

UNIVERZITET U BEOGRADU
MEDICINSKI FAKULTET

Dr Miloš B. Kuzmanović

PROGNOSTIČKI ZNAČAJ MUTACIJA
GENA ZA NUKLEOFOSMIN U AKUTNIM
LEUKEMIJAMA U DECE

DOKTORSKA DISERTACIJA

Beograd, 2012 godine

Mentor

Prof. dr Milica Čolović
Redovni profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu

Članovi komisije

Prof. dr Gradimir Janković
Redovni profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
Klinika za hematologiju Kliničkog centra Srbije

Doc. dr Dragana Vujić
Docent Medicinskog fakulteta u Beogradu
Institut za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije „Dr Vukan Čupić”, Beograd

Dr Sonja Pavlović
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Beograd
Viši naučni saradnik Medicinskog fakulteta u Beogradu

Kratak sadržaj

Prognostički značaj mutacija gena za nukleofosmin u akutnim leukemijama u dece

Cilj rada: Ispitivana je učestalost mutacija u genu za nukleofosmin i *FLT3* u populaciji pedijatrijskih i odraslih bolesnika sa *de novo* akutnom mijeloidnom leukemijom (AML). Određivan je njihov prognostički značaj, kao i povezanost sa drugim demografskim i laboratorijskim parametrima.

Materijal i metode: Ispitivanje je sprovedeno na uzorcima 42 pedijatrijska i 92 odrasla bolesnika obelelih od *de novo* AML. Mutacije u genu za nukleofosmin su određivane lančanim umnožavanjem DNK a zatim sekvencioniranjem dobijenog produkta; mutacije *FLT3* određivane su metodom PCR.

Rezultati: Mutacije u genu za nukleofosmin nađene su u 1/37 (2,7%) pedijatrijskih bolesnika; mutacija je bila tipa Q. U grupi odraslih bolesnika mutacije u genu za nukleofosmin nađene su kod 13/92 bolesnika (14,1%). Mutacije *FLT3* u pedijatrijskih bolesnika nađene su kod 4/42 bolesnika (9,5%); u odraslih bolesnika mutacije *FLT3* nađene su u 25/92 (27,1%) bolesnika.

Zaključak: Učestalost ispitivanih molekularno genetičkih markera kod bolesnika u ispitivanim grupama je u skladu sa podacima iz literature. U obe grupe bolesnika mutacije u genu *FLT3 ITD* bile su povezane sa nepovoljnom prognozom, a u odraslih bolesnika isti rezultat je dobijen i u grupi bolesnika sa mutacijama u genu za nukleofosmin

Ključne reči: AML; *FLT3*; *NPM1*; prognostički značaj

Abstract

Prognostic significance of nucleophosmin mutations in pediatric acute leukemia

Aim of the study: We investigated incidence and prognostic significance of mutated nucleophosmin and FLT3 genes in pediatric and adult patients with de novo acute myeloid leukemia. Also, prognostic impact of demographic and other laboratory data was investigated.

Material and methods: Investigation was conducted on 42 pediatric patients and 92 adult patients with acute myeloid leukemia (AML). Mutations in gene for nucleophosmin was detected through sequencing and *FLT3* gene mutation were detected on PCR.

Results: Mutated nucleophosmin was found in 1/37 (2,7%) pediatric patients; it was a Q type mutation. In a group of adult patients mutated nucleophosmin was found in a 13/92 (14,1%) of patients. Mutations *FLT3* in pediatric patients were found in 4/42 (9,5%); in a group of adult patients mutations *FLT3* were found in 25/92 (27,1%) patients.

Conclusion: Incidence of mutated nucleophosmin and *FLT3s* was in the range of previously published data. In both pediatric and adult patients AML with *FLT3 ITD* mutations had inferior outcome. In a group of adult patients mutated nucleophosmin was also a predictor of poor outcome.

Key words: AML; *FLT3*; *NPM1*; outcome

SARDŽAJ

I UVOD U ISTRAŽIVANJA

I.1 Definicija

I.2 Istorijat

I.3 Epidemiologija i etiologija AML

I.2 Mehanizmi leukemogeneze u AML

I.2.1 Matična ćelija leukemogeneze

I.2.2 Genska osnova samoobnove normalnih i leukemijskih matičnih ćelija

I.3 Karakteristike i specifičnosti AML u osoba starijeg životnog doba i AML u dece

I.3.1 AML u osoba starijeg životnog doba

I.3.2 AML u dece

I.4 Klinička slika, kriterijumi za postavljanje dijagnoze i podela AML

I.4.1 Klinička slika AML

I.4.2 Kriterijumi za postavljanje dijagnoze i podela AML

I.4.3 Podela AML u pedijatriji

I.5. Značaj kariotipa u dijagnostici i stratifikaciji bolesnika s AML

I.5.1 Kariotip u dece s AML

I.6 Genetske promene u AML s normalnim kariotipom

I.6.1 Nukleofosmin

I.6.2 Nukleofosmin kao partnerski gen u onkogenim translokacijama

I.6.3 AML s mutiranim nukleofosminom u citoplazmi

I.6.4 FMS slična tirozin kinaza 3 (FLT3) i FLT3 ligand (FL)

I.7 Druge genetske promene kod AML

I.7.1 C-KIT

I.7.2 RAS

I.7.3 CEBPA

I.7.4 TP 53

I.7.5 ERG

I.8 Lečenje AML

I.8.1 Nove mogućnosti u lečenju AML

II CILJEVI ISTRAŽIVANJA

III MATERIJAL I METODE ISTRAŽIVANJA

III.1 Bolesnici

III.2 Klinička ispitivanja

III.3 Citološka ispitivanja

III.4 Imunofenotipska analiza

III. 5 Citogenetska ispitivanja

III 6 Molekulsko- genetska ispitivanja

III.6.1 Izolacija DNK iz periferene krvi/koštane srži

III.6.2 Izolacija mononuklearnih ćelija iz periferne krvi i aspirata koštane srži

III.6.3 Izolacija DNK iz mononuklearnih ćelija

III 7 Reakcija lančanog umnožavanja DNK (PCR)

III.7.1 Utvrđivanje *FLT3/ITD* mutacije

III.7.2 Utvrđivanje *FLT3/D835* mutacije

III.7.3 Utvrđivanje mutacija u *NPM1* genu

III.8 Analiza DNK na agaroznom gelu

III.9 Analiza DNK na poliakrilamidnom gelu

III 10 Bojenje poliakridamidnih gelova srebronitratom

III 11 Sekvencioniranje PCR produkta

III 13 Statistička obrada podataka

IV REZULTATI ISPITIVANJA

V DISKUSIJA

VI ZAKLJUČCI

VII LITERATURA

I UVOD U ISTRAŽIVANJA

Akutne mijeloidne leukemije (AML) su heterogena grupa klonskih bolesti hematopoeze, koje nastaju usled malignog preobražaja matične ćelije hematopoeze ili delimično opredeljenih progenitora sa potencijalom za diferencijaciju u pravcu granulocita, monocita, megakariocita ili eritroblasta (Estey *et al*, 2006; Dohner *et al*, 2007).

