hypermethylation signature in acute myeloid leukemia directed by EVI1. Blood 2011; 117:234–41.
195. Gomez-Benito M, Conchillo A, Garcia MA, et al. EVI1 controls proliferation in acute myeloid leukemia though modulation of miR-1-2. British Journal of Cancer. 2010;103:1292-1296.
196. Buonamici S, Li D, Chi Z, et al. EVI1 induces myelodysplastic syndrome in mice. The Journal of Clinical Investigation. 2004;114:713-719.
197. Jin G, Yamazaki Y, Takuwa M, et al. Trib1 and Evi1 cooperate with Hoxa and Meis1 in myeloid leukemogenesis. Blood 2007; 109:3998-4005.
198. Watanabe-Okochi N, Kitaura J, Ono R, et al. AML1 mutations induced MDS and MDS/AML in a mouse BMT model. Blood 2008;111:4297-308.
199. Deng X, Cao Y, Liu Y, et al. Overexpression of Evi-1 Oncoprotein Represses TGF-β Signaling in Colorectal Cancer. Mol Carcinog. 2013; 52(4): 255–264.
200. Jazaeri AA, Ferriss JS, Bryant JL, et al. Evaluation of EVI1 and EVI1s (Delta324) as potential therapeutic targets in ovarian cancer. Gynecol Oncol. 2010;118(2):189-95.
201. Patel JB, Appaiah HN, Burnett RM, et al. Control of EVI-1 oncogene expression in metastatic breast cancer cells through microRNA miR-22. Oncogene. 2011 Mar 17;30(11):1290-301.
202. Bei JX, Li Y, Jia WH, et al. A genome-wide association study of nasopharyngeal carcinoma identifies three new susceptibility loci. Nature Genetics 2010; 42:599–603.
203. Lugthart S, Gröschel S, Beverloo HB, et al. Clinical, molecular, and prognostic significance of WHO type inv (3)(q21q26,2)/t(3;3)(q21;q26.2) and various other 3q abdnormalities in acute myeloid leukemia. J Clin Oncol 2010;28:3890-3898.
204. Sun J, Konoplev SN, Wnag X, et al. De novo acute myeloid leukemia with inv (3)(q21q26,2) or t(3;3)(q21;q26.2): a clinicopathologic and cytogenetic study od an entity recently added to the WHO classification. Modern pathology 2011;24:384-389.

205. Eveillard M, Delaunay J, Richebourg S, et al. The closely related rare and severe acute myeloid leukemias carrying EVI1 or PRDM16 rearrangements share singular biological features. Haematologica 2015; 100:e114.
206. Medeiros BC, Kohrt HE, Arber DA, et al. Immunophenotypic features of acute myeloid leukemia with inv(3)(q21q26.2)/t(3;3)(q21;q26.2). Leuk Res. 2010;34(5):594-7.
207. Rogers HJ, Vardiman JW, Anastasi J, et al. Complex or monosomal karyotype and not blast percentage is associated with poor survival in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome patients with inv (3)(q21q26,2)/t(3;3)(q21;q26.2): a bone marrow pathology group study. Hematologica 2014; 99(5):821-829.
208. Yamazaki H, Suzuki M, Otsuki A, et al. A remote GATA2 hematopoietic enhancer drives leukemogenesis in inv(3)(q21;q26) by activating EVI1 expression.Cancer Cell 2014;25(4):415-27.
209. Gröschel S, Sanders MA, Hoogenboezem R, et al. A single oncogenic enhancer rearrangement causes concomitant EVI1 and GATA2 deregulation in leukemia. Cell. 2014;157(2):369-81.
210. Maicas M, Vázquez I, Vicente C, et al. Functional characterization of the promoter region of the human EVI1 gene in acute myeloid leukemia: RUNX1 and ELK1 directly regulate its transcription. Oncogene. 2013;32(16):2069-78.
211. Russel M, List A, Greenberg P, et al. Expression of EVI1 in myelodysplastic syndromesand other hematologic maligmamcies without 3q26 translocations. Blood 1994; 84:1243-1248.
