

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

MIRJANA M. MITROVIĆ

PROGNOSTIČKI FAKTORI RANE SMRTI I
RELAPSA BOLESTI U AKUTNOJ
PROMIJELOCITNOJ LEUKEMIJI

doktorska disertacija

Beograd, 2015

UNIVERSITY OF BELGRADE

SCHOOL OF MEDICINE

MIRJANA M. MITROVIĆ

EARLY DEATH AND DISEASE RELAPSE
PROGNOSTIC FACTORS IN ACUTE
PROMYELOCYTIC LEUKEMIA

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2015.

MENTOR:

Prof. dr Nada Suvajdžić-Vuković, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE:

1. Prof. dr Biljana Mihaljević, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu

2. Prof. dr Dragica Tomin, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu

3. Naučni savetnik dr Sonja Pavlović, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo (IMGGI), Univerziteta u Beogradu.

Profesorki Nadi Suvajdžić-Vuković, mentoru ovog rada, mom prijatelju i učitelju, dugujem najveću zahvalnost za nesebičnu pomoć i stalnu podršku koje mi pruža od početka mog rada u hematologiji.

Profesorki Biljani Mihaljević iskreno zahvaljujem na stručnoj i organizacionoj podršci koju mi je pružala tokom trajanja ovog istraživanja, izrade disertacije ali i mom svakodnevnom radu.

Profesorki Dragici Tomin, mom prvom učitelju interne medicine i hematologije, zahvaljujem što je kao rukovodilac Odeljenja za akutne leukemije, zajedno sa kompletnim timom lekara, sve vreme svesrdno podržavala rad u ovom istraživanju. Takođe joj se zahvaljujem na veoma korisnim sugestijama prilikom korekcija disertacije.

Dr Sonji Pavlović zahvaljujem na veoma korisnim sugestijama prilikom metodološkog dizajniranja ovog istraživanja. Pored toga, bez rada dr Sonje Pavlović i njenih saradnika iz Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo (IMGGI), Univerziteta u Beogradu, koji oni svakodnevno obavljaju na vrhunskom profesionalnom nivou ovo istraživanje ne bi bilo moguće sprovesti. I u tom smislu, njihov rad predstavlja istinski "zlatni standard".

Podrška, pomoć i podsticaj moje porodice, prijatelja i kolega u toku izrade ovog rada bili su za mene od najvećeg značaja. Beskrajna zahvalnost je najmanje što im dugujem.

Mojoj porodici i prijateljima

Prognostički faktori rane smrti i relapsa bolesti u akutnoj promijelocitnoj leukemiji

Rezime

Uvod: Uvodjenjem all-trans retinoične kiseline (ATRA) u terapiju akutne promijelocitne leukemije (APL) i njenim kombinovanjem sa antraciklinima, bolest je od najagresivnijeg postala najizlečiviji podtip akutne mijeloidne leukemije, sa stopom izlečenja od oko 80%. Osnovi uzroci neuspeha lečenja su rana smrt (RS) i relapsa bolesti (RB). Iako je u okviru studija velikih kooperativnih grupa učestalost RS procenjena na 5-10%, nedavno publikovani rezultati populacionih studija ukazuju da je učestalost mnogo veća i iznosi 17-29%. Najčešći uzroci RS su: krvarenje (40-66% bolesnika), diferencijacioni sindrom (6-30%) i infekcije (1-10 %). Sa druge strane RB se dijagnostikuje kod 5-30% bolesnika. Do sada su identifikovani brojni prediktivni faktori za razvoj RS i RB. Međutim, značaj većine je i dalje kontraverzan.

Ciljevi: 1) Utvrđivanje prediktivne vrednosti parametara krvne slike, rutinskih testova hemostaze i skora za diseminovanu intravaskularnu koaguaciju Internacionalnog Udruženja za Hemostazu i Trombozu (International Society of Thrombosis and Haemostasis Scoring System for disseminated intravascular coagulation, ISTH DIK skor), citološkog tipa bolesti, imunofenotipskih i molekularno-genetskih obeležja za nastanak RS. 2) Utvrđivanje prediktivne vrednosti navedenih parametara za pojavu krvarenja kao i nastanak RS uzrokovane hemoragijom (HRS). 3) Dizajniranje prediktivnog skora za nastanak HRS. 4) Utvrđivanje prediktivne vrednosti navedenih parametara za pojavu RB. 5) Utvrđivanje značaja monitoringa ekspresije WT1 gena kao markera minimalne rezidualne bolesti (MRB).

Materijal i metodologija istraživanja: U ovu prospektivno-retrospektivnu studiju uključeno je 75 bolesnika sa APL (prosečna starost 45 godina (opseg: 19 -78), žene/muškarci 40/35) koji su dijagnostikovani i lečni na ATRA + hemoterapija baziranim protokolima (PETHEMA LPA 99 i 2005), u Klinici za hematologiju Kliničkog centra Srbije u periodu od juna 2004. do juna 2014. godine. RS je definisana kao smrt iz bilo kog razloga u periodu od prvog dana hospitalizacije do završetka indukcionog lečenja. Molekularni relaps je definisan kao *PML-RARα* pozitivnost u dva nezavisna uzorka, kod bolesnika sa prethodno dokazanom molekularnom KR. Hematološki relaps je dijagnostikovao u slučaju > 5% blasta u koštanoj srži ili ekstramedularne bolesti uz potvrdu relapsa citogenetskim analizama.

Inicijalna dijagnostika podrazumevala je: kompletnu krvnu sliku, testove hemostaze (fibrinogen, PT, aPTT, D dimer iz kojih je izračunavan ISTH DIK skor), morfološku i citohemijsku analizu razmaza koštane srži obojenih po metodi May-Grunwald-Giemsa i mijeloperoksidazo, imunofenotipizaciju ćelija koštane srži na protočnom citometru direktnom imunofluorescentom tehnikom sa komercijalnim monoklonalnim antitelima, klasičnu citogenetiku metodom HG traka, testove molekularne genetike: a) detekciju *PML-RAR* fuzionih transkripata standardizovanom RT-PCR metodom b) detekciju *FLT3-ITD* i *FLT3-D835* mutacije PCR metodom, odnosno PCR-RFLP (PCR-„restriction fragment length polymorphism“) metodom c) određivanje ekspresija *WT1* gena kvantitativno „real-time“ RQ-PCR metodom i primenom TaqMan tehnologije.

Procena remisije sa monitoringom MRB podrazumevala je: 1. Citomorfološku procenu posle indukcione kure 2. Citomorfološku, citogenetsku i molekularnu procenu (RT-PCR na *PML-RARA* i nivo ekspresije *WT1* gena) posle prve i treće kure konsolidacije 3. Citomorfološku i citogenetsku procenu na kraju terapije održavanja 4. RT-PCR na *PML-RARA* i nivo ekspresije *WT1* gena, svakih šest meseci tokom tri godine od završetka konsolidacionog lečenja.

Rezultati: RS nastupila je kod 17/75 (22.67%) bolesnika. Uzroci rane smrti bili su: krvarenje kod 10/17 (59%) bolesnika, DS kod 4/17 (23.5%) bolesnika, infekcija kod dva (2.67%) i akutni infarkt miokarda kod jednog bolesnika (1.33%). Prediktori nastanka RS u univarijantnoj analizi bili su broj $Le \geq 10 \times 10^9/L$ ($P = 0.0231$), ECOG skor ≥ 3 ($P = 0.0006$), fibrinogen < 2 g/L ($P = 0.02617$), PT $< 50\%$ ($P = 0.007292$), ISTH DIK skor ≥ 6 ($P = 0.00529$), M3v ($P = 0.039$). Multivarijanta analiza je identifikovala leukocitozu, kao nezavisni prognozni faktor nastanka RS.

Prediktori HRS u univarijantnoj analizi bili su: ECOG skor ≥ 3 ($P = 0.010$), vitalno ugrožavajuće krvarenje na prijemu ($P = 0.023$), leukociti $> 15 \times 10^9/L$ ($P = 0.030$), $Le > 20 \times 10^9/L$ ($P = 0.015$), fibrinogen < 2 g/L ($P = 0.05$), PT $< 50\%$ ($P = 0.005$), ISTH DIK skor ≥ 6 ($P = 0.031$) i ISTH DIK skor ≥ 7 ($P = 0.015$). Nezavisni prognozni parametri u multivarijantnoj analizi bili su: vitalno ugrožavajuće krvarenje na prijemu ($P = 0.041$), leukociti $> 20 \times 10^9/L$ ($P = 0.018$) i ISTH DIK skor ≥ 7 ($P = 0.024$). Na osnovu ovih rezultata dizajniran je prognozni skor za HRS: 0 poena bolesnici bez vitalno ugrožavajućeg krvarenja na prezentaciji, sa leukocitima $< 20 \times 10^9/L$ i ISTH DIK skor < 7 ; po 1 poen bolesnici sa vitalno ugrožavajućim krvarenjem na prijemu ili leukocitima $\geq 20 \times 10^9/L$; 2 poena: ISTH

DIK skor ≥ 7 . Na osnovu vrednosti skora bolesnici su klasifikovani u tri grupe: nizak rizik: 0 poena, umeren rizik: 1-2 poena i visok rizik: 3 poena. Učestalost rane hemoragijske smrti se značajno razlikovala između rizičnih grupa: nizak rizik 2.4%, umeren 26.1%, visok rizik 100%, $P < 0.001$.

KR postiglo je 58/75 (77.33%) bolesnika. Relaps APL je registrovan kod 8/55 (13.79), prosečno u 25. mesecu od od postizanja KR (opseg 3 – 43 meseca). Bolesnici sa relapsom APL su imali prosečno veći broj leukocita ($P = 0.02666726$), češće su ekspimirali CD56 antigen ($P = 0.01282$) i *FLT3-ITD* mutaciju ($P = 0.01562$), kao *WT1* gen prekomernu ekspresiju posle konsolidacije ($P = 0,003$) u poređenju sa bolesnicima u trajnoj KR. Povećanje ekspresije *WT1* uočena je u uzorcima tokom relapsa (> 1.5 log u 2/6 (30%) relapsa, > 1 log kod 3/6 (50%) i < 1 log kod 1/6 (16.67%). U jednom slučaju porast *WT1* ekspresije je registrovan 6 meseci pre pojave *PML-RAR α* pozitivnosti.

Zaključak: Rutinski kliničko-laboratorijski parametri urađeni u trenutku hospitalizacije kombinovani u skor mogu identifikovati bolesnike sa veoma visokim rizikom za nastanak HRS. Prevencija RS u ovoj grupi bolesnika podrazumevala intenzivnu transfuzionu terapiju ali i primenu novih terapijskih modaliteta. Ipak, za testiranje novog skor sistema i definisanje terapijskog pristupa neophodne su velike populacione studije. Učestalost RB kao i prognozni faktori njegovog razvoja odgovaraju literaturnim. Praćenjem nivoa *WT1* ekspresije tokom monitoringa MRB mogu se detektovati bolesnici u visokom riziku za RB.

Ključne reči: akutna promijelocitna leukemija, rana smrt, relaps bolesti, prognzni faktori

Naučna oblast: Interna medicina

Uža naučna oblast: Hematologija

Early death and disease relapse prognostic factors in acute promyelocytic leukemia

Summary

Background: Since the introduction of all-trans retinoic acid (ATRA), acute promyelocytic leukemia (APL) from highly fatal has become the most curable of all subtypes of acute myeloid leukemias, with cure rate of 80%. Main reasons for treatment failure are early death (ED) and disease relapse. According to large cooperative groups, ED occurs in approximately 5–10 % of newly diagnosed cases. However, recently population-based studies reported considerably higher ED rates, from 17 to 29%. Hemorrhage is the major cause of mortality in 41–66 % of ED patients, followed with differential syndrome (6-30%) and infection (1-10 %). On the other hand disease relapse occurred in 5-30% of patients. Previous studies identified several prognostic factors for ER and relapse. However, predictive value is controversial in majority of these factors.

Aim: 1) To identify predictive value of complete blood count, routine hemostasis test and International Society of Thrombosis and Haemostasis Scoring System for disseminated intravascular coagulation (ISTH DIC score), morphologic disease type, immunophenotype and molecular-genetic markers expression for ED 2) To identify predictive value of these factors for bleeding and hemorrhagic ED (HED) development 3) To develop prognostic scoring system for HED development 4) To identify predictive value of these factors for disease relapse development 5) To quantify value of *WRI* gene expression as minimal residual disease (MRD) marker.

Material and methods: This prospective-retrospective study was included 75 *de-novo* APL patients (median age 45 years (range: 19 -78), female/male 40/35) who were diagnosed and treated with ATRA+ chemotherapy protocols (PETHEMA LPA 99 i 2005), at the Clinic of Hematology from Jun 2004 to Jun 2014. ED was defined as death from any cause, from the first day of hospitalization up to the end of the induction treatment. Molecular relapse was defined as two successive PCR PML-RAR α positive assays in patients with confirmed complete remission (CR). Hematologic relapse was defined as > 5% of blast in bone marrow or extramedullary disease with genetic confirmation.

The initial diagnosis implied: complete blood count, routine hemostasis test (fibrinogen, PT, aPTT, D dimer) with ISTH DIK score, morphologic bone marrow with May-Grunwald-Giemsa and myeloperoxidase, immunophenotyping by flow cytometry by the direct multicolour immunofluorescent technique, cytogenetic analysis by conventional G-band karyotyping and molecular genetic test: a) *PML-RAR α* fusion transcript was detected using reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) b) *FLT3-ITD* and *FLT3-D835* were detected using PCR-RFLP (PCR-, restriction fragment length polymorphism) method c) *WT1* expression levels were quantified by RQ-PCR method, using TaqMan chemistry.

Postinduction examination and MRD monitoring: 1. Morphologic examination after induction 2. Morphologic, cytogenetic and molecular genetic testing (RT-PCR for *PML-RARA* and *WT1* gene expression) after first and third consolidation 3. Morphologic and cytogenetic after the end of maintenance therapy 4. RT-PCR for *PML-RARA* and *WT1* gene expression, every 6 months during first three years after last consolidation.

Results: ED occurred in 17/75 (22.67%) patients due to: bleeding 10/17 (59%), differentiation syndrome 3 (30%), infection 4/17 (23.5%) and acute myocardial infarction 1/17 (1.33%). Predictors of ED in univariate analysis were: ECOG PS ≥ 3 (P = 0.0006), WBC $> 10 \times 10^9/L$ (P = 0.0231), fibrinogen level < 2 g/L (P = 0.02617), PT $< 50\%$ (P = 0.007292), and ISTH DIC score ≥ 6 (P = 0.00529) and variant disease type (M3v). Independent risk factor in multivariate analysis was leucocytosis.

Predictors of HED in univariate analysis were: ECOG PS ≥ 3 (P = 0.010), severe bleeding at diagnosis (P = 0.023), WBC $> 15 \times 10^9/L$ (P = 0.030), WBC $> 20 \times 10^9/L$ (P = 0.015), fibrinogen level < 2 g/L (P = 0.05), PT $< 50\%$ (P = 0.005), ISTH DIK score ≥ 6 (P = 0.031) and ISTH DIC score ≥ 7 (P = 0.031). Independent risk factors in multivariate analysis were: severe bleeding at diagnosis (P = 0.041), WBC $> 20 \times 10^9/L$ (P = 0.018) and ISTH DIC score ≥ 7 (P = 0.024). A clinical prognostic scoring system was then developed: absence of severe bleeding at diagnosis, WBC $< 20 \times 10^9/L$, ISTH DIC score $< 7 = 0$; WBC $\geq 20 \times 10^9/L$ or severe bleeding at diagnosis = 1 point each and ISTH DIC score $\geq 7 = 2$ points. Accordingly patients were classified in three groups: low risk = 0 points, intermediate = 1-2 points and high risk ≥ 3 points. The HED rate between these groups (low 2.4%, intermediate 26.1% and high 100%) was significantly different (p < 0.001).

CR was achieved in 58/75 (77.33%) patients. Disease relapse was diagnosed in 8/55 (13.79%), patients, with median time to relapse of 25. months (range: 3 – 43 months).

Relapsed patients had higher WBC count ($P = 0.02666726$), CD56 expression ($P = 0.01282$) and *FLT3-ITD* mutation ($P = 0.01562$), and *WT1* gene overexpression after first consolidation ($P = 0,003$) in comparison to patients in CR. The increase in *WT1* expression was observed in all samples during relapse (> 1.5 log in 2/6 relapses (30%), > 1 log in 3/6 (50%) and < 1 log in 1/6 (16.67%)). In one case *WT1* level increment was registered 6 months before PML-RARA positivity.

Conclusion: The prognostic model developed in this study, based on routinely done clinical and laboratory parameters, allows the identification of the patients at high risk for HED, needing more aggressive supportive measures and new therapeutically options. Further large population-based studies for testing new score systems and refinements therapeutic approaches for APL patients in high HED risk are needed. Relapse rate and relapse predictive factor identified in our study are similar to literature data. *WT1* expression monitoring was able to detect patients at high risk of relapse.

Key words: acute promyelocytic leukemia, early death, disease relapse, prognostic factors

Internal medicine, Hematology

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1 AKUTNE LEUKEMIJE, definicija i podela.....	1
1.2. AKUTNA PROMIJELOCITNA LEUKEMIJA.....	3
1.2.1. Istorijat.....	3
1.2.2. Epidemiologija.....	3
1.2.3. Etiopatogeneza.....	4
1.2.4. Etiologija koagulopatije u APL.....	6
1.2.5. Klinička slika APL.....	8
1.2.6. Dijagnoza APL.....	8
1.2.6.1. Krvna slika sa leukocitarnom formulom.....	8
1.2.6.2. Testovi hemostaze.....	8
1.2.6.3. Citomorfološki pregled.....	9
1.2.6.4. Imunofenotip APL.....	10
1.2.6.5. Citogenetska analiza.....	10
1.2.6.5.1. Klasična citogenetska analiza.....	10
1.2.6.5.2. Fluorescentna in situ hibridizacija (FISH).....	11
1.2.6.5.3. RT-PCR (reverse transcriptase polymerase chain reaction).....	11
1.2.6.5.4. Anti-PML monoklonska antitela.....	11
1.2.7. Lečenje.....	12
1.2.7.1. Otkriće ATRA-e.....	12
1.2.7.2. Mehanizam dejstva ATRA-e.....	13
1.2.7.3. Diferencijacioni sindrom.....	14

1.2.7.4. Optimizacija protokola za lečenje APL, zasnovanih na primeni ATRA-e.....	15
1.2.7.5. Lečenje koagulopatije u APL.....	19
1.2.7.5.1. Suportivna transfuziološka terapija.....	19
1.2.7.5.2. Heparin i antifibrinolitici.....	19
1.2.7.5.3. All-trans retinoična kiselina (ATRA).....	19
1.2.7.6. Moderan terapijski pristup.....	20
1.2.7.7. Monitorin <i>PML-RARα</i> putem PCR.....	20
1.2.7.8. ATO u terapiji APL.....	21
1.2.7.8.1. Mehanizam dejstva ATO.....	22
1.2.7.9. Lečenje APL u posebnim slučajevima.....	23
1.2.7.9.1. Bolesnici starije životne dobi.....	23
1.2.7.9.2. Bolesnici sa komorbiditetima.....	23
1.2.7.9.3. Lečenje APL u trudnoći.....	23
1.2.7.9.3.1. Lečenje APL u prvom trimestru trudnoće.....	23
1.2.7.9.3.2. Lečenje APL u drugom i trećem trimestru trudnoće.....	23
1.2.7.9.4. APL nastala posle primene citotoksične terapije.....	24
1.2.7.9.5. Genetske varijante APL.....	24
1.2.7.10. Rana smrt.....	25
1.2.7.10.1. Prognozni faktori rane smrti.....	26
1.2.7.11. Relaps u APL.....	29
1.2.7.11.1. Terapija relapsa.....	30
1.2.7.11.2. Prognozni marker nastanka relapsa u APL.....	31
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	35
3. MATERIJAL I METODOLOGIJA ISTRAŽIVANJA.....	36

3.1. Inicijalna dijagnostika.....	36
3.1.1. Anamneza i fizikalni pregled.....	36
3.1.2. Kompletna krvna slika.....	36
3.1.3. Rutinski testovi hemostaze.....	36
3.1.4. Morfološka i citohemijska analiza razmaza koštane srži.....	37
3.1.5. Imunofenotipizacija protočnom citometrijom.....	37
3.1.5.1. Monoklonska antitela.....	37
3.1.5.2. Metod direktne višekolorne imunofluorescencije.....	38
3.1.5.3. Merenje i analiza uzoraka metodom multiparametarske protočne citometrije.....	38
3.1.6. Klasična citogenetska analiza metodom HG traka.....	40
3.1.7. Molekularno-genetska istraživanja	41
3.1.7.1. Izolacija monoklonskih ćelija iz aspirate koštane srži.....	41
3.1.7.2. Izolacija DNK iz periferne krvi/ koštane srži.....	41
3.1.7.3. Izolacija RNK iz monoklonskih ćelija.....	42
3.1.7.4. Reverzna transkripcija (RT).....	43
3.1.7.5. Standardizovani RT-PCR protokol za detekciju <i>PML-RAR</i> fuzionih transkriptata.....	43
3.1.7.6. Reakcija lančanog umnožavanja DNK (PCR).....	45
3.1.7.6.1. Detekcija <i>FLT3-ITD</i> mutacije.....	45
3.1.7.6.2. Detekcija <i>FLT3-D83</i> mutacije.....	46
3.1.7.6.3. Analiza DNK na agaroznom gelu.....	47
3.1.7.6.4. Praćenje ekspresije gena pomoću "real-time" PCR (q-PCR) metode.....	47
3.1.7.6.5. Relativna kvantifikacija, komparativni ddCt metod.....	52
3.1.7.6.6. Određivanje ekspresije WT1 gena komparativnom ddCt metodom.....	52
3.2. Terapija.....	53

3.2.1. Rana smrt.....	54
3.2.2. Procena remisije i molekularni monitoring.....	54
3.2.3. Relaps bolesti.....	54
4. REZULTATI.....	56
4.1. Demografske osobine bolesnik.....	56
4.1.1. Distribucija bolesnika prema polu.....	56
4.1.2. Distribucija bolesnika prema životnoj dobi.....	56
4.1.3. APL nastala posle prethodne primene citotoksične terapije (t-APL).....	57
4.2. Kliničke osobine bolesnika.....	57
4.2.1. Tegobe na prijemu.....	57
4.2.2. Hemoragijski sindrom na prijemu.....	58
4.2.3. Poređenje kliničko-laboratorijskih osobina bolesnika sa i bez krvarenja na prezentaciji.....	58
4.2.4. Distribucija bolesnika prema opštem funkcionalnom stanju.....	63
4.3. Distribucija bolesnika prema prametrima krvne slike.....	63
4.3.1. Koncentracija hemoglobina.....	63
4.3.2. Broj leukocita.....	64
4.3.3. Broj trombocita.....	64
4.3.4. Sanzov skor.....	64
4.4. Distribucija bolesnika prema vrednostima testova hemostaze.....	65
4.4.1. Fibrinogen.....	65
4.4.2. Protrombinsko vreme.....	65
4.4.3. Aktivirano parcijalno tromboplastinsko vreme.....	65
4.4.4. D-dimer.....	65
4.4.5. ISTH DIK skor.....	66

4.5. Dijagnostički testovi.....	67
4.5.1. Mijelogram.....	67
4.5.2. Imunofenotipizacija.....	69
4.5.3. Citogenetska analiza.....	70
4.5.3.1. Tehnika traka.....	70
4.5.3.2. PCR za <i>PML-RARα</i>	71
4.5.3.3. PCR za mutacije <i>FLT3</i> gena.....	71
4.5.3.4. PCR za WT1 gen.....	74
4.6. Lečenje.....	76
4.6.1. Diferencijacioni sindrom.....	77
4.7. Rana smrt.....	80
4.7.1. Rana smrt uzrokovana krvarenjem.....	84
4.8. Rezultati indukcionog lečenja.....	88
4.9. Konsolidaciona smrt.....	89
4.10. Relaps bolesti.....	90
4.11. Praćenje WT1 ekspresije.....	94
4.12. Lečenje relapsa bolesti.....	94
4.13. Ukupno preživljavanje.....	94
5. DISKUSIJA.....	96
6. ZAKLJUČCI.....	109
7. LITERATURA.....	112
8. PRILOZI.....	124

1. UVOD

1.1 AKUTNE LEUKEMIJE

1.1. Definicija i podela

Akutne leukemije (AL) su maligne klonske bolesti matične ćelije hematopoeze, koje nastaju usled poremećaja genoma matične ćelije, sa posledičnom nekontrolisanom proliferacijom i infiltracijom različitih tkiva i organa [1, 2]. Incidenca AL se procenjuje na 3-5 na 100.000 stanovnika godišnje [1, 2]. Prema poreklu leukemijskih ćelija, AL se klasifikuju na mijeloblastne (AML) i limfoblastne (ALL) [1, 2]. Francusko-američko-britanskih (FAB) grupa je 1976. godine predložila morfološku klasifikaciju AL [3]. U okviru navedene klasifikacije, AML su podeljene na osam podtipova – Tabela 1.

Tabela 1: Morfološka klasifikacija akutnih leukemija

AML minimalno diferentovana (AML-M0)
AML bez sazrevanja (AML-M1)
AML sa sazrevanjem (AML-M2)
Akutna promijelocitna leukemija (AML-M3)
Akutna mijelomonocitna leukemija (AML-M4)
Akutna monoblastna/monocitna leukemija (AML-M5)
Akutna eritrodina leukemija (AML-M6)
Akutna megakarioblastna leukemija (AML-M7)

Na osnovu morfoloških, citohemijskih, imunoloških i citogenetskih osobina leukemijskih ćelija, Svetska Zdravstvena Organizacija (SZO) je 2008. godine izvršila je novu klasifikaciju AML [4] - Tabela 2.

Tabela 2: Klasifikacija akutnih leukemija prema Svetskoj zdravstvenoj organizaciji⁴

AML sa rekurentnim genetskim poremećajima
AML sa t(8;21)(q22;q22), RUNX1-RUNX1T1 AML sa inv(16)(p13.1q22) ili t(16;16)(p13.1;q22);CBFB-MYH11 (AML-M4Eo) AML sa t(15;17)(q22;q12); PML-RARA (AML-M3) 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;26.2);RPN1-EVII AML (megakarioblastna) sa t(1;22)(p13;q13);RBM14-MLK1 Privremeni entitet: AML sa NPM1 mutacijom Privremeni entitet: AML sa CEBPA mutacijom
AML sa znacima mijelodisplazije
AML nastala posle prethodnog lečenja
AML, neklasifikovana
AML minimalno diferentovana AML bez sazrevanja AML sa sazrevanjem Akutna mijelomonocitna leukemija Akutna monoblastna/monocitna leukemija Akutna eritroidna leukemija Čista eritroleukemija Eritroleukemija (eritroidno/mijeloidna) Akutna megakarioblastna leukemija Akutna bazofilna leukemija Akutna panmijeloza sa mijelofibrozom
Mijeloidni sarkom
Mijeloidna proliferacija u Daunovom sindromu
Neoplazma blastičnih plazmocitoidnih ćelija

1.2. AKUTNA PROMIJELOCITNA LEUKEMIJA

Akutna promijelocitna leukemija (APL) je poseban podtip AML koji se odlikuje predominacijom patoloških promijelocita [1-5]. Klinički se bolest odlikuje: krvarenjem koje je posljedica diseminovane intravaskularne koagulacije (DIK), citomorfološkim nalazom koji odgovara AML-M3 tipu prema FAB klasifikaciji i balansiranom recipročnom translokacijom između hromozoma 15 i 17, odnosno fuzijom gena za promijelocitnu leukemiju (PML - promyelocytic leukemia) i gena koji kodira alfa receptor za retinoičnu kiselinu (RAR α -retinoic acid receptor alfa) [1-5].

1.2.1. Istorijat

Švedski lekar Hillestad je 1957. godine opisao tri bolesnika sa "izraženim hemoragijskim sindromom, dominacijom promijelocita u leukocitarnoj formuli i veoma brzim kliničkim tokom bolesti sa fatalnim ishodom u ukupnom trajanju od tri nedelje" [6]. Detaljniji opis APL dao je Bernard sa saradnicima, dve godine kasnije, opisavši 20 bolesnika sa perakutnim kliničkim tokom kojim je dominirao hemoragijski sindrom. Autori su prvi put krvarenje u APL povezali sa DIK-om i hiperfibrinolizom [7].

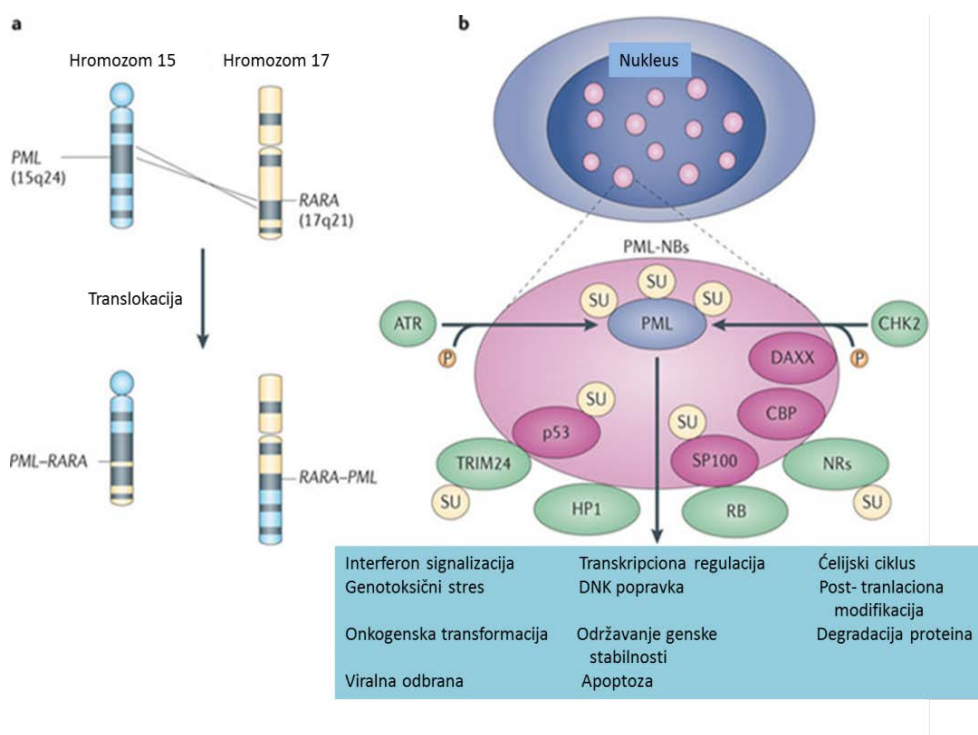
1.2.2. Epidemiologija

APL je redak tip AML. Prema podacima iz evropskih registara, APL čini 5-10% svih AML. Godišnje se u Sjedinjenim Američkim državama (SAD) dijagnostikuje između 600 i 800 slučajeva [1-5]. APL je veoma retka kod dece mlađe od 10 godina. Incidenca potom raste dostižući plato između 35. i 45. godine života da bi se učestalost bolesti smanjila posle 60. godine života, za razliku od ostalih tipova AML [1-5]. Primećena je veća učestalost oboljenja u Meksiku, Centralnoj i Južnoj Americi, Italiji i Španiji [1-5]. Incidenca APL takođe je veća kod bolesnika prethodno lečenih hemio i radioterapijom [1-5].

1.2.3. Etiopatogeneza

Recipročna translokacija t(15;17) registruje se kod 90% bolesnika sa APL. Navedenom translokacijom, PML gen, lociran na hromozomu 15 i RAR α , na hromozomu 17, stvaraju novi, hibridni PML-RAR α gen – Slika 1 [1, 2, 5, 8].

RARA gen kodira sintezu receptora za koji se vezuju all- i cis-retinoična kiselina i odgovoran je za diferencijaciju ćelija granulocitno-monocitne loze [1, 2, 5, 8]. Sa druge strane, PML gen je odgovoran za indukciju apoptoze, očuvanje genske stabilnosti, regulaciju angiogeneze i ćelijskog ciklusa. Ove funkcije ga čine značajnim tumor supresorskim genom – slika 1 [1, 2, 5, 8]. Stvaranje hibridnog PML-RAR α gena dovodi do poremećaja epigenetske kontrole, u vidu aberantne modifikacije histona i hipometilacije, sa posledičnim prekidom diferencijacije leukemijskih ćelija na nivou promijelocita, smanjenjem apoptoze i intenziviranjem, kako angiogeneze tako i genske nestabilnosti – Slika 1 [1, 2, 5, 8].

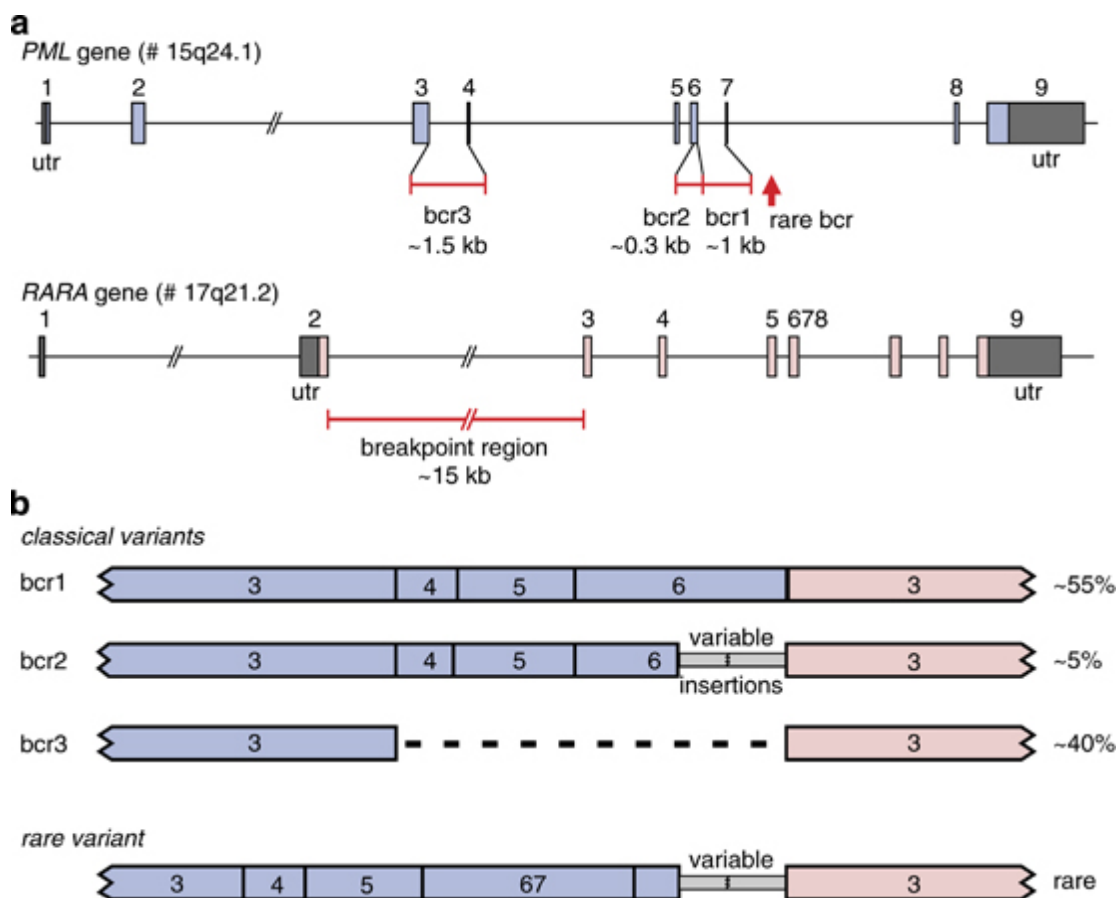


Slika 1: Molekularna osnova akutne promijelocitne leukemije

Preuzeto iz: Wang Z i saradnici. Acute promyelocytic leukemia: from highly fatal to highly curable. Blood 2008;111:2505-15.

Eksperimenti Pandolfija i saradnika, izvedeni na transgenskim miševima, su pokazali da je prisustvo *PML-RAR α* fuzionog gena ključni događaj za nastanak APL, mada su i mutacije FLT3 i K-ras gena potrebne za potpunu manifestaciju bolesti [8]. Dodatne (sekundarne) citogenetske anomalije (DCA) se javljaju kod 40% bolesnika sa APL-om, ali je njihov etiopatogenetski značaj zasada nerazjašnjen [5,8].

Do sada su opisane tri tačke preloma *PML* gena: bcr1, bcr2 i bcr3, sa posledičnim stvaranjem dugog, varijabilnog i kratkog *PML-RARA* transkripta (Slika 2) [1, 2, 4, 5].



Slika 2: Tačke preloma *PML* gena i različiti *PML-RARA* transkripti

Preuzeto iz: Dekking E. Flow cytometric immunobead assay for fast and easy detection of *PML-RAR α* fusion proteins for the diagnosis of acute promyelocytic leukemia. *Leukemia* 2012;26:1976–85

Kod 2-5% bolesnika sa APL, uočene su retke varijantne translokacije koje uključuju *RAR α* gen i ZBTB16 (ranije označen kao PLZF ili promyelocytic leukemia zinc finger) na 11q23; NUMA1 (nuclear matrix associated gene) na 11q13; NPM1 (nucleophosmine gene)

na 5q35; STAT5B gen na 17q11, odnosno nedavno opisane pojedinačne slučajeve PRKAR1A i FIP1L1 na hromozomu 4 – Slika 2 [1, 2, 4, 5, 9, 10].

1.2.4. Etiologija koagulopatije u APL

Najčešće abnormalnosti hemostaznog sistema koje se opisuju kod bolesnika sa APL su: trombocitopenija, hipofibrinogenemija, produženo protrombinsko vreme (PT), produženo aktiviranog parcijalno tromboplastinsko vreme (aPTT) i porast vrednosti fibrinogen-fibrin degradacionih produkata [11, 12].

Trombocitopenija nastaje usled infiltracije koštane srži leukemijskim klonom i potrošnje trombocita u okviru DIK-a [11, 12]. Sa druge strane, opisani koagulacioni poremećaji su kompleksni i nastaju interrekcijom najmanje tri patofiziološka procesa: aktivacije koagulacije prokoagulantnim mehanizmima, fibrinolize i nespecifične proteolize (Slika 3) [11-13].

1. Aktivacija koagulacije prokoagulantnim mehanizmima

Leukemijske ćelije obolelih od APL eksprimiraju velike količine tkivnog faktora (TF) i kancerskog prokoagulansa koji dovode do aktivacije koagulacije [11, 12].

2. Fibrinoliza

Balans između profibrinolitičkih i antifibrinolitičkih faktora je narušen u APL [11-13]. Leukemijski promijelociti sadrže urokinazu, tkivni aktivator plazminogena, kao i aneksin II koji indukuju ekstenzivnu primarnu hiperfibrinolizu [11, 12]. Sekundarna fibrinoliza je pak posledica DIK-om indukovano oslobađanja velike količine prokoagulantnih materija. Neke studije sugerišu da je primarna hiperfibrinoliza osnovni etiološki događaj u nastanku koagulopatije u APL. Međutim, na osnovu do sada dostupnih laboratorijskih testova, teško je dokazati prisustvo primarne hiperfibrinolize, za razliku od sekundarne hiperfibrinolize, koju je lako dokumentovati na osnovu povišenih vrednosti D dimera [11, 12].

3. Proteoliza

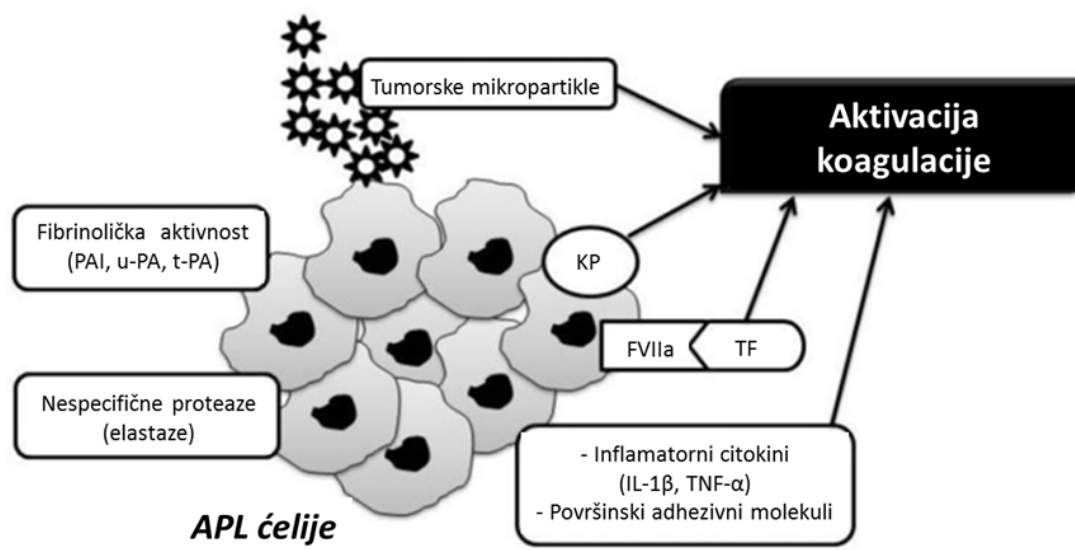
Povišen nivo elastaza u plazmi je opisan kod bolesnika sa APL-om. Elastaze, nastale ćelijskom degranulacijom i lizom, uzrokuju proteolizu fibrinogena i povećanu produkciju fibrin degradacionih produkata (FDP) [12].

4. Prokoagulantne mikropartikle

Mikropartikle su delovi membrana trombocita, eritrocita, leukocita, endotelnih i malignih ćelija koji na svojoj površini sadrže TF. U bolesnika sa APL najveći deo cirkulišućih mikropartikli potiče od malignih promijelocita i odlikuje se visokom ekspresijom TF. TF, slobodni ali i TF vezan za mikropartikle, vezuju se za cirkulišući aktivirani faktor VII, čime se inicira koagulaciona kaskada. TF - noseće mikropartikle takođe olakšavaju vezivanje leukemijskih primijelocita i trombocita za neutrofile i monocite.

5. Citokini

Leukemijski promijelociti sekretuju povećane količine citokina, uključujući interleukin-1 β (IL-1 β) i tumor nekrosis faktor alfa (TNF- α), koji sa jedne strane povećavaju ekspresiju TF i inhibitora aktivatora plazminogena (PAI-1) na endotelu, a sa druge strane smanjuju ekspresiju trombomodulina [11, 12]. Povećana ekspresija prokoagulanasa, sa jedne strane i inhibicija antikoagulacije, sa druge strane, preobražavaju endotel iz normalnog antikoagulantnog stanja u prokoagulantno [11, 12].



Slika 3: Etiopatogeneza koagulopatije u APL

Prezeto iz: Falanga A i saradnici. Pathogenesis and treatment of thrombohemorrhagic diathesis in acute promyelocytic leukemia. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2011;3(1):e2011068.

Legenda: PAI - plazminogen aktivator inhibitor , u-PA- urokinaza, tPA – tkivni aktivator plazminogena, TF - tkivni faktor, KP - kancer prokoagulans, FVIIa – aktivirani faktor sedam, IL-1 β - interleukin-1 β , TNF- α - tumor nekrosis faktor alfa

6. Adhezivni molekuli

Aktivacija endotela putem IL-1 β ili TNF- α dovodi do povećane ekspresije adhezivnih molekula ICAM-1 (intercelularni adhezivni molekul 1) i VCAM-1 (vaskularni ćelijski adhezivni molekul 1), koji predstavljaju receptore za površinske antigene leukemijskih ćelija. Vezivanje leukemijskih ćelija za endotel pokreće koagulacione aktivnosti i formiranje mikrotromba [11, 12].

1.2.5. Klinička slika APL

Najimpresivnija klinička odlika APL je hemoragijski sindrom koji je na prezentaciji prisutan kod 80 – 90% bolesnika [1, 2, 11]. Najčešća su krvarenja u kožu, vidljive sluzokože, menoragije, hematurije ali i vitalno ugrožavajuća krvaranja (npr. gastrointestinalna, plućna i intrakranijalna) [1, 2, 11]. Sa druge strane, neretka inicijalna manifestacija APL su i tromboze, kako arterijske (akutni infarkt miokarda i cerebro-vaskularni insult) tako i venske (duboke venske tromboze, tromboze cerebralnih sinusa i abdominalnih vena) [14, 15].

Bolesnici razvijaju i tegobe karakteristične za akutne leukemije uopšte, kao što su: opšta slabost, malaksalost, lako zamaranje, febrilnost, gubitak apetita i telesne mase, glavobolje, bol u kostima i pojačano znojenje [1, 2].

Zbog veoma visoke smrtnosti tokom dijagnostike i rane faze lečenja, APL predstavlja urgento medicinsko stanje [5].

1.2.6. Dijagnoza APL

1.2.6.1. Krvna slika sa leukocitnom formulom

U krvnoj slici se najčešće uočava pancitopenija (kod 70% pacijenata) [1, 2]. Za razliku od ostalih tipova AML, za APL su tipični leukopenija ili normalan broj leukocita dok je leukocitoza ($> 10 \times 10^9/L$) prisutna kod 30% bolesnika [1, 2]. U leukocitnoj formuli su najčešće prisutni promijelociti i blasti [1, 2].

1.2.6.2. Testovi hemostaze

U rutinskim testovima hemostaze uočavaju se hipofibrinogenemija, produženo PT i aPTT, kao i porast D dimera. Laboratorijske abnormalnosti, uočene u testovima hemostaze bolesnika sa APL-om, opisane su na Slici 4 [11, 12].