Učestalost AML se povećava sa životnim dobom. Citološki i fenotipski nalazi su komparabilni bez obzira na životnu dob, što omogućava primenu jedinstvenih dijagnostičkih kriterijuma. Raspodela citogenetskih aberacija i molekularnih obeležja u AML sa normalnim kariotipom povezana je sa životnim dobom obolelih, što indirektno ukazuje na različite mehanizme leukemogeneze u dece i odraslih bolesnika.

Savremeni terapijski pristup zasniva se na primeni kombinovane hemioterapije, imunoterapije i alogenoj transplantaciji koštane srži. Kod jedne trećine odraslih i u 60% pedijatrijskih bolesnika, može se ostvariti višegodišnja remisija, odnosno izlečenje. Bazična istraživanja i kliničke studije su usmerena u pravcu boljeg definisanja prognoznih pokazatelja, pre svega molekularnih obeležja, kao i u pravcu pronalaženja efikasnijih terapijskih modaliteta (Arceci *et al*, 2007; Löwenberg *et al*, 2008).

I.1.2 Istorijat

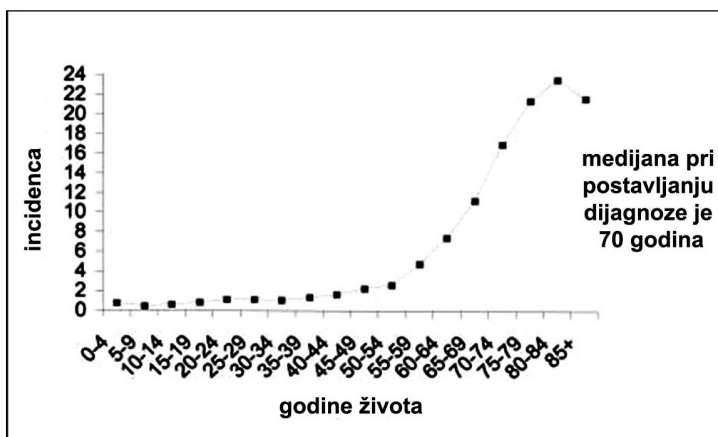
Prvi opis leukemije u medicinskoj literaturi potiče od francuskog lekara Alfred-Arman-Louis-Marie koji je 1827. godine opisao bolesnika sa povišenom temperaturom, malaksalošću, uvećanom jetrom i slezinom i makroskopski izmenjenim izgledom krvi, što je pripisao prisustvu velikog broja leukocita. Seriju bolesnika sa sličnim nalazima opisao je britanski patolog Bennett, koji je izmenjen izgled krvi opisao terminom lukocitemija.

Termin leukemija potiče od nemačkog patologa Rudolfa Firhova, koji je pokazao da klinička slika sa uvećanjem jetre i slezine i izmenjenim makroskopskim izgledom krvi zapravo potiče od povišenog broja leukocita.

Preciznije shvatanje porekla i prirode ove bolesti unapređeno je uvođenjem novih tehnika bojenja mikroskopskih preparata periferne krvi koje je uveo Pol Erlih 1877. godine. Ubrzo potom, 1889. godine leukemije se na osnovu svog toka podeljene na akutne i hronične, dok se prepoznavanje porekla leukemijskih ćelija iz kostne srži pripisuje Neumanu 1869. godine. Otkrićem i opisom mijeloblasta 1900. godine leukemije su podeljene na mijeloidne i limfoblastne, što je bio osnov za dalja istraživanja. Početkom XX veka prepoznato je nekoliko vrsta leukemija i to: hronična limfocitna, hronična granulocitna, akutna limfocitna, monoblastna i eritroleukemija. Savremena klasifikacija AML bazira se na preporukama FAB (French-American-British) grupe koje se primenjuju od sedamdesetih godina XX veka, kao i preporukama Svetske zdravstvene organizacije.

I.1.3 Epidemiologija i etiologija AML

Učestalost akutne mijeloidne leukemije se povećava sa godinama životnim dobom, tako da je medijana pri postavljanju dijagnoze 72 godine (Juliusson *et al*, 2009)(Slika 1).



Slika 1. Učestalost AML u zavisnosti od životnog doba

Učestalost ove bolesti u celokupnoj populaciji je 3,4 bolesnika na 100000; u populaciju starosti do dvadeset godina učestalost je 1,2 na 100000, dok je kod osoba starijeg životnog doba (iznad 80 godina) učestalost 20 bolesnika na 100000. Kod odraslih bolesnika veća učestalost AML je povezana sa izloženšću jonizujućem zračenju, benzenu (glavni izvor je duvanski dim), kao i radio- i hemioterapijom (Estey *et al*, 2006). Izloženost jonizujućem zračenju u formi kosmičkog zračenja povezana je sa češćim nastankom AML (kao i epitelnih neoplazmi) kod posada u avionima, ukoliko godišnje imaju više od 5000 časova letenja (Gundestrup *et al*, 1999).

Kod dece AML ima bimodalnu distribuciju. U uzrastu do dve godine se registruje veća učestalost AML koja zatim opada, a do ponovog porasta učestalosti dolazi u grupi adolescenata (uzrast 15-20 godina). U dečijem uzrastu nije zapažen trend povećanja učestalosti *de novo* AML, ali je primetan diskretan porast učestalosti AML koje nastaju kao posledica primenjene radio ili hemoterapije (tAML). Epidemiološke studije su pokazale veću učestalost AML kod dece koja su bila izložena jonizujućem zračenju, u slučajevima kada su majke u trudnoći konzumirale alkohol, ili unosile namirnice koje sadrže značajnu količinu prirodnih inhibitora topo-II-izomeraze (soja, zeleni i crni čaj, kakao, crno vino) (Belson *et al*, 2007; Clark *et al*, 2009).

Pored razlike u učestalosti, veoma je jasna i razlika u zastupljenosti AML u odnosu na ukupan broj akutnih leukemija kod dece i odraslih. U dečijem uzrastu AML čine oko 20% akutnih leukemija, dok su kod odraslih bolesnika zastupljene sa oko 80% svih akutnih leukemija. Ovaj trend se menja i sa uzrastom, tako da do 15. godine AML čine oko 16% akutnih leukemija u dece, dok su u grupi od 15 do 20 godina zastupljene sa 36% .