212. Haferlach C, Grossman V, Zenger M, et al. The prognostic impact of high EVI1 expression in AML is due to its close correlation to rearrangements involving EVI1 or MLL, which are cytogenetically cryptic in a subset of patients: a study on 332 cases. Blood (ASH Annual Meeting abstracts) 2010;116:1676.
213. Haferlach C, Bacher U, Grossmann V, et al. Three novel cytogenetically cryptic EVI1 rearrangements associated with increased EVI1 expression and poor prognosis identified in 27 acute myeloid leukemia cases. Genes Chromosomes Cancer. 2012;51(12):1079-85.
214. Volkert S, Schnittger S, Zenger M, et al. Amplification of EVI1 on cytogenetically cryptic double minutes as new mechanism for increased expression of EVI1. Cancer Genet. 2014;207(3):103-8.
215. Gröschel S, Lugthart S, Schlenk RF, et al. High EVI1 expression predicts outcome in younger adult patients with acute myeloid leukemia and is associated with distinct cytogenetic abnormalities. J Clin Oncol. 2010;28(12):2101-7.
216. Vázquez I, Maicas M, Cervera J, et al. Down-regulation of EVI1 is associated with epigenetic alterations and good prognosis in patients with acute myeloid leukemia. Hematologica 2011;96(10):1448-1456.

217. Shearer BM, Sukov WR, Flynn HC, et al. Development of a dual-color, double fusion FISH assay to detect RPN1/EVI1 gene fusion associated with inv(3), t(3;3), and ins(3;3) in patients with myelodysplasia and acute myeloid leukemia. Am J Hematol 2010;85:569-574.
218. Arai S, Yoshimi A, Shimabe M, et al. Evi-1 is transcriptional target of MLL oncoproteins in hematopoetic stem cells. Blood 2011;117(23):6304-14.
219. Bindels EMJ, Havermans M, Lugthart S, et al. EVI1 is critical for the pathogenesis of a subset of MLL-AF9-rearranged AML. Blood. 2012;119(24):5838-5849.
220. Gröschel S, Schlenk RF, Engelmann J, et al. Deregulated expression of EVI1 defines a poor prognostic subset of MLL-rearranged acute myeloid leukemias: a study of the German-Austrian Acute Myeloid Leukemia Study Group and the Dutch-Belgian-Swiss HOVON/SAKK Cooperative Goup. J Clin Oncol.2013;31(1):95-103.
221. Noordermeer SM, Monteferrario D, Sanders MA, et al. Improved classification of MLL-AF9–positive acute myeloid leukemia patients based on BRE and EVI1 expression. Blood. 2012; 119(18): 4335-37.
222. Santamaria CM, Chillon MC, Garcia Sanz R, et al. Molecular stratification model for prognosis in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. Blood 2009;114(1):148-52.
223. Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani S, Erpelinck C, van Putten WL, et al. High EVI1 expression predicts poor survival in acute myeloid leukemia:a study of 319 de novo AML patients. Blood 2003;101:837-845.
224. Langabeer SE, Rogers JR, Harrison G, et al. EVI1 expression in acute myeloid leukemia. Br J Haematol. 2001;112:208-211.
225. Lugthart S, van Drunen E, van Norden Y, et al. High EVI1 levels predict adverse outcome in acute myeloid leukemia: prevalence of EVI1 overexpression and chromosome 3q26 abnormalities underestimated. Blood 2008; 111(8):4329-4337.
226. Haas K, Kundi M, Sperr WR, et al. Expression and prognostic significance of different mRNA 5'-end variants of the oncogene EVI1 in 266 patients with de novo AML:EVI1 and MDS1/EVI1 overexpression both predict short remission duration. Genes Chromosomes Cancer. 2008;47(4):288-98.
227. Nucifora G, Laricchia-Robbio L, Senyuk V. Evi1 and hematopoietic disorders: history and perspectives. Gene.2006;368:1-11.
228. Oken MM, Creech RH, Tormey DC, et al. Toxicity And Response Criteria Of The Eastern Cooperative Oncology Group. Am J Clin Oncol 5:649-655, 1982.