Slika 4: Abnormalnosti testova hemostaze u APL

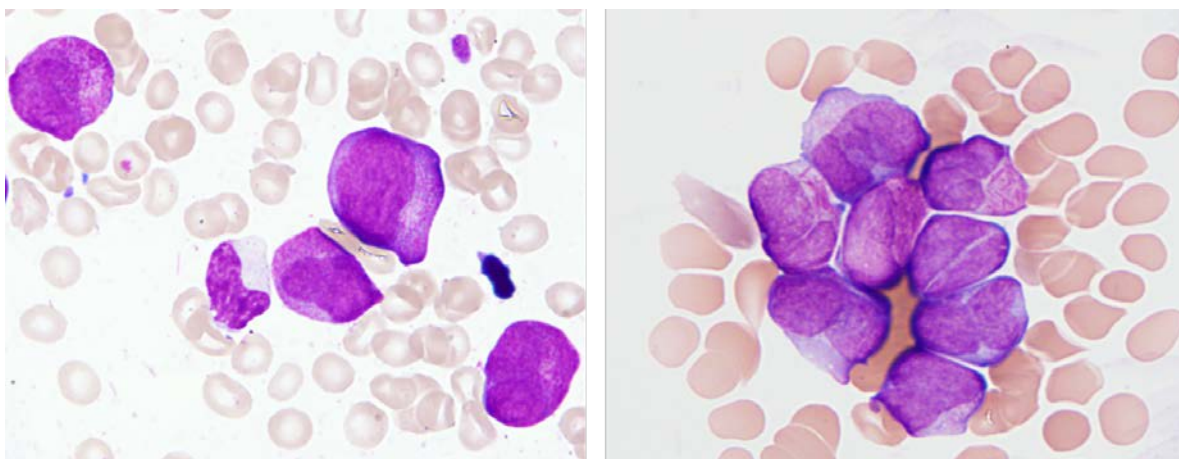
Koagulacija	↑ trombin – antitrombin kompleks ↑ protrombin fragment (F1+2) ↑ Fibrinopeptid
Fibrinoliza	↑ urokinazni aktivator plazminogena ↓ plazminogen ↓ α_2 antiplazmin ↑ D dimer, fibrinogen – fibrin degradacioni produkti (FDP)
Proteoliza	↑ elastaza inhibitor kompleks

Prezeto iz: Falanga A i saradnici. Pathogenesis and treatment of thrombohemorrhagic diathesis in acute promyelocytic leukemia. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2011;3(1):e2011068.

1.2.6.3. Citomorfološke pregled

FAB grupa opisala je klasični hipergranulirani oblik APL još 1976. Sa druge strane, hipogranulirani, mikrogranulirani ili varijantni oblik (M3v), koji čini 20% svih APL, opisan je nekoliko godina kasnije. Osnovno citološko obeležje hipergranuliranog oblika APL su hipergranulirani blasti promijelocitnog izgleda. Veličina jedra je varijabilna dok je njegov oblik iregularan, najčešće bilobaran. Citoplazma je ispunjena gustim, krupnim ružičastim ili crvenim granulama. Pojedine ćelije sadrže nakupine azurofilnih granula (Auerovi štapići). Blasti se intenzivno boje na mijeloperoksidazu (MPO) i Sudan black (SB) - Slika 5a [3].

Sa druge strane, M3v oblik APL se takođe odlikuje bilobarnim jedrom ali vrlo retkim citoplazmatskim granulama. Naime, u ovom obliku APL, granule su submikroskopske veličine pa se ima utisak a/hipogranulirane citoplazme. MPO i SB su takođe intenzivno pozitivni (Slika 5b) [3].



Slika 5 : a) hipergranulirani oblik b) hipogranulirani oblik akutne promijelocitne leukemije

1.2.6.4. *Imnuofenotip APL*

Imunofenotipski profil blasta sa t(15;17) sličan je profilu normalnog promijelocita: niska ekspresija HLA-DR, CD34, leukocitnih integrina CD11a, CD11b i CD18, uz ekspresiju CD33 i CD13. U većini slučajeva registruje se i ekspresija, mada ponekad niska CD117. Sa druge strane, markeri granulocitne diferencijacije CD15 i CD56 su negativni ili slabo pozitivni; CD64 je najčešće eksprimiran [4, 5]. Kod M3v i obliku APLsa bcr3 tipom *PML-RAR α* transkripta najčešće su eksprimirani i CD34 i CD2 [4, 5].

1.2.6.5. *Citogenetska analiza*

Efekat diferencijacione terapije all-trans retinoičnom kiselinom (ATRA) i arsen trioksidom (ATO) se uočava isključivo ukoliko je prisutan *PML-RAR α* fuzioni gen u leukemijskim ćelijama [5]. Stoga, potvrda njegovog prisustva, odnosno citogenetsko testiranje je obavezno kod bolesnika sa sumnjom na APL [5]. Citomorfološka dijagnoza hipergranuliranog tipa APL je visoko prediktivna za *PML-RAR α* pozitivnost, dok imunofenotipizacija mononukleara periferne krvi i/ili koštane srži protočnom citometrijom može povećati pouzdanost citomorfološke dijagnoze, posebno kod bolesnika sa M3v. Ipak, opisani su slučajevi bolesnika sa citomorfološkim i imunofenotipskim odlikama APL u odsustvu *PML-RAR α* rearanžmana [5].

1.2.6.5.1. Klasična citogenetska analiza

Analiza kariotipa tehnikom traka je visoko specifična ali skupa i dugotrajna analiza koja zahteva uzorak sa dobrim metafazama (odsutne kod 20% bolesnika). Nedostatak metode

je i lažna negativnost u slučajevima submikroskopske insercije *RAR α* u *PML* gen. Sa druge strane, metoda je korisna za utvrđivanje kako prisustva retkih i kompleksnih varijantnih translokacija tako i prisustva DCA [5].

1.2.6.5.2. Fulorescentna *in situ* hibridizacija (FISH)

Metoda je visoko senzitivna i specifična a istovremeno je znatno jeftinija od klasične citogenetske analize. Ipak, nedostaci metode su neprepoznavanje kako malih transkripata, tako i transkripata nastalih insercijom. FISH takođe ne pruža informaciju o tipu izoforme *PML-RAR α* koja je neophodna za molekularno praćenje minimalne rezidualne bolesti (MRB) [5].

1.2.6.5.3. RT-PCR (reverse transcriptase polymerase chain reaction)

RT-PCR je zlatni standard dijagnostike APL [5]. Osim što je visoko senzitivna i specifična, neophodna je za definisanje tačke preloma u *PML* genu (izoforme *PML-RAR α*), koja omogućava praćenje MRB. Međutim, u slučajevima lošeg prinosa ribonukleinske kiseline (RNK), RT-PCR test može biti lažno negativan. Sa druge strane, kontaminacija uzorka može dovesti do lažne pozitivnosti. Nedostatak testa je i relativno dugo vreme testiranja (oko dva dana). Takođe, preporučuje se testiranje u referentnoj laboratoriji sa obučanim osobljem [5].

1.2.6.5.4. Anti-PML monoklonska antitela

Ovaj visoko specifičan test koristan je za brzu potvrdu dijagnoze (dužina izvođenja oko dva sata). Test je pozitivan i u onim retkim slučajevima sa atipičnim mestima prekida, koja mogu biti neprepoznata standardnim RT-PCR-om. Danas se koristi u manjim centrima u kojima nisu dostupne druge molekularne dijagnostičke procedure [5].

Sve navedene citogenetske analize su podjednako specifične ali se razlikuju po stepenu pouzdanosti. Pri tom, klasična citogenetska analiza je najmanje pouzdana. Sa druge strane, FISH i anti-PML monoklonska antitela su u pogledu brzine, specifičnosti i senzitivnosti visoko pouzdane za postavljanje dijagnoze APL [5]. Međutim, ove tehnike ne mogu zameniti RT-PCR, pre svega zbog njegove nezaobilazne uloge u praćenju MRB [5].

1.2.7. Lečenje

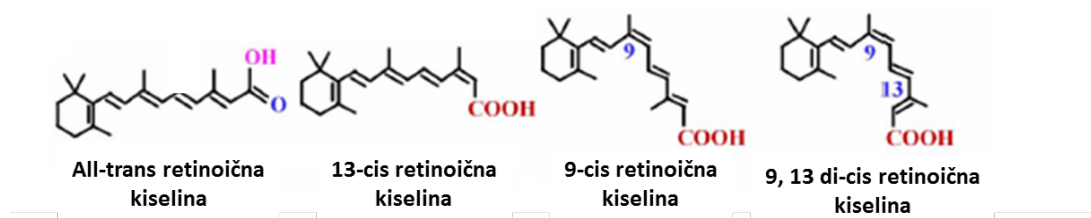
Tokom šezdesetih godina prošlog veka, APL se u terapijskom smislu nije izdvajala od ostalih AML. Naime, bolest je lečena primenom hemioterapije (HT), uz posledično pogoršanje stepena koagulopatije i uz veoma visoku indukcionu smrtnost koja se kretala oko 50% [8, 16]. Tokom 1973. godine, Bernar i saradnici su pokazali da leukemijski promijelociti ispoljavaju visoku senzitivnost na antraciklinske citostatike [17]. Naime, primenom monoterapije Daunorubicinom, ostvaren je porast procenta kompletnih remisija (KR), sa 13% na 57% [17]. Rukovođene navedenim izvanrednim rezultatom, španska, italijanska i francuska kooperativna grupa za APL nastavile su indukciono lečenje APL monoterapijom antraciklinima, dok je u SAD terapijski pristup ostao nepromenjen (citarabin i antraciklini) [8, 16]. Dalje poboljšanje rezultata indukcionog lečenja ostvareno je tokom 80-tih godina prošlog veka, napretkom transfuzioloških procedura i većom dostupnošću suportivne terapije sveže zamrznutom plazmom (SZP) i trombocitima [8, 16]. Uprkos napretku, indukciona smrtnost je i dalje bila visoka (20 – 25%), prosečno trajanje remisije iznosilo je 11 - 25 meseci, a petogodišnji period do progresije bolesti (DFS) se kretao oko 35-45% [8, 16]. Otkriće all-trans retinoične kiseline (ATRA) 1985. godine, otvorilo je novo poglavlje u lečenju APL.

1.2.7.1. Otkriće ATRA-e

Tokom kasnih 70-tih i početkom 80-tih godina prošlog veka, više agenasa (butirati, dimetil-sulfoksid, retinoična kiselina-RA), pokazalo je sposobnost da diferencijuje *in vitro* HL-60 leukemijsku ćelijsku liniju i maligne promijelocite [8, 16]. Nedugo zatim, pojavilo se nekoliko saopštenja u kojima su opisani pojedinačni slučajevi kliničke efikasnosti 13-cis RA u terapiji APL (Slika 6) [8, 18-20]. Ispitivanja Wanga i saradnika, u Šangaju, su započela sa ATRA-om kao oblikom RA koji im je bio dostupan (Slika 6) [8].

Ispitivanja su pokazala da ATRA dovodi do terminalne diferencijacije promijelocita u leukemijskoj ćelijskoj liniji HL-60 *in vitro* i svežih promijelocita (Slika 7) [8, 16]. Prvi pacijent sa APL, lečen monoterapijom ATRA-om, bila je petogodišnja devojčica čija je APL ispoljila rezistenciju na HT. Lečenje je započeto 1985. godine, primenom ATRA-e u dozi od 45 mg/m², u toku godinu dana. Posle četiri nedelje od početka lečenja, registrovana je KR koja traje neprekidno, do danas [8]. Potom su 1988. godine publikovani rezultati lečenja 24 bolesnika sa APL (16 novodijagnostikovanih i 8 refraktarnih) monoterapijom ATRA-om. KR je postignuta u 23/24 slučajeva, dok je jedan bolesnik postigao KR tek posle dodavanja malih

doza citarabina [21]. Naredne studije su pokazale značajno produženje kako jednogodišnjeg perioda do događaja (EFS, 79% u odnosu na 50%) tako i petogodišnjeg DFS, (69% i 29%) kod bolesnika lečenih kombinacijom ATRA-e i HT u odnosu na bolesnike lečene samo HT [22-25].

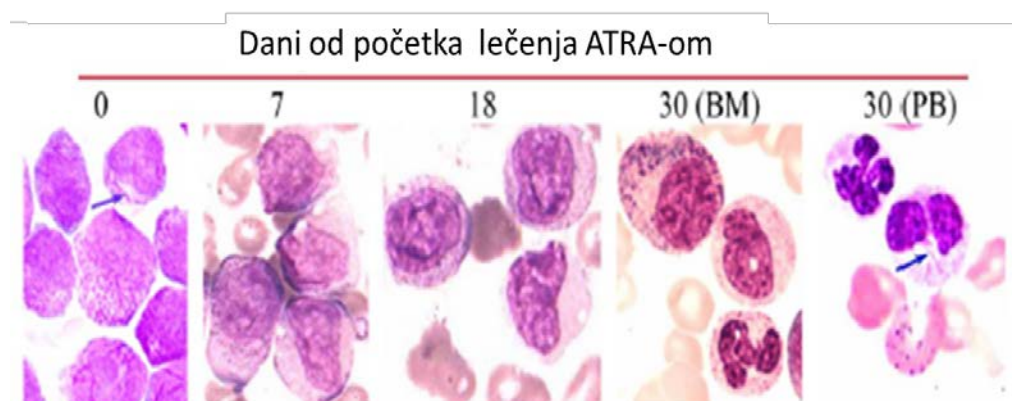


Slika 6: Oblici retinoične kiseline korišćeni u lečenju APL

Preuzeto iz: Wang Z i saradnici. *Acute promyelocytic leukemia: from highly fatal to highly curable. Blood 2008;111:2505-15.*

1.2.7.2. Mehanizam dejstva ATRA-e

ATRA, u farmakološkim dozama (10^{-6} - 10^{-7} M), izaziva konfiguracione promene u *PML-RAR α* genu koje rezultiraju odvajanjem korepresora od receptora, otvaranjem hromatinske strukture i prevazilaženjem transkripcione blokade. ATRA takođe indukuje degradaciju *PML-RAR α* , posredovanu kaspazama i sistemom ubikvitin/proteazoma [8].



Slika 7: Diferencijacija malignih promijelocita u toku terapije ATRA-om

Preuzeto iz: Wang Z i saradnici. *Acute promyelocytic leukemia: from highly fatal to highly curable. Blood 2008;111:2505-15.*

Legenda: BM – koštana srž, PB – periferna krv

In vitro i *in vivo* studije Warrella i sar. pokazale su da ATRA, u farmakološkim dozama, indukuje morfološku maturaciju leukemijskih promijelocita [8, 23]. Proces diferencijacije u APL se karakteriše pojavom ćelija na prelaznim stadijumima sazrevanja koje ekspimiraju zrele i nezrele površinske antigene – Slika 7 [8, 23].

1.2.7.3. *Diferencijacioni sindrom*

Diferencijacioni sindrom (DS), prethodno nazivan ATRA sindromom, predstavlja komplikaciju indukcionog lečenja bolesnika sa APL primenom ATRA-e ili ATO [1, 5, 26]. Sindrom se odlikuje nastankom febrilnosti, porastom telesne mase, pojavom dispnee sa plućnim infiltratima kao i perifernih edema, pleuro-perikardnih efuzija, hipotenzije i akutne bubrežne insuficiencije (ABI) [1, 5, 26].

Etiologija sindroma još uvek nije potpuno razjašnjena. Pretpostavlja se da terapija ATRA-om i/ili ATO-om aktivira kaskadu patofizioloških mehanizama koji prouzrokuju sindrom sistemskog inflamatornog odgovora (SIRS - systemic inflammatory response syndrome) [26]. U osnovi je difuzno oštećenje endotela sa posledičnom povećanom kapilarnom propustljivošću, okluzijom mikrocirkulacije i tkivnom infiltracijom. SIRS je posredovan IL-1, IL-1b, IL-6, IL-8 i TNF, katepsinima i serinskim proteazama koje sekretuju mijeloidne ćelije u toku diferencijacije. Sa druge strane, ATRA povećava adhezivnost APL ćelija, promovišući agregaciju promijelocita i leukocita u malim krvnim sudovima, sa posledičnom vaskularnom okluzijom i migracijom leukocita u tkiva [1, 5, 26].

Učestalost DS u APL se kreće od 2 do 27% [1, 5, 26-29]. Velika varijabilnost u saopštavanoj učestalosti DS je verovatno posledica korišćenja različitih dijagnostičkih kriterijuma za DS [5, 26]. Danas se najčešće koriste kriterijumi DS koje je predložio Frankil sa saradnicima: dispnea, febrilnost nejasne etiologije, porast telesne mase veći od 5 kg, hipotenzija nejasne etiologije, ABI, infiltrati na radiografiji pluća i pleuroperikardni izlivi [30]. Pri tom, španska kooperativna grupa za APL (PETHEMA) gradira DF na "težak" i "umeren". Pacijenti sa teškim oblikom DS ispoljavaju ≥ 4 kriterijuma za DS, mada je dovoljno prisustvo samo jednog simptoma ili znaka koji životno ugrožava pacijenta [26].

DS se isključivo razvija tokom indukcije, sa najvećom učestalošću tokom prve i treće nedelje lečenja i opsegom nastanka od 2. do 46. dana [26, 28]. Rani DS, koji nastaje tokom prvih nedelju dana od početka lečenja, je često "težak" i manifestuje se plućnim infiltratima i zadržavanjem tečnosti u organizmu [26, 28]. Kasno nastali DS je obično "umerenog" intenziteta i najčešće se manifestuje hipotenzijom, febrilnošću, perikardnim izlivom i

razvojem ABI. Uočena je i veća učestalost koagulopatije, krvarenja i hemoragijske smrti ali i tromboza u grupi bolesnika sa "teškim" oblikom DS. Istovremeno, bolesnici u toku "teškog" DS imaju veće potrebe za transfuzijama trombocita u poređenju sa pacijentima bez ove komplikacije [26, 28].

Mortalitet u DS je, zahvaljujući pravovremenom prepoznavanju i lečenju, smanjen sa 30% na 1%, koliko trenutno saopštavaju velike kooperativne studijske grupe za APL [5, 26-28]. Hitna preemtivna primena deksametazona u dozi od 2 x10 mg intravenski (IV), se preporučuje pri nastanku prvih znakova i simptoma DS, čak iako sa sigurnošću nisu isključene druge diferencijalno dijagnostičke mogućnosti (bakterijemija, invazivna gljivična infekcija pluća, sepsa, srčana insuficijencija) [5, 26]. Prekid terapije ATRA-om se preporučuje samo u slučaju razvoja teškog oblika DS, odnosno ako simptomatologija progredira uprkos primeni deksametazona. Lečenje treba nastaviti do potpunog povlačenja simptoma i znakova DS a potom nastaviti ATRA-u ili ATO [5, 26].

Dok je preemtivna primena deksametazona postala standard u lečenju DS, uloga profilaktičke primene kortikosteroida je i dalje kontraverzna. Naime, PETHEMA grupa je pokazala da profilaktička primena kortikosteroida smanjuje učestalost teškog oblika DS ali ne i mortalitet u sklopu DS [5, 26, 27]. U vezi sa ovim, u najnovijem optimizacionom protokolu španske kooperativne grupe (PETHEMA 2012), profilaksa DS primenom deksametazona, u dozi od 2.5 mg/m²/12h IV, rezervisana je samo za bolesnike sa visokim rizikom za nastanak teškog oblika DS, odnosno pacijente sa inicijalnim brojem leukocita > 5x10⁹/L i vrednošću kreatinina u serumu > 123.76 μmol/L [31]. Sa druge strane, Evropska radna grupa za leukemije (ELN), preporučuje profilaktičku terapiju kortikosteroidima kod bolesnika sa inicijalnim brojem Le > 5x10⁹/L koji su bez posebnog rizika za razvoj infekcije [5]. Dijagnostički kriterijumi, profilaksa i lečenje DS prikazani su u prilogu 1.

1.2.7.4. *Optimizacija protokola za lečenje APL, zasnovanih na primeni ATRA-e*

Primenom ATRA-e, u vidu monoterapije, postizala se se stopa KR od 85%. Međutim, ubrzo bi se uspostavila rezistencija, sa posledičnim relapsom bolesti, najčešće posle 3 - 6 meseci lečenja. Monoterapija ATRA-om je često bila praćena leukocitozom i nastankom fatalnog DS [8, 16].

Tokom ranih 90-tih godina prošlog veka sprovedena je studija na 544 kineska bolesnika sa APL, koja je nedvojbeno pokazala dobit kombinovanja ATRA-e i HT [23],

što je podstaklo studijske grupe za APL širom sveta da preuzmu ovaj dizajn lečenja, sa ciljem da se odgovori na sledeća pitanja:

- 1) Da li se kombinovanjem ATRA-e i HT u indukciji postiže bolje ukupno preživljavanje (OS), smanjenje učestalosti rane smrti (RS) i relapsa bolesti (RB)?
- 2) Kako treba da izgleda postindukciona terapija i koliko dugo je treba primenjivati?
- 3) Koji su markeri za praćenje efikasnosti terapije u APL?

Studije koje su poredile efekte mono-HT i kombinaciju "ATRA + HT", u indukcionom lečenju, pokazale su da ne postoji razlika u pogledu učestalosti KR i RS između dve grupe lečenih. Međutim, pacijenti lečeni kombinovanom terapijom su imali značajno nižu stopu relapsa, manju učestalost DS i bolji OS [8, 16, 22, 23, 25, 32-34]. Na osnovu navedenih rezultata, istovremena primena ATRA sa HT je postala zlatni standard indukcionog lečenja APL. Pri tome, nastala su dva pristupa u sprovođenju zlatnog standarda: kombinacija ATRA-e i antraciklina i kombinacija ATRA i klasične antileukemijske terapije. Naime, italijanska (GIMEMA) i španska (PETHEMA) studijska grupa za APL su, u indukciji, uz ATR-u, primenjivale idarubicin, dok je francusko-belgijsko-švajcarska grupa koristila Daunorubicin [5, 25, 34]. U SAD i Velikoj Britaniji je, kao standard lečenja u indukciji, primenjivana kombinacija ATRA sa antraciklinima i citarabinom [5, 35, 36]. Naime, do sada nisu sprovedene randomizovane studije sa ciljem da se utvrde razlike u pogledu efikasnosti i toksičnosti primene Idarubicina i Daunorubicina u indukciji. Sa druge strane, rezultati jedine, do sada sprovedene, randomizovane studije nisu pokazali razlike u pogledu KR, stope relapsa i OS posle monoterapije antraciklinima, sa jedne strane i njihove kombinacije sa citarabinom u indukciji, sa druge strane [5]. Tabela 3 pokazuje različite indukcione kombinacije koje se danas primenjuju u lečenju APL.

U pogledu konsolidacione terapije postoji konsenzus o neophodnosti primene dva do tri konsolidaciona ciklusa HT, bazirana na antraciklinima, čime se postiže stepen molekularne remisije do 95% [5]. Međutim, oko intenziteta i sastava konsolidacije stavovi do danas nisu usaglašeni (Tabela 3).

Retrospektivna studija SWOG (South West Oncology Group) je pokazala da primena visokih doza citarabina, tokom konsolidacije, povećava toksičnost i smrtnost bez smanjenja stope relapsa [1, 34, 35]. Veća učestalost smrti u KR, kod bolesnika lečenih citarabinom u konsolidaciji, uočena je i u MRC14 studiji [1, 22, 35]. Uzimajući u obzir ova saznanja, studijske grupe GIMEMA i PETHEMA modifikovale su originalni AIDA protokol

(isključivanje citarabina, etopozida i tioguanina iz programa konsolidacije), čime je redukovana toksičnost terapije [5, 22, 24, 25] – Prilog 2. Međutim, nedavno publikovani rezultati randomizavane studije Evropske grupe za APL pokazali su povećan rizik od nastanka relapsa ukoliko je citarabin izostavljen kako iz indukcionog, tako i iz konsolidacionih ciklusa [38]. Korist od dodavanja ATR-e u konsolidacionom lečenju bolesnika još uvek nije potvrđena u randomizovanim studijama, mada su rezultati studijskih grupa PETHEMA i GIMEMA pokazali smanjenje stope relapsa i poboljšanje preživljavanja onih bolesnika koji su tokom konsolidacije primali ATR-u [39, 40].

PETHEMA studijska grupa je ukazala na prognostički značaj broja leukocita i trombocita za nastanak relapsa, dizajnirajući skor (Sanzov skor) za procenu verovatnoće relapsa. Nizak rizik imali su bolesnici sa brojem leukocita $< 10 \times 10^9/L$ i brojem trombocita $> 40 \times 10^9/L$; umeren rizik sa leukocitima $< 10 \times 10^9/L$ i trombocitima $< 40 \times 10^9/L$ i visok rizik ukoliko su leukociti $> 10 \times 10^9/L$ [40]. Ostale kooperativne studijske grupe za APL visokorizičnim smatraju bolesnike sa hiperleukocitozom, pri čemu se kao granični broj najčešće uzima vrednost leukocita od $10 \times 10^9/L$ [41]. Stratifikacija bolesnika prema riziku omogućila je intenzifikaciju lečenja u grupi bolesnika visokog rizika, kao i redukciju doze HT u grupi niskog rizika (protokoli PETHEMA LPA 99 i 2005 – Prilog 3 i 4) [34, 42]. Navedenim pristupom, dužina neutropenije i dužina hospitalizacije bolesnika, svrstanih u nisku i umerenu grupu rizika, skraćeni su, dok je istovremeno očuvan antileukemijski efekat [42]. Sa druge strane, u grupi pacijenata visokog rizika, trogodišnja učestalost relapsa je smanjena sa 26% (LPA 99) na 11% (LPA 2005) [42]. Savremeni stav je da se za konsolidaciono lečenje visokorizičnih bolesnika ($Le > 10 \times 10^9/L$) koristi citarabin [42].

Najnoviji otpimizacioni PETHEMA protokol iz 2012. godine otišao je korak dalje u stratifikaciji bolesnika prema riziku (Prilog 5). Naime, usled visoke prediktivne vrednosti ekspresije CD56 na leukemijskim promijelocitima u APL, za nastanak RB, modifikuje se lečenje u odnosu na CD56 pozitivnost. Naime, CD56+ bolesnici niskog rizika leče se kao bolesnici umerenog stepena rizika, dok se CD56+ bolesnici umerenog rizika leče kao visokorizični [31]. Modulacija lečenja u protokolu PETHEMA 2012, izvršena je takođe i prema životnoj dobi bolesnika. Bolesnici stariji od 60 godina češće razvijaju komplikacije u vezi sa HT, te se bez obzira na vrednost Sanzovog skora, leče se kao bolesnici niskog rizika [31].

Tabela 3: Dizajn i terapijska efikasnost protokola APL kooperativnih studijskih grupa

Grupa	Le	Indukcija	Konsolidacija				Th održ	Ishod (86%)
			1	2	3	4		
GIMEMA	≤ 10	ATRA + IDA	ATRA + IDA	ATRA + MTZ	ATRA + IDA		ATRA + MP + MTX (2 god)	6g DFS: 86 6g KIR: 11
	> 10		ATRA + IDA + Ara-C	ATRA + IDA + VP16	ATRA + IDA + Ara-C + TG			6g DFS: 84 6g KIR: 9
French Belgan Swtss	≤ 10	ATRA+DNR + Ara-c	DNR + Ara-C	DNR + ID Ara - C			ATRA + MP + MTX (2 god)	2g EFS: 93 2g KIR: 5
		randomizacija						2g EFS: 77 2g KIR: 16
	> 10	ATRA+DNR + Ara-c	DNR + Ara-C	DNR + HD Ara - C				2g EFS: 89 2g KIR: 3
PETHEMA/ HOVON	≤ 10 Tr > 40	ATRA + IDA	ATRA + IDA	ATRA + MTZ	ATRA + IDA		ATRA + MP + MTX (2 god)	3g DFS: 93 3g KIR: 6
	≤ 10 Tr < 40		ATRA + IDA↑	ATRA + MTZ	ATRA + IDA↑			3g DFS: 94 3g KIR: 6
	> 10		ATRA + IDA+ Ara-C	ATRA + MTZ	ATRA + IDA+ Ara-C			3g DFS: 82 2g KIR: 11
Medical Research Council	Bez podele	ATRA+DNR + Ara-c + VP16	ATRA+DNR + Ara-c + VP16	Amsacrin + Ara-C + VP16 +/- GO	MTZ+ ID Ara-C		ATRA + MP + MTX (2 god)	4g OS: 81
		randomizacija						4g OS: 85
North American Group	Bez podele	ATRA+DNR +Ara-C	ATRA + ATO	ATRA + ATO	ATRA+DNR	ATRA+ DNR	ATRA (1 god)	3g EFS: 77 3g OS: 85
			randomizacija					
					ATRA+DNR	ATRA+ DNR	ATRA + MP + MTX (1god)	

Legenda: Le – leukociti, Tr – trombociti, ATRA - all trans retinoična kisleina, IDA – idarubicin, DNR – daunorubicin, Ara-C – cytarabin, MTZ - mitoksantron, VP -16 – etopozid, TG – tioguanin, MP – 6-merkatopurin, MTX – metotreksat, ID – intermedijarne doze, HD – visoke doze, GO - gentuzumab ozogomicin, DFS – period do relapse, EFS – period do događaja, OS – ukupno preživljavanje.

Rezultati PETHEMA 96 i randomizovane studije američke kooperativne grupe za APL, pokazale su smanjenje stope relapsa u grupama bolesnika lečenih terapijom održavanja, zasnovane na ATR-i [22, 43]. Međutim, ove studije nisu kontrolisale status MRB prilikom ulaska bolesnika u studijsku granu sa terapijom održavanja, usled čega smanjenje stope relapsa može biti rezultat primene terapije održavanja kod onih bolesnika koji nisu postigli molekularnu remisiju na kraju konsolidacije [22, 43]. Sa druge strane, novije GIMEMA i JALSG (Japan Adult Leukemia Study Group) studije, u koje su bili uključeni samo bolesnici koji su po završetku konsolidacije postigli molekularnu remisiju, nisu uočile dobrobit od primene terapije održavanja [22, 43, 45].

1.2.7.5. *Lečenje koagulopatije u APL*

Sušтина strategije lečenja koagulopatije u APL podrazumeva ranu primenu ATR-e, sa ciljem normalizacije kogulacionih testova i zaustavljanja krvarenja [5, 46, 47]. Sa druge strane, primena HT u prvim danima lečenja produbljuje stepen koagulopatije zbog čega je transfuziološka podrška od izuzetnog značaja u ovoj fazi lečenja [5, 12].

1.2.7.5.1. Suportivna transfuziološka terapija

Profilaktička primena transfuzija trombocita značajno je smanjila učestalost krvarenja i ranu smrtnost u APL [5]. U prvim danima indukcionog lečenja, dok je prisutna koagulopatija, broj trombocita treba održavati $> 50 \times 10^9/L$. Sa druge strane, po prestanku koagulopatije, preporučuje se održavanje broja trombocita $> 20 \times 10^9/L$ [5, 34, 42, 44]. Prema novom PETHEMA LPA 2012 protokolu, primena SZP preporučuje se ukoliko je $PT < 60\%$, odnosno $iNR > 1.3$, a primena krioprecipitata ukoliko je koncentracija fibrinogena $< 1g/L$ – Prilog 1 [31].

1.2.7.5.2. Heparin i antifibrinolitici

Svrha primene heparina u toku indukcionog lečenja AL sa koagulopatijom, posebno APL, bila je pokušaj inhibicije stvaranja fibrina, uz smanjenje potrošnje trombocita i faktora koagulacije [12]. Naglašena fibrinolizna i proteolitička aktivnost u APL dovele su do uključivanja antifibrinolitika u terapijske protokole [12, 36]. Međutim, velike randomizovane kliničke studije nisu pokazale korist od primene antikoagulantne i antifibrinolitičke terapije [12, 34]. U vezi sa ovim, primena heparina i antifibrinolitika se, u ovom trenutku, ne preporučuje u rutinskom lečenju APL [5, 31, 43].

1.2.7.5.3. All-trans retinoična kislina (ATRA)

Najveći broj studija potvrdio je normalizaciju koagulacionog i fibrinoliznog sistema, uz redukciju stepena krvarenja, tokom prvih 7-14 dana primene ATR-e [11, 12, 47]. Smatra se

da ovakav pozitivni efekat ATRE na hemostazu nastaje putem smanjene sinteze prokoagulanasa (TF i kancer prokoagulanasa) i profibrinolitika (Aneksin II) sa jedne strane, kao i povećanjem ekspresije trombomodulina, sa druge strane [12, 47]. Neke studije su, takođe, pokazale da primena retinoida indukuje brz porast koncentracije urokinaznog aktivatora plazminogena, koja posle 24h biva prevaziđena povećanom produkcijom PAI-a [12]. Sa druge strane, ATRA može delovati i trombogeno, stimulacijom ekspresije adhezivnih molekula na endotelu, sa jedne strane i sintezom proinflamatornih citokina (IL1, IL3), sa druge [11, 12].

1.2.7.6. **Moderan terapijski pristup**

Moderan terapijski pristup u lečenju APL podrazumeva tri hitne i simultane procedure u slučaju sumnje na APL: početak terapije ATR-om, primenu suportivne transfuzione terapije i brzu genetsku potvrdu bolesti [5, 48]. Zlatni standard indukcionog lečenja u današnje vreme je primena ATR-e u kombinaciji sa antraciklinom. Takođe postoji konsenzus o potrebi primene dva do tri konsolidaciona ciklusa HT [5, 48]. Pritom, većina studijskih grupa primenjuje citarabin kod visokorizičnih bolesnika [5, 48].

1.2.7.7. **Monitoring *PML-RAR α* putem PCR**

Procena molekularne remisije u koštanoj srži pacijenta sa APL, posle trećeg konsolidacionog ciklusa, je od suštinskog značaja za dalje lečenje [5]. Ukoliko je kod pacijenta zaostala MRB u koštanoj srži, radi se o molekularnoj rezistenciji. Sa druge strane, ukoliko je pacijent u MR, nastavlja se terapija održavanja, uz procenu MRB svaka tri meseca metodom PCR, tokom dve do tri godine posle završetka poslednje kure konsolidacije [5]. U slučaju detektovanja PCR pozitivnosti, neophodno je analizu, posle dve do četiri nedelje, ponoviti u lokalnoj laboratoriji ili poslati uzorak na validaciju u drugu referentnu laboratoriju [5]. Dva uzastopno *PML-RAR α* pozitivna uzorka se smatraju sigurnim znakom molekularnog relapsa bolesti [5]. Rana dijagnostika relapsa u molekularnoj fazi, pre razvoja jasnog hematološkog relapsa praćenog koagulopatijom, smanjuje učestalosti RS tokom indukcionog lečenja relapsa [5]. Međutim, uloga monitoringa MRB u APL je polje žive debate [49]. Naime, imajući u vidu veoma nisku stop relapsa kod bolesnika sa APL niskog ili srednjeg stepena rizika, koji su postigli kompletnu remisiju, redovni PCR monitoring je od minimalne koristi. Sa druge strane, PCR monitoring je koristan kod bolesnika sa visokim rizikom od nastanka relapsa [5, 49]. Rešenje navedenih dilema zahteva sprovođenje velikih kliničkih studija ali i individualizaciju terapijskog pristupa.

1.2.7.8. ATO u terapiji APL

Jedinjenja arsenika se koriste u terapijske svrhe više od 2000 godina [8, 16]. Ipak, razvojem manje toksičnih a istovremeno efikasnijih hemio i radioterapijskih metoda, zapadna medicina napustila je ovaj lek. Njegova upotreba nastavljena je u Kini, u terapiji različitih vrsta kancera [8, 16]. Sun i saradnici su 1994. publikovali rezultate monoterapije ATO kod 32 bolesnika sa APL. KR je postignuta u 65% bolesnika, dok je desetogodišnje preživljavanje iznosilo 30% [50]. Dve godine kasnije, publikovani su rezultati lečenja 72 bolesnika, 30 novodijagnostikovana i 42 bolesnika sa relapsom, sa 73% i 50% postignutih KR [51]. Više studija sprovedenih u SAD, Evropi, Indiji i Iranu potvrdilo je efikasnost ATO u relapsu [5, 52, 53]. Danas se ATO smatra zlatnim standardom terapije relapsa APL. Rezultati lečenja bolesnika u relapsu, ali i iskustva Irana i Indije, u kojima se lek iz ekonomskih razloga koristi kao prva terapijska linija, iniciralo je dizajniranje studija sa ATO u prvoj terapijskoj liniji [52-54]. Tako je američka kooperativna grupa za APL pokazala poboljšanje EFS i OS kod bolesnika koji su, posle standardne indukcije a pre nastavka konsolidacija ("ATRA+HT"), primili dva ciklusa ATO, u odnosu na bolesnike lečene standardnim protokolima [55].

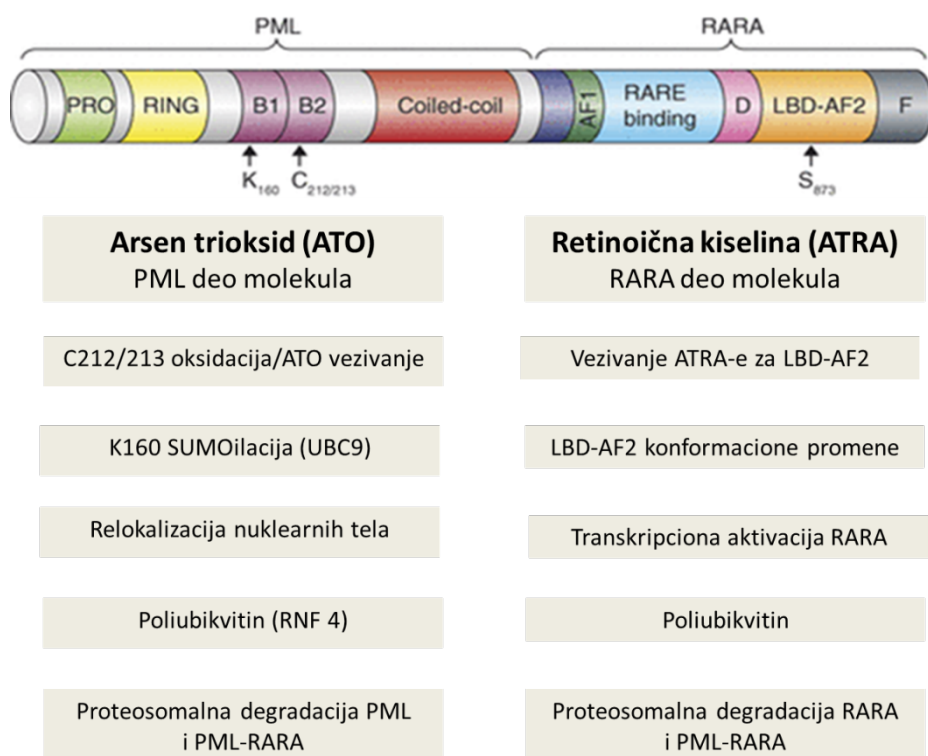
Druga, sve češće ipitivana, mogućnost je primena indukcionog režima bez HT, baziranog na kombinaciji ATR-e i ATO [5]. Naime, izostavljanjem HT bi se smanjile rana i kasna toksičnost sa jedne strane a učestalost komplikacija nastalih usled neutropenije i sekundarnih maligniteta, sa druge strane [5]. Međutim, ne treba zanemariti dosada nedovoljno ispitivanu dugoročnu toksičnost ATO, kao i eventualno smanjenje antileukemijskog efekata, nastalog izostavljanjem HT [5]. Italijansko-Nemačka (GIMEMA-SAL-ALSG) grupa za APL publikovala je 2013. godine rezultate svoje APL406 studije u kojoj je poređena grana indukcionog lečenja bez hemioterapije (ATRA+ATO), sa klasičnom "ATRA+HT" indukcijom (AIDA protokol) kod pacijenata sa *de novo* APL niskog i srednjeg stepena rizika. Bolesnici ni u konsolidaciji nisu primali HT. KR je postignuta u 100% bolesnika, lečenih kombinacijom "ATRA+ATO" i 95% bolesnika lečenih primenom "ATRA+HT", DFR su iznosili 97% i 86%, uz značajno bolje ukupno preživljavanje (P=0.02). Istovremeno, grupa lečena kombinacijom "ATO+ATRA" je ispoljila manju učestalost hematološke toksičnosti i infekcija uz veću učestalost hepatotoksičnosti [56]. Međutim, budući da su prethodna ispitivanja pokazala loše rezultate ATO u terapiji bolesnika visokog rizika u studiju su uključeni samo bolesnici niskog i umerenog rizika [5, 56].

1.2.7.8.1. Mehanizam dejstva ATO

ATO ispoljava dozno zavisni efekat na leukemijske ćelije u APL. Naime, u visokim koncentracijama indukuje apoptozu, dok u nižim promovise diferentovanje leukemijskih promielocita [57]. Ispitivanja su pokazala da ATO indukuje degradaciju *PML-RAR α* i *PML* transkripta [57].

Mehanizam proapoptotskog delovanja ATO uključuje veliki broj gena: histon H3 fosfoacetilaciju na CASPASE-10, JNK signalnog puta, GSTP1-1, ushodnu regulaciju gena odgovornih za reaktivni oksidativni stres, intracelalarnu reparaciju DNK posle oksidativnog stresa, supresiju gena reverzne telomeraza transkriptaze (hTERT), C17, c-Myc gena, represiju NFkB aktivacije i nishodnu regulaciju WT1 gena [57]. Nedavno je i put koji se sastoji od ATR, PML, Chk2 i označen kao ključan za apoptozu indukovanu arsenikom [57].

U kliničkoj praksi uočen je sinergizam ATRA-e i ATO, koji je u potpunosti objašnjen i na molekularnom nivou [57]. Naime, ATO se vezuje za PML deo *PML-RAR α* gena, dok se ATRA vezuje za njegov RAR α deo. Odnosno, destrukcija *PML-RAR α* , uzrokovana ATRA-om i ATO-om, je u biohemijskom pogledu potpuno nezavisan proces (Slika 8) [57].



Slika 8: Mehanizmi degradacije *PML-RARA* posredovani ATRA-om i ATO-om

Preuzeto iz: Santos GA i saradnici. Synergy against *PML-RAR α* : targeting transcription, proteolysis, differentiation, and self-renewal in acute promyelocytic leukemia. *JEM* 2013;13:2792-2802

1.2.7.9. Lečenje APL u posebnim slučajevima

1.2.7.9.1. Bolesnici starije životne dobi

Za razliku od drugih tipova AML, APL je retka u starijoj životnoj dobi. Pri tom, stariji bolesnici podjednako dobro reaguju na terapiju kao mlađi i imaju povoljniju prognozu [5, 61, 61]. Međutim, bolesnici starije životne dobi češće razvijaju komplikacije posle HT i posledično imaju veću indukcionu i konsolidacionu smrtnost [5, 61]. Na primer, u PETHEMA protokolima, mortalitet u kompletnoj remisiji se kreće od 1% za bolesnike mlađe od 60 godina do 19% za starije od 70 godina [5, 61]. Stoga je razumljiv trend smanjenja intenziteta HT u grupi starijih bolesnika [31]. Takođe, za bolesnike koji zbog lošeg opšteg stanja ili komorbiditeta nisu kandidati za konvencionalnu terapiju, kombinacija ATRA+ATO može biti prikladno rešenje [5].

1.2.7.9.2. Bolesnici sa komorbiditetima

Alternativni terapijski pristupi (ATRA, ATO, "ATO+ATRA", gemtuzumab ozogamicin), sa minimalnom primenom HT ili bez nje, mogu se koristiti kod bolesnika sa ozbiljnim komorbiditetima, pre svega kardiovaskularnim [5]. Kao i u slučaju konvencionalne terapije, cilj je postizanje molekularne remisije bolesti, uz praćenje MRB i primenu dopunske terapije u slučaju relapsa. Informacije o dugoročnoj efikasnosti ovakvog terapijskog pristupa, za sada nisu dostupne [5].

1.2.7.9.3. Lečenje APL u trudnoći

Incidenca APL tokom trudnoće nije poznata a najveći deo literaturnih podataka se odnosi na prikaze slučajeva ili male serije. Ipak, opšte pravilo da odlaganje terapije u AML smanjuje šanse za postizanje remisije, posebno je naglašeno u APL [5].

1.2.7.9.3.1. Lečenje APL u prvom trimestru trudnoće

Imajući u vidu teratogeni potencijal HT, ATRA-e i ATO, terapijske opcije za bolesnice sa dijagnostikovanom APL u prvom trimestru su ograničene. Stoga se preporučuje prekid trudnoće posle stabilizacije hemostaze bolesnice primenom ATR-e i HT [5].

1.2.7.9.3.2. Lečenje APL u drugom i trećem trimestru trudnoće

Iako su klinička iskustva ograničena, smatra se da je standardna terapija "ATRA+HT" bezbedna u drugom i trećem trimestru trudnoće [5]. S obzirom da je, u tom periodu trudnoće, završena organogeneza, HT ne izaziva kongenitalne malformacije ali povećava rizik od nastanka niza komplikacija kao što su abrupcije placente, zastoj u intrauterinom rastu i razvoju, prevremeni porođaj, mala telesna masa na rođenju i nastanak neonatalne neutropenije i sepse [5]. Takođe se smatra da je primena ATRA-e tokom drugog ili trećeg trimestra trudnoće relativno bezbedna po majku i plod. Međutim, savetuje se redovna

ehokardiografija fetusa s obzirom na literaturne podatke o pojavi aritmije i reverzibilne dilatacione kardiomiopatije u novorođenčadi čije su majke primale kombinaciju ATR-e i idarubicina [5]. U vezi sa tim se preporučuje zamena idarubicina ekvivalentnim dozama doksorubicina [5].

Osnovna dilema prilikom lečenja APL u drugom i trećem trimestru trudnoće je da li odmah primeniti HT ili sačekati porođaj, čime se izbegavaju potencijalna štetna dejstva na plod. Sa druge strane, iako se monoterapijom ATR-om postiže isti stepen KR kao i primenom "ATRA+HT", rizik od nastanka relapsa je veći [5].

1.2.7.9.4. APL nastala posle primene citotoksične terapije

APL, nastala posle primene HT i radioterapije (t-APL), čini 5 -22% svih slučajeva APL [5]. Lekovi čija se primena najčešće dovodi u vezu sa razvojem t-APL su epirubicin i mitoksantron. Karcinom pluća je najučestaliji malignitet čije lečenje indukuje razvoj t-APL, dok su na drugom mestu non Hodgkinovi limfomi. Lečenje nemalighnih bolesti primenom HT kao što je multipla skleroza, kod koje se primenjuje mitoksantron, dovela je do porasta učestalosti t-APL i u ovoj grupi bolesnika [5].

Do sada publikovani podaci ukazuju da t-APL ima dobru prognozu, mada je stopa RS nešto veća u poređenju sa *de novo* APL [5]. Preporuka ELN je da se t-APL leči standardnim protokolima, zasnovanim na kombinaciji "ATRA+ HT" [5]. Kod izvesnog broja bolesnika, primena antraciklina može biti ograničena ili onemogućena usled prethodno primljene maksimalne kumulativne doze antraciklina. U takvoj situaciji "ATO+ATRA" bi mogla biti terapija izbora [5].

1.2.7.9.5. Genetske varijante APL

Preporuke za lečenje varijanti APL zasada ne postoje, pošto su u literaturu prisutni uglavnom prikazi pojedinačnih slučajeva. Međutim, ukoliko se radi o ATRA senzitivnoj varijanti APL (NuMA-RAR α , NPM1-RAR α i FIP1L1-RAR α), preporučuje se lečenje standardnim protokolima zasnovanim na ATRA i antraciklinima. Sa druge strane, bolesnike sa oblicima APL neosetljivim na ATRA-u (STAT5b-RAR α , PLZF-RAR α) treba lečiti kao ostale AML. U pogledu senzitivnosti na ATO, zasada je poznato da PML-RAR α pozitivne APL reaguju na ATO, dok su PLZF-RARA-pozitivne APL rezistentne na ATO [5].