Donekle različit epidemiološki obrazac postoji kod akutne promijelocitne leukemije (APL ili FAB M3). Naime, u ovom tipu AML incidencija postepeno raste počevši od uzrasta puberteta, dostiže plato u odraslom dobu, a postepeno se smanjuje posle šezdesete godine života. Ostali oblici AML pokazuju eksponencijalni porast učestalosti posle 55. godine života (Sanz *et al*, 2009). Učestalost APL je značajno češća kod osoba poreklom iz Centralne i Južne Amerike, Španije i Italije, mada su podaci u ovoj oblasti kontradiktorni (Matasar *et al*, 2006).

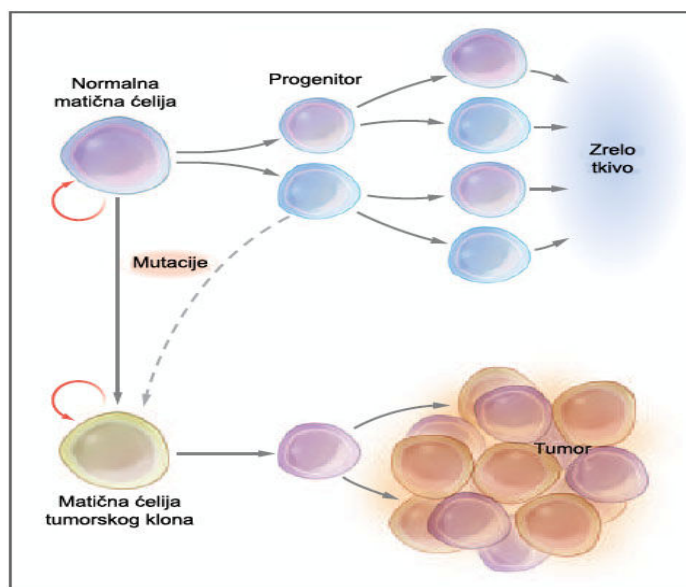
I.2.Mehanizmi leukemogeneze u AML

I.2.1 Matična ćelija leukemogeneze

Maligni klon vodi poreklo od jedne izmenjene matične ćelije, koja ima slične osobine kao i normalne matične ćelije (Jordan *et al*, 2006). Postojanje matičnih ćelija u malignim oboljenjima je prvo dokazano kod bolesnika sa AML, a zatim i kod bolesnika sa akutnom limfoblastnom leukemijom (ALL), tumorima centralnog nervnog sistema, kolona i prostate.

Uloga matičnih ćelija u normalnoj hematopoezi je da održi stalan broj matičnih ćelija u kostnoj srži, kao i da stalno održava potreban broj terminalno diferentovanih ćelija u perifernoj krvi. Matične ćelije mogu biti u fazi mirovanja, mogu podleći procesu apoptoze, diferencijacije ili samoobnove. Kontrola ovih procesa odvija se interakcijom genetskih programa u samoj matičnoj ćeliji sa signalima koji dolaze iz mikrookoline koštane srži. Sličan obrazac regulacije postoji i kod leukemijskih ćelija, s tim da su procesi koji kontrolišu ove regulatorne mehanizme poremećeni.

Odnos normalnih i matičnih tumorskih ćelija prikazan je na slici 2.



Slika 2. Šematski prikaz odnosa normalnih i neoplastičnih matičnih ćelija

U eksperimentima na miševima sa urođenom imunodeficijencijom (NOD-SCID – engl. Non Obese Diabetic–Severe Combined Immuno Deficiency) do razvoja leukemije dolazi samo ukoliko se transplantiraju mijeloblasti nezrelog fenotipa, a ne svi mijeloblasti koji se nalaze u kostnoj srži ili perifernoj krvi obolelih od AML (Lapoidot *et al*, 1994; Bonnet *et al*, 1997). Nezrela populacija mijeloblasta koji imaju sposobnost repopulacije leukemijskog klonu u NOD-SCID miševa izdvojena je na osnovu imunofenotipa, a sačinjava oko 0,1-1% mijeloblasta. Naime, u ovim eksperimentima pokazano je da mijeloblasti fenotipa CD34⁺ i CD38⁻ imaju osobine matičnih ćelija leukemogeneze (engl. leukemia initiating cells) (Bonnet *et al*, 2005). Alternativni način za nastanak matične ćelije leukemogeneze jesu genetske promene (npr. translokacije MLL gena) koje nastaju u opredeljenim progenitorima za mijeloidnu lozu, a ovako izmenjeni i dediferentovani progenitori naknadno stiču potencijal samoobnove i postaju matične ćelije leukemogeneze (Jamieson *et al*, 2004; Minami *et al*, 2008).

Intenzivna hemioterapija i poboljšanje kvaliteta suportivne terapije nisu doveli do boljih rezultata lečenja AML. Značajan broj bolesnika umire od recidiva bolesti ili od primarno rezistentne leukemije. Otkriće matične ćelije leukemogeneze je donekle objasnilo ove nezadovoljavajuće rezultate lečenja. Intenzivna hemioterapija koja, naročito kod dece dovodi do kompletne hematološke remisije, ne uklanja matične ćelije leukemogeneze. Pretpostavlja se da je zaostajanje leukemijskih matičnih ćelija nakon primarne hemioterapije predstavlja polaznu tačku za nastanak recidiva bolesti i razvoj rezistencije na lekove. Ova hipoteza je potvrđena nalazom da je povećan broj, odnosno, procenat matičnih ćelija leukemogeneze u trenutku postavljanja dijagnoze AML u korelaciji sa postojanjem minimalne rezidualne bolesti i lošijeg ishoda lečenja (van Rhenen *et al*, 2005).

Matične ćelije leukemogeneze imaju slične osobine kao i matične ćelije hematopoeze – podležu procesu samoobnove, najvećim delom se nalaze u G0 fazi ćelijskog ciklusa a postoji i mogućnost asimetričnih deoba. Biološke razlike između matičnih ćelija i matičnih ćelija leukemogeneze kao što su različit fenotip, mehanizmi samoobnove i inhibicije apoptoze, različita interakcija sa stromom koštane srži, polazna su tačka za kreiranje ciljane terapije, kojom se selektivno uklanjaju leukemijske matične ćelije.

Različita ekspresija membranskih markera normalnih i leukemijskih matičnih ćelija je od značaja kako za bazična ispitivanja, tako i za kliničku primenu. Normalne matične ćelije hematopoeze su: lin⁻, CD34⁺/38⁻/90⁺/123^{-lo}/117⁺/71⁺/HLA DR⁻, dok su matične ćelije leukemogeneze: lin⁻, CD34⁺/38⁻/90⁻/123⁺/117⁺/71⁺/HLA DR⁻.