229. Sorror ML, Maris MB, Storb R, et al. Hematopoietic cell transplantation (HCT)-specific comorbidity index:a new tool for risk assessment before allogeneic HCT. Blood 2005;106(8):2912-9.
230. Chomczynski P, Sacchi N. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem. 1987;162(1):156-9.
231. Sambrook J, Russel DW. Chapter 8: In vitro amplification of DNA by the polymerase chain reaction. In: Molecular cloning: a laboratory manual (3rd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001.
232. Arya M, Shergill IS, Williamson M, et al. Basic principles of real-time quantitative PCR. Expert Rev Mol Diagnostic 2005;5(2):209-19.
233. Schefe JH, Lehmann KE, Buschmann IR, et al. Quantitative real-time RT-PCR data analysis:current concepts and the novel "gene expression's CT difference" formula. J Mol Med 2006;84(11):901-10.
234. Bacher U, Kern W, Schnittger S, Hiddemann W, Schoch C, Haferlach T. Further correlations of morphology according to FAB and WHO classification to cytogenetics in de novo acute myeloid leukemia: a study on 2,235 patients. Ann Hematol 2005; 84:785–791.
235. Tallman MS, Altman JK. How I treat acute promyelocytic leukemia. Blood 2009;114:5126-5135.
236. Park JH, Qiao B, Panageas KS, et al. Early death rate in acute promyelocytic leukemia remains high despite all-trans retinoic acid. Blood 2011;188(5):1248-1254.
237. Merchant SH, Haines S, Hall B, et al. Fluorescence in situ hybridization identifies cryptic t(16;16)(p13;q22) masked by del(16)(q22) in a case of AML-M4 Eo. J Mol Diagn 2004; 6:271–274.
238. Mrózek K, Prior TW, Edwards C, et al. Comparison of cytogenetic and molecular genetic detection of t(8;21) and inv(16) in a prospective series of adults with de novo acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B Study. J Clin Oncol. 2001;19(9):2482-92.
239. Rowe D, Cotterill SJ, Ross FM, et al. Cytogenetically cryptic AML1-ETO and CBFb-MYH11 gene rearrangements: incidence in 412 cases of acute myeloid leukaemia. British Journal of Haematology 2000; 111: 1051-1056.
240. Ferrara F., Del Vecchio L. Acute myeolid leukemia with t (8;21)/AML1/ETO: a distinct biological and clinical entity. Haematologica. 2002; 87(3):306-319.
241. Adriaansen HJ, te Broekhorst PAW, Hagemeijer AM, et al. Acute myeloid leukemia M4 with bone marrow eosinophilia (M4Eo) and inv(16)(p13q22) exhibits a specific immunophenotype with CD2 expression. Blood 1993;81:3043-3051.

242. Grimwade D, Walker H, Harrison G, et al. The predictive value of hierarchical cytogenetic classification in older adults with acute myeloid leukemia (AML): analysis of 1065 patients entered into the United Kingdom Medical Resarch Council AML 11 trial. Blood 2001; 98: 1312–1320.
243. Mrózek K, Heerema NA, Bloomfield CD. Cytogenetics in acute leukemia. Blood Rev 2004;18:115-36.
244. Marchesi F, Annibali O, Cerchiara E, et al. Cytogenetic abnormalities in adult non-promyelocytic acute myeloid leukemia: a concise review. Critica Reviews in Oncology/Hematology 2011;80:331-346.
245. Mrózek K, Marcucci G, Nicolet D, et al. Prognostic significance of the European LeukemiaNet standardized system for reporting cytogenetic and molecular alterations in adults with acute mzeloid leukemia. J Clin Oncol 2012;30:4515-4523.
246. Bene MC, Castoldi G, Derolf A, et al. Near-tetraploid acute myeloid leukemias: an EGIL retrospective study of 25 cases. Leukemia 2006;20:725–728.
247. Jurisić V, Pavlović S, Čolović N, Djordjevic V, Bunjevacki V, Janković G, et al. Single institute study of FLT3 mutation in acute myeloid leukemia with near tetraploidy in Serbia. J Genet 2009;88:149-52.