1.2.7.10. Rana smrt

Dugo vremena nije postojao konsenzus oko definicije RS. Naime, neki autori su RS definisali kao smrt koja je nastupila u toku prvih 14 dana od početka lečenja [59]. Sa druge strane, švedska studijska grupa pokazala je da smrt, usled same APL i njenog lečanja, može nastupiti i u četvrtoj nedelji od započinjanja lečenja [60]. U vezi sa ovim se u novijoj literaturi RS definiše kao smrt nastala u prvih 30 dana lečenja [60-64]. Međutim, Lo-Coco je sugerisao da u definiciju RS treba uključiti sve smrtne ishode koji su nastupili od trenutka hospitalizacije do kraja indukcionog lečenja, što može biti i duže od 30 dana [65]. Isti autor je predložio kategorizaciju RS na: 1. smrt nastalu pre definitivno postavljene dijagnoze (neprepoznati, klinički visoko suspektne slučajeve) 2. smrt usled pogrešne dijagnoze i/ili neadekvatne terapije 3. smrt koja je nastupila pre započinjanja terapije i 4. smrt tokom indukcionog lečenja [65].

Posle uvođenja ATR-e u terapiju, APL je od najmalignijeg oblika AL postala oblik bolesti sa odličnom prognozom i stopom izlečenja od 75 – 80% [39, 41, 46]. Međutim, RS je i dalje osnovni uzrok neuspeha terapije. Njena učestalost u velikim kooperativnim studijama se procenjuje na 5 -10% [40, 42]. Sa druge strane, pojedinačni centri iz Brazila i Turske su prijavili znatno veću učestalost RS koja se kreće od 32% odnosno 40.8% [59, 66]. Rezultati populacionih studija i registara iz Švedske, Kanade i SAD su pokazali učestalost RS od 29 %, 21.8% i 17% [60-64]. Najčešći uzrok RS u svim studijama je krvarenje, najčešće intrakranijalne a daleko ređe plućne lokalizacije (Tabela 4). Ostali uzroci RS kao što su DS, infekcije, tromboze bili su znatno ređi [40, 42, 59-67].

U literaturi se u visokom procentu navode istovremeni mutipli uzroci smrti. Tako je u brazilskoj studiji krvarenje uz DS bio uzrok smrti kod 9.3% bolesnika, krvarenje i infekcije kod 4.7%, krvarenje, infekcija i DS kod 7% bolesnika a infekcija i DS kod 1.2% bolesnika [59]. U stanfordskoj i švedskoj grupi je respiratorna insuficijencija navedena kao uzrok smrti kod 15% odnosno 17% bolesnika, bez daljeg razjašnjenja etiologije poremećaja [60-62].

Tabela 4: Učestalost i uzroci rane smrti u APL u različitim studijskim grupama

Studijska grupa	PETHEMA ⁶⁴	Švedska ⁵⁷	Stanford ⁵⁹	Brazil ⁵⁶	Turska ⁶²
Rana smrt (%)	8.7	29	26	32.1	40.8
Krvarenje (%)	57	41	54	60.5	65
Diferencijacioni sindrom (%)	16	3.4	0	9.3 (5
Infekcija (%)	27	10	0	2.3	0
Tromboze (%)	0	3.4	8	0	5
Ostalo (%)	0	45.6	38	28.9	25

1.2.7.10.1. Prognozni faktori rane smrti

Do sada je u brojnim studijama identifikovan veliki broj faktora rizika za nastanak RS (Tabela 5). Međutim, oko značaja većine tih faktora i dalje postoji stručno neslaganje.

1) Starija životna dob

Životna dob, najčešće definisana kao starost preko 60 godina, se u većem broju studija navodi kao prediktivni faktor za nastanak RS [60, 61, 68, 69]. U kliničkim studijama smrtnost u ovoj grupi bolesnika kreće se oko 10 -18%, dok je u populacionim studijama i registrima veća [60-62, 69]. Naime, u američkom registru, smrtnost u grupi bolesnika starijih od 54 godine iznosila je 24% [61]. Nemačka AMLCG grupa saopštila je da učestalost RS u grupi bolesnika starijih od 60 godina iznosi 29%, a švedska studija čak 50% [61, 69]. Pri tom, dok je kod osoba mlađih od 60 godina krvarenje osnovni uzrok RS, najčešći uzrok smrti u starijoj životnoj dobi predstavljaju infekcije [5, 69].

2) Loše opšte funkcionalno stanje

U studiji Lehmana i saradnika, učestalost RS je bila u tesnoj korelaciji sa lošim opštim funkcionalnim stanjem i to u svim starosnim grupama [60]. Naime, u grupi bolesnika sa opštim funkcionalnim stanjem prema SZO, procenjenim kao 1, RS je iznosila 7.1%, dok je RS u grupi sa opštim funkcionalnim stanjem prema SZO, procenjenim ≥ 3 bila 78%. Smrtnost bolesnika u starosnoj grupi od 40–59 godina iznosila čak 70%, ukoliko je opšte funkcionalno stanje prilikom dijagnoze bilo ≥ 3 [60].

3) Broj leukocita

Studije koje su definisale prognozne faktore za nastanak RS, kao nezavisan prognozni parametar ističu visok broj Le, čija apsolutna vrednost varira između studija i kreće se od $2.5 \times 10^9/L$, do $17 \times 10^9/L$ [63, 68, 70].

4) Broj trombocita

Nizak broj trombocita kao prediktivni faktor nastanka RS identifikovale su švedska i koreanska grupa [60, 71].

5) Testovi hemostaze

Različite studije su ukazale na prediktivnu vrednost patoloških vrednosti testova hemostaze za nastanak RS, posebno hemoragijskog tipa. U švedskom i japanskom istraživanju nizak nivo fibrinogena je bio prediktivan faktor pojave RS (60, 72). U veoma detaljnom koreanskom istraživanju, kao prediktivni faktori nastanka hemoragijske smrti indentifikovani su nivo fibrinogena < 1.5 g/L i rezistencija na primenu transfuzija trombocita [71]. Većina studijskih grupa označava koagulopatiju kao faktor rizika za nastanak RS ali bez definisanja skora kojim su procenjeni prisustvo i stepen koagulopatije [67, 68, 72].

6) Biohemijski parametri

Povišen kreatinin i hipoalbuminemija su u španskoj kooperativnoj studiji i švedskoj populacionoj studiji identifikovani kao prognozni parametri za nastanak RS [60, 68]. U koreanskoj studiji, LDH $> 2x$ normale je identifikovan kao nezavisni prognozni parametar RS [71].

7) Varijantni oblik APL

M3v se odlikuje većim inicijalnim brojem leukocita, češćom ekspresijom CD2 i CD34, češće prisutnom *FLT3-ITD* mutacijom, bc3 tipom *PML-RAR α* fuzionog transkripta, većom učestalošću RS i relapsa i lošijim ukupnim preživljavanjem [53]. Dve velika studije koje su obuhvatile bolesnike lečene u okviru I0129 NCI protokola, sa jedne strane i PETHEMA LPA 96 i 99 protokolom, sa druge strane, su analizom 155 pacijenata sa M3v i 748 bolesnika sa hipergranuliranim oblikom bolesti, pokazale da bolesnici sa M3v imaju: prosečno veći broj leukocita ($15.8 \times 10^9/L$ prema $1.8 \times 10^9/L$), veću učestalost bcr3 transkripta (58% prema 35%) i *FLT3-ITD* mutacije (52% prema 17%) i veću stopu RS ($P = 0.02$). Posle korekcije vrednosti u odnosu na broj leukocita, razlika u pogledu učestalosti RS više nije bila statistički značajna [72]. Takođe, distribucija uzroka RS se nije razlikovala kod bolesnika sa M3v i M3 [71].

8) Ekspresija CD56 antigena

CD56 antigen je membranski glikoprotein, koji se eksprimira na ćelijama različitih tipova hematopoeznih neoplazmi, uključujući i AML. PETHEMA studija, spovedena na 651 bolesniku, registrovala je CD56 pozitivnost kod 11% bolesnika [73]. Pri tom, CD56 pozitivnost je bila povezana sa višim brojem leukocita, bcr3 tipom *PML-RAR α* transkripta i ekspresijom CD2, CD34, CD7, HLA-DR, CD15 i CD117 [73]. Učestalost RS u CD56 pozitivnoj grupi pacijenata iznosila je 15% u poređenju sa 8% u CD56 negativnoj grupi. Pri

tom je ovaj parametar zadržao prognozni značaj i u multivarijantnoj analizi [73]. Sa druge strane, ni GIMEMA studija, sprovedena na 114 bolesnika, kao ni studija japanske JALSG grupe, na 239 bolesnika, nisu pokazale korelaciju između CD56 pozitivnosti i nastanka RS [74, 75].

9) Ekspresija CD2

Ekspresija CD2 (adhezivni transmembranski glikoprotein) takođe je udružena sa češćom ekspresijom bcr3 forme *PML-RAR α* fuzionog transkripta, M3v, većom učestalosti RS, kraćim trajanjem remisije i kraćim OS [76]. Ipak, nezavisnost ovog markera nije do sada testirana u većim studijama.

10) Mutacije gena za Fms-like tirozin kinazu 3 (*FLT3*)

FLT3 gen se normalno eksprimira u hematopoeznim progenitorima. Konstitutivna aktivacija *FLT3* gena, usled unutrašnje tandem duplikacije (*ITD*) ili tačkaste mutacije u aktivacionoj petlji, može povećati sposobnost leukemijskih blasta da prežive i proliferišu [77-79]. Stoga, prisustvo *FLT3* mutacije, posebno *ITD*, povezano je sa lošijom prognozom u AML. Učestalost mutacija varira između pojedinih podtipova AML i najveća je u APL [78, 79]. Prisustvo *FLT3-ITD* mutacije uočeno je kod 12 - 39% bolesnika sa APL, dok je *FLT3-D835* mutacija registrovana kod 6 - 22% bolesnika [78,79]. Rezultati nekoliko studija ukazali su na postojanje korelacije između prisustva *FLT3-ITD* mutacije, sa jedne strane i većeg broja leukocita, povišene vrednosti LDH u serumu, većeg Sanzovog skora, prisustva koagulopatije, bcr3 tipa *PML-RAR α* , M3v i ekspresije CD2, sa druge strane [78, 79]. Bolesnici sa *FLT3-ITD* mutacijom u APL imali su znatno veću učestalost RS, u odnosu na bolesnike bez mutacije (16% vs. 7%, P=0.03). Međutim, u multivarijantnoj analizi, *FLT3-ITD* nije zadržao prediktivnu vrednost [78, 79].

Tabela 5: Prediktivni parametri rane smrti - izvod iz literature

Parametar	Vrednost	Autor	Multivarijantna analiza
Životna dob	nedefinisan > 55 godina > 60 godina	Jacomo i sar. ⁵⁹ McClellan i sar. ⁶³ Park i sar. ⁶¹ Lehmann i sar. ⁶⁰ De La Serna i sar. ⁶⁸	nije rađena nije rađena nije rađena nije rađena zadržao značajnost
Opšte funkcionalno stanje	SZO > 3 ECOG ≥ 2	Lehmann i sar. ⁶⁰ De La Serna i sar. ⁶⁸	nije rađena nije zadržao značajnost
Broj leukocita	nedefinisan > 10x10 ⁹ /L > 17x10 ⁹ /L	Lehmann i sar. ⁶⁰ De La Serna i sar. ⁶⁸ McClellan i sar. ⁶³	nije rađena zadržao značajnost nije rađena
Broj trombocita	nedefinisan < 30x10 ⁹ /L	Lehmann i sar. ⁶⁰ Kim i sar. ⁷¹	nije rađena zadržao značajnost
Fibrinogen	nizak < 1.5 g/L	Lehmann i sar. ⁶⁰ Yanada i sar. ⁶² Kim i sar. ⁷¹	nije rađena nije rađena zadržao značajnost
Koagulopatija	prisutna	De la Serna i sar. ⁶⁸ Yanada i sar. ⁶²	zadržao značajnost nije rađena
Kreatinin u serumu	nizak	De la Serna i sar. ⁶⁸ Lehmann i sar. ⁶⁰	zadržao značajnost nije rađena
Albumini u serumu	nizak	De la Serna i sar. ⁶⁸ Lehmann i sar. ⁶⁰	nije zadržao značajnost nije rađena
LDH u serumu	nisok ≥ 2N (normal)	Lehmann i sar. ⁶⁰ Kim i sar. ⁷¹	nije rađena zadržao značajnost
M3v		De la Serna i sar. ⁶⁸	nije zadržao značajnost
CD56	pozitivnost	Montesinos i sar. ⁷¹ Breccia i sar. ⁷² Ono i sar. ⁷³	zadržao značajnost nije zadržao značajnost nije zadržao značajnost
CD2	pozitivnost	Lin i sar. ⁷⁴	nije rađena
FLT3-ITD	pozitivnost	Schnittger i sar. ⁷⁶ Barragan i sar. ⁷⁷	nije zadržao značajnost nije zadržao značajnost

1.2.7.11. Relaps u APL

Primenom protokola, zasnovanih na kombinaciji "ATRA+HT", koji su tokom vremena optimizovani, tj. prilagođavani stepenu rizika bolesnika, stopa relapsa je smanjena sa 50% (pre ATRA era) na < 30% [5, 42, 48]. Analiza rezultata PETHEMA 2005 studije, pokazala je četvorogodišnju stopu relapsa od 9%, dok su DFS i OS u istom period iznosili 90 i 89% [42]. Rezultati desetogodišnjeg praćenja bolesnika, lečenih protokolom LPA93, pokazali su kumulativnu desetogodišnju stopu relapsa od 13.4% [80]. Iako je intenzifikacijom HT, na račun uvođenja citarabina, stopa relapsa smanjena i u visokorizičnoj grupi, ona je i dalje veća nego u grupi bolesnika srednjeg i umerenog rizika [5, 42].

Relaps APL najčešće nastupa tokom prve tri godine od postizanja KR. U vezi sa ovim, PETHEMA studijska grupa je označila relapse, nastale u ovom periodu, kao rane [5, 42, 80]. Sa druge strane, relapsi nastali kasnije, tzv. "kasni relapsi", su retki (3-5% bolesnika) [80, 81].

Između 3-5% bolesnika sa APL razvije ekstramedularni relaps, izolovan ili udružen sa sistemskim relapsom [5, 80]. Pritom, najčešća lokalizacija ekstramedularnog relapsa je centralni nervni sistem (CNS) [5, 82].

1.2.7.11.1. Terapija relapsa

Pre ATO ere, lečenje relapsa APL podrazumevalo je indukcionu primenu ATR-e uz HT (citarabin, antraciklini sa ili bez etopozida) [5, 8, 83]. Navedenim ciklusom, druga KR (KR2) postizana je kod 80- 90% bolesnika [81, 83]. Konsolidaciona terapija je podrazumevala primenu još jedne kure "HT+ATRA" a potom bi usledila transplantacija matične ćelije hematopoeze (TMČH) [81, 83, 84].

Danas je ATO zlatni standard lečenja relapsa APL, sa stopom KR2 od 80-90% bolesnika i trogodišnjim preživljavanjem do 70% [5, 8, 53, 85, 86] – Prilog 6.

Pitanje najoptimalnije konsolidacione terapije relapsa APL je i dalje nerazjašnjeno – Prilog 7. Terapijske mogućnosti podrazumevaju standardnu hemioterapiju u kombinaciji sa ATRA-om i/ili ATO-om kao i TMČH [5, 84]. Izbor terapije zavisi od karakteristika bolesnika i logističkih mogućnosti [5, 84]. Studija, sprovedena na 294 bolesnika sa relapsom APL, od kojih je 232 lečeno autologom a 62 alogenom TMČH, pokazala je superiornost autologe transplantacije (5-godišnji DFS 63% vs. 50% (P = 0.10); OS 75% vs. 54% (P = 0.002), prewashodno zbog manje transplantacione toksičnosti [5, 87]. Međutim, alogena TMČH ostaje metod izbora u lečenju bolesnika koji nisu postigli KR2 ili su imali veoma kratku KR1 [5].

Lečenje CNS relapsa podrazumeva primenu trojne intratekalne terapije (IT): metotreksatom, citarabinom i hidrokortizonom, jednom nedeljno, do acelularnosti likvora. Dodatnih 6-10 IT se primenjuje kao terapija konsolidacije [5]. Kako je relaps u CNS, po pravilu, povezan sa sistemskim relapsom treba primeniti istovremeno i sistemsku terapiju. Jedan od terapijskih pristupa je kombinovana terapija "ATO+ATRA+ IT". Takođe je moguće primeniti terapiju koja penetrira hematoencefalnu barijeru (visoke doze citarabina), kraniospinalnu iridijaciju i transplantaciju [5].

1.2.7.11.2. Prognozni marker nastanka relapsa u APL

1) Broj leukocita

Broj leukocita se smatra najznačajnijim prediktorom ishoda lečenja APL. Međutim, različite studijske grupe identifikovale su različite granične vrednosti broja leukocita za nastanak relapsa i to od $10 \times 10^9/L$, $5 \times 10^9/L$ i $2 \times 10^9/L$ [41, 42, 70]. Najčešće primenjivana granična prediktivna vrednost je $10 \times 10^9/L$.

2) Sanzov skor

Studijske grupe za APL, PETHEMA i GIMEMA, uočile su da je jedini nezavisni prediktor relapsa broj leukocita $> 10 \times 10^9/L$. Istovremeno je PETHEMA grupa ustanovila da je u nekim grupama bolesnika broj trombocita $< 40 \times 10^9/L$ bio prediktivan [42]. Stoga, je na osnovu broja leukocita i trombocita dizajniran široko upotrebljavani Sanzov skor, na kome se bazira i terapijski pristup [42].

3) Varijanti oblik bolesti

U dosada najvećoj publikovanoj seriji bolesnika sa M3v, Talman i saradnici su pokazali da bolesnici sa M3v imaju kraće OS (73% vs. 81%, $P = 0.07$), kraći petogodišnji DFR (70% vs. 80%, $P = 0.006$) i veću RR (petogodišnja kumulativna incidenca relapsa 24% vs. 15%, $P = 0.005$) [72]. Posle korekcije za grupu rizika po Sanzu, odnosno broju leukocita kao i u multivarijantnoj analizi, M3v nije zadržala svoj prognozni značaj [72].

4) Dodatne citogenetske anomalije

Prognozni značaj DCA u APL je i dalje nerazjašnjen. Prve studije, publikovane sredinom 90-tih godina, ukazale su na uticaj DCA na ishod lečenja [88]. Međutim, u pitanju su bile studije sprovedene na malom broju neuniformno lečenih bolesnika. Rezultati kasnije sprovedenih studija pokazali su da prisustvo DCA ne utiče na verovatnoću nastanka relapsa [88]. Najnovija publikovana analiza rezultata lečenja 495 bolesnika sa APL, pokazala je da DCA, uočene kod 28% bolesnika, nisu nezavisni prediktivni faktor za nastanak relapsa APL [88].

5) CD56 pozitivnost

CD56 ekspresija je u većem broju kliničkih studija pokazala svoj uticaj na RR, DFS i OS [73, 89-91]. Rezultati najnovije publikovane PETHEMA studije pokazale su uticaj CD56 ekspresije na RR (22% vs. 10%, $p = 0.006$), DFS (73% vs. 85%, $p = 0.03$) i OS (78% vs. 84%, $p = 0.09$). U multivarijantnoj analizi, faktori rizika za nastanak relapsa bili su CD56+ i broj leukocita [73]. Na osnovu navedenih rezultata, novi studijski protokol PETHEMA iz 2012. godine predvideo je intenzifikaciju lečenja kod CD56 pozitivnih bolesnika – Prilog 5 [31].

6) CD2 pozitivnost

U nekim studijama, CD2 pozitivnost je identifikovana kao faktor rizika za nastanak relapsa, premda nije zadržala značajnost u multivarijantnoj analizi [76].

7) CD34 pozitivnost

CD34 ekspresija, čak i sa niskim pragom pozitivnosti od 10%, udružena je sa češćom pojavom relapsa i kraćim OS [89]. Sa druge strane, koekspresija CD34 i CD2 karakteristična je za grupu bolesnika sa visokim brojem leukocita, M3v, bcr3 izoformom, DS, većim RR i kraćim OS [89].

8) CD15 ekspresija

CD15 ekspresija prisutna je kod oko 10% bolesnika sa APL [15]. Dok je u ranijim studijama uočena sklonost ka trombozama u grupi CD15 pozitivnih bolesnika, novije studije su pokazale su da bolesnici sa CD15 pozitivnošću imaju neočekivano visoku RR (42% vs. 20%, p=0.03) i kraće OS (petogodišnje OS 58% vs. 85%, p=0.01) [15, 89].

9) Tip *PML-RAR α* transkripta

Iako je dokazano da je prisustvo bcr3 transkripta udruženo sa većim brojem leukocita, M3v, CD56 pozitivnošću i češćim prisustvom *FLT3-ITD* mutacije, njegov prognostički značaj u APL je i dalje kontraverzan [92]. Naime, neka istraživanja su pokazala da bolesnici sa bcr3 tipom transkripta imaju kraću remisiju, odnosno viši RR, dok druga istraživanja nisu uočila ovu povezanost [92, 93]. Takođe je pokazano, u novijim istraživanjima, da bolesnici sa većom ekspresijom bcr3 transkripta ispoljavaju smanjenu osetljivost na ATRA-u [92].

10) *FLT3* mutacija

Sistematski pregled sa meta analiza koji je uključio 1063 bolesnika iz 11 studija pokazala je da bolesnici sa *FLT3-ITD* mutacijom imaju značajno kraći trogodišnji DFS (RR 1.48, 95% CI: 1.02-2.15) i značajno kraće trogodišnje preživljavanje (RR 1.42, 95% CI: 1.04-1.95), u poređenju sa bolesnicima bez mutacije [94]. Međutim, u multivarijantnoj analizi, ovaj parameter nije zadžao statističku značajnost [94]. Sa druge strane, nije opisana povezanost *FLT3-D835* sa kliničko-laboratorijskim karakteristikama bolesti, incidencom RS, RR i OS [94].

11) Wilmsov tumor 1 (WT1) gen

WT1 je tumorski supresor gen koji se primarno eksprimira u urogenitalnom, nervnom i hematopoetskom tkivu [95]. U zdravoj koštanoj srži, ekspresija ovog gena veoma je niska i ograničena samo na CD34+ ćelije. Sa druge strane, WT1 gen je prekomerno ekspimiran u oko 90% pacijenata sa AML, zbog čega se pretpostavlja da ima ulogu u leukemogenezi [95]. Stepenski ekspresije WT1 gena je različit, u zavisnosti od FAB podgrupe - najviši je kod

bolesnika sa APL a najniži u M4 i M5 podgrupi pacijenata [96-98]. Studije, koje su pratile nivo WT1 transkripta, su pokazale kontraverzne rezultate u pogledu njegovog prognostičkog značaja u AML [96-99]. Naime, neka istraživanja su pokazala povezanost povećane inicijalne ekspresije WT1 gena sa lošom prognozom, dok su druga istraživanja pokazala pozitivnu korelaciju između visoke ekspresije WT1 gena i ishoda bolesti. Treća grupa studija nije uočila postojanje korelacije [96-98]. Pritom je uočen visok stepen korelacije između ekspresije WT1 gena i drugih molekularnih markera, kao što su nukleofosmin i *FLT3*, bilo *FLT3-ITD* ili *FLT3-D835* [96-98].

Visoka ekspresija WT1 gena nakon primenjene hemoterapije, u nekim studijama bila je povezana sa visokim stepenom rizika od RB i lošom prognozom [96-99]. Ekspresija WT1 gena takođe je korišćena u monitoringu MRB, pre svega bolesnika sa AML i normalnim kariotipom [96, 98]. U najvećem broju studija, porast ekspresije WT1 gena je prethodio hematološkom relapsu za 3-6 meseci [96, 98].

U dosada jedinom publikovanom radu o uticaju nivoa ekspresije WT gena na ishod lečenja bolesnika sa APL, uočen je lošije OS bolesnika sa niskom i visokom ekspresijom WT gena, u odnosu na bolesnike sa umerenom ekspresijom (49% visoka, niska 63%, umerena 93%; $p=0.008$). Takođe je uočeno postojanje korelacije između nivoa ekspresije WT gena, sa jedne strane i u DFS pacijenata, sa druge strane (42% kod bolesnika sa visokom WT1 ekspresijom, 63% kod bolesnika sa umerenom i 83% kod bolesnika sa niskom WT1 ekspresijom; $p = 0.047$). Pritom, u multivarijantnoj analizi je WT ekspresija ostala nezavisan prognozni parametar OS [99].

Tabela 6 prikazuje sve parametre sa utvrđenom prediktivnom vrednošću za nastanak RB.

Tabela 6: Parametri sa prediktivnom vrednošću za nastanak relapsa bolesti

Parametar	Vrednost	Autor	Multivarijantna analiza
Broj leukocita	> 10x10 ⁹ /L > 5x10 ⁹ /L > 2x10 ⁹ /L	Sanz i sar. ⁴¹ Tallman i sar. ⁴² Iland i sar. ⁷⁰	zadržao značajnost zadržao značajnost nije rađena
Broj trombocita	< 40x10 ⁹ /L	Sanz i sar. ⁴⁰	zadržao značajnost
Sanzov skor	Visok	Sanz i sar. ⁴⁰	zadržao značajnost
M3v		Talman i sar. ⁷²	nije zadržao značajnost
Dodatne citogenetske anomalije		Cervera i sar. ⁸⁸	bez značajnosti
CD56	pozitivnost	Montesinos i sar. ⁷³ Murray i sar. ⁹⁰ Ferrara i sar. ⁹¹	zadržao značajnost nije rađena nije rađena
CD2	pozitivnost	Lin i sar. ⁷⁶	nije rađena
CD34	pozitivnost	Breccia i sar. ⁸⁹	nije rađena
CD15	pozitivnost	Breccia i sar. ⁸⁹	nije rađena
PML-RAR α	kratki	Tan i sar. ⁹² Stok i sar. ⁹³	nije radjena nije radjena
FLT3-ITD	pozitivnost	Beitinjaneh i sar. ⁹⁴	nije zadržao značajnost
Ekspresija WT1 gena	visoka	Hecht i sar. ⁹⁹	zadržao značajnost

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

APL je redak oblik AML koji je, uvođenjem ATR-e u terapiju, postao izlečiv kod 80-90% bolesnika [5, 8, 42, 48]. Ipak, RS i RB predstavljaju uzroke neuspeha lečenja kod značajnog broja bolesnika. Utvrđivanje faktora rizika za nastanak RS i RB omogućio bi identifikaciju bolesnika sa visokim rizikom prilikom dijagnostikovanja APL i eventualno modifikovanje terapijskog pristupa.

Osnovni ciljevi ovog istraživanja su:

- 1) Utvrđivanje prediktivne vrednosti parametara krvne slike (leukocita, trombocita, blasta i promijelocita), rutinskih testova hemostaze (fibrinogen, PT, aPTT, D-dimer) i ISTH DIK skora, citološkog tipa bolesti, imunofenotipskih i molekularno-genetskih obeležja (izoforma *PML-RARA*, ekspresija *WT1* gena i *FLT3-ITD* mutacije) za nastanak RS.
- 2) Utvrđivanje prediktivne vrednosti navedenih parametara za pojavu krvarenja kao i nastanak RS uzrokovane hemoragijom.
- 3) Dizajniranje prediktivnog skora za nastanak RS.
- 4) Utvrđivanje prediktivne vrednosti navedenih parametara za pojavu RB.
- 5) Utvrđivanje značaja monitoringa ekspresije *WT1* gena kao markera MRB.

3. MATERIJAL I METODOLOGIJA ISTRAŽIVANJA

U ovu prospektivno-retrospektivnu studiju uključeno je 75 bolesnika sa APL, koji su dijagnostikovani u Klinici za hematologiju Kliničkog centra Srbije, u periodu od juna 2004. do juna 2014. godine. Prospektivno praćenje bolesnika započeto je u novembru 2011. od kada je uključeno 28 bolesnika.

3.1. Inicijalna dijagnostika

Inicijalna dijagnostika sprovedena je pre početka lečenja i podrazumevala je:

3.1.1. Anamnezu i fizikalni pregled

"Kašnjenje bolesnika" je definisano kao vreme proteklo od pojave prvih simptoma do javljanja na pregled. "Medicinsko kašnjenje" je definisano kao vreme proteklo od prvog kontakta sa lekarom do primene ATRA-e. "Kašnjenje lečenja" je definisano kao vreme proteklo od trenutka hospitalizacije do početka primene ATRA-e [60, 61].

Kod bolesnika je, počev od trenutka hospitalizacije, svakodnevno procenjivano krvarenje. Krvarenje u CNS, oko, pluća i gastrointestinalni sistem je smatrano krvarenjem koje vitalno ugrožava bolesnika [100].

3.1.2. *Kompletna krvna slika* (broj leukocita, trombocita, eritrocita, hemoglobin, leukocitarna formula) određivana je iz krvi antikoagulisane sa EDTA, na standardnom automatskom brojaču krvnih ćelija "Coulter S plus VI" (Coulter Electronics, Krefeld, Nemačka), metodom baziranom na merenju električne rezistencije, prilikom prolaska krvnih ćelija. Koncentracija hemoglobina je izražavana u g/L, broj leukocita i trombocita kao $\times 10^9/L$. Normalne vrednosti navedenih parametara iznosile su: Hb 120-170 g/L, Le 3,6-10 $\times 10^9/L$, Tr 150-450 $\times 10^9/L$.

3.1.3. Rutinski testovi hemostaze

- Fibrinogen, PT i aPTT su određeni na klasičnom koagulometru (ACL Automated Coagulation Laboratory, IL, Italy). Koagulometar omogućava istovremeno određivanje sva tri parametra, uz upotrebu samo jednog reagensa kalcijum tromboplastina. Referentne vrednosti za fibrinogen su 2-4g/L, za PT su 75-120% (izraženo procentima u odnosu na normalnu plazmu) i za aPTT od 25 do 35s.

- D-dimer je određen imunoturbodimetrijski, na aparatu Siemens BCS XP System (Siemens, Germany). Referentna vredost iznosila je $< 250 \mu g/L$.

- Dijagnoza DIK-a postavljana je prema preporukama Međunarodnog udruženja za trombozu i hemostazu (International Society on Thrombosis and Hemostasis - ISTH) [101]. Izračunavanje DIK skora prikazano je na Tabeli 7. Bolesnici sa skorom ≥ 5 imali su DIK.

Tabela 7: Izračunavanje ISTH DIK skora

Btoj bodova	0	1	2	3
Broj trombocita (x10 ⁹ /L)	> 100	50 - 100	< 50	
PT (%)	> 75	50 – 75	< 50	
Fibrinogen (g/L)	> 1	< 1		
D dimer (μg/L)	normalan		> 2-4 x	> 4 x

3.1.4. Morfološka i citohemijska analiza razmaza koštane srži

Razmazi kostne srži bojeni su prvo metodom MayGrunwald-Giemsa, a potom specifičnim citohemijskim bojenjima (PAS, POX, SB, ANAE). Citohemijsko bojenje omogućava da se odredi linijska pripadnost blasta. Istovremeno se određuje celularnost, prisutnost, brojnost i stepen zrelosti pojedinih ćelija hematopoeze, kao i njihove morfološke osobine [3, 4].

3.1.5. Imunofenotipizacija protočnom citometrijom

Uzorci ispitanika su prikupljeni i obrađivani prema standardnim preporukama i protokolima [102]. Analizirani su sveži nativni uzorci kostne srži bolesnika koja je prikupljena u standardnim epruvetama sa antikoagulansom K3EDTA ili K2EDTA (BD Vacutainer, K3EDTA ili K2EDTA). Koncentracija ćelija uzoraka je određivana ručnom metodom, brojanjem ćelija u hemocitometru. U slučaju kada je koncentracija ćelija bila u opsegu od 1-10x10⁶/ml, obeležavani su alikvoti (tacno određeni deo jednog celog) od 100μl nerazblaženih uzoraka, a u slučaju kada je koncentracija uzorka bila >10x10⁶/ml, pravljena su razblaženja osnovnog uzorka pomoću medijuma (2% FCS/ 0.01% NaN₃/ PBS, pH 7.2). Razblaženi uzorak je podešavan do koncentracije od 10x10⁶ ćelija/ml.

3.1.5.1 Monoklonska antitela

Alikvoti uzoraka su obeležavani primenom panela komercijalnih monoklonskih antitela (MoAt), poreklom od miša sa specifičnošću za humane leukocitne antigene (Ag) - Tabela 6 [102]. Sva MoAt bila su direktno konjugovana molekulima jedne od četiri fluorescentne boje (FITC, PE, PerCP, APC). Većina MoAt su bila proizvod firme BD Biosciences (USA), osim u slučaju MoAt anti-Lizozim (Invitrogen, USA) i anti-CD163 (R&D Systems, USA). Za detekciju Ag mijelo-monocitne loze korišćena su sledeća MoAt: CD13-PE (klon L138), CD14-PE (klon MφP9), CD15-FITC (klon MMA), CD16 (klon 3G8),

CD24-FITC (klon ML5), CD33-PE (klon P67.6), CD36-PE (klon CB38), CD41a-FITC (klon HIP8), CD64-FITC (klon 10.1), CD66b (klon G10F5), CD117-PE (klon 104D2), CD163-PE (klon # 215927), CD235-PE (klon GAR-2), cMPO-FITC (klon 5B8), cLizozim (klon LZ-2). Za detekciju Ag T-limfoidne loze korišćena su sledeća MoAt: CD2-FITC (klon S5.2), cCD3-APC (klon UCHT1), CD4-FITC (klon SK3), CD7-FITC (klon 4H9), CD56-PE (klon MY31). Za detekciju Ag B-loze korišćena su sledeća MoAt: CD10-PE (klon HI10a), CD19-PE (klon SJ25C1), CD22 (klon S-HCL-1), cCD79a-PE (klon HM47). Za detekciju diferencijacionih linijski nespecifičnih Ag korišćena su sledeća MoAt: CD11a (klon HI111), CD11b-PE (klon Mac-1), CD11c (klon B-ly6), CD34-APC (klon 8G12), CD38-APC (klon HIT2), CD45-PerCP (klon 2D1), CD71-FITC (klon L01.1), HLA-DR-FITC (klon L243). Kao mera nespecifične reakcije MoAt i ćelija ispitivanog uzorka, korišćene su izotipske kontrole: msIgG1-FITC (klon X40), msIgG1-PE (klon X40) i msIgG1-APC (klon MOPC-21).

3.1.5.2. Metod direktne višekolorne imunofluorescencije

Primenjen je metod direktne višekolorne imunofluorescencije na uzorcima pune koštane srži (engl. Whole Bone Marrow Lyse Wash, WBMLyW) [100]. Alikvoti uzoraka periferne krvi su obeležavani MoAt direktno konjugovanim sa fluorohromom, prema standardnom panelu za AML (Tabela 7.). Na dno epruveta su prvo sipana MoAt u optimalnoj količini i u kombinaciji koja je predviđena panelom, a zatim je sipan alikvot od 100 µl uzorka (1x10⁶ ćelija) i 10 µl pulovanog humanog AB seruma (Sigma, USA), u cilju smanjenja nespecifičnog vezivanja MoAt za ćelije. Nakon mešanja na vorteksu, alikvoti su inkubirani 15min/20°C u mraku, a zatim su eritrociti lizirani primenom 2ml hipotoničnog rastvora amonijum hlorida, pH 7.2 u trajanju od 10min/20°C u mraku. Posle centrifugiranja na 260g/5min/20 °C i odbacivanja supernatanta, talog ćelija je ispiran medijumom (2% FCS/ 0.01% NaN₃/ PBS, pH 7.2), centrifugiran na 260g/5min/20°C i fiksiran primenom komercijalnog rastvora na bazi formaldehida (BD CelFIX, BD, USA). Obeleženi alikvoti uzoraka su čuvani na +40°C do analize, najduže 24h.

3.1.5.3. Merenje i analiza uzoraka metodom multiparametarske protočne citometrije

Metodom MPC (BD FACSCalibur, BD, USA) mereni su i analizirani fizički ćelijski parametri, relativna veličina (engl. Forward Light Scatter, FLS) i ćelijska granulacija (engl. Side Scatter, SSC), kao i fluorescentni signali (FL1 – FITC, FL2 – PE, FL3 – PerCP) koji odražavaju obrasce ekspresije leukocitnih Ag na populaciji leukemijskih ćelija [102, 103]. Merenje i analiza fluorescentnih signala reflektovanih ili emitovanih sa populacije

leukemijskih ćelija vršena je primenom analitičkog softvera CELLQuest ver. 4.0.1. (Becton Dickinson, USA). Leukemijske ćelije ispitivanog uzorka su selekcionisane u cilju analize na osnovu kombinacije fizičkih svojstava (FSC/SCC) i obrasca ekspresije CD45 molekula i ćelijske granulacije (CD45/SSC).

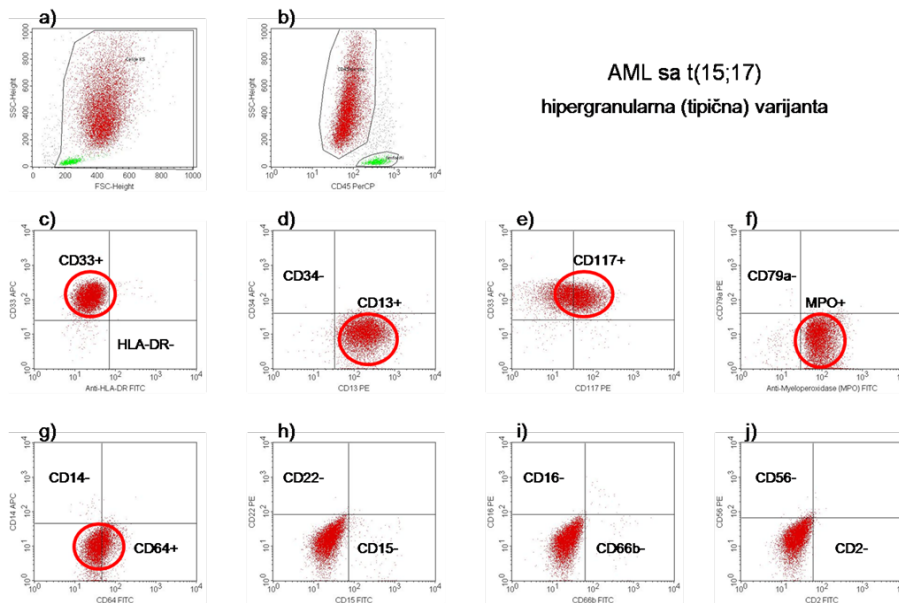
Tabela 8: Standardni panel MoAt za imunofenotipizaciju AML

	<i>FITC</i>	<i>PE</i>	<i>PerCP</i>	<i>APC</i>
<i>epruveta 1.</i>	<i>CD2</i>	<i>CD56</i>	<i>CD45</i>	<i>CD19</i>
<i>epruveta 2.</i>	<i>CD7</i>	<i>CD13</i>	<i>CD45</i>	<i>CD34</i>
<i>epruveta 3.</i>	<i>HLA-DR</i>	<i>CD117</i>	<i>CD45</i>	<i>CD33</i>
<i>epruveta 4.</i>	<i>CD64</i>	<i>CD14</i>	<i>CD45</i>	<i>CD4</i>
<i>epruveta 5.</i>	<i>CD15</i>	<i>CD22</i>	<i>CD45</i>	<i>CD11c</i>
<i>epruveta 6.</i>	<i>CD24</i>	<i>CD11b</i>	<i>CD45</i>	<i>CD11a</i>
<i>epruveta 7.</i>	<i>CD66b</i>	<i>CD16</i>	<i>CD45</i>	<i>CD10</i>
<i>epruveta 8.</i>	<i>CD41a</i>	<i>CD36</i>	<i>CD45</i>	<i>CD38</i>
<i>epruveta 9.</i>	<i>CD71</i>	<i>CD235a</i>	<i>CD45</i>	
<i>epruveta 10.</i>	<i>msIgG1</i>	<i>msIgG1</i>	<i>mCD45</i>	<i>msIgG1</i>
<i>epruveta 11.</i>	<i>cMPO</i>	<i>cCD79a</i>	<i>mCD45</i>	<i>cCD3</i>
<i>epruveta 12.</i>	<i>cLizozim</i>	<i>CD163</i>	<i>mCD45</i>	
<i>epruveta 13.</i>	<i>cmsIgG1</i>	<i>cmsIgG1</i>	<i>mCD45</i>	<i>cmsIgG1</i>

Legenda: FITC – fluoresceinizotiocijanat, PE – fikoeritrin, PerCP - peridinhlorofil proteini, APC – alofokocijanin, msIg - mišji Ig

Rezultati ispitivanja ekspresije svakog pojedinačnog Ag su izražavani kao procenat ćelija u populaciji blasta koje ekspimiraju dati Ag, a kriterijum prema kome je populacija blasta definisana kao pozitivna za neki Ag, bilo je prisustvo proporcije od $\geq 20\%$ obeleženih ćelija za dati plazmamembranski Ag ili proporcije od $\geq 10\%$ obeleženih ćelija za dati intracelularni Ag [103]. Imunološka klasifikacija bolesnika sa AML vršena je na osnovu kriterijuma Evropske grupe za imunološku klasifikaciju leukemija (EGIL) i preporuka SZO [4, 104]. Imunološki tip AML definisan je na osnovu ekspresije kombinacije diferencijacionih Ag mijelomonocitne loze: CD117, CD13, CD33, CD64, CD14, CD163, CD11a, CD11b, CD11c, CD15, CD61 i GpA. Ekspresija diferencijacionih i linijski

nespecifičnih antigena, CD34, CD38 i HLA-DR, definisala je fenotip mladih tj. nediferenciranih ćelija limfo-hematopoeznog sistema.



Slika 9: Primer imunofenotipskog profila populacije leukemijskih ćelija bolesnika sa dijagnozom APL – hipergranularna varijanta. Izgled populacija ćelija kostne srži prikazan je na dvo-parametarskim “dot plot” histogramima, u odnosu na relativnu ćelijsku veličinu i granulaciju (FSC/SSC) (a), odnosno obrazac ekspresije CD45 molekula i relativnu ćelijsku granulaciju (CD45/SSC) (b). Leukemijska populacija ćelija je homogena po svom sastavu i sačinjava je populacija promijelocita (crvena populacija ćelija). Imunofenotipski profil leukemijskih ćelija je definisan na osnovu ekspresije diferencijacionih molekula mijelo-monocitne loze (c-j).

3.1.6. Klasična citogenetska analiza metodom HG traka

Kariotip bolesnika, u momentu postavljanja dijagnoze, utvrđivan je tehnikom HG traka i analiziran je prema Internacionalnom sistemu za humanu citogenetsku nomenklaturu [105].

Analiza je vršena iz uzorka koji sadrži 2 ml aspirata koštane srži i 8 ml medijuma RPMI 1640 sa 20% fetalnim telećim serumom. Uzorku se potom dodaje 0,2 ml (0,02 mg/ml) kolcemida da bi se zaustavilo deljenje ćelija u metafazi i inkubira se 1 h na 37°C. Pre preparacije, ćelije se ispiraju u medijumu RPMI 1640 centrifugiranjem (1600 rpm 10 min.). Odliva se supernatant, a ćelijskom talogu se dodaje hipotonični rastvor (9,8 ml 0,075 M KCl, 0,1 ml tripsina u koncentraciji 0,025%, 0,1 ml kolcemida u koncentraciji 0,001 mikrog/ml). Hipotonični tretman traje 20 minuta na 37°C, a posle se ćelije ponovo centrifugiraju (1600

rpm). Dobijeni talog se resuspenduje sa 10 ml Karneovog fiksativa (tri dela metil alkohola, jedan deo sirćetne kiseline). Posle resuspendovanja taloga u fiksativu, materijal se nanosi kap po kap na hladne mikroskopske pločice, koje se potom prevuku preko plamena špiritusne lampe. Preparati se boje u trajanju od pet minuta sa 2% rastvorom gimze u fosfatnom puferu (0,9% KH_2PO_4 , 1,2% Na_2HPO_4). Dobijeni preparati se analiziraju pod svetlosnim mikroskopom. Neke od pregledanih mitozu se fotografišu i potom se slaže kariogram.

Optimalan broj ćelija za direktnu preparaciju, a i za ćelijsku kulturu je 20×10^6 . Citogenetska analiza za svakog bolesnika rađena je na osnovu 20-30 pregledanih ćelija u metafazi, sa apsolutnim minimumom od 10 pregledanih ćelija u metafazi kod pacijenta sa normalnim kariotipom [105]. Pod citogenetski patološkim klonom podrazumeva se prisustvo najmanje dve ćelije sa istom strukturnom aberacijom ili trizomijom istog hromozoma ili tri i više metafaza sa monozomijom istog hromozoma [105].

3.1.7. Molekularno – genetska istraživanja

Za sve vrste molekularno-genetskih istraživanja korišćeni su uzorci aspirata koštane srži, uzeti na 0.38% Na-citratu kao antikoagulansu. U slučaju retrospektivne analize mutacije u FLT3 genu, izolacija DNK je rađena sa pločica razmaza koštane srži.

3.1.7.1. Izolacija mononuklearnih ćelija iz aspirata koštane srži

Protokol:

1. 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)
2. centrifugirati na 1 500 g/25 min na sobnoj temperaturi, u kliničkoj centrifugi, bez kočenja
3. posle centrifugiranja, pipetom prebaciti „buffy coat“ interfazu koja je sastavljena od mononuklearnih ćelija u novu sterilnu epruvetu
4. isprati dva puta u PBS-u, posle svakog ispiranja sledi centrifugiranje na 1500 g/15 min
5. talog resuspendovati u TRIzol®-u (Invitrogen)

3.1.7.2. Izolacija DNK iz periferne krvi/koštane srži

Za izolaciju DNK iz krvi odnosno koštane srži korišćen je QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Germany).

Protokol:

- 1) na dno tube sipati 20 µl proteinaze K (20 mg/ml), dodati 200 µl uzorka, 200 µl pufera AL i promešati vorteksovanjem
- 2) inkubirati u vodenom kupatilu 10 min/56°C
- 3) dodati 200 µl 96-100% etanola i promešati vorteksovanjem
- 4) ovako pripremljen uzorak naneti na QIAamp Mini spin kolonicu i centrifugirati na

8 000 rpm/1 min

- 5) kolonicu isprati sa 500 µl pufera AW1, centrifugirati na 8 000 rpm/1 min
- 6) kolonicu isprati sa 500 µl pufera AW2, centrifugirati na 13 000 rpm/3 min
- 7) na kraju prebaciti kolonicu u čistu tubu, dodati 200 µl pufera AE i centrifugirati na 8 000 rpm/1 min

3.1.7.3. 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 predstavlja unapređen klasični metod izolacije RNK definisan od strane Chomczynski P & Sacchi N [106].