Potencijalna meta za selektivno uklanjanje matičnih ćelija leukemogeneze u AML je antigen CD123 (receptor za IL-3), koji je na njihovoj membrani selektivno eksprimiran (Jordan *et al*, 2000; Munoz *et al*, 2001). Interleukin 3 (IL-3) stimuliše mitotsku aktivnost ćelija i njihovu diferencijaciju, dok inhibira apoptozu. Fuzioni protein koji se sastoji od IL-3 i toksina difterije pokazao je na eksperimentalnim modelima (NOD-SCID miševi) selektivno smanjenje prihvatanja kalemata leukemijskih matičnih ćelija. Ovi eksperimentalni rezultati su poslužili kao osnova za kliničke studije, gde su postignuti povoljni rezultati kod bolesnika sa relapsom ili primarno rezistentnom AML (Frankel *et al*, 2006). Pored navedenog, razvijeno je i specifično monoklonsko antitelo koje se vezuje za CD123. U eksperimentalnim modelima ovo antitelo označeno kao 7G3, smanjuje prihvatanje kalemata leukemijskih matičnih ćelija i produžava preživljavanje transplantiranih NOD-SCID miševa (Jin *et al*, 2009). Terapijski potencijal ove imunoterapije nije ograničen samo na bolesnike sa AML, već i na pre B ALL, gde je ovaj antigen takođe eksprimiran.

Mogućnosti razvoja terapijskih pristupa kojima bi se eradicirala matična ćelija leukemogeneze za sada su još uvek u eksperimentalnoj fazi, najviše zbog nepotpunog poznavanja regulatornih mehanizama koji određuju sudbinu matičnih ćelija, kako normalnih tako i leukemijskih.

Druge terapijske mogućnosti za uklanjanje matičnih ćelija leukemogeneze su zasnovane na farmakološkim manipulacijama signalnih puteva koji usmeravaju matičnu ćeliju ka samoobnavljanju, indukciji apoptoze ili diferencijacije.

Signalni putevi koji održavaju samoobnovu matičnih ćelija leukemogeneze generalno nisu pogodna meta za selektivno uklanjanje ovih ćelija, s obzirom na to da su mehanizmi koji održavaju samoobnovu slični kod normalnih i leukemijskih ćelija. Za razliku od normalnih ćelija hematopoeze, ovi signalni putevi, kao npr. WNT/ β katenin, su u leukemijskim matičnim ćelijama konstitutivno aktivni.

Signalni put kojim se u matičnim ćelijama aktivira prelazak iz G0 faze u deobu označen kao PI3K-AKT-FoxO, može u eksperimentalnim modelima biti konstitutivno aktivisan gubitkom supresornog proteina PTEN (LoPiccolo *et al*, 2008). Stalna aktivacija signalnog puta koji dovodi matične ćelije iz G0 faze u deobu izaziva smanjenje broja matičnih ćelija i razvoj AML. Deregulacija signalnog puta mTOR koji je distalno od PTEN je jedna od glavnih posledica ovog poremećaja (Martelli *et al*, 2010). Potencijalna terapijska meta je upravo mTOR (**m**ammalian **t**arget of **r**apamycin), koji predstavlja serin treonin kinazu koja učestvuje u regulaciji proliferacije, motiliteta i sinteze proteina. Ovaj enzim je moguće inhibisati rapamicinom, pri čemu je selektivno pogođen konstitutivno aktivan signalni put u matičnim ćelijama leukemogeneze, ali ne i u normalnim matičnim ćelijama hematopoeze (Martelli *et al*, 2009). U *in vitro* uslovima je primećeno da istovremenom primenom rapamicina i citozin arabinozida dolazi do njihovog sinergističkog dejstva na inhibiciju ovog signalnog puta (Janus *et al*, 2009). Ova otkrića su primenjena i u kliničkim studijama, gde je registrovan povoljan odgovor kod 4/9 bolesnika sa AML (Récher *et al*, 2005).

Poremećaj diferencijacije kod leukemijskih matičnih ćelija objašnjava se mutacijama u proteinima koji su odgovorni za ovaj proces, kao što su PU.1 i C/EBP α ili represornim dejstvom novonastalih fuzionih proteina kao što su AML1-ETO i PML-RAR α . Farmakološka manipulacija ovog procesa se odvija primenom inhibitora histon deacetilaze koji dovodi do derepresije gena odgovornih za diferencijaciju (Piekarz *et al*, 2009).

Proces leukemogeneze, pored sekvencijalne aktivacije određenih grupa gena i signalnih puteva, zahteva i interakciju sa mikrookolinom koštane srži, kako sa ćelijama strome tako i sa drugim hematopoetskim ćelijama. Ključnu ulogu u procesima komunikacije matičnih ćelija i strome ima adhezivni molekul CD44. Ovaj membranski glikoprotein, receptor za hijaluronsku kiselinu, ima ulogu u vezivanju matičnih ćelija hematopoeze za stromu koštane srži (engl. homig). Primena monoklonskog antitela specifičnog za CD44 je pokazala antileukemijski efekat u NOD-SCID modelu AML (Jin *et al*, 2006).

I.2.2 Genska regulacija samoobnove normalnih i leukemijskih matičnih ćelija

Uspostavljanje samoobnove matičnih ćelija leukemogeneze predstavlja ključni događaj u nastanku i održavanju klona mijeloblasta. Dosadašnja saznanja ukazuju da je proliferativni potencijal matičnih ćelija regulisan signalnim putevima u kojima učestvuju geni označeni kao *Wnt*, *Notch*, *Shh* i *Homeobox*.

Poseban značaj u nastanku leukemijskog klona ima izmenjena regulacija familije homeoboks (Homeobox – Hox) gena. Klasa *Hox* gena je grupa evolutivno vrlo konzervativnih genetskih sekvenci, koja kodira transkripcione faktore. Kod sisara postoje dva glavna klastera *Hox* gena: primordijalni i *ParaHox*, za koje se pretpostavlja da su nastali duplikacijom ishodnog *ProtoHox* klastera tokom evolucije. Primordijalni klaster sadrži 39 *Hox* gena, raspoređenih u klase (A-D). Svaka klasa se nalazi na različitom hromozomu, i to: *HOXA* (7q21), *HOXB* (17q21), *HOXC* (12q13) i *HOXD* (2q31) (Garcia-Fernández *et al*, 2005).

Tokom embriogeneze sekvencijalna aktivacija ovih gena dovodi do prostornog formiranja anatomskih struktura u kraniokaudalnom smeru. U hematopoezi su aktivni *Hox* gen A, B i C klase, i to tako da je najintenzivnija ekspresija prisutna u populaciji matičnih ćelija, i postepeno opada tokom diferencijacije. Ovo zapažanje ukazalo je na potencijalni značaj ove klase gena u nastanku matičnih ćelija leukemogeneze (Grier *et al*, 2005; Argiropoulos *et al*, 2007).