248. Othus M, Kantarjian H, Petersdorf S, et al. Declining rates of treatment-related mortality in patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia (AML) given “intensive” induction regimens: A Report From the Southwest Oncology Group (SWOG) and MD Anderson Cancer Center (MDA). Leukemia 2014;28(2):289-92.
249. Buckley SA, Othus M, Estey EH and Walter RB. The treatment-related mortality score is associated with non-fatal adverse events following intensive AML induction chemotherapy. Blood Cancer Journal 2015;5:e276.
250. Privitera E, Longoni D, Brambillasca F, Biondi A. EVI-1 gene expression in myeloid clonogenic cells from juvenile myelomonocytic leukemia (JMML). Leukemia 1997;11:2045-2048.
251. Soderholm J, Kobayashi H, Mathieu C, et al. The leukemia-associated gene MDS/EVI1 is a new type of GATA-binding tranactivator. Leukemia 1997;11(3):352-358.
252. Stein S, Ott MG, Schultze-Strasser S, et al. Genomic instability and myelodysplasia with monosomy 7 consequent to EVI1 activation after gene therapy for chronic granulomatous disease. Nat Med. 2010;16(2):198-204.
253. Ilencikova D, Kolenova A. MLL Gene Alterations in Acute Myeloid Leukemia (11q23/MLL+AML). In Oncogene and Cancer-from bench to clinic. Ed. Yahmardiah Siregar. InTech Rijeka 2013.

254. Matsuo H, Kajihara M, Tomizawa D, et al. EVI1 overexpression is a poor prognostic factor in pediatric patients with mixed lineage leukemia-AF9 rearranged acute myeloid leukemia. Haematologica 2014; 99:e225.
255. Nguyen AT, Taranova O, He J, Zhang Y. DOT1L, the H3K79 methyltransferase, is required for MLL-AF9-mediated leukemogenesis. Blood 2011; 117: 6912–6922.
256. Greenblatt SM, Nimer SD. Chromatin modifiers and the promise of epigenetic therapy in acute leukemia. Leukemia 2014; 28: 1396–1406.
257. Lugthart S, van Drunen E, Beverloo H, van Norden YH, Valk PJM, Lowenberg B, Delwel HR. Cryptic 3q26 aberrations partly explain abnormal expression of EVI1 in AML cases without cytogenetically recognizable translocations in this locus. Haematologica 2007; 92[suppl.2]:336. Abstract 0900.
258. Thiede C, Koch S, Creutzig E, et al. Prevalence and prognostic impact of NPM1 mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML). Blood 2006;107(10):4011-20.
259. Schneider F, Hoster E, Unterhalt M, et al. NPM1 but not FLT3-ITD mutations predict early blast cell clearance and CR rate in patients with normal karyotype AML (NK-AML) or high-risk myelodysplastic syndrome (MDS). Blood 2009;113(21):5250-5253.
260. Schneider F, Hoster E, Unterhalt M, et al. The FLT3-ITD mRNA level has a high prognostic impact in NPM1-mutated, bez not in NPM1 unmutated, AML with a normal karyotype. Blood 2012;119:4383-4386.
261. Ilyas AM, Ahmad S, Faheem M, et al. Next generation sequencing of acute myeloid leukemia: influencing prognosis. BMC Genomics 2015;16(S5):1-12.
262. Luthra R, Patel KP, Reddy NG, et al. Next-generation sequencing-based multigene mutational screening for acute myeloid leukemia using MiSeq: applicability for diagnostics and disease monitoring. Haematologica 2014;99(3):465-473.
263. Zhang Y, Sicot G, Cui X, et al. Targeting a DNA binding motif of the EVI1 protein by a pyrrole-imidazole polyamide. Biochemistry 2011;50:10431-10441.
264. Syed J, Pandian GN, Sato S, et al. Targeted Supression of EVI1 oncogene expression by sequence-specific pyrrole-imidazole polyamide. Chemistry and Biology 2014;21(10):1370-80.
265. Yoshimi A, Kurokawa M. Evi1 forms a bridge between the epigenetic machinery and signaling pathways. Oncotarget 2011; 2:575-586.