Protokol:

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

5. 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)
6. centrifugirati na 12 000 rcf/15 min/+4°C, a zatim ukloniti supernatant dekantovanjem i oprati talog sa 1 ml hladnog 70% etanola
7. centrifugirati na 12 000 rcf/10 min/+4°C, ukloniti pažljivo etanol i talog osušiti na sobnoj temperaturi
8. talog RNK rastvoriti u „RNase-free“ vodi, a koncentraciju i čistoću RNK odrediti merenjem A260/A280 na spektrofotometru

3.1.7.4. Reverzna transkripcija (RT)

Sinteza cDNK je izvršena reakcijom reverzne transkripcije.

Protokol:

1. 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
2. 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)
3. inkubirati 10 min. na 25°C, a zatim 1h na 42°C
4. reakcija se zaustavlja inkubacijom od 10 min. na 70°C

3.1.7.5. Standardizovani RT-PCR protokol za detekciju *PML-RAR* fuzionih transkripata

Detekcija *PML-RAR* fuzionih transkripata kod obolelih je rađena standardizovanom RT-PCR metodom preporučenom od strane EAC-grupe („Europe Against Cancer-group“) [105].

RT-PCR protokol se sastoji iz jedne ili dve runde PCR reakcija, u zavisnosti da li se fuzioni transkript detektuje na početku bolesti ili se vrši praćenje minimalne rezidualne bolesti. Osetljivost metode varira u zavisnosti od transkripta i za prvu PCR reakciju („1st round“) iznosi 10^{-2} - 10^{-3} , dok se u drugoj rundi („2nd round“ ili „nested“-PCR) postiže osetljivost od 10^{-4} - 10^{-6} .

Protokol:

Prva runda PCR (finalni volumen 25 µl)	Druga runda PCR (finalni volumen 25 µl)
<ul style="list-style-type: none"> • 50-100 ng cDNK (5-10% RT smeše) • 1x reakcioni pufer • prajmeri finalne koncentracija 400 nM • dNTP finalne koncentracije 200 µM • MgCl₂ finalne koncentracije 1,5 mM • 2,5 U HotStarTaq polimeraza (Qiagen, Nemačka) 	<ul style="list-style-type: none"> • 1 µl smeše prve runde PCR reakcije • 1x reakcioni pufer • prajmeri finalne koncentracija 400 nM • dNTP finalne koncentracije 200 µM • MgCl₂ finalne koncentracije 1,5 mM • 2,5 U HotStarTaq polimeraza (Qiagen, Nemačka)

Temperaturni profil amplifikacije (za obe runde PCR reakcija)

1. 15 min/95⁰C – aktivacija HotStarTaq polimeraze
2. 35 ciklusa;
 - 30 sec/95⁰C – denaturacija
 - 1 min/65⁰C – aniling
 - 1 min/72⁰C – elongacija
3. 10 min/72⁰C – finalna elongacija

Tabela 8: Dužina PCR produkta kod bcr2⁺ pacijenata je varijabilna zbog varijabilne tačke prekida u egzonu 6 PML gena

hromozomska aberacija	fuzioni transkript	prajmeri za prvu rundu PCR reakcije	veličina produkta PCR (bp)		prajmeri za drugu rundu PCR reakcije	veličina produkta PCR (bp)	
			A1-B	A2-B		A1-B	A2-B
t(15;17)(q22;q21)	PML-RARA	PML-A1 5'-CAGTGTACGCCCTTCCATCA-3' PML-A2 5'-CTGCTGGAGGCTGGAC-3' RARA-B 5'-GCTTGATAGATGCGGGGTAGA-3'	bcr1 381 bcr2 345 ³ bcr3 —	(1329) (819) ³ 376	PML-C1 5'-TCAAGATGGAGTCTGAGGAGG-3' PML-C2 5'-AGCGCGACTACGAGGAGAT-3' RARA-D 5'-CTGCTGCTGGGTCTCAAT-3'	bcr1 214 bcr2 178 ³ bcr3 —	(688) (652) ³ 287
			A-B1	A-B2		A-B1	A-B2

3.1.7.6. Reakcija lančanog umnožavanja DNK (PCR)

PCR („polymerase chain reaction“) je *in vitro* amplifikacija 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), prajmere (oligonukleotidi komplementarni krajevima sekvence koja se kopira), nukleotide (gradivni elementi DNK), *Taq* polimerazu (termostabilna DNK polimeraza koja katalizuje ugradnju nukleotida po principu komplementarnosti sa matricom), jone magnezijuma i pufer (neophodni za optimalni rad *Taq* polimeraze).

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 restriktionog enzima.

3.1.7.6.1. Detekcija FLT3/ITD mutacije

Reakciona smeša zapremine 30 μ l, sastojala se od sledećih elemenata; 100 – 300 ng DNK, 1x PCR pufer, 1x Q-solution, dNTP (2 mM finalno), MgCl₂ (2,75 mM finalno), prajmeri 14F i 15R (Tabela 8) (350 mM finalno) i 2U HotStarTaq®DNA Polimerase (Qiagen, Nemačka).

Tabela 9: 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

Temperaturni profil PCR reakcije

1. 15 min/95⁰C – aktivacija HotStarTaq polimeraze
2. 35 ciklusa;
 - 1 min/95⁰C – denaturacija
 - 1 min/60⁰C – aniling
 - 2 min/72⁰C – elongacija
3. 10 min/72⁰C – finalna elongacija

Analiza dobijenih PCR produkata je vršena elektroforezom na 4% agaroznom gelu. Očekivana dužina wt PCR produkta 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 amplifikaciju.

3.1.7.6.2. Detekcija FLT3/D835 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), MgCl₂ (2,75 mM finalno), prajmeri 21F i 21R (Tabela 4.) (350 mM finalno) i 2U HotStarTaq® DNA Polimerase (Qiagen, Nemačka).

Temperaturni profil PCR reakcije

1. 15 min/95⁰C – aktivacija HotStarTaq polimeraze
2. 35 ciklusa;
 - 1 min/95⁰C – denaturacija
 - 1 min/58⁰C – aniling
 - 2 min/72⁰C – elongacija
3. 10 min/72⁰C – finalna elongacija

Produkt PCR reakcije za *FLT3/D835* je 114 bp. Detekcija mutacije se vrši digestijom ovako dobijenog PCR fragmenta restriktionim enzimom *EcoRV* (Fermentas). Prisustvo mutacije narušava restriktiono 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 *EcoRV* (Fermentas)

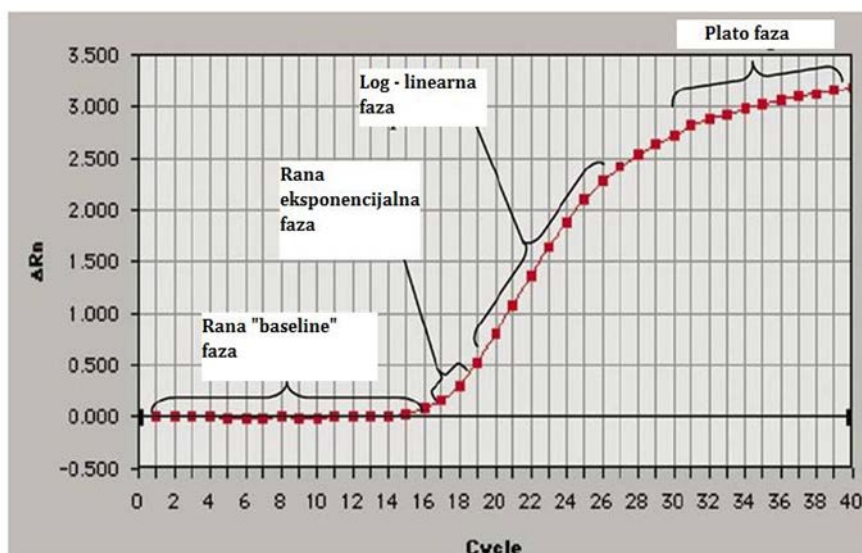
Uslovi digestije su 12 sati na 37°C. Analiza fragmenata se vrši na 8% poliakrilamidnom gelu.

3.1.7.6.3. Analiza DNK na agaroznom gelu

Analiza DNK je vršena na horizontalnom agaroznom gelu odgovarajuće koncentracije (2 – 4%), u zavisnosti od veličine molekula DNK koje treba razdvojiti. 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).

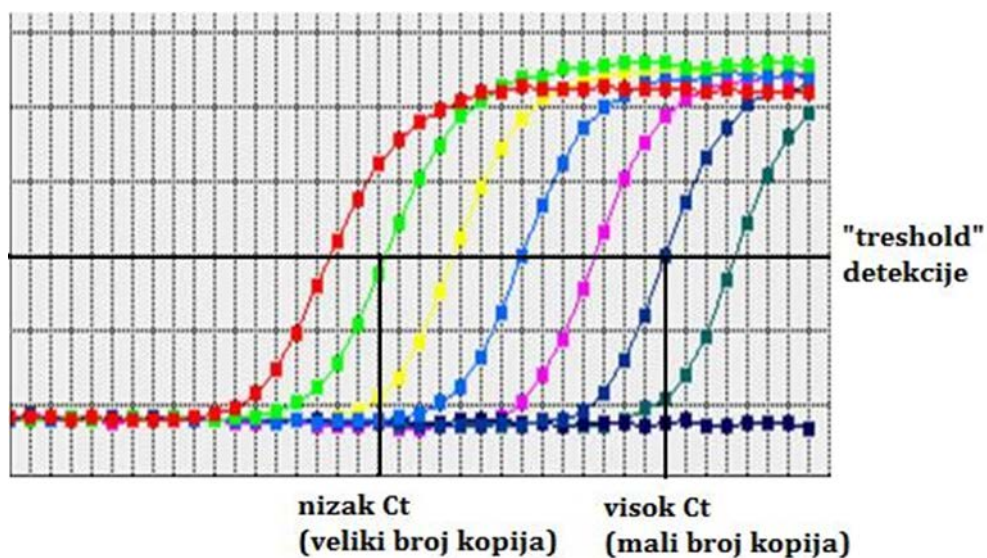
3.1.7.6.4. Praćenje ekspresije gena pomoću „real-time“ PCR (q-PCR) metode

„Real-time“-PCR ili kvantitativni PCR (q-PCR) jeste metod koji omogućava tačnu kvantifikaciju količine PCR produkta u toku svakog PCR ciklusa, tj. u ralnom 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. 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 10).



Slika 10: Faze PCR amplifikacije. R_n predstavlja vrednost fluorescencije reporterske boje, a ΔR_n predstavlja razliku R_n vrednosti između uzorka i kontrole („no template control“).

U početnim ciklusima intenzitet fluorescencije ne prelazi bazalni nivo („baseline“). Ciklus u kome je fluorescentni signal uzorka značajno viši od bazalnog signala, naziva se „threshold cycle“ – C_t . Vrednost C_t je direktno proporcionalna količini target sekvence u uzorku. Što je veći početni broj kopija target sekvence, C_t je niži, i obratno, C_t je viši u uzorcima sa manjom početnom količinom target sekvence (Slika 11).

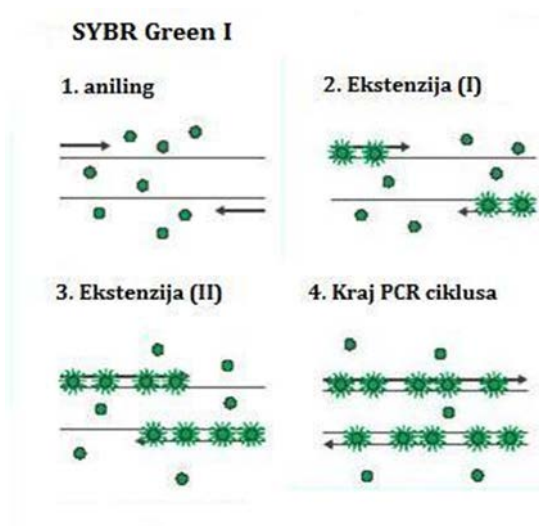


Slika 11: Amplifikacioni plotovi sa različitim početnom količinom target molekula. Niska C_t vrednost znači da je broj početnih molekula bio veliki.

Trenutno se koriste 2 osnovne „real-time“ PCR tehnike:

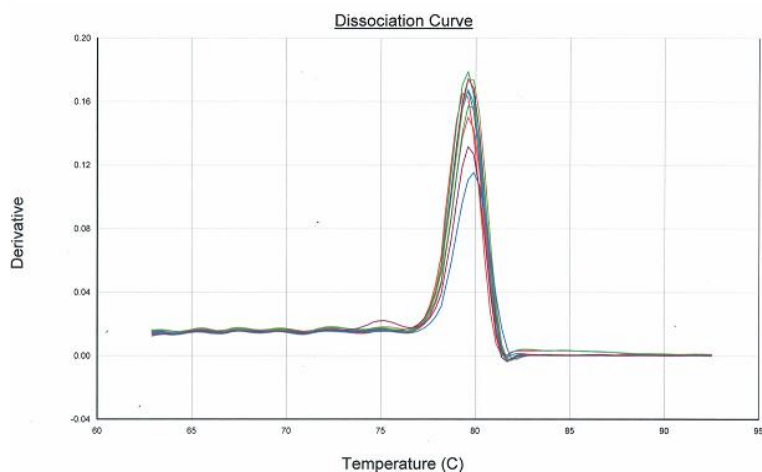
1. SYBR Green
2. TaqMan

SYBR Green je najjednostavnija tehnika, zasnovana na primeni DNK-interkalirajuće SYBR Green I boje. Ova boja se vezuje za manji žleb dvolančane DNK i sa povećanjem broja PCR reakcije dolazi do povećanja količine dvolančane DNK, pa samim tim dolazi i do povećanja fluorescentnog signala koga emituje SYBR Green I boja (na 520nm) (Slika 12).



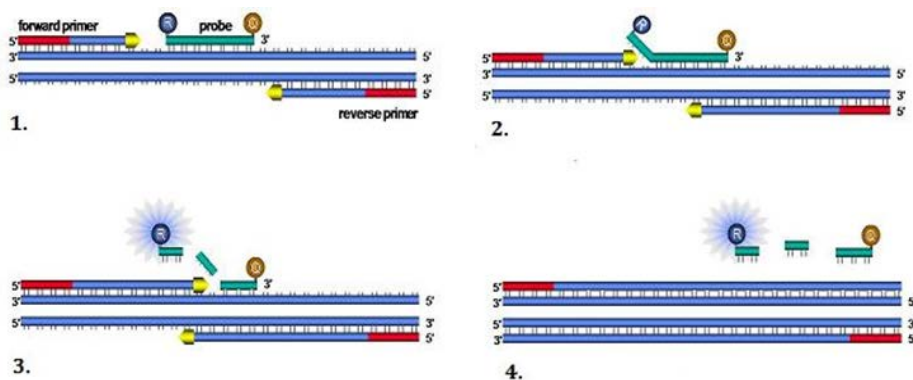
Slika 12: Princip rada SYBR Green I tehnike

SYBR Green tehnika nije specifična i za posledicu može imati detekciju nespecifično amplifikovanih PCR produkata, kao i detekciju dimera prajmera. Za procenu specifičnosti primenjuje se nalaiza krive topljenja („melting curve analysis“). U ovoj analizi, temperatura polako raste od 40 do 95°C, pri čemu se konstantno prati nivo fluorescencije. Fluorescentni signal će biti visok pri niskim temperaturama u slučaju postojanja dvolančane DNK, ali će fluorescencija drastično pasti pri temperaturama oko tačke topljenja PCR produkata. PCR produkti različite dužine i sastava će imati različite tačke topljenja pa će davati različite pikove fluorescencije. Specifični PCR produkt ima samo jedan pik (Slika 13).



Slika 13. Kriva topljenja specifičnog PCR produkta.

TaqMan tehnika koristi $5' \rightarrow 3'$ 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 (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 $5' \rightarrow 3'$ egzonukleazna aktivnost Taq polimeraze izmešta probu i uklanja je sa DNK lanca, što rezultira u emitovanju detektabilne fluorescencije od strane reporter boje (Slika 14). U toku svakog novog ciklusa PCR reakcije, fluorescencija će rasti kao posledica akumulacije „slobodnih“ reportera.



Slika 14. Princip rada TaqMan tehnike; 1. TaqMan proba i prajmeri se vezuju za target sekvencu i ekstenzija započinje, 2. Kada Taq polimeraza stigne do probe, njena $5' \rightarrow 3'$ egzonukleazna aktivnost uklanja probu, 3. započinje sekanje probe i emitovanje fluorescencije, 4. završetak polimerizacije.

Teorijski gledano, u toku eksponencijalne faze PCR reakcije, kvantitativni odnos između početne količine target sekvence i količine PCR produkta u bilo kom ciklusu je;

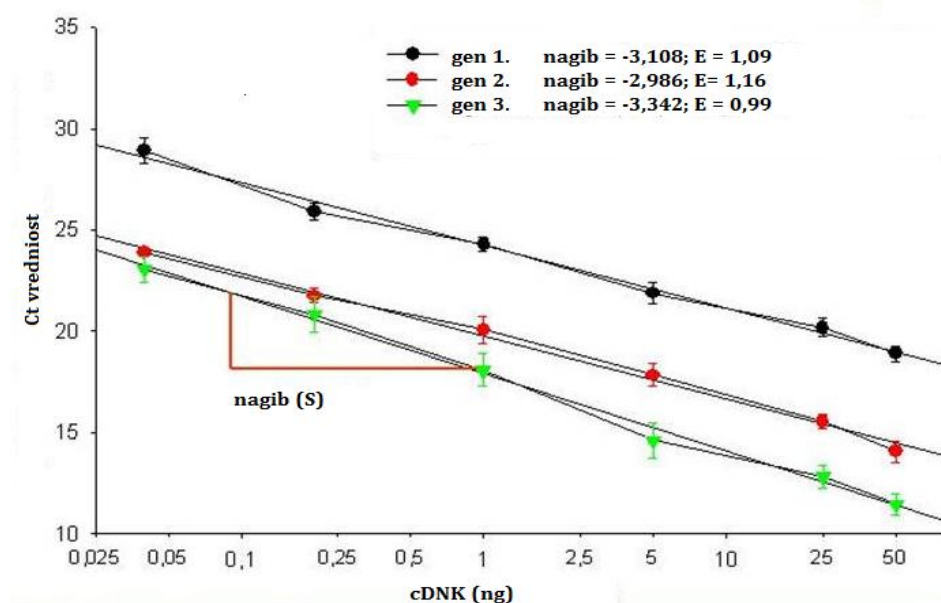
$$X_n = X_0 (1+E)^n$$

Gde je X_n količina target sekvence u ciklusu n , X_0 početna količina sekvence, dok je E efikasnost amplifikacije i može imati vrednosti od 0 (nema amplifikacije) do 1 (u svakom ciklusu dolazi do dupliranja količine target sekvence).

Efikasnost reakcije je veoma važna za odabir metode kvantifikacije qPCR podataka i ona se izračunava iz nagiba (S) standardne krive (Slika 15);

$$E = 10^{-1/S} - 1$$

Standardna kriva se pravi analiziranjem desetostrukih razblaženja početne količine cDNK (RNK ili DNK).



Slika 15. Određivanje efikasnosti PCR reakcije metodom standardne krive

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.
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. 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 ekspresija ne menja prilikom esperimentalnih tretmana.

3.1.7.6.5. Relativna kvantifikacija, komparativni ddCt metod

Komparativni ddCt metod je najčešće korišćen metod kvantifikacije ekspresije target gena primenom qPCR tehnologije, definisan od strane Livak KJ & Schmittgen TD (Livak KJ & Schmittgen TD, 2001). Količina target gena, normalizovanog u odnosu na endogenu kontrolu i relativno u odnosu na kalibrator je:

$$Q = 2^{-ddCt}, \text{ gde je}$$

$$ddCt = dCt_{\text{uzorak}} - dCt_{\text{KALIBRATOR}} =$$

$$(Ct_{\text{target}} - Ct_{\text{endogena kont.}}) - (Ct_{\text{target, KALIBRATOR}} - Ct_{\text{endogena kont., KALIBRATOR}})$$

Da bi kalkulacija primenom ove metode bila tačna, efikasnost amplifikacije target gena i endogene kontrole mora biti približno ista i mora biti iznad 96%.

3.1.7.6.6. Određivanje ekspresije WT1 gena komparativnim ddCt metodom

Ekspresija *WT1* gena je praćena primenom „real-time“ PCR metode na 7500 Real-time PCR aparatu (Applied Biosystems), upotrebom TaqMan hemije. Kao endogena kontrola korišćen je *ABL* gen. Prajmeri i proba za *ABL* gen kao i njihove sekvence su navedeni u tabeli 10. Za ekspresiju *WT1* gena je korišćen TaqMan®Gene Expression Assay (Applied Biosystems).

Tabela 10. Sekvence prajmera i probe za „real-time“ PCR kvantifikaciju gena za *ABL*.

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
probe	sekvenca (5'-3')
ABL - P	(FAM) – CCA TTT TTG GTT TGG GCT TCA CAC CAT T – (TAMRA)

Finalni volumen PCR reakcije je bio 10 µl sledećeg sastava;

ABL	WT1
<ul style="list-style-type: none"> • 50 ng cDNK • 1x TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, • Prajmeri finalne koncentracije 300 nM • Proba finalne koncentracije 200 nM 	<ul style="list-style-type: none"> • 50 ng cDNK • 1x TaqMan®Gene Expression Assay (Applied Biosystems), • 1x TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)

Temperaturni 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 $ddCt = dCt_{uzorak} - dCt_{KALIBRATOR} = dCt_{uzorak} - dCt_{zdrave kontrole}$ (medijana). Na osnovu vrednosti srednje vrednosti WT1 ekspresije + jedna SD bolesnici su klasifikovani u grupu sa visokom odnosno niskom WT1 ekspresijom.

3.2. Terapija

Protokolom PETHEMA APL 099, u periodu od 2004.-2010. godine, u Klinici za hematologiju KCS, lečeno je 42 bolesnika, (Prilog 3) [34]. Lečenje protokolom PETHEMA 2005 primenjivano je od početka 2010. do novembra 2014. godine [42]. Navedenim portokolom lečena su 33 bolesnika (Prilog 4).

Terapija ATRA-om započinjana je pri samoj sumnji na APL a na osnovu pregleda periferne krvi ili koštane srži [5]. U indukcionoj fazi lečenja, dok postoje kriterijumi za DIK, transfuzija trombocita primenjivana je ukoliko je broj trombocita $< 50 \times 10^9/L$, transfuzija SZP (10 – 15 ml/kg) ukoliko je PT $< 50\%$ a krioprecipitata (3x 8 – 10 doza) ako je fibrinogen $< 1 \text{ g/L}$ [5, 34, 42]. Da bi proverili pridržavanje navedenim preporukama kao i efikasnost transfuzione terapije tokom prvih sedam dana terapije, beležili smo broj dana sa brojem trombocita i koncentracijom fibrinogena ispod preporučenih [61].

Dijagnoza DS postavljena je prema klasičnim Frankilovim kriterijumima: dispnea, febrilnost nejasne etiologije, porast telesne mase veći od 5 kg, hipotenzija nejasne etiologije, ABI, infiltrati na radiografiji pluća i pleuroperikardni izlivi [30]. Klasifikacija DS prema težini vršena je prema preporukama PETHEMA APL grupe. Naime, bolesnici sa ≥ 4 simptoma ili znaka imaju težak DS, bolesnici sa 2 ili 3 simptoma i znaka imaju umeren DS. Ukoliko postoji samo jedan simptom ili znak koji vitalno ugrožava bolesnika, DS se smatra teškim (Prilog 1) [26, 27].

3.2.1. Rana smrt

Rana smrt je definisana kao smrt bilo koje etiologije koja je nastupila od trenutka hospitalizacije do završetka indukcionog lečenja [64].

3.2.2. Procena remisije i molekularni monitoring

Kompletna remisija podrazumevala je: 1) broj neutrofila $> 1.5 \times 10^9/L$, trombocita $> 100 \times 10^9/L$; 2) odsustvo leukemijskih blasta i promijelocita iz periferne krvi; 3) $< 5\%$ blasta ili malignih promijelocita u koštanoj srži i 4) odsustvo ekstramedularne leukemije [5].

Procena remisije podrazumevala je:

1. citomorfološku procenu posle indukcione kure
2. citomorfološku, citogenetsku i molekularnu procenu (RT-PCR na $PML-RAR\alpha$ i nivo WT ekspresije) posle prve i treće kure konsolidacije
3. citomorfološku i citogenetsku procenu na kraju terapije održavanja
4. RT-PCR na $PML-RAR\alpha$ i nivo ekspresije WT1 gena, u okviru monitoringa MRB, svakih šest meseci tokom tri godine od završetka konsolidacionog lečenja.

3.2.3. Relaps bolesti

Relaps bolesti definisan je kao hematološki i molekularni.

Hematološki relaps: $> 5\%$ blasta ili promijelocita u koštanoj srži, uz genetsku potvrdu u bilo kom trenutku posle konsolidacije [5].

Ekstramedularni relaps: registrovanje leukemijskih blasta ili promijelocita u CNS, koži ili drugim ekstramedularnim lokalizacijama, uz genetsku potvrdu [5].

Molekularni relaps je definisan kao *PML-RAR α* pozitivnost, procenjena PCRom, u dva nezavisna uzastupna uzorka, u razmaku od 2-4 nedelje, u bilo kom trenutku posle konsolidacije [5].

Rani relaps je definisan kao relaps tokom tri godine od postizanja KR [5].

4. REZULTATI

4.1. Demografske osobine bolesnika

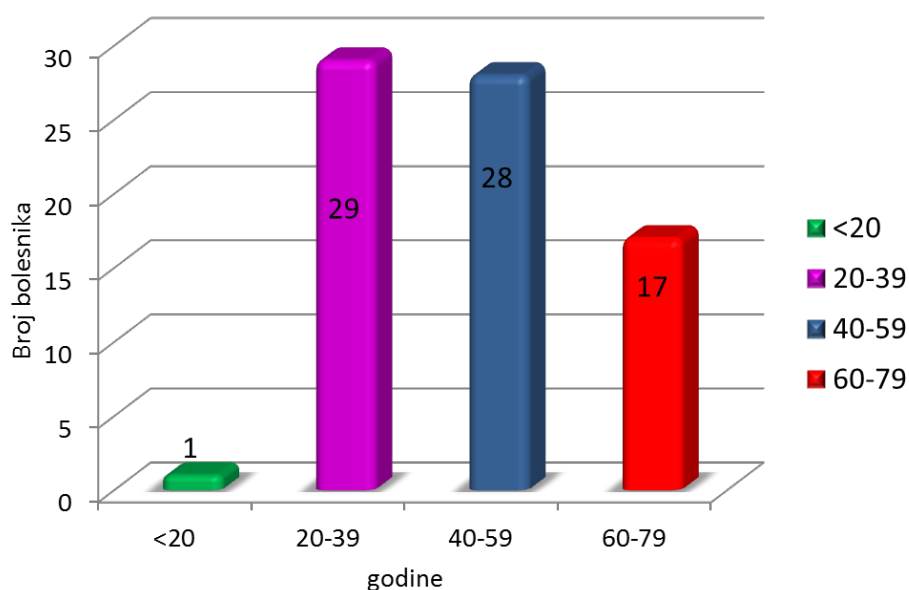
U periodu od 2004.-2014. godine, u Klinici za hematologiju KCS, dijagnostikovano je i lečeno 75 bolesnika sa APL (7-8 bolesnika, godišnje). Pritom, ukupan broj dijagnostikovanih pacijenata sa AML u toku jedne godine iznosio je oko 120.

4.1.1. Distribucija bolesnika prema polu

Studijsku grupu bolesnika činilo je 40 žena (53%) i 35 (47%) muškaraca.

4.1.2. Distribucija bolesnika prema životnoj dobi

Prosečna starost bolesnika iznosila je 45 godina (opseg: 19 -78). Starijih od 60 godina bilo je 14/75 (27%) bolesnika, a starijih od 70 bilo je 3/75 (4%), dok je samo jedan (1.33%) bolesnik bio stariji od 75 godina - Dijagram 1.



Dijagram 1: Distribucija bolesnika prema životnoj dobi

4.1.3. APL nastala posle prethodne primene citotoksične terapije

t-APL je imalo 3/75 bolesnika (4%) – Tabela 11.

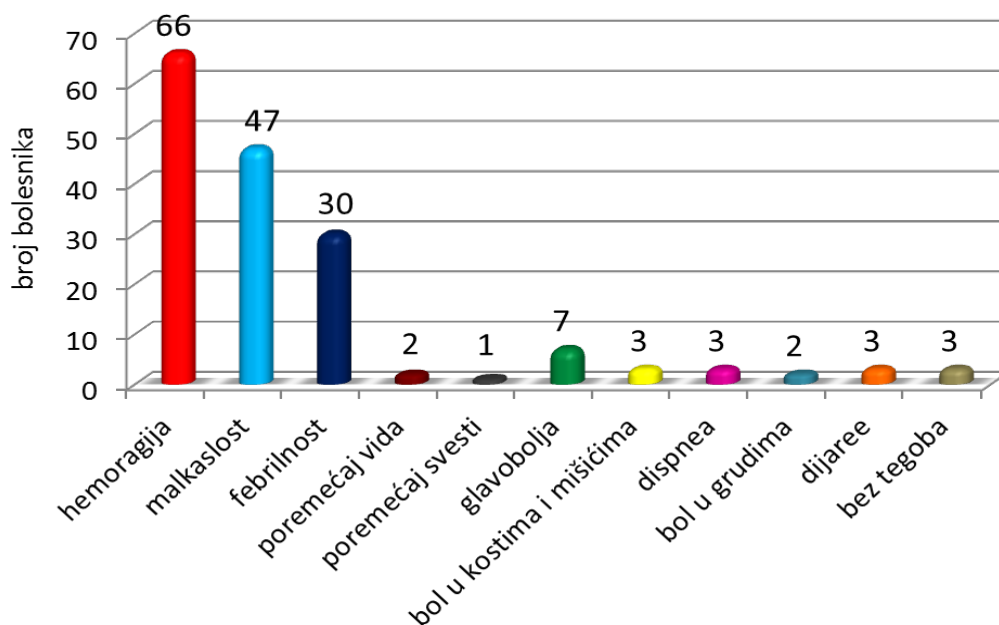
Tabela 11: Primarna dijagnoza, vreme njenog postavljanja i način lečenja

Primarna dijagnoza	Vreme od dijagnoze primarne bolesti do dijagnoze APL	Terapija primarne bolesti
Karcinom dojke	18 meseci	operacija, hemioterapija + radioterapija
Karcinom grlića materice	24 meseca	operacija i radioterapija
Multipla skleroza	8 meseci	mitoksantron

4.2. Kliničke osobine bolesnika

4.2.1. Tegobe na prijemu

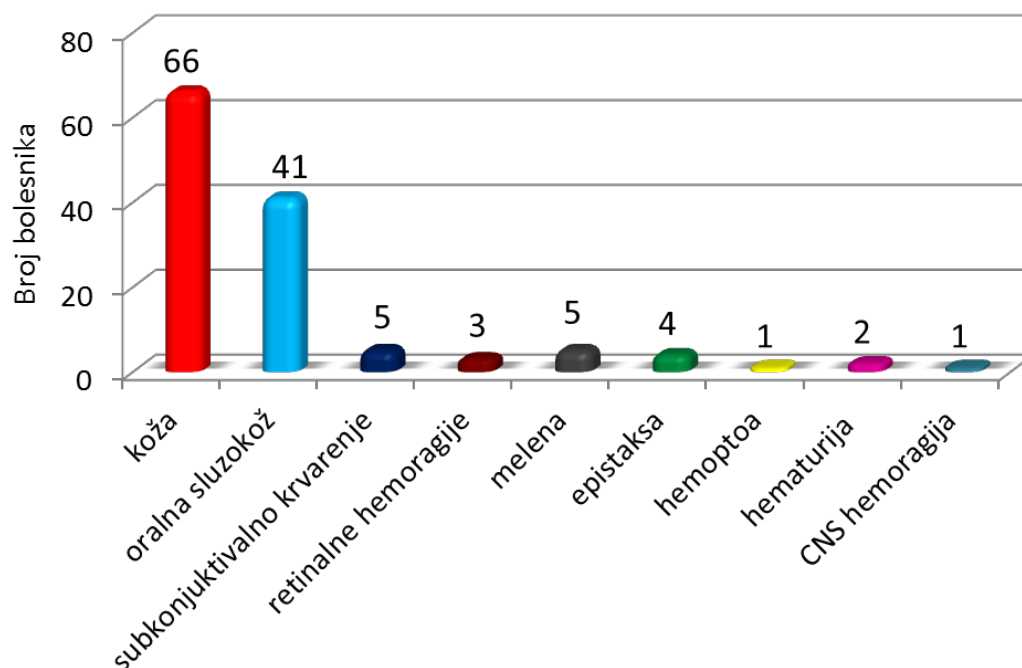
Najučestalija tegoba na prijemu bilo je krvarenje, koje je prijavilo 66/75 bolesnika (88%). Malaksalost i febrilnost su bile prisutne kod 47/75 (62.67%), odnosno 30/75 (40%) bolesnika. Ostale tegobe su bile znatno ređe zastupljene - Dijagram 2.



Dijagram 2: Distribucija bolesnika prema tegobama na prezentaciji

4.2.2. Hemoragijski sindrom na prijemu

Hemoragijski sindrom na prijemu imalo je 68/75 bolesnika (91%). Najčešća lokalizacija krvarenja bila je koža, kod 65/75 (87.67%) bolesnika. Distribucija organa zahvaćenih krvarenjem predstavljena je na Dijagramu 3.



Dijagram 3: Distribucija bolesnika prema lokalizaciji krvarenja

4.2.3. Poređenje kliničko-laboratorijskih osobina bolesnika sa i bez krvarenja na prezentaciji

Bolesnici sa i bez krvarenja na prezentaciji su se značajno razlikovali u pogledu broja leukocita ($17.98 \times 10^9/L$ vs. $1.86 \times 10^9/L$, $P = 0.040455$), broja trombocita ($35.56 \times 10^9/L$ vs. $65.57 \times 10^9/L$, $P = 0.00078$), vrednosti PT (62.62% vs. 78.29% , $p = 0.0010$) i ISTH DIK skora (5.62 vs. 4.23 , $P = 0.00012$) – Tabele 12 i 13. Prediktori krvarenja u univariјantnoj analizi bili su: broj leukocita $\geq 10 \times 10^9/L$ ($P = 0.03705$), broj trombocita $< 40 \times 10^9/L$ ($p = 0.04$), PT $\leq 50\%$ ($P = 0.0034$) i ISTH DIK skor ≥ 5 ($P = 0.01121$). Najznačajniji prediktivni faktor za nastanak krvarenja u multivariјantnoj Koksovoj proporcionalnoj regresiji bila je leukocitoza ($p = 0.013$, RR 1.679, CI 1.117–2.577).

Tabela 12: Poređenje demografskih parametara, parametara krvne slike i testova hemostaze kod bolesnika sa i bez krvarenja

Parametar	Bolesnici sa krvarenjem (N 68)	Bolesnici bez krvarenja (7)	P
Starost (godine, mediana)	45 (19-78)	41 (31-69)	0.85013
Pol, muški (N (%))	31 (45.59%)	4 (57.14%)	0.87
Leukociti (x10⁹/L, mediana)	17.98 (0.4-138)	1.86 (0.9-3.9)	0.040455
Leukociti > 10x10⁹/L (N (%))	24 (35.29%)	0	0.03705
Trombociti (x10⁹/L, mediana)	35.56 (0-137)	65.57 (14-135)	0.00078
Trombociti (x10⁹/L) < 40x10⁹/L (N (%))	47 (69.12%)	1 (14.28%)	0.04
Sanzov skor N(%)	Nizak	14 (20.59%)	0.04
	Umeren	29 (42.65%)	
	Visok	25 (36.76%)	
Fibrinogen (g/L, mediana)	2.45 (0.57-8.8)	3.044 (1.39-6.23)	0.69816
PT (% , mediana)	62.62 (21-124)	78.29 (59-97)	0.0010
PT ≤ 50% (N (%))	14 (20.59%)	0	0.0034
aPTT (s, mediana)	27.01 (21-36)	29.3 (24.1-35.5)	0.69
D – dimer (μg/L, mediana)	3344.65 (246-11340)	2184.43 (624-6000)	0.07146
ISTH DIK skor (mediana)	5.5 (4-7)	4 (2-6)	0.00012
ISTH DIK skor ≥ 5 (N (%))	59 (89.39%)	4 (57%)	0.01121
Kašnjenje bolesnika (dani, mediana)	20.8	13.29	0.420

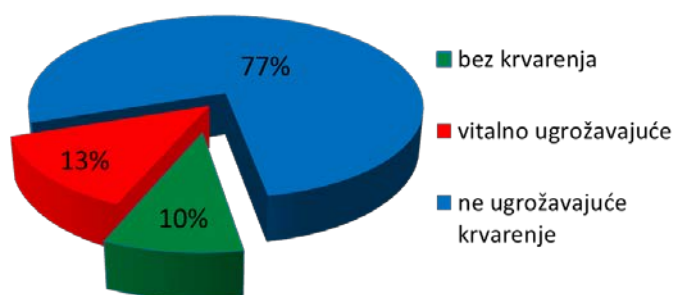
N: broj bolesnika, s: sekunde

Tabela 13: Poređenje morfološkog tipa, ekspresije imunofenotipskih markera, citogenetskog i molekularnogenetskog nalaza kod bolesnika sa i bez krvarenja

Prametar		Bolesnici sa krvarenjem (N 68)	Bolesnici bez krvarenja (N 7)	P
Varijantni tip (N (%))		8 (11.76%)	0	0.45
CD2 ekspresija (N (%))		14/61 (22.95%)	3/7 (42.86%)	0.98
CD56 ekspresija (N (%))		3/36 (8.3%)	1/4 (25%)	0.13
CD15 ekspresija (N (%))		16/61 (22.95%)	3/7 (42.86%)	0.34
CD34 ekspresija (N (%))		17/61 (27.87%)	2/7 (28.57%)	0.87
Dodatne citogenetske abnormalnosti (N (%))		12/66 (18.18%)	0	0.134
PML-RAR α (N (%))	bcr1	16/37 (43.24%)	5/6 (83.33%)	0.465
	bcr2	4/37 (10.81%)	0	
	bcr3	16/37 (43.24%)	1/6 (16.67%)	
FLT3 (N (%))	ITD	14/46 (30.4%)	2/6 (30%)	0.738
	D385	5/46 (10.87%)	0	0.630
Ekspresija WT1 gena	Broj replikacija	3680	2393	0.555
	Visok nivo (N (%))	8/28 (28.57%)	1/3 (33%)	0.378

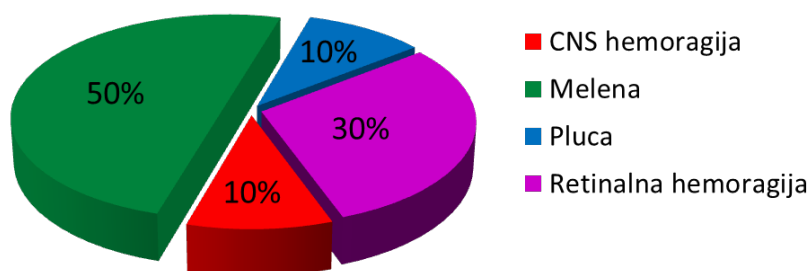
N: broj bolesnika,

Vitalno ugrožavajuće krvarenje ispoljilo je 10/75 bolesnika (13.33%) - Dijagram 4



Dijagram 4: Distribucija bolesnika prema intenzitetu krvarenja

Najčešća vitalno ugrožavajuća krvarenja bila su melene, potom retinalne hemoragije, dok je krvarenje u CNS i krvarenje u pluća nastalo kod pojedinačnih bolesnika- Dijagram 5.



Dijagram 5: Distribucija bolesnika sa vitalno ugrožavajućim krvarenjem, prema lokalizaciji krvarenja.

Nije bilo statistički značajne razlike u pogledu kliničko-laboratorijskih parametara između bolesnika sa vitalno ugrožavajućim krvarenjem i ostalim krvarenjima (Tabela 14).

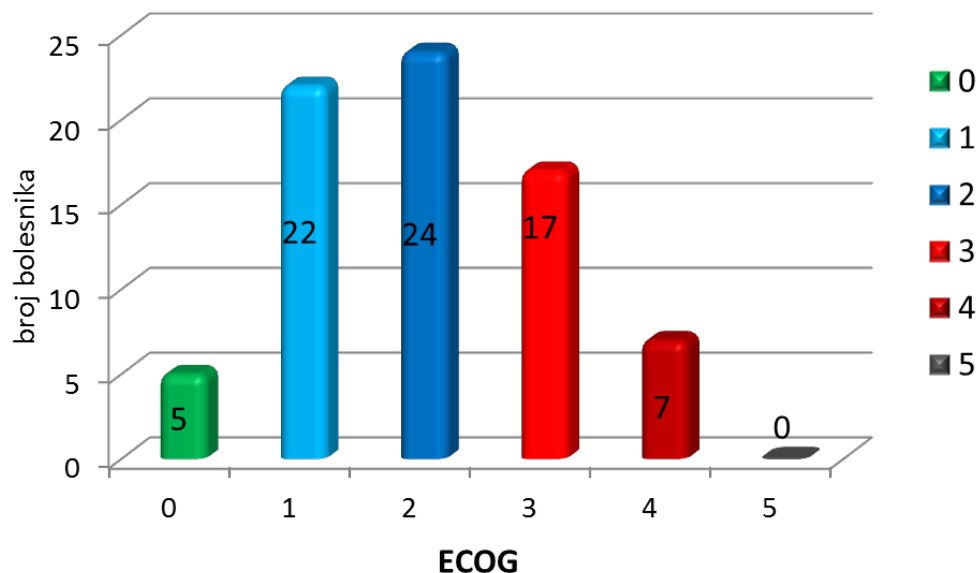
Tabela 14: Poređenje demografskih parametara i kliničko laboratorijskih parametara kod bolesnika sa vitalno ugrožavajućim i ostalim krvarenjima

Parametar (mediana)		Bolesnici sa vitalno ugrožavajućim krvarenjem (N 10)	Bolesnici sa ostalim krvarenjima (N 58)	P
Starost (godine, mediana)		45.2	45.15	0.99
Pol, muški (N (%))		5 (50%)	30 (51.7)	0.89
Leukociti ($\times 10^9/L$, mediana)		28.09	15.92	0.22
Leukociti $> 10 \times 10^9/L$ (N (%))		5 (50%)	17 (29.30)	0.29
Trombociti ($\times 10^9/L$, mediana)		39	34.17	0.53
Trombociti ($\times 10^9/L$) $< 40 \times 10^9/L$ (N (%))		3 (30%)	20 (34.48)	0.76
Sanzov skor (N (%))	Nizak	3 (30%)	11 (19.00%)	0.29
	Umeren	2 (20%)	27 (46.55%)	
	Visok	5 (50%)	20 (34.48%)	
Fibrinogen (g/L, mediana)		2.56	3.10	0.79
PT (% , medijana)		72	60	0.47
PT $\leq 50\%$ (N (%))		2 (0%)	10 (17.24%)	0.67
aPTT (s, medijana)		26.10	27.16	0.54
D – dimer ($\mu g/L$, medijana)		3464	2644	0.37
ISTH DIK skor (mediana)		5	6	0.23
ISTH DIK skor ≥ 5 (N (%))		7 (70%)	51 (87.93%)	0.06
Varijantni tip (N (%))		2 (20%)	6 (10.34%)	0.06
CD2 ekspresija (N (%))		1 (10%)	6 (10.34%)	0.75
CD56 ekspresija (N (%))		0	6 (10.34%)	0.51
CD15 ekspresija (N (%))		1 (10%)	13 (22.4%)	0.23
CD34 ekspresija (N (%))		1 (10%)	16 (27.58%)	0.39
Dodatne citogenetske abnormalnosti (N)		1 (10%)	11 (18.97%)	0.47
PML-RAR α (N (%))	bcr1	1/2 (50%)	23 (57.5%)	0.65
	bcr2	0	4 (10%)	
	bcr3	1/2 (50%)	13/40 (32.5%)	
FLT3 (N (%))	ITD	2/6 (30%)	12/46 (28.26%)	0.62
	D385	0	5/52 (9.62%)	0.41
Ekspresija WT1 gena	Broj replikacija	4905	4234	0.65
	Visok nivo (N (%))	1 (50%)	8 (30.7%)	0.89
Kašnjenje bolesnika (dani, mediana)		19.75	20.98	0.82
Medicinsko kašnjenje (dani, mediana)		8.86	7.63	0.62
Kašnjenje terapije (dani, mediana)		1.75	1.58	0.75

N: broj bolesnika, s: sekund

4.2.4. Distribucija bolesnika prema opštem funkcionalnom stanju

ECOG skor 3 i 4 imala su 24/75 (32%) bolesnika - Dijagram 6.