Uloga *Hox* gena u hematopoezi dokazana je nizom eksperimenata na animalnim eksperimentalnim modelima (engl. – „knock out mice“). Povišena ekspresija *HoxA10*, *HoxB3* i *HoxB6* u miševa dovodi do čitavog niza promena kao što su prekid u diferencijaciji B i T limfocita, neefikasna eritropoeza, zatim nastanak mijeloproliferativnih oboljenja i akutne mijeloidne leukemije (Abramovich *et al*, 2005).

Kod matičnih ćelija hematopoeze jednu od odlučujućih uloga u mehanizmima samoobnove ima *HoxB4*. Naime, povišena ekspresija ovog gena dovodi do značajne ekspanzije matičnih ćelija, ali ne i do nastanka leukemijskog klon. Međutim, eliminacija ovog gena u eksperimentalnim modelima (engl. – „knock out mice“) nije dovela do dramatičnih promena u hematopoezi. Istovremena eliminacija *HoxB3* gena dovela je do smanjenja broja matičnih ćelija, dok u načinu odvijanja hematopoeze nije bilo promena. Ovi eksperimentalni podaci ukazuju da su u mehanizme samoobnove uključeni i drugi geni iz ove grupe. Ukoliko se kod eksperimentalnih životinja uklone oba alela *HoxA9* dolazi do smanjenja broja matičnih ćelija hematopoeze, nedovoljnog za repopulaciju kostne srži u letalno ozračenih primaoca (Amsellem *et al* 2003; Klump *et al*, 2005).

Ekspresija *Hox* gena zavisi i od drugih genskih lokusa. Tako, *MLL* gen (mixed lineage leukemia) kodira proteine koji modifikuju hromatin i neophodni su za održavanje ekspresije *Hox* gena tokom razvoja. Eksperimentalne životinje kojima nedostaju oba alela *MLL* ne formiraju kolonije kostne srži *in vitro*, a ovaj defekt se može korigovati transfekcijom *HoxA9*, *HoxB3* i *HoxB4* (Argiropoulos *et al*, 2007).

Pokazano je da kod pedijatrijskih bolesnika postoji različit profil ekspresije *Hox* gena u zavisnosti od postojanja *MLL* rearanžmana. Kod bolesnika sa mutiranim nukleofosminom (NPM⁺ AML) nađena je povišena ekspresija *HoxA9*, *HoxA10*, *HoxB2*, *HoxB6* i *MEIS1*. Kod leukemija gde je postojao mutirani *MLL* registrovana je i različita ekspresija *Hox* gena, u smislu dominantne ekspresije *HoxB2*, *HoxB3* i *HoxB4*. Na osnovu ovih nalaza zaključeno je da disregulacija *Hox* gena kod NPM⁺ AML se razlikuje od one kada postoji i *MLL* rearanžman (Armstrong *et al*, 2002; Alcalay *et al*, 2005; Mullighan *et al*, 2007).

Uticaj na ekspresiju *Hox* gena ispoljava i familija gena označena kao *cdx*, tako što povišena ekspresija ovih gena može da dovede do nastanka AML (Fröhling *et al*, 2007).

Regulacija funkcije *Hox* gena vrši se i posttranslaciono, dejstvom kofaktora kao što je MEIS1 (engl. myeloid ecotropic viral integration site 1). Naime, proteini kodirani *Hox* genima se vezuju za DNK sa malom specifičnošću, a ovaj nedostatak se koriguje njihovim vezivanjem za kofaktore. Samim tim, mutacije kofaktora dovode do poremećaja funkcije Hox proteina i imaju ulogu u poremećenoj funkciji samoobnove, koja dovodi do formiranja matične ćelije leukemogeneze.

U osnovi nastanka matične ćelije leukemogeneze nalazi se povećana ekspresija *HoxA9*, *HoxA10*, *HoxB3*, *HoxB6* i *HoxB8* koja dovodi do proliferativne prednosti klona. Međutim, pored ključne uloge u samoobnovi matičnih ćelija hematopoeze, narušena ekspresija *Hox* gena ima i klinički značaj. Naime, povećana ekspresija *HoxA9* je najznačajniji pojedinačni pokazatelj lošeg ishoda lečenja kod bolesnika sa AML (Andreeff *et al*, 2008).

Jedan od načina na koji *Hox* geni učestvuju u leukemogenezi je i učešće u različitim genskim fuzijama koje nastaju kao posledica recipročnih translokacija. Više kalstera *Hox* gena stvara fuzioni genski produkt sa genom za nukleoporin *NUP98* (*NUP98-Hox*) (Moore *et al*, 2001; Tosić *et al*, 2009). Gen za nukleoporin se nalazi na hromozomu 11p15.5, i do sada je otkriveno da sa 21 partnerskim genom formira fuzionisane genske rearnžmane. Ovaj protein učestvuje u formiranju kompleksa koji sačinjava nuklearne pore, a koje su uključene u transport proteina, RNA i nekih DNA virusa (Moore *et al*, 2007).

Mehanizmi leukemogeneze kod leukemija sa translokacijama u kojima učestvuje *MLL* gen smatra se da je povećana ekspresija *Hoxa9* i *MEIS1*. Dalje, *MEIS1* dovodi do ushodne regulacije FLT3 receptora i ovaj mehanizam se smatra glavnim efektivnim putem kojim se ispoljava funkcija preterano eksprimiranih *Hox* gena i *MEIS1*. Ipak, za nastanak leukemijskog klona *MEIS1* nije neophodan ukoliko je wtFLT3 prisutan u povećanoj koncentraciji. Naime, normalan FLT3 (wild type - wt) sam po sebi ne dovodi do leukemijske transformacije iako je u mijeloblastima eksprimiran u većoj koncentraciji. Zajedno sa *NUP98-HOX* fuzionim proteinima dolazi do formiranja AML (Palmqvist *et al*, 2006; Rice *et al*, 2007).

I.3. Karakteristike i specifičnosti i AML u osoba starijeg životnog doba i AML u dece

I.3.1 AML u osoba starijeg životnog doba

Poboljšanje rezultata lečenja koje je zapaženo poslednjih decenija, najmanje se odnosi na populaciju osoba starijih od šezdeset godina, u kojih se AML najčešće javlja. Pridružene bolesti i promene u farmakodinamici citostatika nisu jedini razlog za loše rezultate lečenja. Naime, u ovoj starosnoj grupi češće se javljaju leukemije sa prognostički nepovoljnim citogenetskim aberacijama, zatim leukemije sa ekspresijom markera koji ukazuju na rezistenciju na citostatike (MDR – multi drug resistance), kao leukemije koje nastaju u toku evolucije mijelodisplaznog sindroma. Lošiji ishod lečenja postoji i u grupi bolesnika sa normalnim kariotipom, što ukazuje da postojanje MDR fenotipa ima nezavisni uticaj na ishod lečenja od citogenetskog nalaza (Leith *et al*, 1997). Primena hematopoeznih činilaca rasta nije doprinela smanjenju smrtnosti u indukciji, niti ukupnom poboljšanju preživljavanja, već je samo postignuto smanjenje trajanja hospitalizacije (Dombret *et al*, 1995). Glavni razlog terapijskog neuspeha jesu primarno rezistentne leukemije se javljaju kod 25%-45% bolesnika. S obzirom na čestu ekspresiju glikoproteina P, koji je odgovoran za rezistenciju na citostatike, u terapijskim studijama korišćeni su inhibitori ovog membranskog efluks sistema, ali bez značajnog uspeha. Pretpostavlja da prisustvo markera koji ukazuju na rezistenciju nije po sebi uzrok neuspeha terapije, već da predstavlja marker nezrelog leukemijskog fenotipa (Tallman *et al*, 2008).