Dijagram 6: Distribucija bolesnika prema vrednostima ECOG skora

4.3. Distribucija bolesnika prema parametrima krvne slike

Tabela 15: Distribucija bolesnika prema vrednostima parametara krvne slike

Parametar	Jedinica	Normalna vrednost	Srednja vrednost	Mediana	Min	Max	SD
Hemoglobin	g/L	> 120	99.39	101.00	60.00	138.00	18.62
Leukociti	$\times 10^9/L$	4-10	16.24	2.90	0.40	131.60	27.84
Blasti	%	0	13.75	7.00	0	97.00	19.26
Promijelociti	%	0	27.10	19.00	0	90.00	26.12
Trombociti	$\times 10^9/L$	150-450	37.92	29.00	1	137.00	28.91

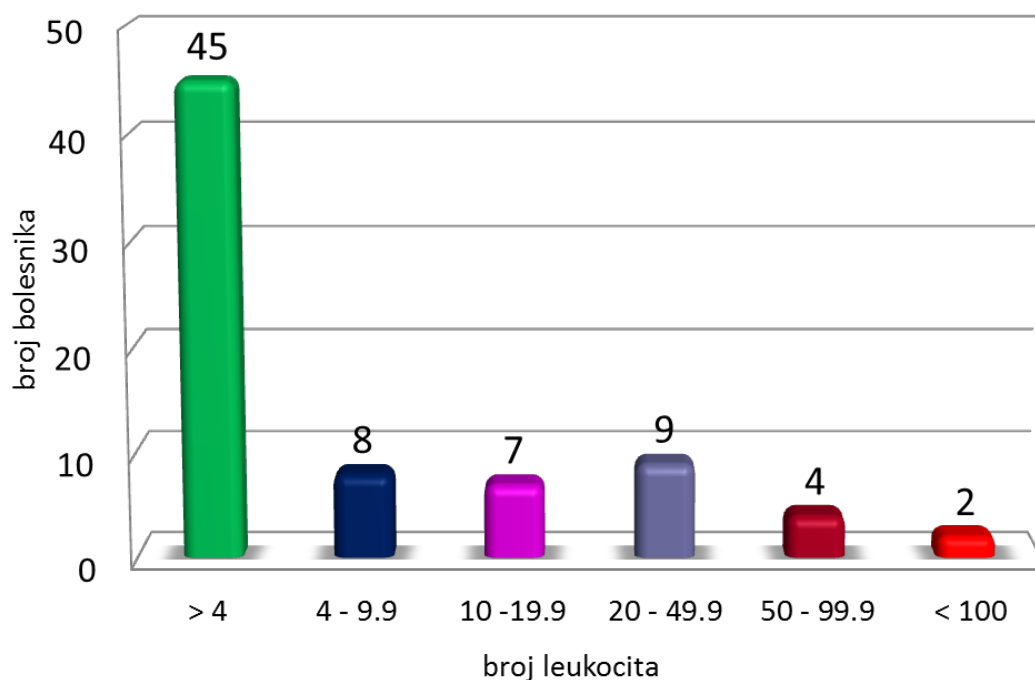
4.3.1. Koncentracija hemoglobina

Prosečna vrednost koncentracije hemoglobina (Hb) u studijskoj grupi iznosila je 99.39 g/L. Normalnu vrednost Hb imalo je samo 11/75 (15%) bolesnika, dok je anemija bila

prisutna kod većine bolesnika, njih 64/75 (85%). Koncentraciju Hb između 100 - 120 g/L imalo je 29/75 (39%), između 80 - 100 g/L 25/75 (33%) i < 80 g/L 10/75 (13%) bolesnika.

4.3.2. Broj leukocita

Prosečna vrednost broja leukocita iznosila je $16.24 \times 10^9/L$. Leukopenično (Leukociti < $4 \times 10^9/L$) je bilo 45/75 (60%) bolesnika. Broj leukocita $\geq 20 \times 10^9/L$ imalo je 22/75 (29%) bolesnika, njih 6/75 (8%) imalo je broj $\geq 50 \times 10^9/L$, dok su samo dva bolesnika (3%) imala ekstremnu leukocitozu ($\geq 100 \times 10^9/L$) - Dijagram 7.



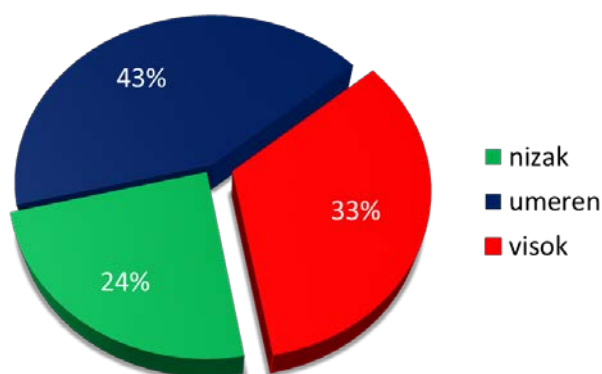
Dijagram 7: Distribucija bolesnika prema broju leukocita

4.3.3. Broj trombocita

Svi bolesnici su bili trombocitopenični a prosečna vrednost broja trombocita na prijemu iznosila je $37.92 \times 10^9/L$. Broj trombocita između 100 - $150 \times 10^9/L$ imalo je 4/75 (5%) bolesnika, između $50-99 \times 10^9/L$ 12/75 (16%) bolesnika, dok je čak 59/75 (79%) bolesnika imalo broj trombocita < $50 \times 10^9/L$. Broj trombocita < $20 \times 10^9/L$ imao je 21/75 (28%) bolesnika.

4.3.4. Sanzov skor

Nizak rizik za nastanak RB prema Sanzovom skoru imalo je 18/75 (24%) bolesnika, umereni rizik njih 32/75 (43%), dok je 24/75 (33%) bolesnika pripadalo grupi visokog rizika - Dijagram 8.



Dijagram 8: Distribucija bolesnika prema vrednosti Sanzovog skora

4.4. Distribucija bolesnika prema vrednostima testova hemostaze

Tabela 16: Distribucija bolesnika prema vrednostima testova hemostaze

	Jednica	Normalna vrednost	Srednja vrednost	Mediana	Min	Max	SD
Fibrinogen	g/L	2-4	2.99	2.70	0.57	8.80	1.53
PT	%	75-125	64	64.00	21.00	124.00	17.76
aPTT	s	25-35	27.22	26.00	21.00	36.00	3.86
D-dimer	µg/L	>250	3225.25	2371.00	267	11340	2621.6

4.4.1. Fibrinogen

Prosečna vrednost fibrinogena iznosila je 2.99 g/L. Tri bolesnika (4%) imala su nivo fibrinogena u serumu < 1 g/L.

4.4.2. Protrombinsko vreme

Prosečna vrednost PT iznosila je 64%. Normalnu vrednost PT imalo je 17/75 (23%), vrednost između 50 - 75% imalo je 38/75 (50%) bolesnika, dok je vrednost PT <50% uočena kod 20/75 (27%) bolesnika.

4.4.3. Aktivirano parcijalno tromboplastinsko vreme

Prosečna vrednost aPTT bila je 27.22 s. Svi bolesnici su imali normalne vrednosti ovog testa.

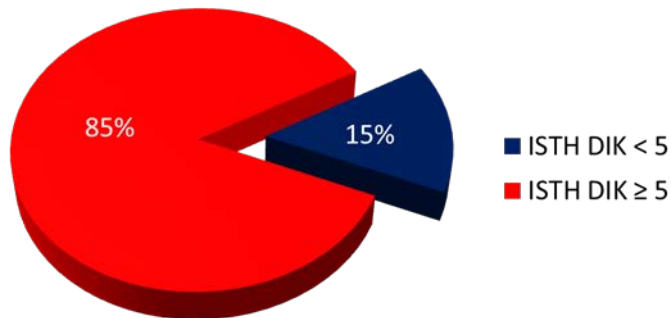
4.4.4. D-dimer

Prosečna vrednost D-dimera iznosila je 3225.25 µg/L (12 puta više od normale). Svi bolesnici su imali povišen D-dimer. Jedan bolesnik (1.33%) imao je D-dimer povišen < 2

puta, 6/75 (8%) imalo je D-dimer povišen 2-4 puta, dok su preostali imali D-dimer povišen \geq 4 puta

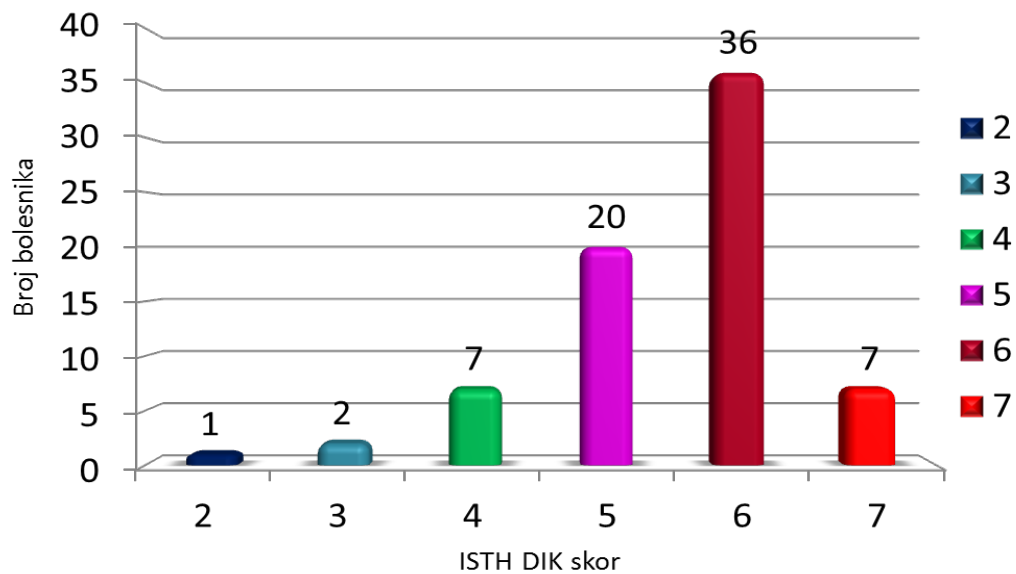
4.4.5. ISTH DIK skor

Prema vrednosti ISTH DIK skora, 62/73 (85%) bolesnika imalo je DIK (ISTH DIK skor \geq 5 - Dijagram 9.



Dijagram 9: Distribucija bolesnika prema prisutnosti DIK-a

Vrednost ISTH skora 6 imalo je 36/73 (49%) bolesnika, dok je skor 7 imalo 7/73 (9.5%) bolesnika - Dijagram 10.

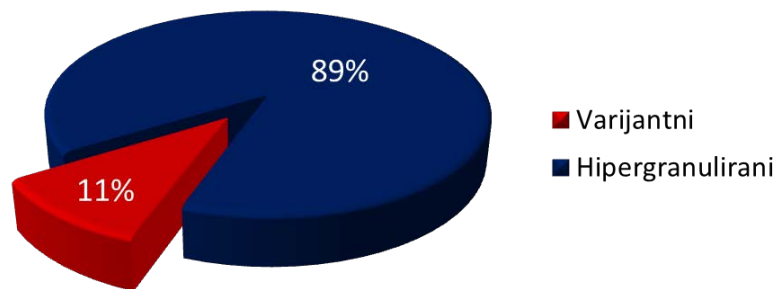


Dijagram 10: Distribucija bolesnika prema vrednosti ISTH DIK skora

4.5. Dijagnostički testovi

4.5.1. Mijelogram

67 (89%) bolesnika je imalo imalo klasični, hipergranulirani tip APL, dok je osam bolesnika (11%) imalo varijantni oblik bolesti - Dijagram 11.



Dijagram 11: Distribucija bolesnika prema citološkom tipu APL

Bolesnici sa M3v imali su u proseku veći broj leukocita ($10.16 \times 10^9/L$ vs. $67.11 \times 10^9/L$, $P = 0.0000$), veći procenat blasta u krvnoj slici (9.9% vs. 46%, $P = 0.0000$), češće visok Sanzov skor (25.37% vs. 100, $P = 0.0006$), nižu koncentraciju fibrinogena (3.09 g/L vs. 2.14 g/L, $P = 0.04$), prosečno veći ISTH DIK skor (5.24 vs. 6.26, $P = 0.017$), odnosno veći broj bolesnika sa ISTH DIK skorom ≥ 6 (52.24% vs. 100%, $P = 0.01$). Takođe su uočene češća ekspresija CD34 (24.19% vs. 66%, $P = 0.03$), CD2 (20.98% vs 66%, $P = 0.02$) i CD56 antigena na leukemijskim ćelijama (11.43% vs 66%, $P = 0.01$), kao i češća zastupljenost *FLT3-ITD* mutacije (27.66% vs 60%, $P = 0.049$). Poređenje bolesnika sa varijantnim i klasičnim oblikom APL prikazano je u Tabeli 17.

Tabela 17: Razlike između bolesnika sa klasičnim i varijantnim oblikom APL, u pogledu kliničko-laboratorijskih parametara

Parametar		Hipergranulirani (N 67)	Varijanti oblik (N 8)	P
Starost (godine, mediana)		45.70	39.63	0.29
Leukociti (x10⁹/L, mediana)		10.16	67.11	0.0000
Blasti (PK, %, mediana)		9.9	46	0.0000
Promijelociti (PK, %, mediana)		25.43	40.63	0.12
Trombociti (x10 ⁹ /L, mediana)		39.27	26.75	0.25
Sanzov skor (N (%))	Nizak	18 (26.87%)	0	0.0006
	Umeren	32 (47.72%)	0	
	Visok	17 (25.37%)	8 (100%)	
Fibrinogen (g/L, mediana)		3.09	2.14	0.04
D – dimer (µg/L, mediana)		3103	4199	0.27
ISTH DIK skor (mediana)		5	6	0.017
ISTH DIK skor ≥ 6 (N (%))		35 (52.24%)	8/8 (100%)	0.01
CD34 ekspresija (N (%))		15/62 (24.19%)	4/6 (66%)	0.03
CD2 ekspresija (N (%))		13/52 (20.98%)	4/6 (66%)	0.02
CD56 ekspresija (N (%))		4/35 (11.43%)	2/3 (66%)	0.01
CD15 ekspresija (N (%))		18/61 (58%)	0	0.12
Dodatne citogenetske abnormalnosti (N (%))		11/65 (16.92%)	1/7 (14.29%)	0.59
PML-RARα (N (%))	bcr1	20/40 (50%)	½ (50%)	0.80
	bcr2	4/40 (10%)	0	
	bcr3	16/40 (40%)	½ (50%)	
FLT3 (N (%))	ITD	13/47 (27.66%)	3/5 (60%)	0.049
	D385	5/47 (10.63%)	0	0.44
Ekspresija WT1 gena	Broj replikacija	3613	3031	0.88
	Visok nivo (N (%))	9/30 (30%)	0	0.52

N: broj bolesnika, PK: periferna krv

4.5.2. Imunofenotipizacija

Distribucija bolesnika prema ekspresiji antigena na leukemijskim ćelijama prikazana je u Tabeli 18.

Table 18: Distribucija bolesnika prema ekspresiji antigena na leukemijskim ćelijama

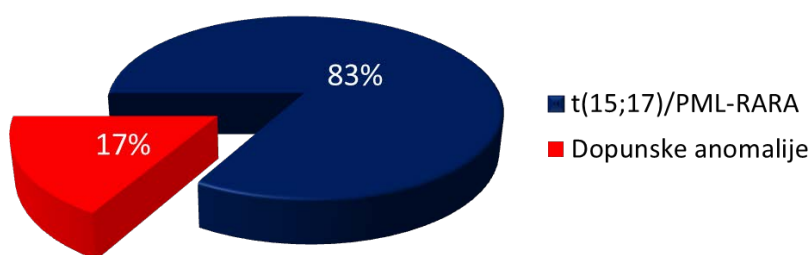
Antigen	Ukupan broj bolesnika	Broj pozitivnih bolesnika (%)	Broj negativnih bolesnika (%)
CD34	68	19 (28%)	49 (72%)
HLA-DR	68	4 (6%)	64 (94%)
CD117	68	62(91%)	6 (9%)
CD13	68	68 (100%)	0
CD33	68	67(99%)	1 (1%)
cMPO	46	42 (91%)	4 (9%)
CD14	68	1 (1%)	67 (99%)
CD64	68	46 (68%)	22 (32%)
CD11b	67	5 (7%)	62 (93%)
CD11c	35	1 (3%)	34 (97%)
CD11a	30	8 (27%)	22 (73%)
CD15	68	19 (28%)	49 (72%)
CD66	37	0	37 (100%)
CD16	37	0	37 (100%)
CD41	63	0	63 (100%)
CD235a (GPA)	63	0	63(100%)
CD7	68	0	68 (100%)
CD2	67	17 (25%)	50 (75%)
mCD3	54	0	54 (100%)
cCD3	37	0	37 (100%)
CD38	26	13 (50%)	13 (50%)
CD4	39	6 (18%)	32 (82%)
CD56	38	6 (16%)	32 (84%)
CD19	68	1 (1%)	67 (99%)
mCD22	33	0	33 (100%)
cCD79a	35	0	35 (100%)
CD24	35	0	35 (100%)

Ekspresija CD56 antigena na leukemijskim ćelijama registrovana je kod 6/38 (16%) ispitanih bolesnika. Sa druge strane, CD34 pozitivnost je registrovana kod 19/68 bolesnika (28%), CD2 kod 17/67 (25%), dok je CD34/CD2 koekspresija bila prisutna kod 12/67 (18%) bolesnika. Pritom, CD15 je ekspimiralo 19/68 (28%) bolesnika.

4.5.3. Citogenetske ananalize

4.5.3.1. Tehnika traka

Analiza je bila izvodljiva kod 72/75 bolesnika (96%), dok kod preostala tri nije bilo metafaza. Pet bolesnika (6.7%) imalo je normalan kariotip. Kod 55/72 (76%) bolesnika uočena je izolovana t(15;17). Dopunske citogenetske anomalije (DCA) su uočene kod 12/72 (17%) bolesnika. Prisustvo PML-RAR α potvrđeno je RT-PCR metodom kod svih bolesnika sa normalnim kariotipom kao i kod onih bolesnika kod kojih je konvencionalna citogenetska analiza bila neuspešna - Dijagram 12.



Dijagram 12: Distribucija bolesnika prema prisustvu DCA

Najčešća DCA +8, uočena je kod pet bolesnika (41.67% bolesnika sa DCA; kod 6.94% svih bolesnika). Ostale citogenetske anomalije su bile zastupljene kod pojedinačnih bolesnika - Tabela 19.

Tabela 19: Dodatne citogenetske anomalije

Dodatna citogenetska anomalija	Broj bolesnika
+ 8	5
add(16) p	1
+mar	1
+C	1
-17,+mar	1
der(3),-6,add(7q)	1
der(10),t(10;12)(q?;q?),-12,t(15;17)(q22;q12-21)+mar	1

Bolesnici sa DCA su statistički značajno češće eksprimirali CD56 na leukemijskim ćelijama, u odnosu na bolesnike sa izolovanom t(15;17) (50% vs. 11.76, P = 0.04). Međutim, bolesnici sa DCA su takođe značajno ređe imali mutiran *FLT3-ITD* gen (10% vs. 30%, P =

0.009). Između bolesnika sa i bez DCA nisu uočene statistički značajne razlike u pogledu ostalih kliničko-laboratorijskih parametara - Tabela 20.

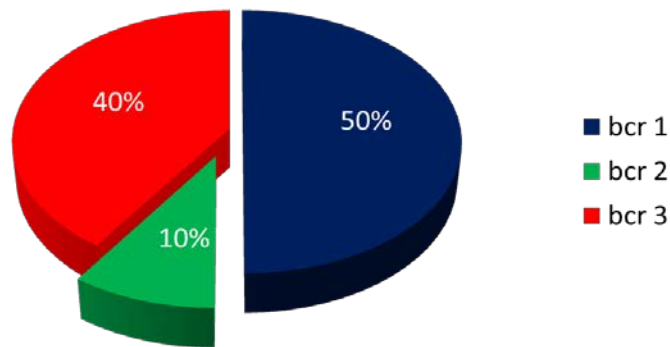
Tabela 20: Razlike između bolesnika sa i bez DCA u pogledu kliničko-laboratorijskih karakteristika

Parametar		DCA (N 12)	Bez DCA (N 60)	P
Starost (godine, mediana)		42.33	47.85	0.58
Leukociti ($\times 10^9/L$, mediana)		23.7	15.55	0.29
Blasti (PK, %, mediana)		15.5	14.15	0.73
Promijelociti (PK, %, mediana))		38.42	25.28	0.06
Trombociti ($\times 10^9/L$, mediana)		39.67	34.87	0.86
Sanzov skor (N (%))	Nizak	1 (8.3%)	17 (28.33%)	0.21
	Umeren	5 (41.67%)	26 (43.33%)	
	Visok	6 (50%)	17 ((28.33%)	
Fibrinogen (g/L, mediana)		2.28	3.25	0.06
D – dimer ($\mu g/L$, mediana)		3685.17	3306.51	0.47
ISTH DIK skor ≥ 5 (N (%))		11(91.67%)	50/60 (83.33%)	0.44
CD34 ekspresija (N (%))		1/12 (8.33%)	18/54 (33.33%)	0.08
CD2 ekspresija (N (%))		1/11 (9.09%)	11/54 (20.37%)	0.14
CD56 ekspresija (N (%))		2/4 (50%)	4/34 (11.76%)	0.04
CD15 ekspresija (N (%))		4/12 (33.33%)	13/53 (24.53%)	0.53
Varijantni oblik bolesti (N (%))		1/7 (14.29%)	11/58 (19.00%)	0.59
FLT3 (N (%))	ITD	1/10 (10%)	15/50 (30%)	0.009
	D385	1/10 (10%)	4/50 (8%)	0.79
Ekspresija WT1 gena	Broj replikacija	2193.33	4194.16	0.61
	Visok nivo (N (%))	6/25 (24%)	0/3	0.24

N: broj bolesnika, PK: periferna krv

4.5.3.2. PCR za *PML-RAR α*

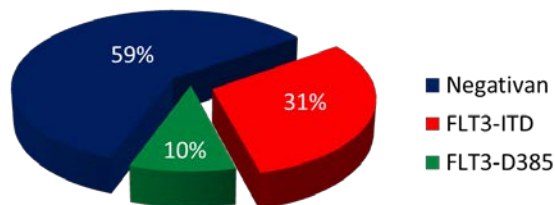
PCR na translokaciju *PML-RAR α* urađen je kod 42 bolesnika. Dugi tip transkripta (bcr1) imao je 21/42 (50%) bolesnika, intermedijarni (bcr2) 4/42 (10%) i kratki (bcr3) 17/42 (40%) bolesnika - Dijagram 13.



Dijagram 13: Distribucija bolesnika prema tipu PML-RARA transkripta

4.5.3.3. PCR za mutaciju *FLT3* gena

PCR za mutacije u *FLT3* genu je urađen kod 52 bolesnika, pri čemu je 31/52 (60%) bolesnik bio negativan, *FLT3-ITD* mutaciju je eksprimalo 16/52 (30%) bolesnika, a *FLT3-D385* mutaciju 5/52 (10%) bolesnika - Dijagram 14.



Dijagram 14: Distribucija bolesnika prema prisustvu mutacije u *FLT3* genu

Poređenje FLT3 pozitivnih i negativnih bolesnika

FLT3-ITD pozitivnost je bila udružena sa prosečno većim brojem leukocita ($26.35 \times 10^9/L$ vs. $10.31 \times 10^9/L$, $P = 0.0020$), češćom zastupljenošću M3v (18.75% vs. 6.45%, $P = 0.049$), češćom ekspresijom CD2 (60% vs. 14.71%, $P = 0.0001$) i CD56 antigena (30.77% vs. 5.5%, $P=0.008$), manjom učestalošću DCA (6.25% vs. 25%, $P = 0.009$), većom ekspresijom WT1 gena (5806 vs. 2472, $P = 0.03$) i većom učestalošću tromboza (31.25%

vs. 22.58%, P=0.05). Poređenje kliničko laboratorijskih parametara bolesnika sa i bez *FLT3-IDT* mutacije, prikazano je u Tabeli 21.

Tabela 21: Poređenje *FLT3-IDT* pozitivnih i *FLT3* negativnih bolesnika, u pogledu kliničko-laboratorijskih karakteristika

Parametar		FLT3-IDT pozitivni (N 16)	FLT3 negativni (N 31)	P
Starost (godine, mediana)		42.81	43.55	0.83
Leukociti (x10⁹/L, mediana)		26.35	10.31	0.0020
Blasti (PK, %, mediana)		16.75	11	0.36
Promijelociti (PK, %, mediana)		25.625	27.94	0.94
Trombociti (x10 ⁹ /L, mediana)		38	39.90	0.99
Sanzov skor (N (%))	Nizak	4 (25%)	10 (32.26%)	0.76
	Umeren	5 (31.25%)	14 (45.16%)	
	Visok	7 (43.75%)	12 (38.71%)	
Fibrinogen (g/L, mediana)		2.69	2.93	0.39
D-dimer (μg/L, mediana)		3088	3401	0.42
ISTH DIK skor ≥ 5 (N (%))		14/16 (87.5%)	25/31 (80.65%)	0.70
Varijantni tip (N (%))		3/16 (18.75%)	2/31 (6.45%)	0.049
CD2 ekspresija (N (%))		9/15 (60%)	5/34 (14.71%)	0.0001
CD56 ekspresija (N (%))		4/13 (30.77%)	1/18 (5.5%)	0.008
CD15 ekspresija (N (%))		3/14 (21.43%)	7/30 (23.3%)	0.52
Dodatne citogenetske abnormalnosti (N (%))		1/16 (6.25%)	8/31 (25%)	0.009
PML-RARA (N (%))	bcr1	1/7 (14.28%)	14/19 (73.68%)	0.328
	bcr2	2/7 (28.57%)	2/19 (10.53%)	
	bcr3	4/7 (57.14%)	3/19 (15.79%)	
Ekspresija WT1 gena	Broj replikacija	5806	2472	0.03
	Visok nivo(N (%))	6/9 (66.67%)	3/19 (15.79%)	0.0007
Tromboze (N (%))		5/16 (31.25%)	7/31 (22.58%)	0.05

N: broj bolesnika, PK: periferna krv,

Sa druge strane, nisu uočene značajne razlike u pogledu kliničko-laboratorijskih parametara, između bolesnika sa i bez *FLT3-D385* mutacije (Tabela 22).

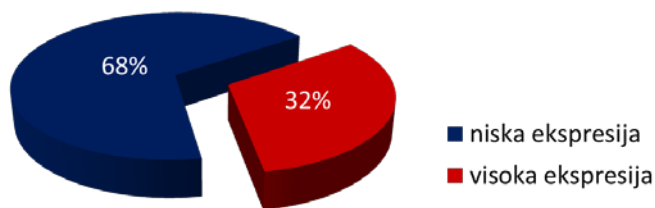
Tabela 22: Poređenje *FLT3-D385* pozitivnih i *FLT3* negativnih bolesnika, u pogledu kliničko- laboratorijskih parametara

Parametar		FLT3-D385 pozitivni (N 5)	FLT3 negativni (N 31)	P
Starost (godine, mediana)		45.4	43.55	0.895
Leukociti ($\times 10^9/L$, mediana)		37.94	10.31	0.342
Blasti (PK, %, mediana)		15.2	11	0.817
Promijelociti (PK, %, mediana)		43.6	27.94	0.158
Trombociti ($\times 10^9/L$, mediana)		43.80	39.90	0.222
Sanzov skor (N (%))	Nizak	0	10 (32.26%)	0.428
	Umeren	1/5 (20%)	14 (45.16%)	
	Visok	4/5 (80%)	12 (38.71%)	
Fibrinogen (g/L, mediana)		3.2	2.93	0.565
D-dimer ($\mu g/L$, mediana)		6374	3401	0.518
ISTH DIK skor ≥ 5 (N (%))		5/5 (100%)	25/31 (80.65%)	0.965
Varijantni tip (N (%))		0	2/31 (6.45%)	0.965
CD2 ekspresija (N (%))		0	5/34 (14.71%)	0.421
CD56 ekspresija (N (%))		0	1/18 (5.5%)	0.298
CD15 ekspresija (N (%))		1/5 (20%)	7/30 (23.3%)	0.154
Dodatne citogenetske abnormalnosti (N (%))		1/4 (25%)	8/31 (25%)	0.954
PML-RARA (N (%))	bcr1	0	14/19 (73.68%)	0.965
	bcr2	0	2/19 (10.53%)	
	bcr3	2/2 (100%)	3/19 (15.79%)	
Ekspresija WT1 gena	Broj replikacija	13189	2472	0.923
	Visok nivo (N (%))	1/1 (100%)	3/19 (15.79%)	0.765

N: broj bolesnika, PK: periferna krv

4.5.3.4. PCR za WT1 gen

Ekspresija WT1 gena je bila statistički značajno veća kod obolelih od APL, u poređenju sa zdravom kontrolom (4123.57 ± 725.91 , opseg 13.64-14164.58 vs. 1.95 ± 1.18 , opseg 0.06-8.77, $p < 0,001$). Visoku inicijalnu WT1 ekspresiju imalo je 9/28 (32%) bolesnika – Dijagram 15.



Dijagram 53: Distribucija bolesnika prema nivou WT1 ekspresije

Bolesnici sa inicijalno visokom ekspresijom WT1 gena imali su statistički značajno veći broj leukocita ($16.34 \times 10^9/L$ vs. $4.94 \times 10^9/L$, $P = 0.003$), viši Sanzov skor (5/9 (55.6%) vs. 2/19 (10.5%), $P = 0,001$), češći bcr3 tip *PML-RAR α* transkripta (6/9 (66.7%) vs 4/19 (21.15%), $P = 0,05$) i češće prisutnu *FLT3-ITD* mutaciju (4/9 (44.4%) vs. 2/19 (10.5%), $P = 0,03$), u poređenju sa bolesnicima sa inicijalno niskim nivoom WT1 ekspresije – Tabela 23.

Tabela 23: Poređenje bolesnika sa inicijalno niskim i visokim nivom WT ekspresije, u pogledu kliničko-laboratorijskih karakteristika

Parametar		Visoka WT1 ekspresija (N 9)	Niska WT1 ekspresija (N 19)	P
Starost (godine, mediana)		42 (26-66)	46 (19-73)	0.809
Leukociti (x10⁹/L, mediana)		16.34 x10⁹/L	4.94 x10⁹/L	0.003
Blasti (PK, %, mediana)		10.00 (0-25)	3.0 (0-39)	0.847
Promijelociti (PK, %, mediana)		27(0-45)	5(0-58)	0.847
Trombociti (x10 ⁹ /L, mediana)		43 (15-92)	47(10-103)	0.764
Sanzov skor (N (%))	Nizak	3/9 (33.5%)	8/19 (42%)	0.001
	Umeren	1/9 (11%)	10/19 (53%)	
	Visok	5/9 (55.5%)	1/19 (5%)	
Fibrinogen (g/L)		3.00 (1.21-5.45)	3.27 (1.56-60.00)	0.562
D-dimer (μg/L, mediana)		1120 (16.73-10000)	1345.00 (12.17-10000)	0.809
ISTH DIK skor (mediana)		5	6	0.505
CD2 ekspresija (N (%))		3/9 (30%)	3/19 (15.79%)	0.291
CD56 ekspresija (N (%))		1/8 (12.5%)	1/16 (6.25%)	0.602
CD15 ekspresija (N (%))		2/9 (22.22%)	3/19 (15.79%)	0.678
Dodatne citogenetske abnormalnosti (N (%))		0	1/19 (5.26%)	0.483
PML-RARα (N (%))	bcr1	2/9 (22.3%)	12/19 (63%)	0,05
	bcr2	1/9 (11%)	3/19 (16%)	
	bcr3	6/9 (66.7%)	4/19 (21.1)	
FLT3 (N (%))	ITD	4/9 (44.4%)	2/19 (10.5%)	0,03
	D385	1/9 (11.11%)	3/19 (15.79%)	0.963

N: broj bolesnika, PK: periferna krv

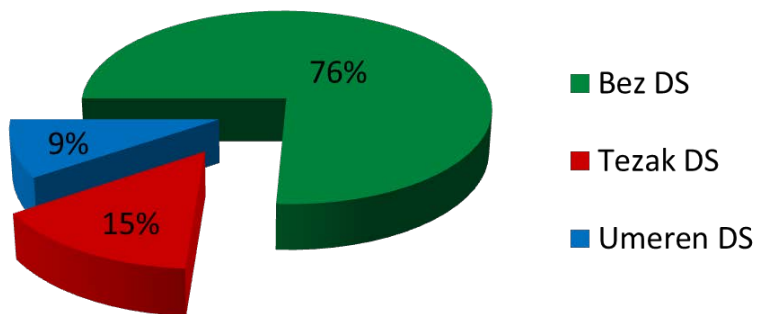
4.6. Lečenje

Prosečno "vreme kašnjenja bolesnika" iznosilo je 16 dana (opseg: 1-120), prosečno "medicinsko kašnjenje" iznosilo je 8.5 dana (opseg: 1-20) i prosečno "kašnjenje lečenja" iznosilo je 0 dana (opseg: 0-5).

U periodu od septembra 2004. do avgusta 2010. godine, 42 *de novo* bolesnika sa APL su lečena po protokolu PETHEMA APL 99, sa prosečnom dužinom praćenja od 62 meseca (opseg: 0-122 meseca). Trideset tri bolesnika, dijagnostikovana u periodu septembar 2010. - juni 2014. lečena su primenom PETHEMA APL 2005 protokola, sa prosečnom dužinom praćenja od 19 meseci (opseg 0 – 54 meseca).

4.6.1. Diferencijacioni sindrom

Diferencijacioni sindrom (DS) se razvio kod 18/75 (24%) bolesnika i to teškog stepena kod 12/18 (67%) i umerenog kod 6 (38%) bolesnika - Dijagram 16. DS sa fatalnim ishodom je registrovan kod 4/18 (22%) bolesnika. Pojava DS je registrovana u proseku 5. dana od početka terapije (opseg: 1-24).



Dijagram 16: Učestalosti diferencijacionog sindroma i stepen njegove težine.

Bolesnici koji su razvili DS imali su u proseku veći inicijalni broj leukocita ($20.25 \times 10^9/L$ vs. $14.97 \times 10^9/L$, $P = 0.05$), češće visok Sanzov skor (56% vs. 27%, $P = 0.007$), veći procenat promijelocita u perifernoj krvi (39.44% vs. 23.05%, $P = 0.02$) i češće varijantni oblik bolesti (22% vs. 7%, $P = 0.03$). U pogledu ostalih kliničkih i laboratorijskih markera nije bilo razlike između pacijenata sa i bez DS – Tabela 24 i 25.

Tabela 24: Poređenje bolesnika sa i bez diferencijacionog sindroma prema demografskim karakteristikama, parametrima krvne slike i testovima hemostaze

Parametar (mediana)		Bolesnici sa DS (N 18)	Bolesnici bez DS (N 57)	P
Starost (godine, mediana)		41	46	0.174
Profilaksa kortikosteroidima (N (%))		8 (44%)	20 (35%)	0.497
Leukociti ($\times 10^9/L$, mediana)		20.25	14.97	0.05
Leukociti $> 10 \times 10^9/L$ (N (%))		9 (50%)	9 (16%)	0.05
Blasti (PK, %, mediana)		9.34	15.12	0.27
Promijelociti (PK, %, mediana)		39.44	23.05	0.02
Trombociti ($\times 10^9/L$, mediana)		41.38	36.80	0.56
Sanzov skor (N (%))	Nizak	6/18 (33%)	12/57 (21%)	0.007
	Umeren	2/18 (11%)	30/57 (52%)	
	Visok	10/18 (56%)	15/67 (27%)	
Fibrinogen (g/L, mediana)		2.748	3.064	0.75
D-dimer ($\mu g/L$, mediana)		3121	3259	0.19
ISTH DIK skor (mediana)		5	5	0.259
ISTH DIK skor ≥ 6 (N (%))		13 (72.22%)	24 (42.10%)	0.00893
Tromboza (N (%))		3/17 (18%)	12/57 (21%)	0.49

N: broj bolesnika, PK: periferna krv

Tabela 25: Poređenje bolesnika sa i bez diferencijacionog sindroma prema citološkim, imunofenotipskim i molekularno-genetskim parametrima

Parametar		Bolesnici sa DS (N 18)	Bolesnici bez DS (N 57)	P
Varijantni tip (N (%))		4/18 (22%)	4/57 (7%)	0.03
CD2 ekspresija (N (%))		6/15 (40%)	11/51 (22%)	0.25
CD56 ekspresija (N (%))		2/9 (22%)	4/29 (14%)	0.44
CD15 ekspresija (N (%))		2/15 (13%)	16/52 (31%)	0.16
CD34 ekspresija (N (%))		6/16 (37.5%)	13/52 (25%)	0.25
Dodatne citogenetske abnormalnosti (N (%))		2/17 (12%)	10/55 (18%)	0.41
PML-RARA (N (%))	bcr1	6/9 (67%)	15/33 (46%)	0.89
	bcr2	0	4/33 (12%)	
	bcr3	3/9 (33%)	14/33 (42%)	
FLT3 (N (%))	ITD	4/12 (33%)	12/40 (30%)	0.54
	D385	1/12 (8%)	4/49 (10%)	0.675
Ekspresija WT1 gena	Broj replikacija	2393	3945	0.347
	Visok nivo (N (%))	2/7 (29%)	7/21 (33%)	0.734

N: broj bolesnika

4.7. Rana smrt

Rana smrt (RS) nastupila je kod 17/75 (22.67%) bolesnika. Uzroci rane smrti bili su: krvarenje kod 10/17 (59%) bolesnika, DS kod 4/17 (23.5%) bolesnika, infekcija kod dva (2.67%) i akutni infarkt miokarda kod jednog bolesnika (1.33%). RS je u proseku nastupila 5. dana od početka terapije (opseg 0-28). Kod tri bolesnika, smrt prouzrokovana krvarenjem, nastupila je pre početka lečenja –Tabela 26.

Tabela 26: Podela bolesnika prema uzroku i vremenu nastanka RS

Rana smrt		Ukupno	Pre dg	Bez dg	Pre terapije	Tokom indukcije
Broj bolesnika			0	0	3 (17.6%)	14 (82%)
Krvarenje	N (%)	10 (59%)	0	0	3 (30%)	7 (70%)
	Dan; mediana (opseg)	4 (0-26)	0	0	0	5 (2-26)
DS	N (%)	4 (23%)	0	0	0	4 (100%)
	Dan; mediana (opseg)	7 (2-20)	0	0	0	7 (2-20)
Ostalo	N (%)	3 (17.5%)	0	0	0	3 (100%)
	Dan; mediana (opseg)	26 (22-28)	0	0	0	26 (22-28)

N: broj bolesnika, DS: diferencijacioni sindrom

Poređenje rano umrlih i preživelih bolesnika prema karakteristikama, prikazano je u Tabelama 27 i 28. Bolesnici koji su rano umrli imali su lošiji inicijalni ECOG status ($P = 0.004$, Dijagram 17), prosečno veći inicijalni broj leukocita ($36.26 \times 10^9/L$ vs. $10.27 \times 10^9/L$, $P = 0.000665$, Dijagram 18), blasta (22.12% vs. 11.50%, $P = 0.05$) i promijelocita u krvnoj slici (38.37% vs. 23.87%, $P = 0.05$), u većoj meri produženo PT (48% vs. 69%, $P = 0.000024$), prosečno veći ISTH DIK skor (6.24 vs 5.268, $P = 0.00467$), odnosno veći broj bolesnika sa inicijalnim ISTH DIK skorom ≥ 6 (88% vs. 48%, $P = 0.00076$) i veću ekspresiju WT1 gena (3545.557 vs. 3512,659, $P = 0.013$, Dijagram 19). Prediktori nastanka RS u univarijantnoj analizi bili su broj leukocita $\geq 10 \times 10^9/L$ ($P = 0.0231$), ECOG skor ≥ 3 ($P = 0.0006$), fibrinogen < 2 g/L ($P = 0.02617$), PT $< 50\%$ ($P = 0.007292$), ISTH DIK skor ≥ 6 ($P = 0.00529$) i M3v ($P = 0.039$). Sa druge strane, multivarijanta analiza je identifikovala samo leukocitozu (broj leukocita $\geq 10 \times 10^9/L$), kao nezavisni prognozni faktor nastanka RS.

Tabela 27: Poređenje rano umrlih i preživelih bolesnika prema kliničkim, parametrima krvne slike, hemostaze, razvoju DS i tromboza

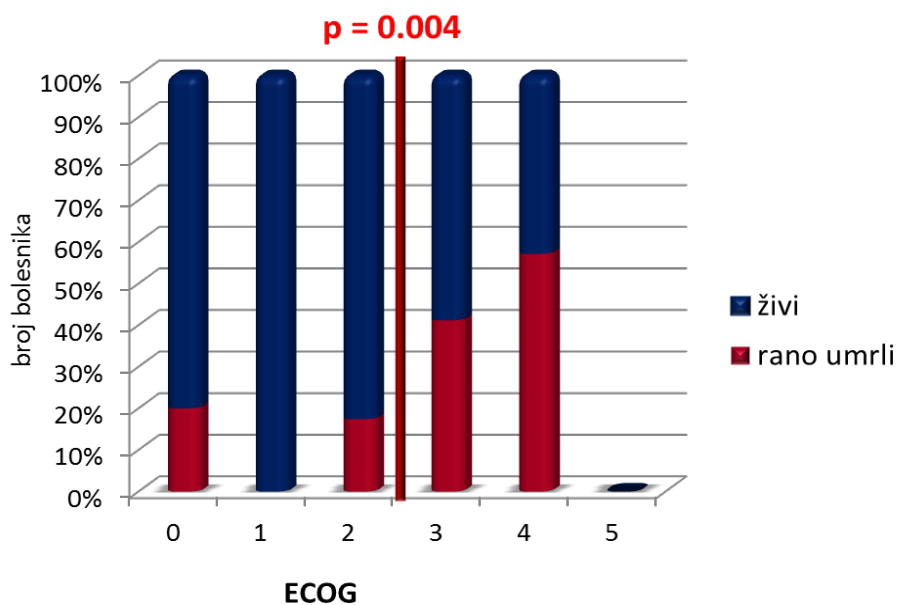
Parametar		Rano umrli (N 17)	Živi (N 58)	P
Starost (godine, mediana)		47	44	0.57
Stariji od 60 godina (N (%))		4 (23%)	13 (22%)	0.473
Pol, muški (N (%))		10 (59%)	24 (41%)	0.7824
Kašnjenje bolesnika (dani, mediana)		21.3	19.62	0.61
Medicinsko kašnjenje (dani, mediana)		9.00	7.84	0.21
Kašnjenje lečenja (dani, mediana)		1.88	1.45	0.56
Krvarenje na prezentaciji (N (%))		17 (100%)	51 (89%)	0.1678
Vitalno ugrožavajuće krvarenje na prezentaciji (N (%))		4 (23%)	6 (10%)	0.13565
ECOG skor 0-2		5	45	0.004
3-4		12	13	
Leukociti (x10⁹/L, mediana)		36.26	10.27	0.000665
Leukociti > 10x10⁹/L (N (%))		9 (53%)	14 (24%)	0.009
Blasti (PK, %, mediana)		22.12	11.50	0.05
Promijelociti (PK, %, mediana)		38.37	23.87	0.05
Trombociti (x10 ⁹ /L, mediana)		28	40	0.1219
Sanzov skor (N (%))	Nizak	2 (12%)	16 (28%)	0.06644
	Umeren	6 (35%)	27 (47%)	
	Visok	9 (53%)	15 (26%)	
PT (% , mediana)		48	69	0.000024
aPTT (s, mediana)		27.607	26.267	0.218171
Fibrinogen (g/L, mediana)		3.031	2.831	0.650
D-dimer (µg/L, mediana)		3133	3781	0.397
ISTH DIK skor (mediana)		6 (5-7)	5 (2-7)	0.00467
ISTH DIK skor ≥5 (N (%))		17 (100%)	45 (78%)	0.054
ISTH DIK skor ≥6 (N (%))		15 (88%)	28 (48%)	0.00076
DS (N (%))		4 (23.52%)	14 (24%)	0.11251
Tromboza (N (%))		2 (13%)	14 (24%)	0.31289

N: broj bolesnika, PK: periferna krv, DS: diferencijacioni sindrom

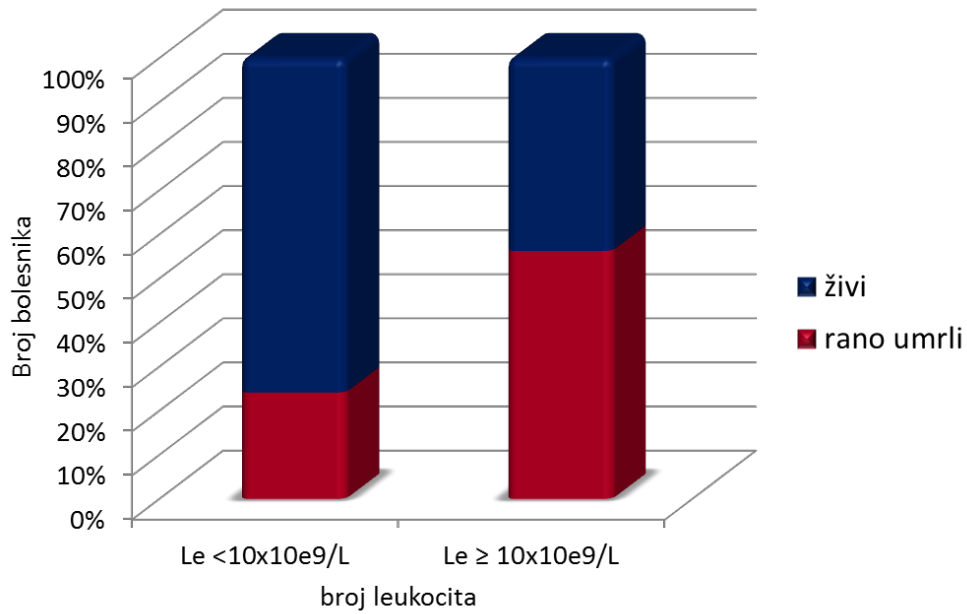
Tabela 28: Poređenje rano umrlih i živih bolesnika prema citološkim, imunofenotipskim i molekularnogenetskim parametrima

Prarmetar		Rano umrli (N17)	Živi (N58)	P
Varijantni tip (N (%))		3/17 (17.64%)	5/58 (8.62%)	0.039
CD2 ekspresija (N (%))		3/14 (21.43%)	14/53 (26.41%)	0.39
CD56 ekspresija (N (%))		1/6 (16.67%)	5/31 (16.12%)	0.698329
CD15 ekspresija (N (%))		2/13 (15.38%)	17/55 (30.90%)	0.36
CD117 ekspresija (N (%))		10/13 (76.9%)	51/54 (94.4%)	0.08205
HLA-DR ekspresija (N (%))		1/13 (8%)	3/54 (5.55%)	0.58740
CD34 ekspresija (N (%))		3/13 (23%)	16/54 (29%)	0.46187
Dodatne citogenetske abnormalnosti (N (%))		3/15 (20%)	9/57 (16%)	0.4899
PML-RARA (N (%))	bcr1	4/5 (80%)	17/37 (45.95%)	0.44862
	bcr2	0	4/37 (10.81%)	
	bcr3	1/5 (20%)	16/37 (43.24%)	
FLT3 (N (%))	ITD	4/10 (40%)	12/42 (28.57)	0.363
	D385	1/10 (10%)	4/42 (9.52%)	0.672
ekspresija WT1 gena	Broj replikacija	3545.557	3512,659	0.013
	Visok nivo (N (%))	4/9 (44.4%)	2/19 (10.5%)	0.03

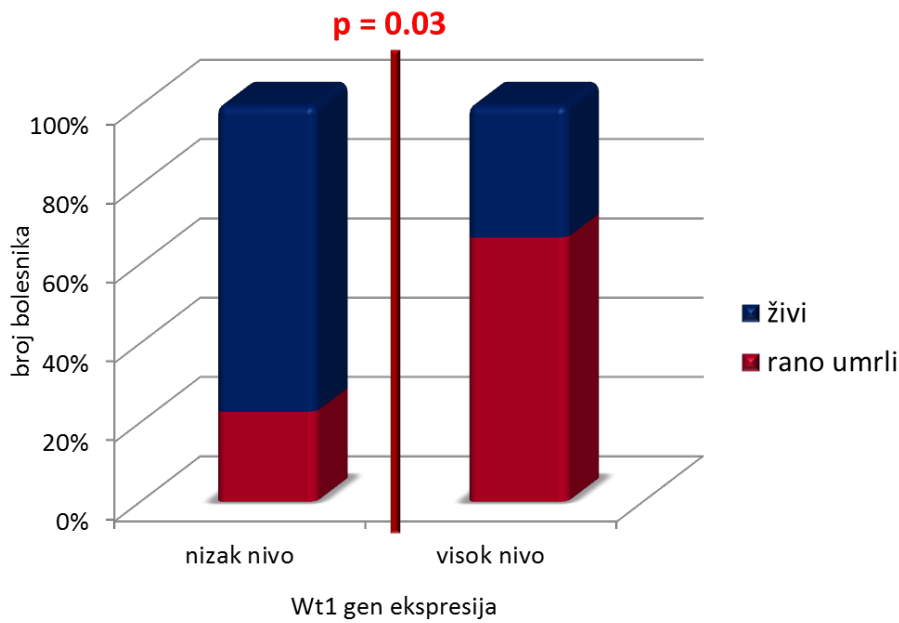
N: broj bolesnika



Djagram 17: Distribucija rano umrlih i preživelih bolesnika prema vrednostima ECOG skora.



Dijagram 18: Učestalost broja leukocita >10x10⁹/L u grupi rano umrlih i preživelih bolesnika



Dijagram 19: Distribucija rano umrlih i preživelih bolesnika, prema nivou ekspresije WT1 gena

4.7.1. Rana smrt uzrokovana krvarenjem

Bolesnici koji su rano umrli usled krvarenja češće su imali vitalno ugrožavajuća krvarenja na prijemu (40% vs. 10%, $P = 0.02304$), viši inicijalni ECOG skor ($P = 0.00740$, Dijagram 19) prosečno veći broj leukocita ($46.267 \times 10^9/L$ vs. $10.267 \times 10^9/L$, $P = 0.000142$) i procenat blasta (28% vs. 11.50%, $P = 0.0017653$), češće produženo PT (49% vs. 69%, $P = 0.0010$), prosečno veći ISTH DIK skor (6.222 vs. 5.268, $P = 0.006679$), odnosno veći broj bolesnika sa inicijalnim ISTH DIK skorom ≥ 6 (90% vs. 48%, $P = 0.0243$) – Tabela 29 i 30.

Prediktori hemoragijske RS u univarijantnoj analizi bili su: ECOG skor ≥ 3 ($P = 0.010$), vitalno ugrožavajuće krvarenje na prijemu ($P = 0.023$), broj leukocita $>15 \times 10^9/L$ ($P = 0.030$), broj leukocita $>20 \times 10^9/L$ ($P = 0.015$), fibrinogen <2 g/L ($P = 0.05$), PT $< 50\%$ ($P = 0.005$), ISTH DIK skor ≥ 6 ($P = 0.031$) i ISTH DIK skor ≥ 7 ($P = 0.015$) - Dijagrami 19, 20, 21.

Tabela 29: Poređenje preživelih i bolesnika sa ranom hemoragijskom smrću prema demografskim karakteristikama, parametrima krvne slike, testovima hemostaze, pojavi DS i trombozama

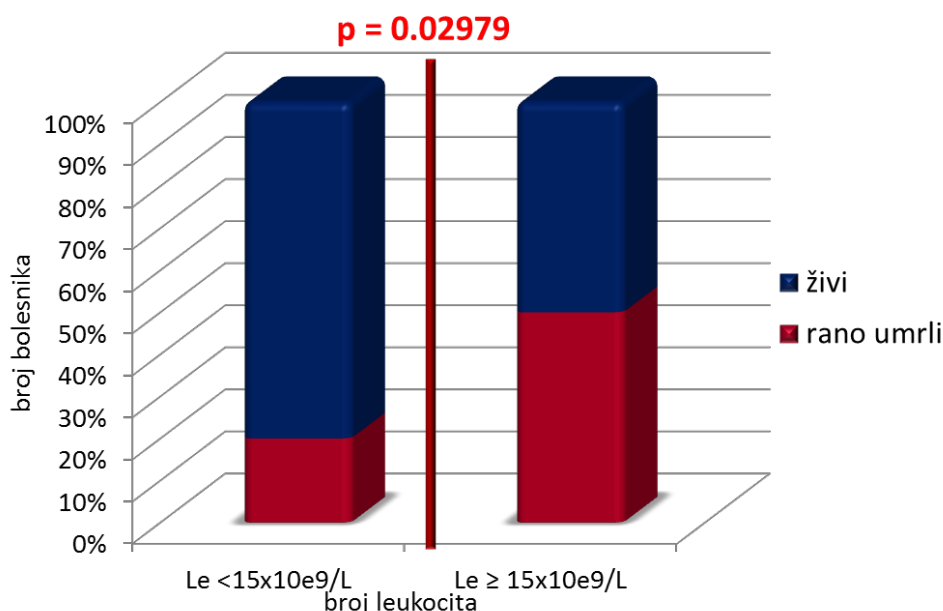
Parametar		Rano umrli (N10)	Živi (N58)	P
Starost (godine, mediana)		45	44	0.12286
Stariji od 60 g (N (%))		1 (10%)	12 (22%)	0.44072
Pol , muški (N (%))		6 (60%)	4 (40%)	0.345
Kašnjenje bolesnika (dani, mediana)		21.33	19.627	0.727875
Medicinsko kašnjenje (dani, mediana)		10.12	8.85	0.123
Kašnjenje lečenja (dani, mediana)		2.222	1.447	0.125
Hemoragijski sindrom na prezentaciji (N (%))		10 (100%)	51 (89%)	0.34574
Vitalno ugrožavajuće krvarenje na prezentaciji (N (%))		4 (40%)	6 (10%)	0.02304
ECOG status 0-2		2	45	0.00740
3-4		8	13	
Leukociti (x10⁹/L, mediana)		46.267	10.267	0.000142
Leukociti ≥ 10x10 ⁹ /L (N (%))		5 (50%)	14 (24%)	0.05171
Leukociti ≥ 15x10⁹/L (N (%))		5 (50%)	11 (18.95%)	0.02979
Leukociti ≥ 20x10⁹/L (N (%))		5 (50%)	9 (15.17%)	0.01547
Blasti (PK, %, mediana)		28	11.50	0.0017653
Promijelociti (PK, %, mediana)		36.222	23.87	0.173006
Trombociti (x10 ⁹ /L, mediana)		32	40	0.4488554
Sanzov skor (N (%))	Nizak	2 (20%)	16 (28%)	0.17817
	Umeren	2 (20%)	27 (47%)	
	Visok	6 (60%)	15 (26%)	
PT (% , mediana)		49	69	0.0010
PT ≤ 50% (N (%))		5/10 (50%)	15/68 (22%)	0.0124
aPTT (s, mediana)		25.7	26.267	0.69
Fibrinogen (g/L, mediana)		3.031	2.831	0.650
Fibrinogen ≤ 2 g/L (N (%))		4 (40%)	16 (27%)	0.675
D-dimer (μg/L, mediana)		4580	3133	0.160594
ISTH DIK skor (mediana)		6 (5-7)	5 (5-7)	0.006679
ISTH DIK skor ≥5 (N (%))		10 (100%)	45 (78%)	0.16636
ISTH DIK skor ≥6 (N (%))		9 (90%)	28 (48%)	0.0243
DS (N (%))		4 (23.52%)	14 (24%)	0.11251
Tromboza (N (%))		1 (10%)	14 (24%)	0.39385

Le: leukociti, DS: diferencijacioni sindrom, PK: periferna krv, s: sekunde, N: broj bolesnika

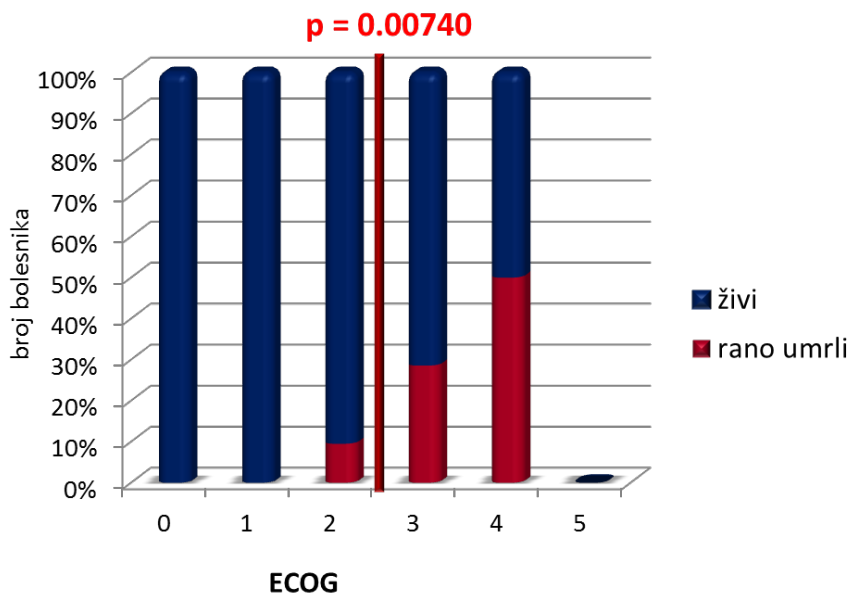
Tabela 30: Poređenje preživelih i bolesnika i umrlih usled krvarenja prema citološkim, imunofenotipskim i citogenetskim parametrima

Prametar		Rano umrli (N 10)	Živi (N 58)	P
Varijantni tip (N (%))		2/10 (20%)	5/58 (8.62%)	0.041
CD2 ekspresija (N (%))		1/8 (12.5%)	14/53 (26.41%)	0.838
CD56 ekspresija (N (%))		0	5/31 (16.12%)	0.71591
CD15 ekspresija (N (%))		1/7 (14.28%)	17/55 (30.90%)	0.390
CD117 ekspresija (N (%))		5/8 (62.5%)	51/54 (94.4%)	0.8200
HLA-DR ekspresija (N (%))		0	3/54 (5.55%)	0.138
CD34 ekspresija (N (%))		3/13 (23%)	16/54 (29%)	0.46187
Dodatne citogenetske abnormalnosti (N (%))		3/15 (20%)	9/57 (16%)	0.4899
PML-RARA (N (%))	bcr1	3/3 (66.66%)	17/37 (45.95%)	0/724
	bcr2	0	4/37 (10.81%)	
	bcr3	1/3 (33.33%)	16/37 (43.24%)	
FLT3 (N (%))	ITD	2/7 (28.57%)	12/42 (28.57)	0.47181
	D385	1/7 (14.86%)	4/42 (9.52%)	0.44544
WT1 ekspresija	Broj replikacija	4197.770	3512,659	0.84898
	Visok nivo (N (%))	1/3 (33.3%)	2/19 (10.5%)	0.48276

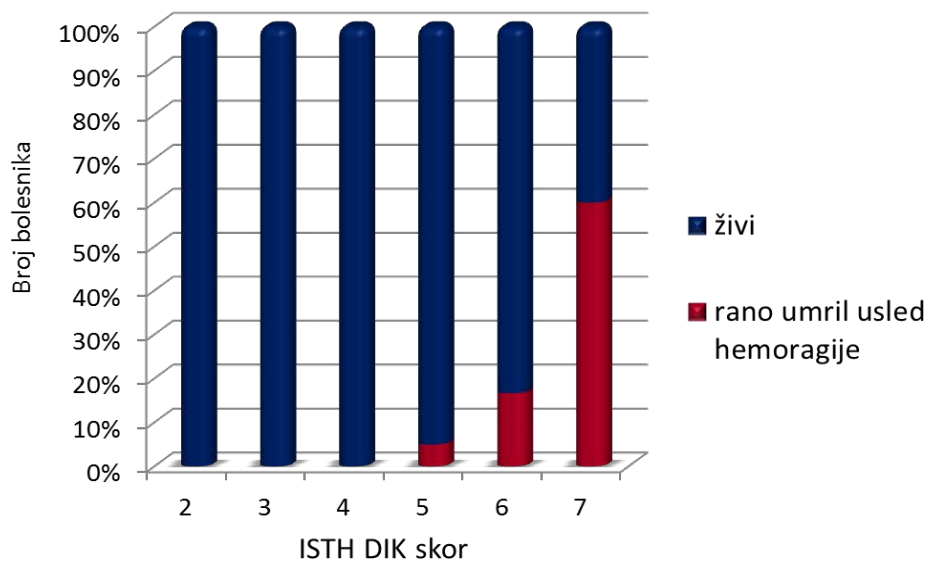
N: broj bolesnika



Dijagram 20: Učestalost broja leukocita >15x10⁹/L u grupi rano umrlih usled hemoragije i preživelih bolesnika



Dijagram 21: Distribucija rano umrlih usled hemoragije i preživelih bolesnika prema vrednostima ECOG-a



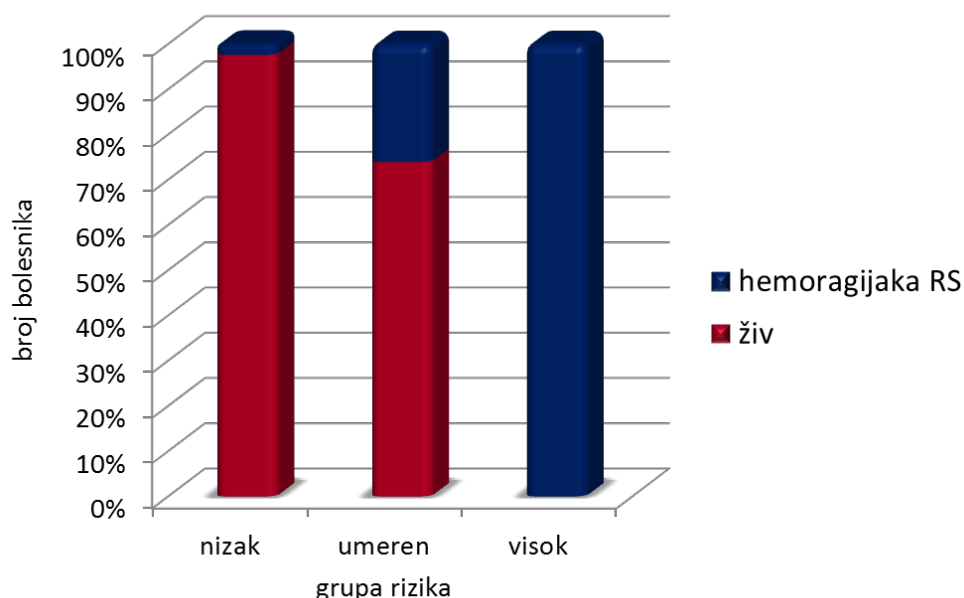
Dijagram 22: Distribucija rano umrlih usled hemoragije i živih bolesnika prema vrednostima ISTH DIK skora

Nezavisni prognozni parametri u multivarijantnoj analizi bili su: vitalno ugrožavajuće krvarenje na prijemu ($P = 0.041$), leukociti $>20 \times 10^9/L$ ($P = 0.018$) i ISTH DIK skor ≥ 7 ($P=0.024$). Na osnovu ovih rezultata dizajniran je prognozni skor za hemoragijsku ranu smrt (Tabela 31)

Tabela 31: Prognozni skor za hemoragijsku ranu smrt

Broj poena	Parametar
0	<ul style="list-style-type: none"> • bez vitalno ugrožavajućeg krvarenja na prezentaciji • leukociti $< 20 \times 10^9/L$ • ISTH DIK skor < 7
1	<ul style="list-style-type: none"> • vitalno ugrožavajuće krvarenje na prijemu • leukociti $\geq 20 \times 10^9/L$
2	<ul style="list-style-type: none"> • ITSH DIK skor ≥ 7

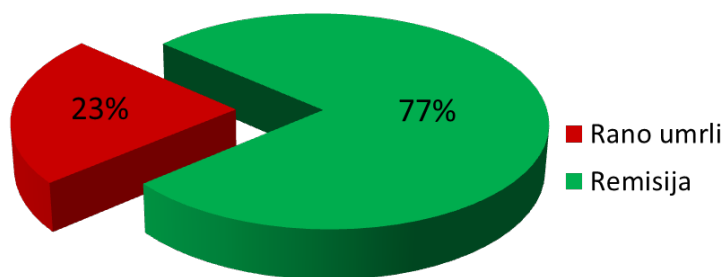
Na osnovu vrednosti skora bolesnici su klasifikovani u tri grupe: nizak rizik: 0 poena, umeren rizik: 1-2 poena i visok rizik: 3 poena. Učestalost rane hemoragijske smrti se značajno razlikovala između rizičnih grupa: nizak rizik 2.4%, umeren 26.1%, visok rizik 100%, $P < 0.001$ – Dijagram 23.



Dijagram 23: Distribucija rano umrlih usled hemoragije i živih bolesnika prema vrednostima prediktivnog skora

4.8. Rezultati indukcionog lečenja

U našoj studijskoj grupi nije bilo slučajeva primarne rezistencije. Naime, svih 58/75 (77.33%) preživelih bolesnika postiglo je citološku remisiju posle indukcije kao i citogenetsku remisiju i MR posle završetka konsolidacionog lečenja - Dijagram 24.

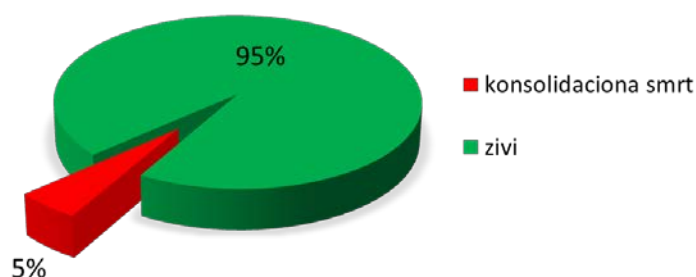


Dijagram 24: Zastupljenost kompletnih remisija

Praćenje ekspresije WT1 gena sprovedeno je kod 22 bolesnika. Posle prve konsolidacione kure postignuta je redukcija ekspresije WT1 gena od >3 loga kod 16/22 (72.72.64%) bolesnika, > 2 loga kod 5/22 (22.72%) i <1 loga kod 1/22 (4.54%) bolesnika. Prosečna ekspresija WT1 gena posle prve konsolidacije iznosila je 24.34 (opseg 0.95-72), dok 6/22 (27%) bolesnika nije normalizovalo svoju ekspresiju WT1 gena.

4.9. Konsolidaciona smrt

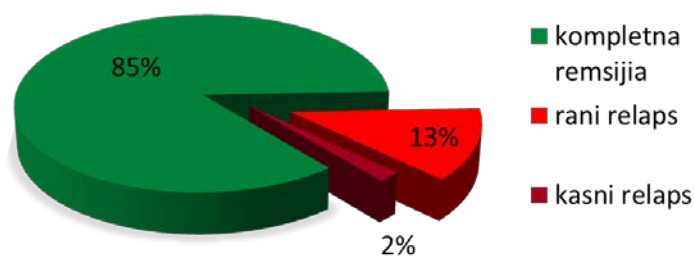
Tokom konsolidacionog lečenja smrtni ishod nastupio je kod tri bolesnika (5.17%) - Dijagram 25. Jedan bolesnik (1.72%) je umro tokom prve konsolidacione kure, dok su 2/57 (3.45%) umrla tokom druge konsolidacione kure, svi usled infekcija.



Dijagram 25: Zastupljenost konsolidacione smrti

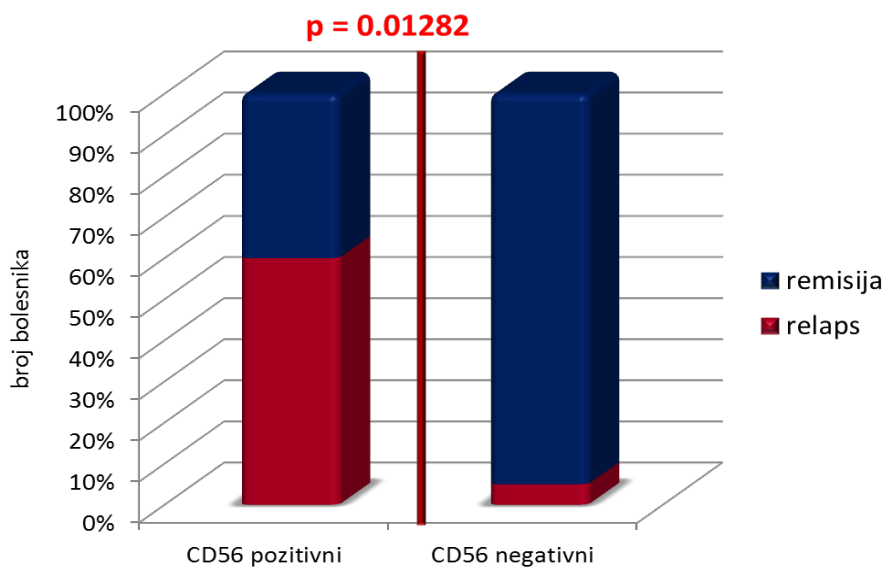
4.10. Relaps bolesti

Relaps APL je registrovan kod 8/55 (13.79%) bolesnika, i to hematološki relaps kod tri i molekularni relaps kod pet bolesnika. Relaps APL je registrovan kod 6/32 (18.75%) bolesnika lečenih protokolom PETHEMA LPA 99 i kod 2/27 (7.4%) bolesnika, lečenih protokolom PETHEMA LPA 2005. Relapsi su dijagnostikovani prosečno u 25. mesecu od postizanja KR (opseg 3 – 43 meseca). Pritom, rani relaps je nastao kod 7/8 bolesnika (87.5%, opseg 3 – 35 meseci), dok je kasni relaps registrovan kod samo jednog bolesnika (14.3%) i to u 43. mesecu od početka lečenja – Dijagram 26. CNS infiltracija, u sklopu sistemskog relapsa dijagnostikovana je kod 2/55 (3.64%) bolesnika.

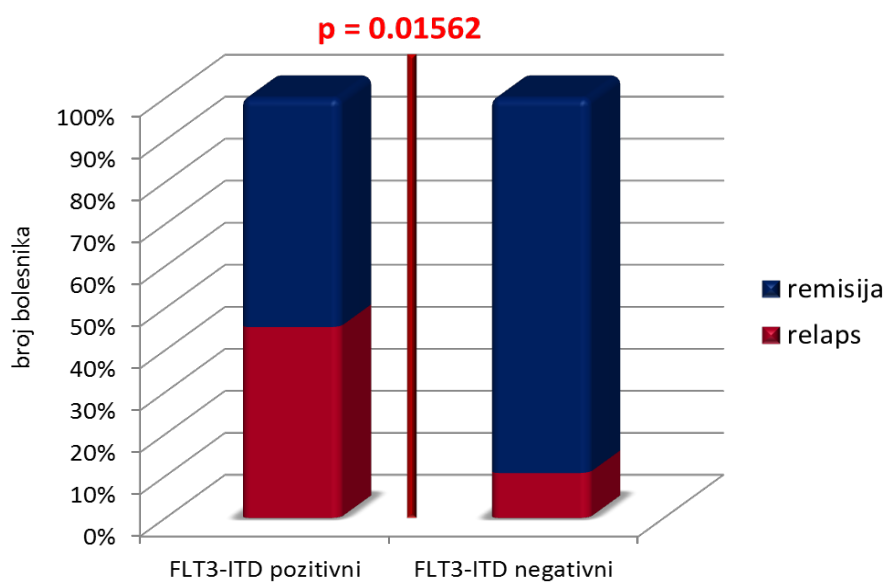


Dijagram 26: Zastupljenost perzistentne KR, ranog i kasnog relapsa bolesti

Bolesnici sa relapsom APL su imali prosečno veći broj leukocita ($17.813 \times 10^9/L$ vs. $9.357 \times 10^9/L$), češće su ekspimirali CD56 antigen (75% vs. 9.52%, $P = 0.01282$) i *FLT3-ITD* mutaciju (62.5% vs. 19.35%, $P = 0.01562$), u poređenju sa bolesnicima u perzistentnoj KR - Tabela 32, 33 i dijagrami 26 i 27, 28. Dve grupe se nisu razlikovale prema drugim posmatranim parametrima (Tabela 32).



Dijagram 26: Odnos CD56 pozitivnosti i nastanka relapsa bolesti

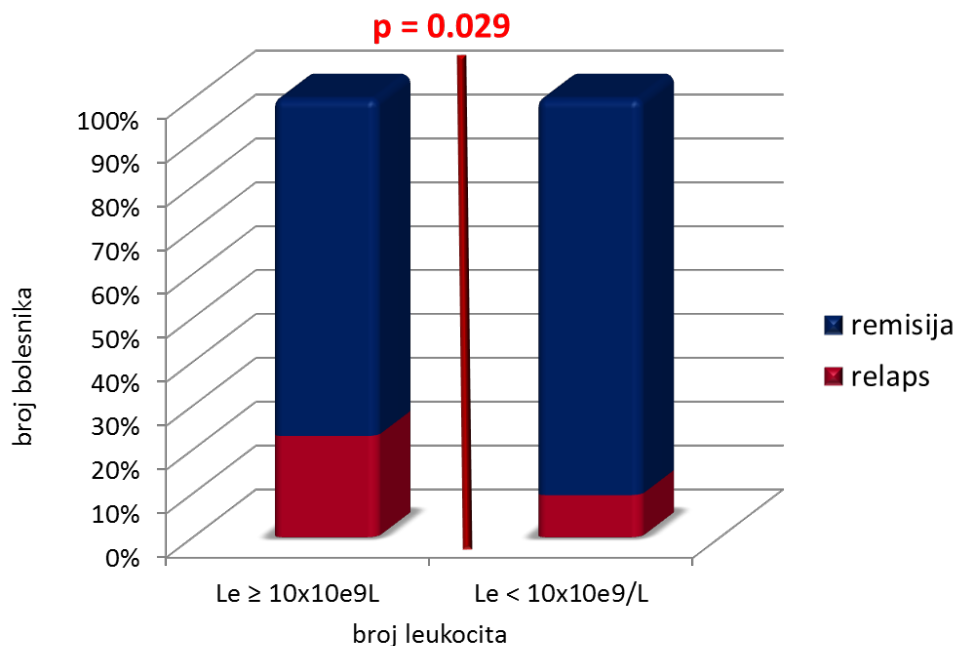


Dijagram 27: Odnos FLT3-ITD pozitivnosti i nastanka relapsa bolesti

Tabela 32: Poređenje bolesnika sa relapsom i perzistentnom KR

Parametar		Relaps (N 8)	U kompletnoj remisiji (N47)	P
Starost (godine, mediana)		46	39	0.239911
Stariji od 60 g (N (%))		1 (12.8%)	12 (22%)	0.48005
Pol, muški (N (%))		4 (50%)	20 (42.55%)	
Kašnjenje bolesnika (dani, mediana)		19.57	17.600	0.691884
Medicinsko kašnjenje (dani, mediana)		11.000	8.828	0.394068
Kašnjenje lečenja (dani, mediana)		2.429	1.278	0.048487
ECOG skor 0-2		4	38	0.19608
3-4		4	8	
Leukociti (x10⁹/L, mediana)		17.813	9.357	0.02666726
Le ≥ 10x10⁹/L (N (%))		3 (37.5%)	10 (21.28%)	0.029019
Blasti (PK, %, mediana)		11.625	10.913	0.900162
Promijelociti (PK, %, mediana)		33.875	22.932	0.269188
Trombociti (x10 ⁹ /L, mediana)		44.125	38.867	0.653030
Hemoglobin (g/L, mediana)		105.375	97.289	0.268619
Sanzov skor (N (%))	Nizak	3 (37.5%)	11 (23.4%)	0.15606
	Umeren	2 (25%)	25 (53.2%)	
	Visok	3 (27.5%)	11 (23.4%)	
ISTH DIK skor (mediana)		5 (3-6)	3 (2-7)	0.60475
Varijantni tip (N (%))		1 (12.5%)	3 (6.38%)	0.48400
CD2 ekspresija (N (%))		1/8 (12.5%)	14/53 (26.41%)	
CD56 ekspresija (N (%))		¾ (75%)	2/21 (9.52%)	0.01282
CD15 ekspresija (N (%))		1/7 (14.28%)	17/55 (30.90%)	
CD117 ekspresija (N (%))		6/7 (85.71%)	41/43 (95.34%)	0.37036
HLA-DR ekspresija (N (%))		0	3/43 (6.98%)	0.62964
CD34 ekspresija (N (%))		3/7 (42.86%)	12/43 (27.91%)	0.34766
Dodatne citogenetske abnormalnosti ((N (%))		1 (12.5%)	8/44 (18.18%)	0.57808
PML- RARA (N (%))	bcr1	2/5 (40%)	13/24 (54.17%)	0.34565
	bcr2	0	3/24 (12.5%)	
	bcr3	3/5 (60%)	8/24 (33.33%)	
FLT3 (N (%))	ITD	5 (62.5%)	6/31 (19.35)	0.01562
	D385	0/8	3/31 (9.68%)	0.49185
WT1 ekspresija	Broj replikacija	1245.3	3285.478	0.288773
	Visok nivo (N (%))	0	5/20 (20%)	0.36477
DS (N (%))		3 (37.5%)	6 (12.77%)	0.11848

Le: leukociti, PK: periferna krv, N: broj



Dijagram 28: Odnos broja leukocita i nastanka relapsa bolesti

4.11. Praćenje WT ekspresije

Povećanje ekspresije WT1 gena uočena je u uzorcima tokom relapsa (>1.5 log u 2/6 (30%) relapsa, >1 log kod 3/6 (50%) i <1 log kod 1/6 (16.67%), sa srednjom vrednošću od 274.07 (opseg: 11.93- 1327.96). Povećanje WT1 ekspresije korelisalo je sa pojavom *PML-RARA* pozitivnosti u 5/6 (83.3%) uzoraka. U jednom slučaju porast WT1 ekspresije je registrovan 6 meseci pre pojave *PML-RARα* pozitivnosti.

Srednja vrednost WT1 ekspresije kod bolesnika u MR iznosila je 21.17 (opseg: 3.34-59.76), uz visoku varijabilnost i povećanu ekspresiju u 11/30 (36.7%) uzoraka. Međutim, porast WT1 ekspresije za >1 log nije uočen kod bolesnika u perzistentnoj MR.

Relaps APL bio je udružen sa povećanom ekspresijom WT1 gena na kraju prve konsolidacije (3/4 (75%) vs. 3/18 (16.67%), $P = 0,003$) kao i povećanjem ekspresije od >1 log tokom praćenja MRB (5/6 (83.3%) vs. 0, $p=0,0001$).

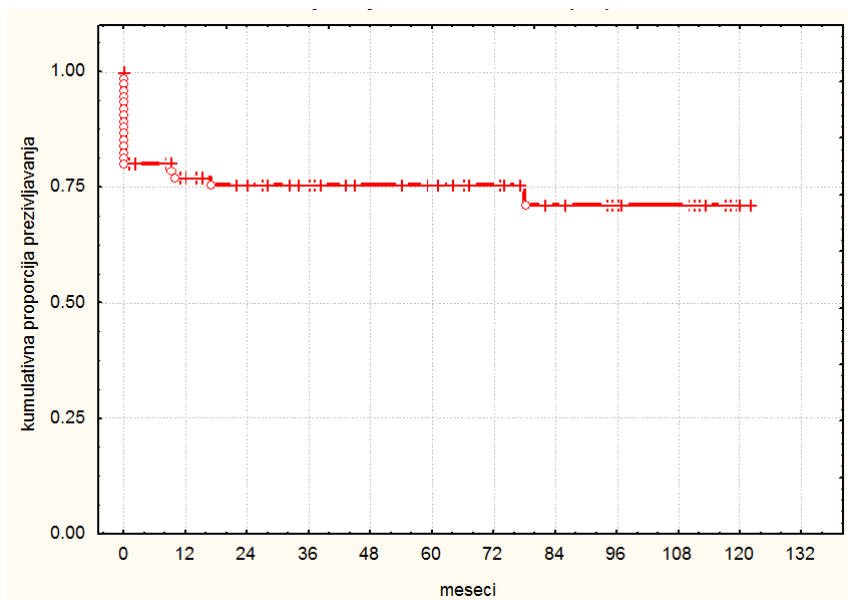
4.12. Lečenje relapsa bolesti

Sedam bolesnika sa relapsom APL lečeno je PETHEMA LPA 99 "rescue" protokolom (ATRA+HT – Prilog 10), dok je samo jedan bolesnik lečen primenom ATO (Prilog 11). Indukciona smrtnost iznosila je 2/8 (25%). Svi preživeli bolesnici su postigli

drugu KR (KR2). Konsolidacija je kod svih podrazumevala primenu autologe TMČH. Prosečno trajanje KR2 iznosilo je 27 meseci (opseg 1 – 72). Drugi relaps dijagnostikovao je kod dva bolesnika i to pet meseci posle sprovođenja autologe transplantacije TMČH. Oba bolesnika su lečena primenom "HT+ATRA" a potom alogenom TMČH i do danas se nalaze u trećoj KR.

4.13. Ukupno preživljavanje

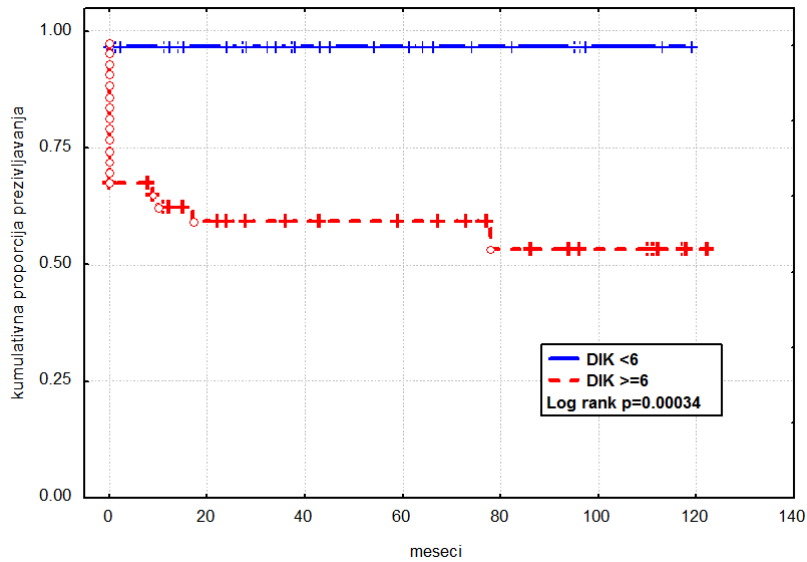
Tokom studijskog perioda umrlo je 22/75 bolesnika (29.33%): 17/22 (77.27) tokom indukcije, 3/22 (13.63%) tokom konsolidacija i 2/22 (9.1%) u relapsu bolesti. Petogodišnje OS iznosilo je 75% - Dijagram 29.



Dijagram 29: Ukupno preživljavanje bolesnika sa APL-om

Faktori koji su uticali na ukupno preživljavanje bili su: visok ECOG skor ($P = 0.02544$), broj leukocita $\geq 10 \times 10^9/L$ (13/23 vs. 42/52, $P = 0.0127$), viši procenat blasta u perifernoj krvi (27% vs. 9.3%, $P = 0.00062$), veći procenat promijelocita u perifernoj krvi (37.94% vs. 23.28%, $P = 0.034269$), niži broj trombocita ($26.52 \times 10^9/L$ vs. $41.85 \times 10^9/L$, $P = 0.045536$), visok Sanzov skor (13/23 vs. 13/52, $P = 0.05$), produženo PT (48.68% vs. 69.68%, $P = 0.00002$), povišen D dimer (4245.444 vs. 2885.181, $P = 0.0560011$), M3v

(6/23 vs. 2/52, $P = 0.00265$), ISTH DIK skor ≥ 5 (23/23 vs. 13/52, $P = 0.02690$), ISTH DIK skor ≥ 6 (21/23 vs. 26/52, $P = 0.00012$ – Dijagram 30). Ostali analizirani parametri nisu pokazali uticaj na OS.



Dijagram 30: Uticaj vrednosti ISTH DIK skora ≥ 6 na ukupno preživljavanje bolesnika sa APL-om

5. DISKUSIJA

APL je redak hematološki malignitet sa procenjenom incidencom od 0.083 novoobolela na 100 000 stanovnika godišnje [108]. Tokom desetogodišnjeg perioda, u Klinici za hematologiju, dijagnostikovano je 75 bolesnika (7-8 godišnje), što predstavlja 6.25% svih dijagnostikovanih bolesnika sa AML. Zastupljenost APL koju smo mi registrovali odgovara uočenoj u ostalim evropskim centrima a to je 5-10% svih dijagnostikovanih AML [5]. Pri tom smo APL dijagnostikovali kod tri bolesnika koja su prethodno primila citotoksičnu terapiju (t-APL), odnosno kod 4% svih naših bolesnika sa APL. U vezi sa tim, zastupljenost t-APL u našoj grupi je bila nešto manja nego što se saopštava u literaturi (5 – 30% svih APL) [5, 109].

Prosečna starost bolesnika u našoj grupi iznosila je 45 godina (opseg: 19 -78), što je u saglasnosti sa podacima iz populacionih studija i registara i saopštenjima iz pojedinačnih centara, u kojima se medijana starosti kreće od 45 - 54 godine [60, 65, 68]. Sa druge strane, kliničke studije su uključivale znatno mlađe bolesnike, sa medijanom starosti od 37 - 44 godine [34, 36, 37, 40, 41].

U našoj grupi ispitanika, učestalost APL dostiže maksimum u životnoj dobi od 20 – 39 godina (39% bolesnika), da bi se potom registrovao plato u dobi od 40-59 godina (37% bolesnika). Sa druge strane, 23% bolesnika je dijagnostikovano u uzrasnoj dobi od 60-79 godina, pri čemu je samo 4% pacijenata bilo starije od 75 godina. Distribucija pacijenata po uzrastu u našoj studiji odgovara literaturnim podacima [5, 8].

Najučestalija tegoba, koju su naši bolesnici naveli pri prijemu, bila je pojava spontanog krvarenja, koju je uočilo čak 88% bolesnika, dok je na inicijalnom pregledu hemoragijski sindrom konstatovan kod 91% bolesnika. Iako su krvarenja u kožu i sluzokože bila najučestalija, čak 13% bolesnika je imalo vitalno ugrožavajuća krvarenja u trenutku postavljanja dijagnoze (melene, CNS krvarenje, krvarenje u oko i pluća). Sa druge strane, učestalost vitalno ugrožavajućeg krvarenja tokom celokupnog indukcionog perioda iznosila je 27%, odnosno u toku lečenja registrovano je dodatnih 14% epizoda krvarenja, najverovatnije uslovljenih pogoršanjem DIK-a tokom lečenja. Populacione studije iz Amerike, Kanade i Švedske nisu se bavile učestalošću krvarenja kako na prijemu tako ni tokom hospitalizacije [60-64], tako da nije bilo moguće izvršiti poređenje naših rezultata. Sa druge strane, učestalost vitalno ugrožavajućih krvarenja kod naših bolesnika na prezentaciji

bila je znatno veća nego u japanskoj studiji - 6.5%, ali približno jednaka saopštenoj u brazilskoj studiji - 17.2% [60, 64].

U našoj studiji prediktivni značaj za nastanak krvarenja imali su: broj leukocita $\geq 10 \times 10^9/L$, broj trombocita $< 40 \times 10^9/L$, $PT \leq 50\%$ i ISTH DIK skor ≥ 5 . Pri tom je najznačajniji prediktorni faktor u multivarijantnoj analizi bio broj leukocita $\geq 10 \times 10^9/L$. Druge studije su takođe indentifikovale veći broj prediktivnih faktora za nastanak krvarenja, kao što su loše opšte funkcionalno stanje, trombocitopenija, leukocitoza, niska koncentracija fibrinogena u serumu, visoka vrednost LDH u serumu, produžen PT i visok D-dimer [60-64, 68, 71]. Naši rezultati podržavaju gledište da je DIK najvažniji uzrok krvarenja u APL, odnosno da je stepen koagulopatije u korelaciji sa rizikom od nastanka krvarenja [71]. Sa druge strane, naši rezultati ukazuju i na međusobnu povezanost stepena aktivnosti bolesti, izražene brojem leukocita, sa jedne strane i koagulopatije i krvarenja, sa druge strane.

Prosečna vrednost broja leukocita u našoj grupi ispitanika iznosila je $16.24 \times 10^9/L$, što je znatno više od prosečne vrednosti koje su saopštile PETHEMA LPA 99 i 2005 studijske grupe ($2.2 \times 10^9/L$ i $3.0 \times 10^9/L$), GIMEMA ($2.6 \times 10^9/L$) i brazilska grupa ($4.9 \times 10^9/L$) [33-36, 58, 105]. Grupi visokog rizika po Sanzu pripadalo je 33% naših bolesnika, što je više nego što su saopštile druge studijske grupe: Stanfordska (19%), PETHEMA 099 i 2005 (25- 26%) i GIMEMA (26%) [33-37, 63, 107]. Sa druge strane, naš rezultat je u korelaciji sa rezultatima iz Brazila (36.9%) i Turske (34%) [59, 67]. Više od $50 \times 10^9/L$ leukocita imalo je 8% pacijenata u našoj studiji, što je slično rezultatima koje saopštavaju studijske grupe PETHEMA LPA 99 i 2005 (7% i 5%) [34, 110]. Veći prosečan broj leukocita i veća zastupljenost visokorizičnih bolesnika na prezentaciji, u našoj studiji, mogu ukazivati na kasno postavljenu dijagnozu ili pak agresivniji tok bolesti.

U inicijalnim labaratorijskim analizama naših pacijenata dominantan nalaz bila je koagulopatija, u našoj studiji definisana kao ISTH DIK skor ≥ 5 . Proporcija bolesnika sa koagulopatijom u našoj seriji (85%) znatno je viša nego što je saopšteno u drugim studijama (45–50 %) [5, 34, 58, 62, 71]. Navedena razlika je najverovatnije posledica upotrebe različitih dijagnostičkih kriterijuma za DIK. Naime, definicija koagulopatije u nekim studijama nije precizirana, dok je u drugima bila zasnovana na patološkim vrednostima testova hemostaze kao što su aPTT, PT, fibrinogen, FDP i D dimer, dok je samo u našoj studiji korišćen integrativni DIK skor [34, 58, 61, 71]. Zapravo, DIK se ne može dijagnostikovati nijednim pojedinačnim testom, zbog čega je, prilikom razmatranja njegove dijagnoze neophodno uzeti u obzir kliničko stanje bolesnika, osnovnu bolest i vrednost

laboratorijskih testova [101]. Ipak, kod bolesnika sa oboljenjem za koje je poznato da je udruženo sa DIK-om, kombinacija hemostaznih testova može biti dovoljna za postavljanje dijagnoze DIK-a i to sa visokim stepenom pouzdanosti [101]. Ovim konceptom se rukovodio ISTH prilikom kreiranja skora za DIK, baziranog na jednostavnim laboratorijskim testovima, dostupnim svim bolnicama [101]. ISTH DIK skor moguće je primeniti kako u infektivnim tako i u neinfektivnim bolestima, sa senzitivnošću od 91% i specifičnošću od 97% [101, 111-113]. Prisustvo DIK-a, dokazanog ISTH skorom, se u stanjima sepse pokazalo kao nezavisni prediktor smrtnog ishoda. Naime, bolesnici sa sepsom i ISTH DIK skorom ≥ 5 imaju mortalitet od 47%, dok je smrtnost u grupi bez DIK-a samo 27%. Pritom, sa svakim dodatnim bodom u DIK skor, rizik od smrtnog ishoda raste za 1.29 [99, 111-113]. Za razliku od sepse, zasada nisu sprovedene studije koje ispituju prediktivnu vrednost ISTH skora za DIK u malignitetima, uključujući i APL.

U našoj grupi bolesnika, zastupljenost M3v je iznosila 11%, što je nešto niže nego što je saopšteno u literaturnim podacima 15 – 25% [5, 72]. Slično saopštenjima stranih autora, i u našoj grupi pacijenata uočena je korelacija između M3v, sa jedne strane i većeg broja leukocita i blasta krvnoj slici, višim Sanzovim skorom, nižom koncentracijom fibrinogena i češćom ekspresijom CD2, CD34, CD56 i *FLT3-ITD* na leukemijskim ćelijama, sa druge strane [72].

DCA smo registrovali kod 17% bolesnika, dok je u literaturi saopštena nešto veća učestalost, od 26-39% [5, 88]. Trizomija hromozoma 8 u našoj grupi pacijenata bila je najučestalija DCA (41.67%), dok je adicija hromozoma 7 uočena kod 8.3% bolesnika. Takođe smo registrovali i visoku učestalost kompleksnih hromozomskih anomalija (16.67%). Prema literaturnim podacima, najučestalija DCA je trizomija hromozoma 8 koja je registrovana kod 33-53% pacijenata [88]. Abnormalnosti hromozoma 7, sledeće po učestalosti DCA u APL, dijagnostikuju se kod 5-7% bolesnika, dok se kompleksne DCA uočavaju kod < 5% bolesnika [89]. Visoka učestalost poremećaja hromozoma 8, kako u u našoj tako i u većini drugih studija, podržava hipotezu o njegovoj ulozi u leukemogenezi APL [73]. Sa druge strane, visok procenat kompleksnih DCA je najverovatnije posledica malog broja bolesnika uključenih u nasu studiju.

Bolesnici sa DCA su u našoj grupi statistički značajno češće ekspimirali CD56. Navedena korelacija do sada nije opisana u literaturi. Takođe smo uočili postojanje negativne korelacije između prisustva DCA, sa jedne strane i *FLT3-ITD* mutacije, sa druge strane. Odnosno, naši bolesnici sa DCA su ređe ekspimirali *FLT3-ITD* mutaciju. Navedenu

korelaciju uočili su i drugi autori [73, 78]. U kliničkim studijama, sprovedenim na velikom broju ispitanika, za razliku od naše, uočena je takođe i povezanost DCA, sa jedne strane i trombocitopenije, umereno i visokorizičnog oblika APL, prisustva koagulopatije i bcr3 tipa *PML-RAR α* transkripta, sa druge strane [78, 79, 114].