Obzirom na činjenicu da je ukupno preživljavanje u ovoj grupi bolesnika manje od 10%, novi terapijski pristup je od ključnog značaja za unapređenje lečenja.

Specifične biološke karakteristike AML kod starijih osoba ukazuju na potrebu za posebnim vidom stratifikacije AML u osoba starijih od 60 godina. Naime, mutacije u *CFB* (engl. core binding factor leukemia) se u osoba starijeg životnog doba javljaju sa manjom učestalošću, a njihova prognoza nije tako dobra kao u mlađih bolesnika. Načini za unapređenje ishoda lečenja su primena imunoterapije (anti CD33 antitelo), zatim primena malih doza citozin arabinozida u postindukcionoj fazi, kao i niskih doza klofarabina i inhibitora histon deacetilaze (Stock *et al*, 2006; Martin *et al*, 2008; Dombret *et al*, 2009).

Akutna promijelocitna leukemija (APL) za razliku od drugih tipova AML je u ovoj grupi obolelih srazmerno retko zastupljena, a odgovor na terapiju se ne razlikuje u odnosu na bolesnike mlađeg životnog doba (Sanz *et al*, 2004).

I.3.2 AML u dece

Za razliku od odraslih bolesnika, AML u dece se četiri puta ređe javljaju u poređenju sa akutnom limfoblastnom leukemijom, koja je najčešća leukemija dečijeg doba. Iako su zastupljene sa ukupnom učestalošću od 20%, AML u dece dovode do polovine smrtnih ishoda zbog akutnih leukemija (Arceci, 2007). Etiologija AML u dece je najčešće nepoznata. Podaci iz epidemioloških studija povezuju veću učestalost AML dečijeg doba sa izloženošću hemijskim mutagenima tokom prenatalnog razvoja, a određeni konstitutivni genetski poremećaji jasno su povezani sa većom učestalošću AML (Smith *et al*, 2005). Veća učestalost AML u dece nalazi se u dece sa Daunovim (Down) sindromom, zatim u dece sa neurofibromatozom tip I, ali i u dece sa urođenim aplazijama kostne srži kao što su Fankonijeva (Fanconi) anemija, Švahmanov Dajmondov (Scwachman Diamond) sindrom, Nunanov (Noonan) sindrom, urođena trombocitopenija sa predispozicijom za evoluciju u AML, Sekelov (Seckel) sindrom, Nijmegenov (Nijmegen) sindrom, Blumov (Bloom) sindrom i Klinefelterov sindrom. Učestalost ovih genetskih poremećaja je sa izuzetkom Daunovog sindroma (1 na 700 živorođene dece) i neurofibromatoze tip I (1 na 3000 živorođene dece) srazmerno mala. Prepoznavanje ovih urođenih sindroma je značajno jer je učestalost leukemija značajno veća u odnosu na decu bez ovih genetskih poremećaja (Belson *et al*, 2007).

Deca obolela od Daunovog sindroma imaju veći rizik za nastanak akutnih leukemija. U ovih bolesnika češće su zastupljene ALL, AML i tranzitorni mijeloproliferativni sindrom koji je karakterističan samo za decu sa Daunovim sindromom. U kohorti dece sa akutnim leukemijama, deca sa Daunovim sindromom čine 1-2% dece sa ALL i 10% dece sa AML. Tranzitorni mijeloproliferativni sindrom, javlja se kod oko 10% novorođenčadi sa Daunovim sindromom, i najčešće prolazi spontano. Obolela deca imaju veću učestalost za razvoj akutne megakarioblastne leukemije u poređenju sa decom sa Daunovim sindromom koja nisu imala ovaj poremećaj. Učestalost akutne megakarioblastne leukemije je u ovih bolesnika oko 400 puta veća u poređenju sa zdravom populacijom. S obzirom na veću verovatnoću smrtnog ishoda zbog septičnih komplikacija, BMF (Berlin-Frankfurt-Münster) grupa preporučuje protokol sa smanjenim dozama citostatika (ali uz uobičajene doze citozina arabinzida) i bez profilaktičkog zračenja centralnog nervnog sistema. Navedenim modifikacijama hemioterapijskih protokola u dece sa Daunovim sindromom postižu se rezultati lečenja kao i u dece bez Daunovog sindroma (Dixon *et al*, 2006; Xavier *et al*, 2009).

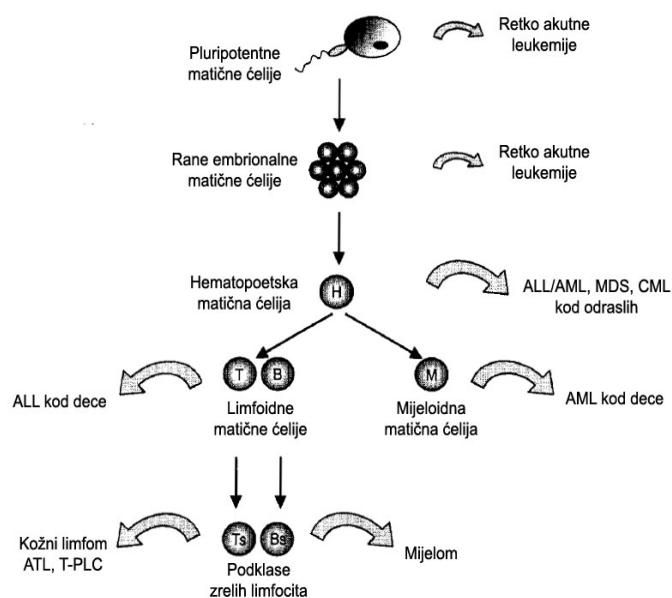
Specifičnost leukemogeneze u dece sa Daunovim sindromom je stečena mutacija transkripcionog faktora GATA1. Ovaj transkripcioni faktor, čiji se gen nalazi na kratkom kraku hromozoma X, neophodan je tokom eritropoeze, a naročito je značajan za razvoj eritroidne i megakariocitne loze (Pevny *et al*, 1995). U miševa dobijenih rekombinatom tehnologijom (knock out) gde potpuno izostaje funkcija GATA1, eritropeza se razvija do stadijuma proeritroblasta, zbog čega miševi sa ovom mutacijom umiru *in utero* od posledica teške anemije. Nasuprot posledicama po eritropezu, u megakariocitnoj lozi deficit ili mutacija GATA1 dovode do povećane proliferacije megakarioblasta, ali sa poremećajem u maturaciji, a samim tim dolazi i do trombocitopenije. Nastali trombociti nemaju punu funkcionalnu aktivnost i izmenjene su morfologije (Vyas *et al*, 1999).