Prisustvo *FLT3* mutacije utvrdili smo kod 40% bolesnika i to *FLT3-ITD* kod 30% a *D385* kod 10% bolesnika. Naši rezultati su u skladu sa literaturnim podacima po kojima je *FLT3-ITD* mutacija registrovana kod 12 - 39% bolesnika, odnosno *FLT3-D835* mutacija kod 6 - 22% bolesnika [78, 79, 114]. U našoj grupi, *FLT3-ITD* pozitivnost bila je povezana sa većim prosečnim brojem leukocita i većim procentom blasta, težim stepenom trombocitopenije, višim Sanzovim skorom, M3v tipom bolesti, ekspresijom CD2 i CD56, ređim prisustvom DCA i većom učestalošću tromboza. Pri tom, nismo uočili povezanost *FLT3-ITD* mutacije, sa jedne strane i uzrasta bolesnika, vrednosti testova hemostaze, nivoa LDH u serumu, bcr3 tipa *PML-RAR α* i ekspresije ostalih imunofenotipskih markera, sa druge strane. Korelacija između prisustva *FLT3-ITD* mutacije i CD56 pozitivnosti prvi put je saopštena u našoj studiji, dok su ostali rezultati u skladu sa literaturnim podacima [78, 79, 114]. Za razliku od *FLT3-ITD* mutacije, prisustvo *FLT3-D835* mutacija ni u našoj seriji, ni prema literaturnim podacima ne koreliše ni sa jednom kliničko-laboratorijskim parametrom [78, 79, 114].

Bolesnici sa APL su, i u našoj grupi kao i u literaturnim podacima, imali značajno viši nivo ekspresije WT1 gena u odnosu na zdravu kontrolu [95, 98, 99]. Do sada su publikovani rezultati dve studije koje su ispitivale nivo WT1 ekspresije u APL, ali nijedna nije ispitivala udruženost nivoa ekspresije sa kliničko-laboratorijskim parametrima [98, 99]. Za razliku od ovih studija, u našoj studiji je registrovana povezanost visokog nivoa ekspresije WT1 gena, sa jedne strane i višeg broja leukocita, višeg Sanzovog skora, češćeg bcr3 tipa transkripta i prisustva *FLT3/ITD* mutacije, sa druge strane. Od interesa je napomenuti da je, ispitivanjem nivoa ekspresije WT1 gena u ostalim tipovima AML, takođe utvrđena povezanost između visoke ekspresije WT1 gena, sa jedne strane i *FLT3-ITD* pozitivnosti, sa druge strane, dok korelacija sa ostalim kliničko-laboratorijskim parametrima nije uočena [95].

DS je česta komplikacija lečenja APL, sa saopštenom učestalošću u literaturi od 2 – 27% [1, 5, 26-29]. Ovako veliki raspon učestalosti se može objasniti korišćenjem različitih kriterijuma za dijagnozu i procenu stepena težine DS, kao i korišćenjem različitih indukcionih protokola, od kojih su neki predviđali a neki ne profilaksu za DS. Učestalost DS u našoj studiji iznosila je 24%, što je istovetno sa učestalošću od 24,8% koju saopštava

PETHEMA studijska grupa, od koje smo preuzeli dijagnostičke kriterijume za DS. Međutim, "težak" oblik DS bio je zastupljeniji u našoj grupi (67%) u odnosu na PETHEMA grupu (51%) [26, 27].

U našoj studiji su broj leukocita $\geq 10 \times 10^9/L$ i ISTH DIC skor ≥ 6 bili prediktivni za nastanak DS. Sa druge strane, PETHEMA studijska grupa za APL je kao prediktivne faktore za nastanak umerenog oblika DS identifikovala: broj leukocita $\geq 10 \times 10^9/L$, povišen nivo LDH u serumu i $\geq 70\%$ promijelocita u leukocitnoj formuli, dok su prediktivni faktori za razvoj "teškog" oblika DS bili broj leukocita $\geq 5 \times 10^9/L$, povišen nivo kreatinina u serumu, prisustvo *FLT3-ITD* mutacije, M3v i bcr3 [26, 27]. Međutim, treba naglasiti da Italijanska kooperativna grupa za APL (GIMEMA) nije pokazala prediktivni značaj broja leukocita za nastanak DS [35]. Japanska studijska grupa za APL i PETHEMA grupa ukazale su da je nastanak DS, posebno "ranog" oblika i "teškog" stepena bio značajno češći kod bolesnika sa koagulopatijom [26, 27]. Navedene rezultate podržavaju i naši rezultati po kojima je inicijalni ISTH DIC skor ≥ 6 prediktivan za nastanak DS. Uočene veze između nastanka DS, sa jedne strane i pojave trombohemoragijskih komplikacija, sa druge strane, podržavaju hipotezu Sanza da bi razvoj lekova koji su usmereni na blokadu koagulacionih mehanizama koji "operišu" u APL, mogao da spreči pojavu DS [26].

Mortalitet bolesnika sa DS u našoj grupi od 5.3%, bio je relativno visok u poređenju sa rezultatima velikih studijskih grupa u kojima mortalitet usled DS nije veći od 1% [26-29, 68]. Međutim, iskustva nekih drugih pojedinačnih centara takođe ukazuju na visoku učestalost fatalnog DS u APL - Tunis (7.6%) i Brazil (7.6%) [60, 68]. Saopšteni visok mortalitet u DS je najverovatnije posledica veće zastupljenosti "teškog" oblika DS. Zapravo, mortalitet u grupi naših bolesnika sa "teškim" oblikom DS iznosio je čak 54.54%, što koreliše sa saopštenjima PETHEMA studijske grupe (mortalitet 40%) [27,68]. Najverovatnije zato je i u našoj i u PETHEMA studijama "težak" DS prediktivan za nastanak RS [26, 27]. Sa druge strane, nastanak umerenog DS, ni u našoj kao ni u studijama PETHEMA grupe nije imao uticaj na mortalitet [26, 27].

APL je prvi agresivan malignitet koji je postao izlečiv u velikog broja bolesnika, primenom molekularne ciljane terapije. Primenom kombinovane terapije "ATRA+ HT" izlečenje se postiže kod približno 80% bolesnika [5, 8, 16]. Neprekidnom optimizacijom standardnih protokola stopa relapsa u APL se progresivno smanjuje usled čega je RS najčešći uzroko neuspeha lečenja u APL [5, 8, 16].

Učestalost RS u našoj grupi iznosila je 22.67%, dok su velike kooperativne studijske grupe za APL saopštile učestalost RS u svojim kliničkim studijama manju od 10% [5, 25, 34-37, 41]. Međutim, u poslednje vreme, velike populacione studije i registri (američki, kanadski, švedski), kao i neki pojedinačni centri (Brazil, Turska, Tunis) saopštavaju znatno veću učestalost RS koja se kreće oko 30% [59-67]. Ovi rezultati ukazuju da se, u eri lečenja ATRA-om, učestalost RS nije smanjila u odnosu na eru pre ATRE (18.1% tokom 1992.–1996. vs 22.7%, tokom 2002.–2007. godine), što je navelo eksperte za APL da se upitaju u kojoj meri rezultati studija kooperativnih grupa odgovaraju stvarnom životu [46, 65]. Razmatrajući navedeno pitanje, Sanz i saradnici navode da je glavni uzrok isključena pacijenata iz studija PETHEMA grupe bilo loše opšte funkcionalno stanje prouzrokovano vitalno ugrožavajućim krvarenjem, zbog kojih je inicijalno isključeno 5% bolesnika, što nije zanemariv broj pacijenata, ukoliko se ima u vidu da oni su gotovo svi umrli [65, 109]. Takođe, kliničke studije u odnosu na registracione uključuju prosečno mlađe bolesnike koji imaju manju učestalost RS [65, 109].

U vezi sa problemom "stvarne" učestalosti RS, Lo-Cocco ukazuje na neophodnost kako prijavljivanja rezultata lečenja bolesnika koji nisu uključeni u kliničke studije a dijagnostikovani su u periodu njihovog trajanja, tako i neophodnost stimulisanja epidemioloških i populacionih studija koje bi pružile uvid realan život [65]. Lo Coco takođe predlaže redefinisane aktuelnog pojma RS, predlažući uključivanje u definiciju RS bolesnika umrlih pre početka terapije, kao i izostavljanje iz definicije RS numeričke odrednice za dužinu lečenja [65]. U skladu sa njegovim preporukama, RS je u našoj studiji definisana kao smrt koja je nastupila od trenutka hospitalizacije do završetka indukcionog lečenja. Pet bolesnika u našoj grupi umrlo je posle 14. dana od početka terapije, a poslednja RS dijagnostikovana je 28. dana, što pokazuje da smrt u APL može nastupiti i u kasnim fazama indukcionog lečenja. Sa druge strane, tri bolesnika (4%) su umrli pre početka terapije što je značajno niže u poređenju sa saopštenjem Švedskog registra u okviru koga je registrovana RS pre započinjanja lečenja od 13% [60]. Istovremeno, nismo zabeležili smrt nedijagnostikovanih ali APL visoko suspektnih bolesnika, kao ni smrt usled pogrešne dijagnoze i terapije. Do sada nisu publikovane studije koje su na ovaj način klasifikovale RS u APL, te poređenje učestalosti pojedinih potkategorija nije zasada moguće.

Krvarenje i to isključivo u CNS, bilo je uzrok RS kod 59% naših bolesnika što je u skladu sa saopštenjima PETHEMA, GIMEMA, švedske, brazilske i Turske grupe u kojima je

hemoragija kao uzrok RS registrovana kod: 50%, 54.5%, 41%, 60.5% i 65% bolesnika [33, 59, 60, 66, 111].

Sa druge strane, DS je bio uzrok RS kod 23% naših bolesnika, što je veća smrtnost u poređenju sa rezultatima PETHEMA studija (16%), GIMEMA studije (6.8%), švedskog registra (3.4%), brazilske studije (9.3%), i turske grupe (5%) [26-29, 33, 59, 60, 66, 68]. U našoj grupi, uočena je veoma visoka učestalost ARDS-a kao manifestacije DS dok, sa druge strane, nismo bili u mogućnosti da dokažemo krvarenje u pluća ni kod jednog pacijenta. U vezi sa ovim, važno je istaći da je, zbog neizvodljivosti agresivnih dijagnostičkih procedura (bronhoskopija) tokom indukcionog lečenja APL, veoma teško razlikovati krvarenje u pluća od ARDS-a u sklopu DS, što može biti uzrok registrovanja većeg broja "teškog" i fatalnog DS u našoj grupi.

Kao treći uzročnik RS u našoj grupi navedene su infekcije sa učestalošću od 11.76%. U PETHEMA grupi infekcije su ipak bile znatno zastupljenije, sa čak 27% udela u RS [68]. U brazilskoj studiji infekcije nisu uopšte navedene kao uzrok smrti, ali zajedno sa ATRA sindromom ili krvarenjem čine 14% svih RS [59]. Niži procenat RS uzrokovane infekcijama u našoj grupi može takođe biti posledica neadekvatne diferencijalne dijagnoze DS i infekcije pluća, ili koegzistiranja oba stanja.

Tipična vremenska distribucija uzroka RS, opisana u literaturi, uočena je i kod naših bolesnika [5, 69]. Naime, u našoj studiji, krvarenje je bilo jedini uzrok RS pre terapije i dominantan uzrok smrti tokom prve nedelje lečenja, sa medijanom nastanka 4. dana. Samo kod jednog bolesnika je RS nastupila usled krvarenja posle prve nedelje lečenja (na 26. dan od početka terapije). Sa druge strane, smrt usled "teškog" oblika DS javljala se kasnije, prosečno 7. dana a najkasnije 20. dana od početka terapije. Infekcije kao uzrok smrti registrovane su tokom 4. nedelje lečenja.

Strategija prevencije RS u toku APL podrazumeva bolje razumevanje faktora rizika za njen nastanak. U vezi sa ovim, Talman i saradnici su sugerisali da bi i do 60% svih slučajeva RS u APL moglo da se izbegne ukoliko bi se ATRA pravovremeno primenila [46]. U cilju analize korelacije stope RS i kašnjenja u primeni ATR-e u našoj seriji bolesnika sa APL, analizirali smo uticaj parametara: "kašnjenje bolesnika", "medicinsko kašnjenje" i "kašnjenje terapije" na učestalost RS. Iako su sva tri vremena bila duža kod rano umrlih bolesnika, razlika nije dostigla statističku značajnost. U vezi sa ovim, švedska populaciona studija je ispitivala kašnjenje terapije počev od prvog medicinskog kontakta, prvog kontakta

hematologa i od datuma dijagnoze. Statistički značajna razlika nije uočena ali uz postojanje trenda kašnjenja kod nekih bolesnika sa RS [60]. Stanfordska studija koja je je ispitivala kašnjenje terapije, odnosno period od hospitalizacije do primene ATR-e, takođe nije uočila značajno kašnjenje u grupi rano umrlih bolesnika. Sa druge strane, Altman i saradnici su pokazali da, ukoliko se ATRA primeni u roku od 48 h od postavljanja sumnje na APL, stopa RS iznosi 20%, dok se smrtnost povećava na čak 80%, ukoliko se ATRA primeni 3. i 4. dana [115]. Za razliku od naše studije, u navedenim studijama kašnjenje bolesnika nije ispitivano. Uočen trend kašnjenja lečenja kod pacijenata sa RS u APL u svim do sada sprovedenim studijama dovoljno je da podrži primenu ATRA-e pri najmanjoj sumnji na oboljenje [60, 63, 115, 116].

Dizajn naše, unicentrične studije, ograničio je mogućnost analize uticaj tipa bolnice u kojoj se leče oboleli sa APL na pojavu RS. U vezi sa ovim, rezultati švedske i studije iz SAD-a pokazuju znatno bolje preživljavanje bolesnika lečenih u univerzitetskim bolnicama u odnosu na manje centre [60, 115, 116].

Identifikovanje kliničko-laboratorijskih parametara na prezentaciji APL, koji imaju prognozni značaj za nastanak RS, omogućio bi formiranje prognostičkog skora i rano otkrivanje bolesnika sa visokom rizikom za nastanak RS i eventualni preemtivni terapijski pristup.

Prediktori RS, identifikovani univarijantnom analizom u našoj grupi, bili su: broj leukocita $\geq 10 \times 10^9/L$, ECOG PS ≥ 3 , fibrinogen < 2 g/L, PT $< 50\%$, ISTH DIK skor ≥ 6 i M3v tip bolesti. Multivarijanta analiza je identifikovala samo broj leukocita $\geq 10 \times 10^9/L$ kao nezavisni prognozni faktor RS. Do sada su u literaturi indentifikovani brojni prognozni faktori za nastanak RS. Tako su, u švedskoj populacionoj studiji kao prediktori RS indentifikovani: starost > 55 godina, ECOG PS 3-4, broj leukocita $> 10 \times 10^9/L$, povišen kreatinin u serumu, povišena vrednost CRP i LDH u serumu, hipoalbuminemija i trombocitopenija [60]. Sa druge strane, američka populaciona studija je identifikovala samo životnu dob > 55 godina kao prediktivni faktor RS [61]. Španska kooperativna grupa za APL je pak ukazala na značaj sledećih prediktivnih faktora za nastanak RS: povišena vrednost kreatinina u serumu, broj leukocita $> 10 \times 10^9/L$, starost > 60 godina, muški pol, ECOG PS > 1 i CD56 pozitivnost [68].

Prisustvo *FLT3-ITD* mutacije u našoj grupi bolesnika nije imalo prognozni značaj za nastanak RS, što je u skladu sa nalazom drugih autora [78, 114]. Međutim, studija Barragán i

saradnika, sprovedena na 306 bolesnika sa APL, pokazala je da bolesnici sa *FLT3-ITD* mutacijom imaju veću učestalost RS, mada prisustvo *FLT3-ITD* nije zadržalo prognozni značaj u multivarijantnoj analizi [79]. Sa druge strane, visok nivo ekspresije WT1 gena je, u našoj studiji, imao prediktivnu vrednost za nastanak RS. Hecht sa saradnicima, koji je jedini pored nas ispitivao značaj WT1 ekspresije u APL, nije uočio sličnu korelaciju, mada su visoku ekspresiju WT1 definisali na drugačiji način [99]. Naime, u našoj studiji je kao "visoka" definisana ekspresija veća od srednje ekspresije + jedna SD, dok je u studiji Hechta i saradnika ona definisana kao ekspresija iznad 75 percentila [99].

Sledeći primer PETHEMA grupe koja je analizirala prediktivne faktore za svaki uzrok RS ponaosob (RS uzrokovana krvarenjem, infekcijom i DS), analizirali smo prediktivne faktore za nastanak hemoragijskog oblika RS [68]. Sa druge strane, broj bolesnika umrlih usled DS i infekcije bio je isuviše mali za adekvatnu statističku analizu.

Prediktivni faktori za nastanak hemoragijske RS, identifikovani u PETHEMA studijama multivarijantnom analizom su: povišen kreatinin u serumu, broj blasta u krvnoj slici $>30 \times 10^9/L$ i prisustvo koagulopatije [68]. Sa druge strane, koreanska grupa autora ukazala je da su dvostruko povećana koncentracija LDH u serumu i nivo fibrinogena u serumu ≤ 1.5 gr/L prognozni faktori za nastanak hemoragijske RS [71].

Prediktori hemoragijske RS, u univarijantnoj analizi, u našoj grupi bolesnika, bili su: loše opšte funkcionalno stanje - ECOG PS ≥ 2 , vitalno ugrožavajuće krvarenje na prijemu, broj leukocita $> 20 \times 10^9/L$, nivo fibrinogena u serumu < 2 g/L, PT $< 50\%$, ISTH DIK skor ≥ 6 i ISTH DIK skor ≥ 7 . Međutim, u multivarijantnoj analizi nezavisnost su zadržali samo vitalno ugrožavajuće krvarenje prisutno na prijemu, broj leukocita $> 20 \times 10^9/L$ i ISTH DIK skor ≥ 7 . Na osnovu ovih parametara koji su zadržali značajnost, dizajniran je prediktivni skor za razvoj hemoragijske RS. Zapravo, učestalost hemoragijske RS u grupi pacijenata visokog rizika iznosila je 100%, dok je u grupi umerenog rizika bila 26.1% a u grupi niskog rizika samo 2.4%. Navedeni rezultati ukazuju da rutinski kliničko-laboratorijski parametri kombinovani u skor mogu identifikovati bolesnike sa veoma visokim rizikom za nastanak hemoragijske RS. Prevencija RS grupi visokorizičnih bolesnika sa APL podrazumevala bi što raniju primenu ATRA-e, intenzivnu transfuzionu terapiju ali i primenu novih terapijskih modaliteta.

Jedna od mogućnosti koju smo razmatrali tokom naše studije je da su bolesnici sa hemoragijskim oblikom RS bili ili neadekvatno transfundovani ili da su bili rezistentni na

transfuzije trombocita [63]. Međutim, broj dana sa brojem trombocita $\leq 30^9/L$ i nivoom fibrinogenom u serumu $\leq 1g/L$ bio je istovetan u grupi bolesnika sa i bez hemoragijskog oblika RS. Sa druge strane, broj dana provedenih sa $PT \leq 50\%$ bio je statistički značajno veći kod bolesnika sa hemoragijskom RS, što je u korelaciji sa rezultatima Stanfordske studije [63]. Većina studijskih protokola za APL kao i ELN, preporučuju primenu SZP u slučaju hipofibrinogenemije ($< 1 g/L$), dok produžena vrednost PT nije bila kriterijum za susstitutivnu terapiju [5, 33, 34, 109]. Sa druge strane, naši rezultati ukazuju na potrebu održavanja vrednosti PT iznad 50% kod bolesnika sa APL. U vezi sa ovim, novi protokol PETHEMA LPA 2012 predvideo je da se broj trombocita tokom trajanja koagulopatije održava $> 50 \times 10^9/L$ a vrednost $INR < 1.3$ [31].

Takođe, Sanz je sugerisao da bi razvoj novih lekova koji blokiraju menahizam koagulacionih poremećaja bio od najvećeg značaja u prevazilaženju problema hemoragijske RS [48]. Jedan od ovih novih lekova, trombomodulin α je pokazao odlične rezultate u sanaciji DIK-a i smanjenju hemoragijskih komplikacija, u postmarketinškoj studiji, sprovedenoj na 1032 hematološka bolesnika, od kojih je njih 172 imalo APL. Trombomodulin α je kod bolesnika sa APL, primenjenjivan u standardnoj dozi (0.06 mg/kg IV) pre početka anitileukemijske terapije, a potom jednom dnevno do rezolucije DIK-a. Prosečno vreme primene leka je iznosili 7.0 ± 6.3 dana. Transfuzije koncentrovanih trombocita i SZP su primenjivane u istom periodu prema standardnim vodičima. Hemoragijska RS je nastupila kod samo 6/172 (3.5%) bolesnika sa APL-om, dok je 12/172 (7%) bolesnika razvilo po život opasna krvarenja [117, 118].

Relaps APL dijagnostikovali smo kod 13.79% bolesnika. Naime, kod naših bolesnika, lečenih protokolom PETHEMA LPA 99, stopa relapsa je iznosila 18.74%, dok je u grupi pacijenata, lečenih protokolom PETHEMA LPA 2005, stopa relapsa bila 7.4%. Naši rezultati su u skladu sa rezultatima lečenja španske kooperativne grupe PETHEMA LPA 2005, koja je saopštila četvorogodišnju učestalost relapsa od 9%, što je statistički značajno manje od 11% koliko iznosi stopa relapsa tokom lečenja protokolom PETHEMA LPA 99 [34, 110]. Trend smanjenja stope relapsa u grupi bolesnika lečenih novijim protokolom je posledica intenzivnijeg konsolidacionog lečenja visokorizičnih bolesnika [5, 110]. Neophodno je istaći da su sve PETHEMA studije pokazale da je stope relapsa veća u grupi bolesnika visokog rizika, uprkos stalnoj intenzifikaciji konsolidacionog lečenja [5, 110]. U vezi sa tim se veća učestalost relapsa u našoj grupi pacijenata može objasniti prisustvom veće proporcije visokorizičnih bolesnika.

Prosečno vreme do nastanka relapsa APL, u našoj studiji, iznosilo je 26 meseci (opseg: 4- 44), što je značajno duži period od perioda koji je saopštila španska kooperativna grupa analizom lečenja protokolima PETHEMA LPA 99 i 2005 (15 meseci) [34, 110] i može biti posledica malog broja uključenih pacijenata u našoj studiji. Učestalost kasnih relapsa (1/8 naših bolesnika) je redak događaj i u skladu sa učestalošću registrovanom u velikim studijskim grupama (do 5%) [5, 35, 119]. Učestalost ekstramedularne (CNS lokalizacije – 2.5%) u našoj studiji odgovara rezultatima publikovanim u drugim studijama (3-5%) [5].

Relapsi APL u našoj grupi češće su dijagnostikovani u molekularnoj fazi u odnosu na hematološki relaps (62.5% vs. 37.5%). Sa druge strane, zastupljenost molekularnih relapsa znatno je manja u literaturnim podacima (PETHEMA LPA 2005 23%, kineska grupa 18.75%) [110, 110]. Rano dijagnostikovanje relapsa pre razvoja koagulopatije, odnosno njegovo otkrice u molekularnoj fazi prediktor je dobrog ishoda "salvage" terapije, pre svega zbog niske stope hemoragijske smrti tokom reindukcionog lečenja [5, 120].

Ispitivanje prognoznih faktora za postizanje KR2 ograničeno je malim brojem bolesnika, kako u našoj studiji takop i u drugim daleko brojnijim studijama [5, 121, 122]. U našoj analizi prediktori relapsa u trenutku dijagnoze APL, bili su broj leukocita $\geq 10 \times 10^9/L$, *FLT3-ITD* pozitivnost i *CD56* pozitivnost. U PETHEMA-GIMEMA studiji, publikovanoj 2000. godine, izvršena je analiza većeg broja kliničko – labaratorijskih parametara u pogledu prediktivne vrednosti za nastanak relapsa. Kao značajni su izdvojeni samo broj leukocita i trombocita. Na osnovu njih je dizajniran Sanzov skor koji je zadržao značajnost i u svim narednim PETHEMA studijama [41]. U studijama drugih grupa leukociti su uvek imali prediktivnu vrednost, što nije uvek bio slučaj i sa Sanzovim skorom [5, 35, 123]. Univarijantne analize različitih studija identifikovale i starost ≥ 60 godina, *M3v*, *DCA*, *bcr3* tip transkripta, *FLT3-ITD* mutaciju i *CD56* pozitivnost kao prediktivne faktore za nastanak relapsa APL [5, 36, 73, 74, 79, 88, 121].

Koliko nam je poznato, naša studija je zasada jedina koja je pratila nivo ekspresije *WT1* gena u APL i to počev od dijagnoze, tokom indukcije, konsolidacionog lečenja, terapije održavanja kao i po završetku lečenja, u okviru praćenja MRB. Posle primene indukcione kure dolazilo je do naglog smanjenja ekspresije *WT1* gena kod većine bolesnika. Ipak, 27% bolesnika je zadržalo povećanu *WT1* ekspresiju. Tokom monitoringa MRB, posle završetka konsolidacije, uočena je velika varijabilnost ekspresije *WT1* gena i to kako između bolesnika tako i kod pojedinačnih bolesnika. Pri tom je čak jedna trećina bolesnika u periodu MR imala bar jednu epizodu povećane ekspresije *WT1* gena. Navedeni rezultat je u saglasnosti sa

rezultatima uočenim u drugim tipovima AML i verovatno je posledica ekspresije WT1 gena u normalnim ćelijama [95-98]. Nažalost, ovakav profil ekspresije smanjuje upotrebnu vrednost markera u praćenju MRB. Naša analiza je ukazala da bolesnici sa povećanom ekspresijom WT1 gena posle prve konsolidacije, kao i oni sa porastom ekspresije ≥ 1 log tokom daljeg praćenja imaju veću verovatnoću nastanka relapsa. Kod 1/6 (16.7%) bolesnika sa relapsom povećanje ekspresije WT1 gena uočeno je pre detekcije *PML-RAR α* pozitivnosti. Ipak, neophodne su studije na većem broju bolesnika da bi se utvrdio stvarni prediktivni značaj monitoringa ekspresije WT1 gena kao markera MRB u APL.

Zbog malog broja bolesnika sa relapsom APL, terapijske mogućnosti su ispitivane samo putem manjeg broja nerandomizovanih studija uz korišćenje istorijskih kontrola [5, 83-87, 120]. S obzirom da terapija ATO-om još uvek nije dostupna u Srbiji, 7/8 naših bolesnika sa relapsom je lečeno primenom kombinacije "ATRA + HiDAC", koju predviđaju protokoli PETHEMA LPA 99 i 96 [83]. Poređenje ishoda lečenja naše grupe bolesnika sa originalnim španskom studijom pokazuje slične rezultate. Naime, KR2 postignuta je kod 75% naših bolesnika, sa indukcijom smrtnošću od 25%, dok rezistencija nije registrovana. Sa druge strane, procenat bolesnika koji su postigli KR2 u PETHEMA studiji iznosio je 75%, uz stopu indukcione smrtnosti od 13.5% i zastupljenost rezistencije od 13% [83]. Veća indukciona smrtnost uz odsustvo rezistencije na terapiju u našoj seriji je najverovatnije posledica malobrojnosti našeg uzorka.

Studije koje su analizirale lečenje pacijenata sa relapsom APL pokazale su superiornost autologe u odnosu na alogenu transplantaciju M \acute{C} H u pogledu toksičnosti, DFS i OS [5, 87, 123]. U vezi sa ovim, u našoj studiji, svi bolesnici koji su postigli drugu molekularnu remisiju lečeni su autologom transplantacijom M \acute{C} H, bez značajnih toksičnih efekata i peritransplantacionog mortaliteta. U daljem toku, relaps je posle autologe transplantacije M \acute{C} H nastao kod 2/5 (40%) bolesnika, dok je, prema literaturnim podacima, incidenca relapsa u KR2 19-32% [5, 37, 84-89].

Naša studija je, kao prognozne parametre sa uticajem na OS bolesnika identifikovala broj leukocita, visok Sanzov skor, ISTH DIK skor ≥ 5 i M3v. U vezi sa ovim, u literaturi su kao prediktivni faktori kraćeg OS u APL do sada registrovani: leukociti $\geq 10 \times 10^9/L$, visok Sanzov skor, starost ≥ 60 godina, M3v, bcr3 izoforma transkripta, *FLT3-ITD* mutacija i CD56 pozitivnost [5, 36, 37, 40, 58, 60, 63, 68, 73, 79]. Izostanak CD56 pozitivnosti sa liste prediktivnih markera u našoj seriji je naverovatnije posledica malog broja analiziranih

bolesnika. Od interesa je istaći da u našoj studiji pacijenti stariji od 60 godina nisu imali veću učestalost RS, konsolidacione smrti i relapsa.

Najvažniji nalaz naše studije je visoka statistička značajnost ISTH DIK skora kao prognosnog parametra dužine OS obolelih od APL. Naime, navedeni parameter nije u drugim studijama testiran a u našoj studiji je uz broj leukocita $\geq 10 \times 10^9/L$ bio jedini parameter koji je zadržao značajnost u multivarijantnoj analizi.

6. ZAKLJUČCI

- 1) Značajan broj bolesnika na prijemu je imao hemoragijski sindrom (68/75, 91%), dok je vitalno ugrožavajuće krvarenje ispoljilo 10/75 (13.33%) bolesnika. Prediktivni faktori za pojavu krvarenja u univarijantnoj analizi bili su: broj leukocita $\geq 10 \times 10^9/L$, broj trombocita $< 40 \times 10^9/L$, $PT \leq 50\%$ i ISTH DIK skor ≥ 5 . Najznačajniji prediktivni faktor u multivarijantnoj analizi bila je leukocitoza.
- 2) Većina bolesnika je na prezentaciji bila leukopenična (45/75, 60%). Broj leukocita $\geq 20 \times 10^9/L$ imalo je 22/75 (29%) bolesnika, njih 6/75 (8%) imalo je broj $\geq 50 \times 10^9/L$, dok su samo dva bolesnika (3%) imala ekstremnu leukocitozu.
- 3) Prema vrednosti ISTH DIK skora, 62/73 (85%) bolesnika je na prezentaciji ispunjavalo kriterijume za DIK. Vrednost ISTH skora 6 imalo je 36/73 (49%) bolesnika, dok je skor 7 imalo 7/73 (9.5%) bolesnika.
- 4) M3v imalo je 8/75 (11%) bolesnika. Bolesnici sa M3v imali su u proseku veći broj leukocita, veći procenat blasta u krvnoj, nižu koncentraciju fibrinogena, prosečno veći ISTH DIK skor, češću ekspresiju CD34, CD2, CD56 i češće *FLT3-ITD* mutaciju.
- 5) DCA su uočene kod 12/72 (17%) bolesnika. Najčešća DCA bila je +8, uočena je kod 5/12 (42%) bolesnika. Bolesnici sa DCA su statistički značajno češće ekspresirali CD56 a značajno ređe su imali *FLT3-ITD*.
- 6) Distribucija bolesnika prema tipu *PML-RAR α* transkripta bila je: dugi tip transkripta (bcr1) imalo je 21/42 (50%), intermedijarni (bcr2) 4/42 (10%) i kratki (bcr3) 17/42 (40%) bolesnika.
- 7) *FLT3-ITD* mutaciju je ekspresiralo 16/52 (30%) bolesnika, a *FLT3-D385* mutaciju 5/52 (10%) bolesnika. *FLT3-ITD* pozitivnost je bila udružena sa prosečno većim brojem leukocita, većom zastupljenošću M3v, češćom ekspresijom CD2 i CD56 antigena, manjom učestalošću DCA, kao i većom ekspresijom WT1 gena i većom učestalošću tromboza. Sa druge strane, nisu uočene značajne razlike u pogledu kliničko-laboratorijskih parametara, između bolesnika sa i bez *FLT3-D385* mutacije.
- 8) Ekspresija WT1 gena je bila statistički značajno veća kod obolelih od APL, u poređenju sa zdravom kontrolom. Visoku inicijalnu WT1 ekspresiju imalo je 9/28 (32%) bolesnika. Bolesnici sa visokom ekspresijom imali su veći broj leukocita, viši Sanzov skor, češće bcr3 tip *PML-RAR α* transkripta i češće prisutnu *FLT3-ITD* mutaciju, u poređenju sa bolesnicima sa inicijalno niskim nivoom WT1 ekspresije.

- 9) Prosečno "vreme kašnjenja" bolesnika iznosilo je 16 dana (opseg: 1-120), prosečno "medicinsko kašnjenje" iznosilo je 8.5 dana (opseg: 1-20) i prosečno "kašnjenje lečenja" iznosilo je 0 dana (opseg: 0-5).
- 10) DS se razvio kod 18/75 (24%) bolesnika i to teškog stepena kod 12/18 (67%) i umerenog kod 6 (38%) bolesnika. Bolesnici koji su razvili DS imali su veći inicijalni broj leukocita, češće visok Sanzov skor, veći procenat promijelocita u krvnoj slici i češće varijantni oblik bolesti.
- 11) RS nastupila je kod 17/75 (22.67%) bolesnika. Uzroci rane smrti bili su: krvarenje kod 10/17 (59%) bolesnika, DS kod 4/17 (23.5%) bolesnika, infekcija kod dva (2.67%) i akutni infarkt miokarda kod jednog bolesnika (1.33%).
- 12) RS je u proseku nastupala 5. dana od početka terapije (opseg 0-28). Kod tri bolesnika, smrt prouzrokovana krvarenjem, nastupila je pre početka lečenja.
- 13) Prediktori nastanka RS u univarijantnoj analizi bili su broj leukocita $\geq 10 \times 10^9/L$, ECOG skor ≥ 3 , fibrinogen < 2 g/L, PT $< 50\%$, ISTH DIK skor ≥ 6 i M3v. Sa druge strane, multivarijanta analiza je identifikovala samo leukocitozu kao nezavisni prognozni faktor nastanka RS.
- 14) Prediktori hemoragijske RS u univarijantnoj analizi bili su: ECOG skor ≥ 3 , vitalno ugrožavajuće krvarenje na prijemu, leukociti $> 15 \times 10^9/L$, leukociti $> 20 \times 10^9/L$, fibrinogen < 2 g/L, PT $< 50\%$, ISTH DIK skor ≥ 6 i ISTH DIK skor ≥ 7 . Nezavisni prognozni parametri u multivarijantnoj analizi bili su: vitalno ugrožavajuće krvarenje na prijemu, leukociti $> 20 \times 10^9/L$ i ISTH DIK skor ≥ 7 .
- 15) Na osnovu rezultata multivarijante analize prediktivnih faktora za razvoj hemoragijske RS dizajniran je prognozni skor: 0 poena bolesnici bez vitalno ugrožavajućeg krvarenja na prezentaciji, sa leukocitima $< 20 \times 10^9/L$ i ISTH DIK skorom < 7 ; 1 poen bolesnici sa vitalno ugrožavajućim krvarenjem na prezentaciji, sa leukocitima $\geq 20 \times 10^9/L$; 2 poena ITSH DIK skor ≥ 7 . Na osnovu vrednosti skora bolesnici su klasifikovani u tri grupe: nizak rizik (0 poena), umeren rizik (1-2 poena) i visok rizik (3 poena). Učestalost rane hemoragijske smrti se značajno razlikovala između rizičnih grupa: nizak rizik 2.4%, umeren 26.1%, visok rizik 100%.
- 16) U studijskoj grupi nije bilo slučajeva primarne rezistencije. Naime, svih 58/75 (77.33%) preživelih bolesnika postiglo je citološku remisiju posle indukcije kao i citogenetsku remisiju i MR posle završetka konsolidacionog lečenja.
- 17) Posle prve konsolidacione kure postignuta je redukcija ekspresije WT1 gena od > 3 loga kod 16/22 (72.64%) bolesnika, > 2 loga kod 5/22 (22.72%) i < 1 loga kod 1/22

- (4.54%) bolesnika. Ipak, 6/22 (27%) bolesnika nije normalizovalo ekspresiju WT1 gena.
- 18) Tokom konsolidacionog lečenja smrtni ishod, isključivo usled infektivnih komplikacija, nastupio je kod tri bolesnika (5.17%).
 - 19) Relaps APL je registrovan kod 8/55 (13.79%) bolesnika, i to hematološki kod tri i molekularni kod pet bolesnika. CNS infiltracija, u sklopu sistemskog relapsa dijagnostikovana je kod 2/55 (3.64%).
 - 20) Relapsi su dijagnostikovani prosečno u 25. mesecu od postizanja KR (opseg 3 – 43 meseca). Pri tom, rani relaps je nastao kod 7/8 bolesnika (87.5%, opseg 3 – 35 meseci), dok je kasni relaps registrovan kod samo jednog bolesnika (14.3%) i to u 43. mesecu od početka lečenja.
 - 21) Bolesnici sa relapsom APL su imali prosečno veći broj leukocita, češće su ekspimirali CD56 antigen i *FLT3-ITD* mutaciju, u poređenju sa bolesnicima u perzistentnoj KR.
 - 22) Povećanje ekspresije WT1 uočena je u uzorcima tokom relapsa (>1.5 log u 2/6 (30%) relapsa, >1 log kod 3/6 (50%) i <1 log kod 1/6 (16.67%). Povećanje ekspresije WT1 gena korelisalo je sa pojavom PML-RAR α pozitivnosti u 5/6 (83.3%) uzoraka. U jednom slučaju porast WT1 ekspresije je registrovan 6 meseci pre pojave PML-RARA pozitivnosti.
 - 23) Relaps APL bio je udružen sa povećanom ekspresijom WT1 gena na kraju prve konsolidacije kao i povećanjem ekspresije od >1 log tokom praćenja MRB.
 - 24) Tokom studijskog perioda umrlo je 22/75 (29.33%) bolesnika: 17/22 (77.27) tokom indukcije, 3/22 (13.63%) tokom konsolidacija i 2/22 (9.1%) u relapsu bolesti. Petogodišnje OS iznosilo je 75%
 - 25) Faktori koji su uticali na ukupno preživljavanje bili su: ECOG skor ≥ 3 , veći procenat blasta i promijelocita u perifernoj krvi, niži broj trombocita, visok Sanzov skor, produženo PT, povišen D dimer, M3v, ISTH DIK skor ≥ 5 .

7. LITERATURA

1. Sretenovic A. Značaj utvrđivanja PML-RAR Alfa gena u proceni remsije i njegova uloga u predviđanju relapse akutne promijelocitne leukemije. Magistarska teza. Medicinski fakultet u Beogradu 2010.
2. Janković G. Maligne bolesti krvi, Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, Beograd, 1999, str. 81-118.
3. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT et al. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med* 1985;103:620–5.
4. Arber DA, Brunning, Le Beau RD et al. WHO classification. IARC. Lyon, 2008, str 110-146.
5. Sanz M, Grimwade D, Tallman M, Lowenberg B, Fenaux P, Estey E et al. Management of acute promyelocytic leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* 2009;113:1875-91.
6. Hillestad LK. Acute promyelocytic leukemia. *Acta Med Scand*. 1957;159:189-94.
7. Bernard J, Mathe G, Boulay J et al. Acute promyelocytic leukemia: a study made on 20 cases. *Schweiz Med Wochenschr*. 1959;89:604-8.
8. Wang Z, Chen Z. Acute promyelocytic leukemia: from highly fatal to highly curable. *Blood* 2008;111:2505-15.
9. Catalano A, Dawson MA, Somana K et al. The PRKAR1A gene is fused to RARA in a new variant acute promyelocytic leukemia. *Blood* 2007;110:4073-6.
10. Kondo T, Mori A, Darmanin S et al. The seventh pathogenic fusion gene FIP1L1-RARA was isolated from a t(4;17)- positive acute promyelocytic leukemia. *Haematologica* 2008;93:1414-6.
11. Mitrović M, Elezović I. Trombohemoragijske komplikacije u akutnim leukemijama. *Acta Clinica* 2011; 3: 294-312.
12. Falanga A, Russo L, Tartari C. Pathogenesis and Treatment of thrombohemorrhagic diathesis in Acute Promyelocytic Leukemia. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2011;3(1):e2011068.
13. Sanz MA, Montesinos P. Open issues on bleeding and thrombosis in acute promyelocytic leukemia. *Thromb Res* 2010;125: S51-S54.

14. Rashidi A, Silverberg ML, Conkling PR et al. Thrombosis in acute promyelocytic leukemia. *Thromb Res* 2013;131:281-9.
15. Breccia M, Avvisati G, Latagliata R et al. Occurrence of thrombotic events in acute promyelocytic leukemia correlates with consistent immunophenotypic and molecular features. *Leukemia* 2007;21:79-83.
16. Lo-Coco F, Cicconi L. History of Acute Promyelocytic Leukemia: A Tale of Endless Revolution. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2011;3(1):e2011067.
17. Bernard J, Weil M, Boiron M et al. Acute promyelocytic leukaemia. Results treatment with daunorubicin. *Blood* 1973;41:489-96.
18. Flynn PJ, Miller WJ, Weisdorf DJ et al. Retinoic acid treatment of acute promyelocytic leukemia: in vitro and in vivo observations. *Blood*. 1983;62:1211-7.
19. Nilsson B. Probable in vivo induction of differentiation by retinoic acid of promyelocytes in acute promyelocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 1984;57:365-71.
20. Daenen S, Vellenga E, van Dobbenburgh OA et al. Retinoic acid as antileukemic therapy in a patient with acute promyelocytic leukemia and *Aspergillus* pneumonia. *Blood* 1986;67:559-61.
21. Huang ME, Ye YC, Chen SR et al. Use of alltrans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Blood*. 1988;72:567-72.
22. Fenaux P, Le Deley MC, Castaigne S et al. Effect of all trans retinoic acid in newly diagnosed acute promyelocytic leukemia: results of a multicentre randomized trial: European APL 91 Group. *Blood* 1993;82:3241-9.
23. Warrell RP, Frankel SR, Miller WH et al. Differentiation therapy of acute promyelocytic leukemia with tretinoin (all trans retinoic acid). *N Engl J Med* 1991;324:1385-93.
24. Sun GL, Huang YG, Chang XF. Clinical study of the treatment with all-trans retinoic acid in 544APL patients. *Chin J Hematol*. 1992;13:135-137.
25. Avvisati G, Lo Cocco F, Diverio D et al. AIDA (all-trans retinoic acid + idarubicin) in newly diagnosed acute promyelocytic leukemia: a GIMEMA pilot study. *Blood* 1996;88:1390-8.
26. Sanz M, Montesinos P. How we prevent and treat differentiation syndrome in patients with acute promyelocytic leukemia. *Blood* 2014;123:2777-82.
27. Montesinos P, Bergua JM, Vellenga E et al. Differentiation syndrome in patients with acute promyelocytic leukemia treated with all- trans retinoic acid and anthracycline chemotherapy: characteristics, outcome, and prognostic factors. *Blood* 2009;113:775-83.

28. Cardinale L, Asteggiano F, Moretti F et al. Pathophysiology, clinical features and radiological findings of differentiation syndrome/all-trans-retinoic acid syndrome. *World J Radiol* 2014; 28;6:583-8.
29. Cabral R, Caballero JC, Alonso S, Dávila J, Cabrero M, Caballero D. Late Differentiation Syndrome in Acute Promyelocytic Leukemia: A Challenging Diagnosis. *Hematol Rep* 2014;6(4):5654.
30. Frankel SR, Eardley A, Lauwers G et al. The 'retinoic acid syndrome' in acute promyelocytic leukemia. *Ann Intern Med* 1992; 117:292-6.
31. Tratamiento de la Leucaemia Promielocitica Aguda de Novo Diagnostico. Recomendaciones terapeuticas PETHEMA LPA 2012. Version 30 May 2012.
32. Bourgeois E, Chevret S, Sanz M, et al. Long-term follow-up of APL treated with ATRA and chemotherapy (CT) including incidence of late relapses and overall toxicity [abstract]. *Blood*. 2003;102: 140a. Abstract 483.
33. Avvisati G, Petti MC, Lo Cocco F, et al. The Italian way of treating acute promyelocytic leukemia (APL): final act [abstract]. *Blood*. 2003;102:142a. Abstract 487.
34. Sanz MA, Martin G, Gonzalez M et al. Risk adapted treatment of acute promyelocytic leukemia with all-trans-retinoic acid and anthracyclines monochemotherapy: a multicenter study by the PETHEMA group. *Blood*. 2004;103:1237-43.
35. Estey E, Thall PF, Pierce S et al. Treatment of newly diagnosed acute promyelocytic leukemia without citarabine. *J Clin Oncol* 1997;15:483-490.
36. Tallman MS, Andersen JW, Schiffer CA et al. Alltrans retinoic acid in acute promyelocytic leukemia: long-term outcome and prognostic factor analysis from the North American Intergroup protocol. *Blood* 2002;100:4298-302.
37. Avvisati G, Petti MC, Lo Coco F et al. Induction therapy with idarubicin alone significantly influences event-free survival duration in patients with newly diagnosed hypergranular acute promyelocytic leukemia: final results of the GIMEMA randomized study LAP 0389 with 7 years of minimal follow-up. *Blood* 2002;100:3141-6.
38. Ades L, Chevret S, Raffoux E et al. Is cytarabine useful in the treatment of acute promyelocytic leukemia? Results of a randomized trial from the European Acute Promyelocytic Leukemia Group. *J Clin Oncol* 2006;24:5703-10.
39. Sanz M, Martin G, Gonzales M et al. Risk adapted treatment of acute promyelocytic leukemia with all-trans-retinoic acid and antracycline monochemotherapy: a multitercentric study by the PETHEMA group. *Blood* 2004;103:1237-43.

40. Lo-Coco F, Avvisati G, Vignetti M et al. Front-line treatment of acute promyelocytic leukemia with AIDA induction followed by risk-adapted consolidation: results of the AIDA-2000 trial of the Italian GIMEMA group. *Blood*. 2004;104:392
41. Sanz M, Lo Coco F, Martí'n G et al. Definition of relapse risk and role of nonanthracycline drugs for consolidation in patients with acute promyelocytic leukemia: a joint study of the PETHEMA and GIMEMA cooperative groups. *Blood* 2000;96:1247-53.
42. Tallman M, Nabhan C, Feusner J et al. Acute promyelocytic leukemia: evolving therapeutic strategies. *Blood* 2002;99:759-67
43. Tallman MS, Andersen JW, Schiffer CA et al. Alltrans retinoic acid in acute promyelocytic leukemia. *N Engl J Med*. 1997;337:1201-8.
44. Avvisati G, Lo-Coco F, Paoloni F et al. AIDA 0493 protocol for newly diagnosed acute promyelocytic leukemia: very long-term results and role of maintenance. *Blood* 2011;117:4716-25.
45. Asou N, Kishimoto Y, Kiyoi H et al. A randomized study with or without intensified maintenance chemotherapy in patients with acute promyelocytic leukemia who have become negative for PML-RAR{alpha} transcript after consolidation therapy: The Japan Adult Leukemia Study Group (JALSG) APL97 study. *Blood* 2007;110:59-66.
46. Tallman MS, Manji GA. Don't just stand there, do something: strategies for the prevention of early death in acute promyelocytic leukemia: a commentary. *Blood Cells Mol Dis* 2011;46:173-4.
47. Tallman MS, Lefèvre P, Baine RM et al. Effects of all-trans retinoic acid or chemotherapy on the molecular regulation of systemic blood coagulation and fibrinolysis in patients with acute promyelocytic leukemia. *J Thromb Haemost* 2004; 2:1341-50.
48. Sanz M, Lo-Coco F. Modern Approaches to Treating Acute Promyelocytic Leukemia. *J Clin Oncol* 2011; 29:495-503.
49. Grimwade D, Jovanovic JV, Hills RK. Can we say farewell to monitoring minimal residual disease in acute promyelocytic leukaemia? *Best Pract Res Clin Haematol* 2014;27:53-61.
50. Sun HD, Ma L, Hu XC et al. I treated 32 cases of acute promyelocytic leukemia. *Chin J Integrat Chin West Med*. 1992;12:170-1.
51. Zhang P, Wang SY, Hu LH. Arsenic trioxide treated 72 cases of acute promyelocytic leukemia. *Chin J Hematol*. 1996;17:58-62.