Mutacije *GATA1* nastaju još *in utero* i dovode do zastoja u diferencijaciji megakariocita uz stimulaciju proliferacije megakarioblasta (Ferreira *et al*, 2005).

U leukemijskom klonu dece sa Daunovim sindromom pronađena je mutacija GATA1 transkripcionog faktora, koja se ne nalazi u dece starijeg uzrasta sa i bez ovog sindroma kod *de novo* AML. S obzirom na to da u dece starije od 4 godine AML ima biološke karakteristike kao i kod ostalih bolesnika sa AML, preporuka je da se načini skrining za ovu mutaciju i tako odredi optimalan način lečenja (Hasle *et al*, 2008).

Kod najvećeg broja obolelih od akutne limfoblastne leukemije sa rearanžmanom *TEL-AML1* i infant leukemije sa *MLL* rearanžmanom je pokazano *in utero* poreklo leukemijskog klona. Ovim saznanjima doprinela je molekulska analiza uzoraka krvi uzetih na rođenju za skrining na urođene metaboličke bolesti, kao i proučavanjem leukemija kod identičnih blizanaca (Greaves *et al*, 1999). Analizirajući uzorke krvi uzete na rođenju ustanovljeno je da se i translokacija t(8;21) (*AML1/ETO* rearanžman) karakteristična za AML može naći još na rođenju (Wiemels *et al*, 2002). Pored navedenog, proces leukemogeneze u AML može da se u potpunosti ispolji i tokom intrauterusnog perioda što se završava intrauterusnom smrću (Hunger *et al*, 1998). Ipak, sistematskim praćenjem genetskih rearanžmana *TEL/AML1* i *AML1/ETO* pokazano je da se ćelije koje su potencijalni leukemijski klonovi stvaraju tokom intrauteričnog razvoja u znatno većem broju nego što je učestalost leukemija. Samim tim, potrebno je da dodatni leukemogeni događaj doprinesu formiranju leukemijskog klona. Ova saznanja imaju i praktični značaj za planiranje transplantacije matičnih ćelija iz krvi pupčanika (Mori *et al*, 2002).

Razlike u mestu nastanka matične ćelije leukemogeneze u odraslih i dece prikazane su na slici 3.



Slika 3. Najčešća mesta nastanka matične ćelije leukemogeneze tokom diferencijacije matičnih ćelija u dece i odraslih bolesnika

Proučavanje mehanizama leukemogeneze u dece sa urođenim genetskim poremećajima doprinelo je razumevanju mehanizama onkogeneze uopšte, s obzirom da su *germline* mutacije kod ovih bolesnika često identične sa stečenim mutacijama koje se javljaju u dece sa AML. Klinički značaj dijagnostikovanja AML nastale u sklopu genetskih poremećaja određuje i optimalni terapijski pristup. U dece sa Daunovim sindromom višak genetskog materijala na hromozomu 21 dovodi do veće osetljivosti mijeloblasta na citozion arabinozid, što doprinosi dobrim rezultatima lečenja ove grupe bolesnika. Zbog veće toksičnosti citostatske terapije dece sa Daunovim sindromom, AML se u ovih bolesnika leči prema posebno prilagođenim hemioterapijskim protokolima (Creutzig *et al*, 2005).

Fankonijeva anemija je najčešći poremećaj u grupi urođenih aplazija kostne srži koja stvara predispoziciju za razvoj mijelodisplaznog sindroma i evolucije u AML. Bolesnici sa ovim poremećajem imaju povećanu osetljivost na mutagene iz sredine, odnosno, homozigoti imaju poremećaj mehanizama za popravku DNK što vodi akumulaciji mutacija u matičnoj ćeliji i progenitorima hematopoeze sa nastankom klonskih poremećaja (Dokai *et al*, 2008). S obzirom na to da je učestalost heterozigota za Fankonijevu anemiju srazmerno velika (1 na 300), pokazano je da i heterozigoti kod sporadično nastalih AML imaju veću učestalost FAC mutiranih gena u poređenju sa osobama u opštoj populaciji (Awan *et al*, 1998).

Prepoznavanje Fankonijeve anemije značajno je za planiranje hemioterapije kao i za pripremu za alogenu transplantaciju kostne srži. Naime, s obzirom da se radi o smanjenom kapacitetu mehanizama koji učestvuju u reparaciji DNK ovi bolesnici ispoljavaju značajno češća i teža neželjena dejstva hemioterapije i radioterapije. Podaci ukazuju da je modifikovanim protokolima moguće ostvariti hematološku remisiju, za razliku od istorijskih podataka gde su publikovani lošiji ishodi lečenja dece sa AML i Fankonijevom anemijom (Mehta *et al*, 2007).

Deca sa Fankonijevom anemijom zbog veće osetljivosti na alkilišuće citostatike imaju mnogo više toksičnih nuspojava tokom lečenja AML, tako da su potrebe modifikacije uobičajenih protokola. Takođe, protokoli za kondicioniranje pre transplantacije matične ćelije hematopoze su posebno kreirani da bi se izbegla često fatalna toksičnost kao posledica poremećenih mehanizama popravke DNK koja postoji u svim tkivima (Gluckman *et al*, 1990).

U dece sa neurofibromatozom tip I, genska osnova poremećaja je mutacija u genu za protein neurofibromin (*NFI*). U polovine obolelih poremećaj je nasledan, a u ostalih je u pitanju nova mutacija. Deca, ali ne i odrasli bolesnici, češće obolevaju od AML, juvenilne mijelomonocitne leukemije (JMML) i mijelodisplaznog sindroma (MDS) (Emanuel *et al*, 2008). S obzirom na to da je u leukemijskom klonu uvek prisutan samo mutirani alel *NFI*, zaključeno je da *NFI* deluje kao tumor supresorski gen. Proteinski produkt ovog gena, neurofibromin, reguliše aktivnost *RAS* onkogena (Gutmann *et al*, 2001). Mutirani neurofibromin ne može da smanji aktivnost *RAS* onkogena, koji sintetiše trozin kinaze koje učestvuju u transdukciji proliferativnih signala, tako da se u jedro stalno prenosi signal za proliferaciju.