52. Niu C, Yan H, Yu T et al. Studies on treatment of acute promyelocytic leukemia experience with arsenic trioxide: remission induction, follow-up, and molecular monitoring in 11 newly diagnosed and 47 relapsed acute promyelocytic leukemia patients. *Blood* 1999;94:3315-24.
53. Lazo G, Kantarjian H, Estey E et al. Use of arsenic trioxide (As₂O₃) in the treatment of patients with acute promyelocytic leukemia: the M.D. Anderson experience. *Cancer* 2003;97:2218-24.
54. Wanga H, Chenb X, Wanga B et al. The efficacy and safety of arsenic trioxide with or without all-trans retinoic acid for the treatment of acute promyelocytic leukemia: A meta-analysis. *Leuk Res* 2011;35:1170-7.
55. Powell BL, Moser B, Stock W et al. Effect of consolidation with arsenic trioxide (As₂O₃) on event free survival (EFS) and overall survival (OS) among patients with newly diagnosed acute promyelocytic leukemia (APL): North American Intergroup Protocol C9710. *J Clin Oncol* 2007(ASCO Meeting Abstracts Part I):2.
56. Lo-Cocco F, Ciccione L. Novel strategies in treatment of acute promyelocytic leukemia. *Leukemia Supplements* 2012;1:S18-S19.
57. dos Santos GA, Kats K, Pandolfi P. Synergy against PML-RARα: targeting transcription, proteolysis, differentiation, and self-renewal in acute promyelocytic leukemia. *J Exp Med* 2013;210:2793-802.
58. Sanz MA, Vellenga E, Rayo'n C et al: All-trans retinoic acid and anthracycline monochemotherapy for the treatment of elderly patients with acute promyelocytic leukemia. *Blood* 2004;3490-3.
59. Jacomo RH, Melo RA, Souto RF et al. Clinical features and outcomes of 134 Brazilians with acute promyelocytic leukemia who received ATRA and anthracyclines. *Haematologica* 2007;92:1431-2.
60. Lehmann S, Ravn A, Carlsson L et al. Continuing high early death rate in acute promyelocytic leukemia: a population-based report from the Swedish Adult Acute Leukemia Registry. *Leukemia* 2011;25:1128-34.
61. Park JH, Qiao B, Panageas KS et al. Early death rate in acute promyelocytic leukemia remains high despite all-trans retinoic acid. *Blood* 2011;118:1248-54.

62. Yanada M, Matsushita T, Asou N et al. Severe hemorrhagic complications during remission induction therapy for acute promyelocytic leukemia: incidence, risk factors, and influence on outcome. *Eur J Haematol* 2007;78:213-9.
63. McClellan JS, Kohrt HE, Coutre SR et al. Treatment advances have not improved the early death rate in acute promyelocytic leukemia. *Haematologica* 2012;97:133-6.
64. Paulson K, Serebrin A, Lambert P et al. Acute promyelocytic leukaemia is characterized by stable incidence and improved survival that is restricted to patients managed in leukaemia referral centres: a pan-Canadian epidemiological study. *Br J Haematol* 2014;166:660-6.
65. Lo-Coco F. ED in APL: tip of the iceberg? *Blood* 2011;118:1188-9.
66. Serefhanoglu S, Buyukasik Y, Goker H et al. Clinical features and outcomes of 49 Turkish patients with acute promyelocytic leukemia who received ATRA and anthracyclines (PETHEMA protocol) therapy. *Leuk Res* 2010;34:317-9.
67. Jeddi R, Ghe'dira H, Menif S et al. Treatment of acute promyelocytic leukemia with PETHEMA LPA 99 protocol: a Tunisian single center experience, *Hematology* 2010;15(4):204-9.
68. De la Serna, P. Montesinos, E. Vellenga et al. Causes and prognostic factors of remission induction failure in patients with acute promyelocytic leukemia treated with all-trans retinoic acid and idarubicin. *Blood* 2008;111:3395-402.
69. Lengfelder E, Hofmann WK, Nolte F. Management of elderly patients with acute promyelocytic leukemia: progress and problems. *Ann Hematol* 2013;92:1181-8.
70. Iland H, Bradstock K, Seymour J et al. Results of the APML3 trial incorporating all-trans-retinoic acid and idarubicin in both induction and consolidation as initial therapy for patients with acute promyelocytic leukemia. *Haematologica* 2012; 97:227-34.
71. Kim DY, Lee JH, Lee JH et al. Significance of fibrinogen, D-dimer, and LDH levels in predicting the risk of bleeding in patients with acute promyelocytic leukemia. *Leuk Res* 2011;35:152-8.
72. Tallman MS, Kim HT, Montesinos P et al: Does microgranular variant morphology of acute promyelocytic leukemia independently predict a less favorable outcome compared with classical M3 APL? A joint study of the North American Intergroup and the PETHEMA Group. *Blood* 2010;116:5650-9.

73. Montesinos P, Rayon C, Vellenga E et al: Clinical significance of CD56 expression in patients with acute promyelocytic leukemia treated with all- trans retinoic acid and anthracycline-based regimens. *Blood* 2011;117:1799-805.
74. Breccia M, De Propriis MS, Minotti et al. Aberrant phenotypic expression of CD15 and CD56 identifies poor prognostic acute promyelocytic leukemia patients. *Leuk Res* 2014;38:194-7.
75. Ono T, Takeshita A, Kishimoto Y et al. Expression of CD56 is an unfavorable prognostic factor for acute promyelocytic leukemia with higher initial white blood cell counts. *Cancer Sci* 2014;105:97-104.
76. Lin P, Hao S, Medeiros J et al. Expression of CD2 in Acute Promyelocytic Leukemia Correlates With Short Form of PML-RAR α Transcripts and Poorer Prognosis. *Am J Clin Pathol* 2004;121:402-7.
77. Kottaridis PD, Gale RE, Linch DC. Flt3 mutations and leukaemia. *Br J Haematol*. 2003;122:523-38.
78. Schnittger S, Haferlach C, Kern W et al. Clinical impact of FLT3 mutation load in acute promyelocytic leukemia with t(15;17)/PML-RARA. *Haematologica* 2011;96:1799–807.
79. Barragan E, Montesinos P, Camos M et al. Prognostic value of FLT3 mutations in patients with acute promyelocytic leukemia treated with all-trans retinoic acid and anthracycline monochemotherapy. *Haematologica* 2011;96:1470–7.
80. Ade`s L, Guerci A, Raffoux E et al. Very long-term outcome of acute promyelocytic leukemia after treatment with all- trans retinoic acid and chemotherapy: the European APL Group experience. *Blood* 2010;115:1690-6.
81. Douera D, Zicklb L, Schifferc C et al. All-trans retinoic acid and late relapses in acute promyelocytic leukemia: Very long-term follow-up of the North American Intergroup Study I0129. *Leuk Res* 2013;37:795–801.
82. Wang H, Cao F, Li J et al. Arsenic trioxide and mannitol for the treatment of acute promyelocytic leukemia relapse in the central nervous system. *Blood* 2014;124:1998–2000.
83. Esteve J, Escoda L, Marti´n G et al. Outcome of patients with acute promyelocytic leukemia failing to front-line treatment with all-trans retinoic acid and anthracycline-based chemotherapy (PETHEMA protocols LPA96 and LPA99): benefit of an early intervention. *Leukemia* 2007;21: 446–52.
84. Estey EH. Treatment options for relapsed acute promyelocytic leukemia. *Best Prac Res Clin Haematol* 2003;16:521-34.

85. Au WY, Lie AK, Chim CS et al. Arsenic trioxide in comparison with chemotherapy and bone marrow transplantation for the treatment of relapsed acute promyelocytic leukaemia. *Ann Oncol* 2003;14:752-7.
86. Raffoux E, Rousset P, Poupon J et al. Combined treatment with arsenic trioxide and all-trans retinoic acid in patients with relapsed acute promyelocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2003;21:2326-34.
87. Chakrabarty H, Rubinger M, Le-Rademacher J et al. Autologous is superior to allogeneic hematopoietic cell transplantation for acute promyelocytic leukemia in second complete remission. *Biol Blood Marrow Transplant* 2014;20:1021-5.
88. Cervera H, Montesinos P, Hernández-Rivas J et al. Additional chromosome abnormalities in patients with acute promyelocytic leukemia treated with all-trans retinoic acid and chemotherapy. *Haematologica* 2010;95:424-31.
89. Breccia M, De Propriis MS, Stefanizzi C et al. Negative prognostic value of CD34 antigen also if expressed on a small population of acute promyelocytic leukemia cells. *Ann Hematol* 2014;93:1819-23.
90. Murray CK, Estey E, Paietta E et al. CD56 expression in acute promyelocytic leukemia: a possible indicator of poor treatment outcome? *J Clin Oncol* 1999;17:293-7.
91. Ferrara F, Morabito F, Martino B et al. CD56 expression is an indicator of poor clinical outcome in patients with acute promyelocytic leukemia treated with simultaneous all-trans-retinoic acid and chemotherapy. *J Clin Oncol* 2000;18:1295-300.
92. Tan Y, Bian S, Xu Z et al. The short isoform of the long-type PML-RARA fusion gene in acute promyelocytic leukaemia lacks sensitivity to all-trans-retinoic acid. *Br J Haematol* 2013;162:93-7.
93. Stock W, Moser B, Sher DA et al. PML-RAR α isoform at diagnosis is associated with disease-free survival (DFS) in patients enrolled in the intergroup trial (C-9710) for treatment of acute promyelocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2006;24 abstract 6504.
94. Beitinjaneh A, Jang S, Roukoz H et al. Prognostic significance of FLT3 internal tandem duplication and tyrosine kinase domain mutations in acute promyelocytic leukemia: a systematic review. *Leuk Res* 2010;34:831-6.
95. Barragán E, Cervera J, Bolufer P et al. Prognostic implications of Wilms' tumor gene (WT1) expression in patients with de novo acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2004;89:926-33.

96. Nowakowska-Kopera A, Sacha T, Florek I et al. Wilms' tumor gene 1 expression analysis by real-time quantitative polymerase chain reaction for monitoring of minimal residual disease in acute leukemia. *Leuk Lymphoma* 2009;50:1326-32.
97. Cilloni D, Renneville A, Hermitte F et al. Real-time quantitative polymerase chain reaction detection of minimal residual disease by standardized WT1 assay to enhance risk stratification in acute myeloid leukemia: a European Leukemia- Net study. *J Clin Oncol* 2009;27:5195–01.
98. Gaur CG, Ramadan SM, Cicconi L et al. Analysis of mutational status, SNP rs16754, and expression levels of Wilms tumor 1 (WT1) gene in acute promyelocytic leukemia. *Ann Hematol* 2012;91:1855–60.
99. Hecht A, Nolte F, Nowak D et al. Prognostic Importance of Expression of the Wilms' Tumor Gene in Newly Diagnosed Acute Promyelocytic Leukemia. *Leuk Lymphoma* 2015;21:1-7.
100. Schulman S, Kearon C. Definition of major bleeding in clinical investigations of antihemostatic medical product in non-surgical patients. *J Throm Haemos* 2004;3:692-4.
101. Taylor FB, Toh CH, Hoots et al. Scientific Subcommittee on Disseminated Intravascular Coagulation (DIC) of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH). Toward definition, clinical and laboratory criteria and scoring system for disseminated intravascular coagulation. *Thromb Haemost* 2001;86:1327-30.
102. Béné MC¹, Nebe T, Bettelheim P et al. Immunophenotyping of acute leukemia and lymphoproliferative disorders: a consensus proposal of the European LeukemiaNet Work Package 10. *Leukemia* 2011;25:567-74.
103. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) document H43-A2 – Clinical Flow Cytometric Analysis of Neoplastic Hematolymphoid Cells; Approved Guideline – [Second Edition 2007]
104. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, et al. *ITS Classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*. 4th ed. Lyon: IARC Press; 2008.
105. International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN). *Recommendations for the International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature*. Memphis, Tennessee, USA, Oct 9-15, 1994.

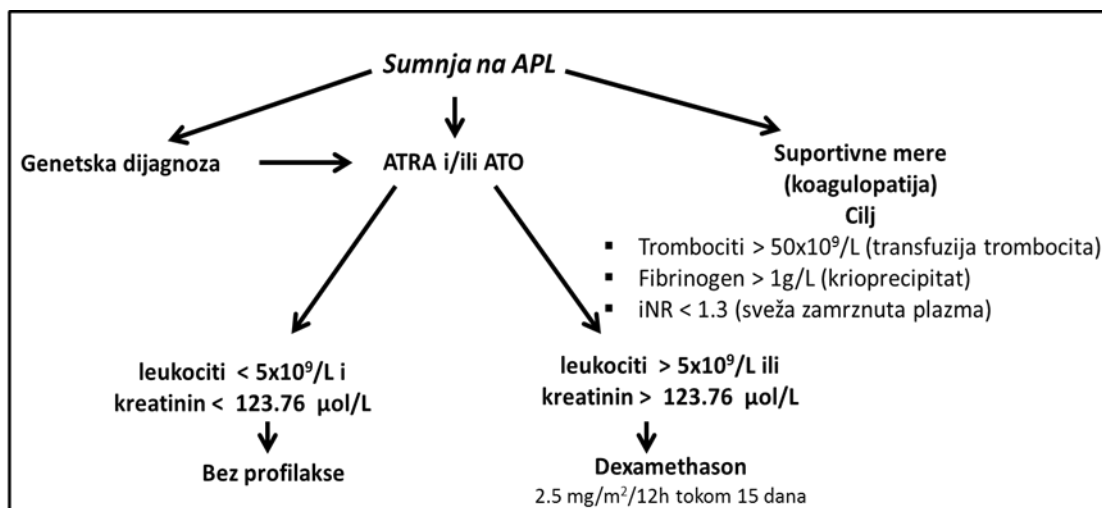
106. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156-9.
107. Van der Burg M, Beverloo HB, Langerak AW et al. Rapid and sensitive detection of all types of MLL gene translocations with a single FISH probe set. *Leukemia* 1999;13:2107-13.
108. Paulson K, Serebrin A, Lambert P et al. Acute promyelocytic leukaemia is characterized by stable incidence and improved survival that is restricted to patients managed in leukaemia referral centres: a pan-Canadian epidemiological study. *Br J Haematol* 2014;166:660-6.
109. Braun T, Cereja S, Chevret S et al. Evolving characteristics and outcome of secondary acute promyelocytic leukemia (APL): A prospective analysis by the French-Belgian-Swiss APL group. *Cancer* 2015; doi: 10.1002/cncr.29389.
110. Sanz M, Montesinos P, Rayón C et al. Risk-adapted treatment of acute promyelocytic leukemia based on all-trans retinoic acid and anthracycline with addition of cytarabine in consolidation therapy for high-risk patients: further improvements in treatment outcome. *Blood* 2010;115:5137-46.
111. Levi M, Toh CH, Thachil J et al. Guidelines for the diagnosis and management of disseminated intravascular coagulation. British Committee for Standards in Haematology. *Br J Haematol* 2009;145:24-33.
112. Lissalde-Lavigne G, Combescure C, Muller L et al. Simple coagulation tests improve survival prediction in patients with septic shock. *J Thromb Haemost* 2008;6(4):645-53.
113. Voves C, Wuillemin WA, Zeerleder S. International Society on Thrombosis and Haemostasis score for overt disseminated intravascular coagulation predicts organ dysfunction and fatality in sepsis patients. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2006;17:445-51.
114. Gale RE, Hills R, Pizzey AR, et al. Relationship between FLT3 mutation status, biologic characteristics, and response to targeted therapy in acute promyelocytic leukemia. *Blood*. 2005;106:3768-76.

115. Altman JK, Rademaker A, Cull E et al. Administration of ATRA to newly diagnosed patients with acute promyelocytic leukemia is delayed contributing to early hemorrhagic death. *Leuk Res* 2013;37:1004-9.
116. Rashidi A, Riley M, Goldin TA et al. Delay in the administration of all-trans retinoic acid and its effects on early mortality in acute promyelocytic leukemia: final results of a multicentric study in the United States. *Leuk Res* 2014;38:1036-40
117. Matsushita T, Watanabe J, Honda G et al. Thrombomodulin alfa treatment in patients with acute promyelocytic leukemia and disseminated intravascular coagulation: a retrospective analysis of an open-label, multicenter, post-marketing surveillance study cohort. *Thromb Res* 2014;133:772-81.
118. Asakura H, Takahashi H, Tsuji H et al. Post-marketing surveillance of thrombomodulin alfa, a novel treatment of disseminated intravascular coagulation - safety and efficacy in 1,032 patients with hematologic malignancy. *Thromb Res* 2014;133:364-70.
119. Adès L, Guerci A, Raffoux E et al. Very long-term outcome of acute promyelocytic leukemia after treatment with all- trans retinoic acid and chemotherapy: the European APL Group experience. *Blood* 2010;115:1690-96.
120. Esteve J, Escoda L, Martín G et al. Outcome of patients with acute promyelocytic leukemia failing to front-line treatment with all-trans retinoic acid and anthracycline-based chemotherapy (PETHEMA protocols LPA96 and LPA99): benefit of an early intervention. *Leukemia* 2007;21; 446–52.
121. Lou Y, Suo S, Tong Y et al. Outcomes and prognostic factors of first relapsed acute promyelocytic leukemia patients undergoing salvage therapy with intravenous arsenic trioxide and chemotherapy. *Ann Hematol* 2014;93:941-8.
122. Lengfelder E, Lo-Coco F, Ades L et al. Arsenic trioxide-based therapy of relapsed acute promyelocytic leukemia: registry results from the European LeukemiaNet. *Leukemia* 2015; doi: 10.1038/leu.2015.12
123. de Botton S, Fawaz A, Chevret S al. Autologous and allogeneic stem-cell transplantation as salvage treatment of acute promyelocytic leukemia initially treated

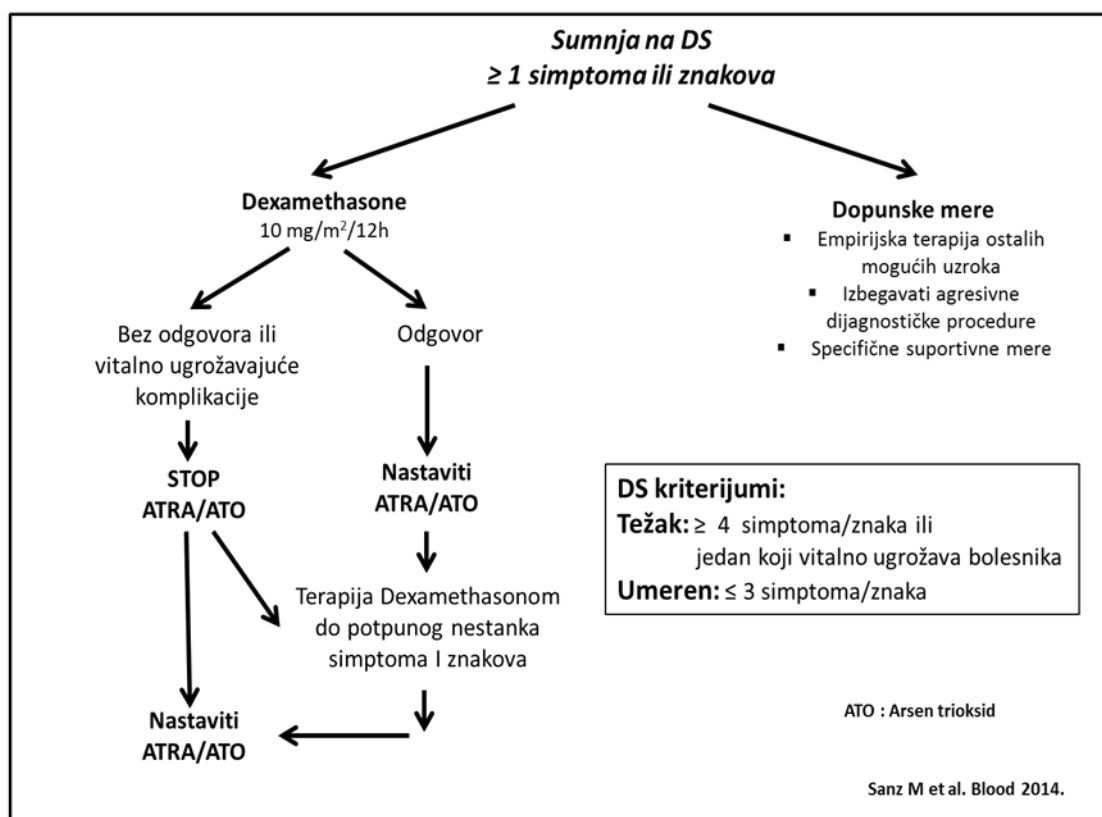
with all-trans-retinoic acid: a retrospective analysis of the European acute promyelocytic leukemia group. *J Clin Oncol* 2005; 1;23(1):120-6.

8. PRILOZI

Prilog 1: Dijagnostički kriterijumi, profilaksa i terapija diferencijacionog sindroma

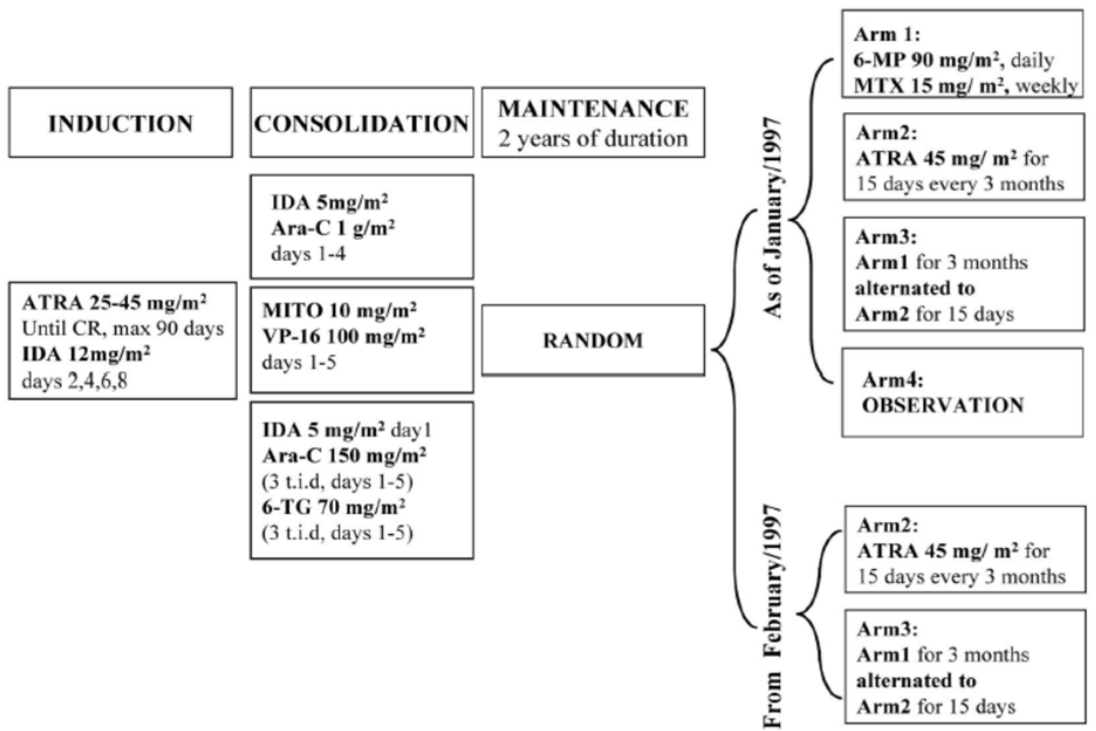


DS simptomi i znaci: febrilnost, porast telesne težine, ARDS, intersticijalni plućni infiltrati, pleuro/perikardne efuzije, akutna bubrežna insuficijencija, hipotenzija

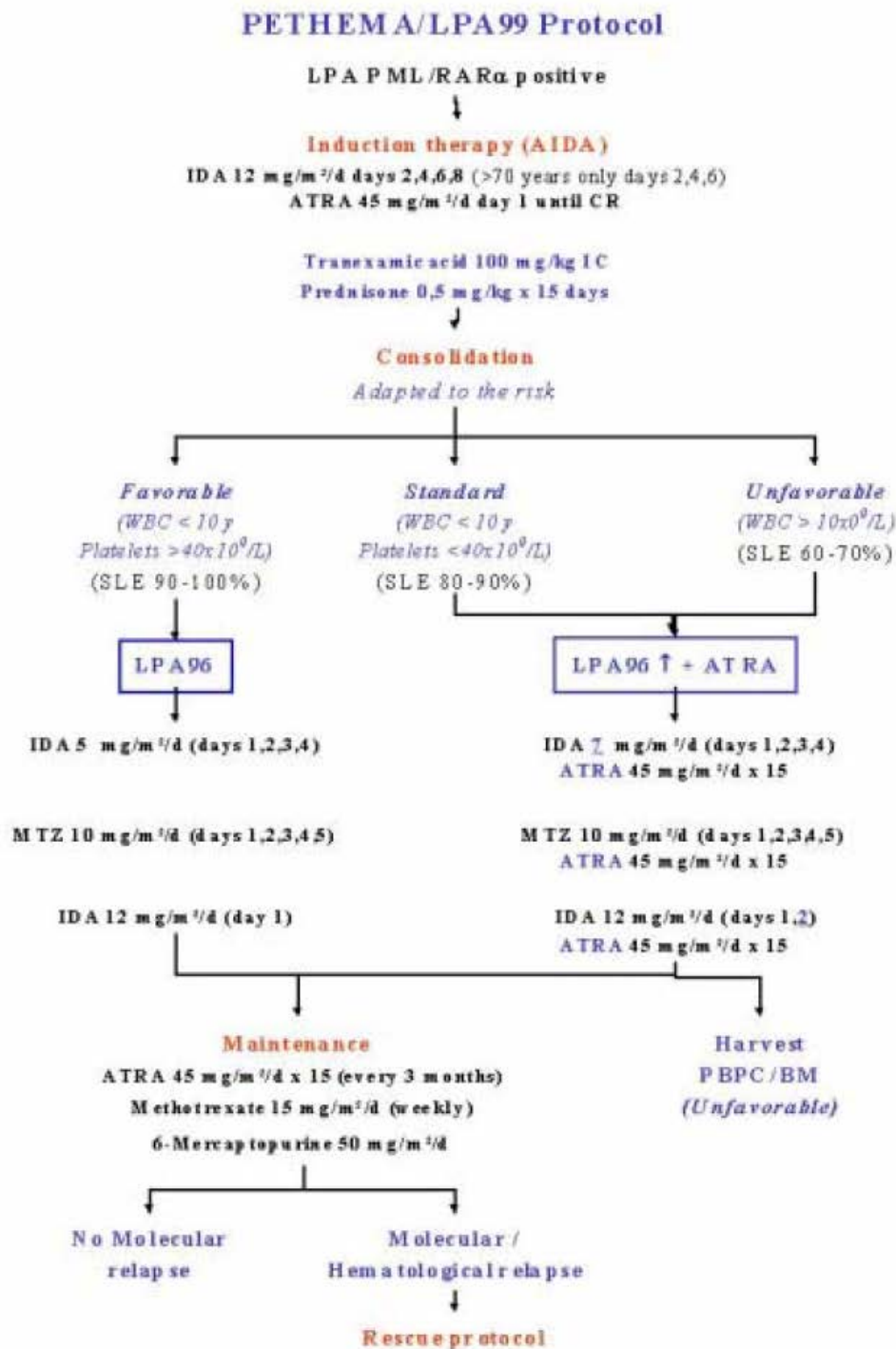


Sanz M et al. Blood 2014.

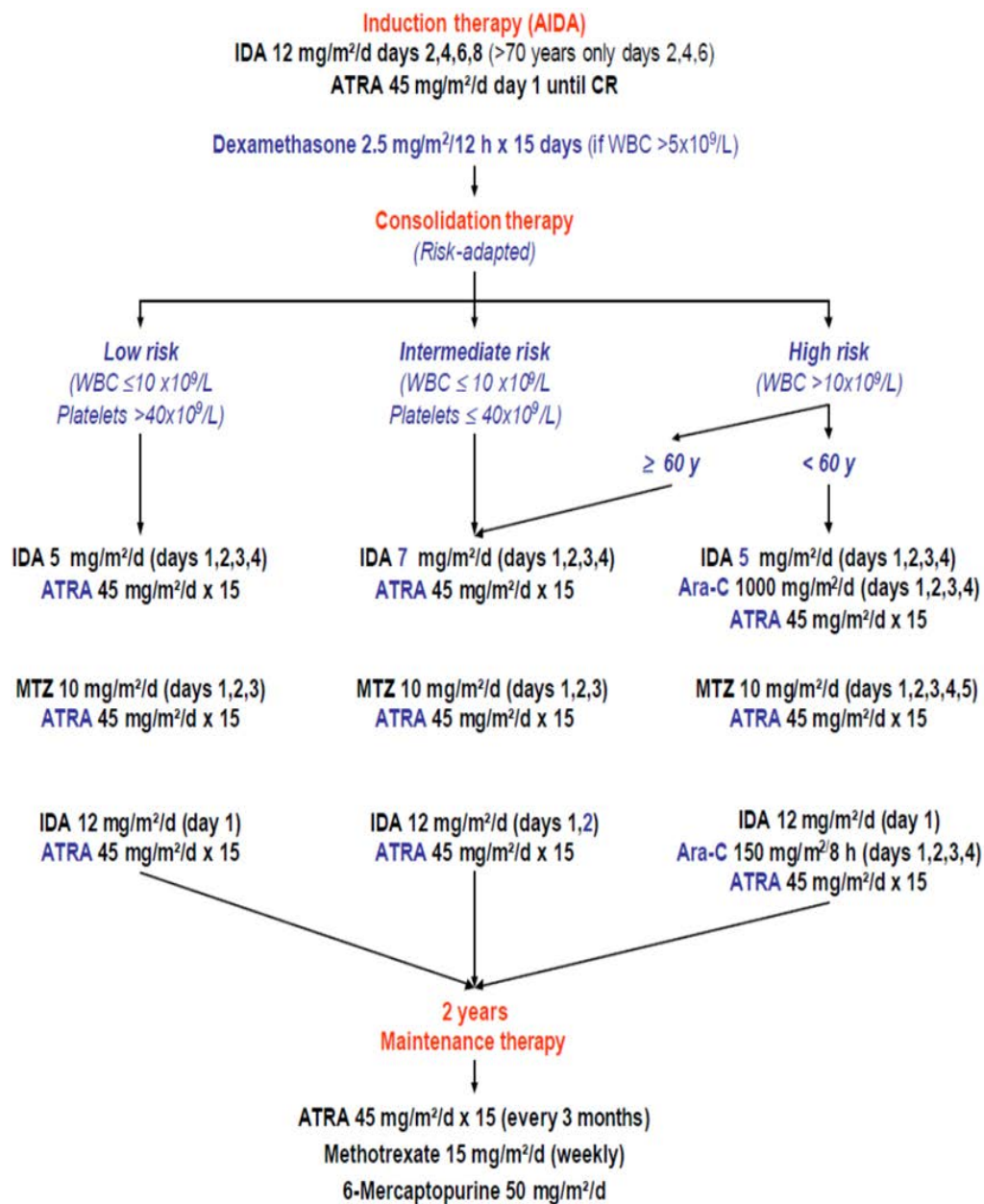
Prilog 2: Optimizacija protokola za lečenje APL – protokol AIDA



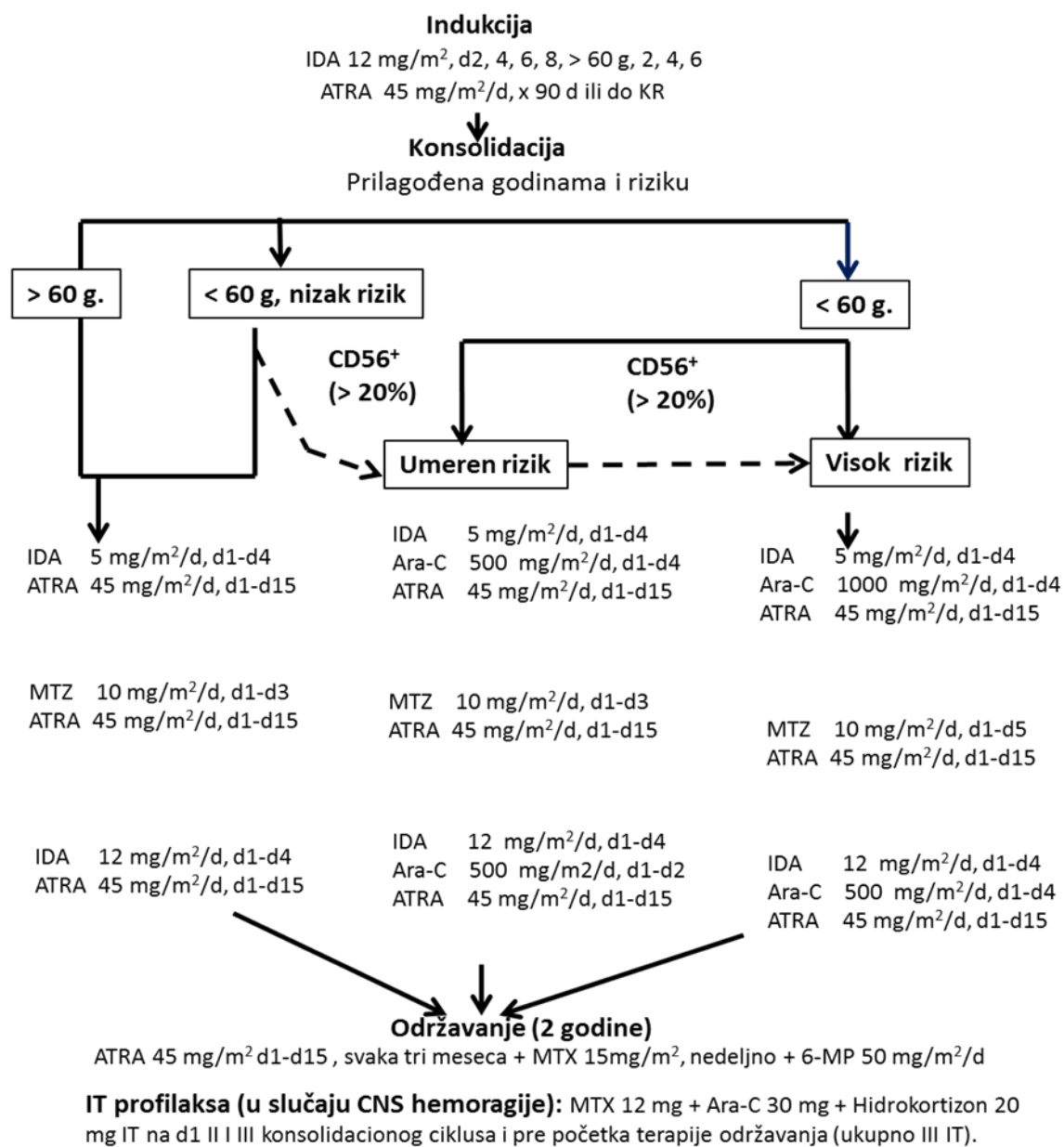
Prilog 3: Optimizacija protokola za lečenje APL – PETHEMA LPA 99



Prilog 4: Optimizacija protokola za lečenje APL – PETHEMA LPA 2005



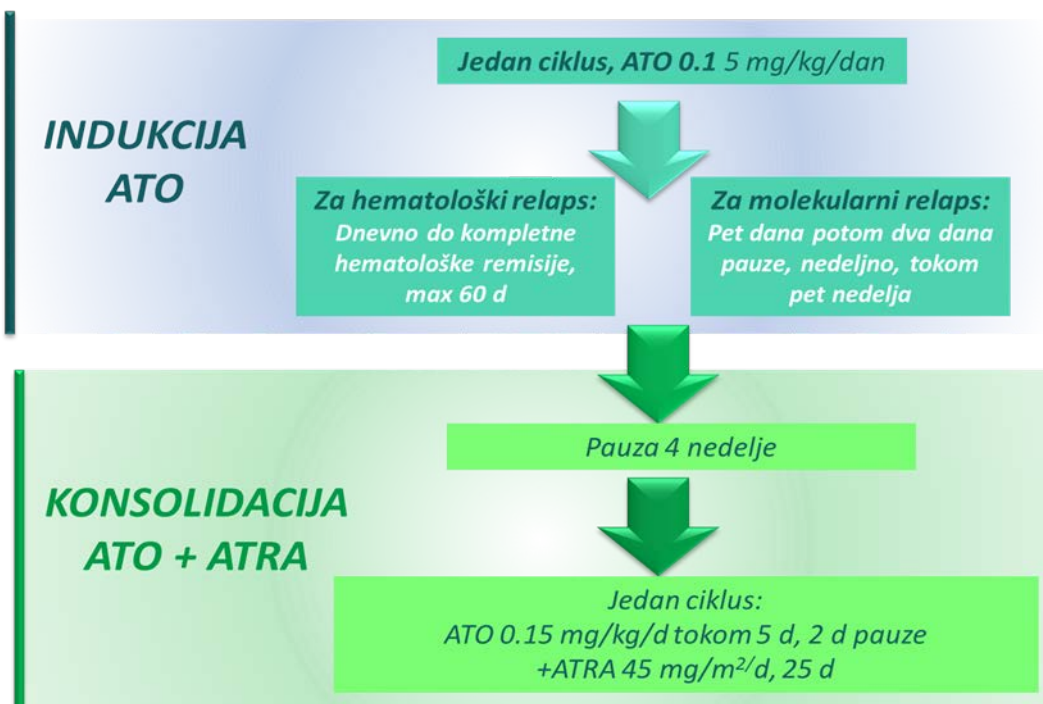
Prilog 5: Optimizacija protokola za lečenje APL – PETHEMA LPA 2012



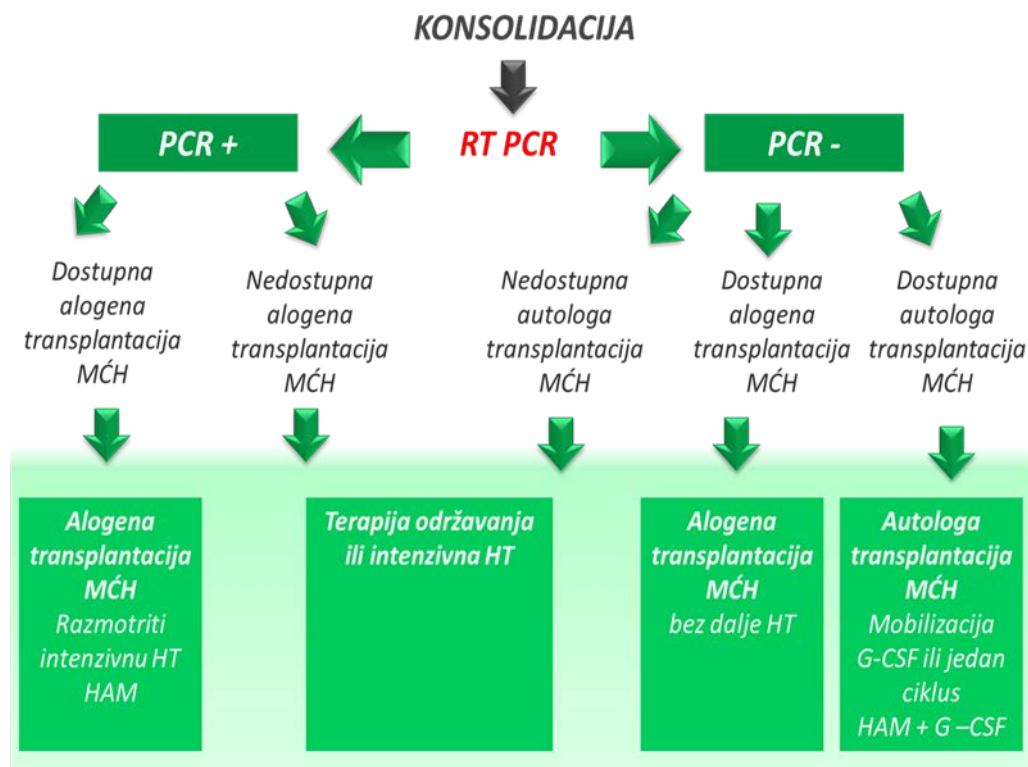
ATRA: all trans retinoicna kiselina,
MTZ: Mitoxantron

PALG – PETHEMA LPA 2012 trial

Prilog 6: ELN (European leukemia net) preporuke za terapija relapse APL



Prilog 7: ELN (European leukemia net) preporuke za postkonsolidacionu terapija relapsa



SPISAK SKRAĆENICA KORIŠĆENIH U TEKSTU

AL	akutna leukemija
AML	akutna mijeloidna leukemija
ALL	akutna limfoblasna leukemija
APL	akutna promijelocitna leukemija
FAB	francusko američko britanska grupa
SZO	Svetska zdravstvena organizacija
DIK	disemnovana intravaskularna koagulacija
PML	gen za promijelocitnu leukemiju
RAR α	gen koji kodira α receptor za retinoičnu kiselinu
DCA	dopunske citogenetske anomalije
ZBTB16/PLZF	promyelocytic leukemia zink finger
HUMA	nuclear matrix associated gene
NPM1	nukleofoymin gen
PT	protrombinsko vreme
aPTT	aktivirano parcijalno tromboplastinsko vreme
FDP	fibrin degradacioni produkti
TF	tkivni faktor
IL	interleukin
TNF- α	tumor necrosis factor α
PAI	inhibitor aktivatora plazminogena
ICAM	intracelularni adhezivni molekul
VCAM	vaskularni ćelijksi adhezivni molekul
MPO	mijeloperoksidaza
SB	Sudan black
M3v	varijantni, mikrogranulirani oblik APL

MRB	minimalna rezidualna bolest
FISH	fluorescentna in situ hibridizacija
RT-PCR	reverse transcriptase polymerase chain reaction
RNK	ribonukleinska kiselina
KR	kompletna remisija
SAD	Sjedinjene Američke Države
DFS	period do progresije bolesti
ATRA	all trans retinoična kiselina
EFS	period do događaja
DS	diferencijacioni sindrom
ABI	akutna bubrežna insuficijencija
SIRS	sindrom sistemskog inflamatornog odgovora
ELN	evropska radna grupa za akutne leukemije
RS	rana smrt
RB	relaps bolesti
HT	hemoterapija
PETHEMA	Programa para el Estudio de la Terape´utica En Hemopatí'a Maligna
GIMEMA	Italian Group for Hematological Disease in Adults
SWOG	South West Oncology Group
JALSG	Japan Adult Leukemia Study Group
ATO	Arsen trioksid
LDH	laktat dehidrogenaza
FLT3	gen za Fms-like tirozin kinazu
FLT3-ITD	unutrašnja tandem duplikacija u FLT3 genu
TMĆH	transplantacija matične ćelije hematopoeze
CNS	centralni nervni system
RR	incidence relapse

WT1	Wilms tumor 1 gen
ISTH	International Society for Thrombosis and Hemostasis
DNK	deoksiribonukleinska kiselina
EAC	Europe against cancer
qPCR	kvantitativni PCR
t-APL	APL nastala polse prethodne primene citostatika
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
Hb	haemoglobin
CRP	C reaktivni protein

Biografija autora

Mirjana Mitrović rođena je 02.01.1978. u Loznici. Medicinski fakultet u Beogradu upisala je 1996, a diplomirala 2003, sa prosečnom ocenom 9.89. Tokom studija pohvaljivana za izvanredne rezultate i uspehe u učenju školske: 1996/97, 1997/98, 1998/99, 1999/2000, 2000/2001. Nosilac je nagrada: Fond prof. Dr Zoran Radovanović, školske 1999/2000, Stipendija prof. Dr Maksim Šternić 2001, Fond Miloš Smiljković 2001 i programa „ Generacija koja obećava“ Kraljevine Norveške.

Od 2006. zaposlena je u Klinici za hematologiju Kliničkog centra Srbije. Magistarsku tezu "Poremećaji hemostaze u Gošeovoj bolesti" odbranila je 2009. Specijalistički ispit iz oblasti interne medicine položila je u oktobru 2012.

Doktorsku tezu "Prognostički faktori rane smrti i relapsa bolesti u akutnoj promijelocitnoj leukemiji" prijavila je u decembru 2012. Dok je subspecijalizaciju iz oblasti hematologije upisala školske 2014/2015.

Mirjana Mitrović je autor u 12 radova publikovanih časopisima indeksiranim u Current Contentsu (CC) ili Science Citation Index-u (SCI), pri čemu je prvi autor u 7 radova. Takođe je autor u 5 radova objavljenih u časopisima indeksiranim u Science Citation Index-u (SCI) Expanded i tri rada koja su objavljena časopisima koji nisu uključeni u gore pomenute baze podataka. Autor je jednog poslavlja u knjigama i tri vodiča.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани: Мирјана Митровић

број индекса _____

Изјављујем


да је докторска дисертација под насловом

Прогностички фактори ране смрти и релапса болести у акутној промијелоцитној леукемији

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 26.06.2015.



Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Мирјана Митровић

Број индекса _____

Студијски програм _____

Наслов рада: Прогностички фактори ране смрти и релапса болести у акутној промијелоцитној леукемији

Ментор: проф др Нада Сувајџић Вуковић

Потписани/а Мирјана Митровић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 26.06.2015.



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

"Прогностички фактори ране смрти и релапса болести у акутној промијелоцитној леукемији"

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

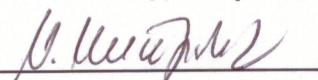
5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

У Београду, 26.06.2015.

Потпис докторанда



1. Ауторство - Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.