Deca sa Nunanovim sindromom takođe češće razvijaju JMML (juvenilna mijelomonocitna leukemija) usled mutacije gena koji kodira tirozin fosfatazu, a koja prenosi aktivacione signale od receptora za faktore rasta do jedra (Tartaglia *et al*, 2003).

I.4. Klinička slika, kriterijumi za postavljanje dijagnoze i podela AML

I.4.1 Klinička slika AML

Simptomi i znaci AML su posledica insuficijencije kostne srži (simptomi i znaci anemije, hemoragijski sindrom zbog trombocitopenije i/ili diseminovane intravaskularne koagulopatije), hiperleukocitoze (hiperviskozni sindrom sa znacima leukostaze u plućima i centralnom nervnom sistemu), ekstramedulske infiltracije mijeloblastima, i sistemskih infekcija koje su posledica agranulocitoze (Miller *et al*, 2005).

Jedan od načina ispoljavanja AML je u formi ekstramedularnih tumora (granulocitini sarkom, hlorom) koji su sačinjeni od mijeloblasta. Ovi tumori se mogu javiti na svakoj anatomskoj lokalizaciji. U značajnog broja obolelih dijagnostikuju se pre nego što se pojavi infiltracija mijeloblastima u koštanoj srži. Dijagnostika se zasniva na imunohistohemijskom određivanju porekla tumorskih ćelija. Terapija se sprovodi prema protokolima za lečenje AML uz lokalnu primenu radioterapije (Reinhardt *et al*, 2002; Čolović *et al*, 2002; Janić *et al*, 2007).

Broj leukocita kod bolesnika sa AML varira od leukopenije do hiperleukocitoze. Hiperleukocitoza je u korelaciji sa postojanjem mutiranog *FLT3* i ima prognozni značaj, kao i koncentracija hemoglobina (Čolović N *et al*, 2006). U pojedinih bolesnika nalazi se normalan ili snižen broj leukocita, dok se u perifernoj krvi ne detektuju mijeloblasti. Ovakav način ispoljavanja AML naziva se aleukemijska forma bolesti.

Citopenije kod bolesnika sa AML nisu samo posledica fizičkog potiskivanja normalnih elemenata hematopoeze, već se razvijaju i zbog inhibicije hematopoeze hemokinima koje proizvode mijeloblasti (Iversen *et al*, 2005).

Hemoragijski sindrom u obolelih od AML najčešće je posledica sniženog broja trombocita koji nastaje kao posledica potiskivanja megakariopoeze patološkim mijeloblastima. Naročito delikatan problem je poremećaj koagulacije kod bolesnika sa akutnom promijelocitnom leukemijom, gde pored trombocitopenije zbog infiltracije koštane srži, hemoragijskoj dijatezi doprinose diseminovana intravaskularna koaguopatija, kao i fibrinoliza i fibrinogenoliza (Elezović 1994; Talman *et al*, 2007).

I.4.2 Kriterijumi za postavljanje dijagnoze i podela AML

Dijagnoza AML postavlja se na osnovu rezultata citoloških, imunoloških i genetičkih ispitivanja.

Za podelu AML koriste se kriterijumi i preporuke Francusko-Američko-Britanske kooperativne grupe (FAB) (Bennett *et al*, 1985) i podela Svetske zdravstvene organizacije (SZO) (Vardiman *et al*, 2009).

Razlike kriterijuma FAB i SZO su u procenat blasta u kostnoj srži na osnovu koga se postavlja dijagnoza AML, kao i činjenici da podela SZO uvodi genske promene u algoritam za dijagnostiku i podelu mijeloidnih neoplazmi.

Podela Francusko-Američko-Britanske kooperativne grupe (French-American-British clasiffication – FAB), objavljena 1976. godine, kao citološki kriterijum za postavljanje dijagnoze AML uzima infiltraciju kostne srži mijeloblastima od 30%. Stepen i pravac mijeloidne diferencijacije određeni su na osnovu citoloških i citohemijskih kriterijuma.

Uporedo sa širim uvođenjem imunoloških metoda u dijagnostiku leukemija, originalnoj FAB podeli su pridodata i dva entiteta koji se ne mogu definisati samo na osnovu postojećih kriterijuma, već je za njihovo definisanje neophodan nalaz imuofenotipa mijeloblasta. To su: akutna mijeloidna leukemija sa minimalnom diferencijacijom (FAB M0) i akutna megakarioblastna leukemija (FAB M7) (Bennet *et al*, 1985, 1991).

Za dijagnozu i podelu AML prema FAB kriterijumima primenjuju se standardno bojeni preparati periferne krvi i kostne srži (Wright-Giemsa metodom) ili biopsije kostne srži. Za određivanje pravca i stepena mijeloidne diferencijacije koriste se, pored citoloških karakteristika mijeloblasta, četiri standardna citohemijska bojenja: periodic-acid Schiff (PAS), Sudan crno (SBB), peroksidaza i esteraze (specifična i nespecifična). Peroksidaza i SBB su karakteristični za granulocitnu, eozinofilnu i monocitnu liniju diferencijacije.

Esteraze su karakteristične za monocitnu liniju diferencijacije i korisne su citološkoj diferencijaciji granulocitne od monocitne linije diferencijacije. Hloracetat esteraza je karakteristična za granulocite i mastocite, dok se monociti ne boje na ovaj način. Nasuprot njima, nespecifične esteraze (α naftil butirat esteraza i α acetat esteraza) su snažno pozitivne u ćelijama monocitne linije. Granulociti i limfociti su negativni na nespecifične esteraze. PAS ima manji diferencijalni značaj u odnosu na pomenuta bojenja i pozitivan je u eritroblastima kod eritroleukemije i eozinofilima u mijelomonocitnoj leukemiji sa eozinofilijom. Normalni eritroblasti ne ispoljavaju PAS pozitivnost. Povezanost FAB tipova AML sa rezultatima citohemijskih bojenja prikazana je na tabeli 1.

FAB tip	MPO ili SBB	NSE
M0	±	–
M1	+ (>3% blasta)	–
M2	++	–
M3	+++	–
M4	+ (granulociti)	±
M5	–	++
M6	+ (mijeloblasti)	–
M7	–	±

Tabela 1. Citohemijska bojenja u akutnim mijeloidnim leukemijama

Prvi korak pri postavljanju dijagnoze leukemije je određivanje procenta blasta u kostnoj srži. Kako je razlikovanje mijeloblasta od normalnih mijeloidnih prekursora delikatno, sastavni deo preporuka za dijagnostiku leukemija su i citološki kriterijumi za razlikovanje mijeloblasta od normalnih prekursora.

Prema preporukama Muftija i saradnika iz 2008. godine mijeloblasti se dele na granulirane i agranulirane. Mijeloblasti su prema ovim preporukama definisani kao ćelije sa visokim nuklearno/citoplazmatskim odnosom, uočljivim jedarcima i najčešće finim hromatinom. Odlike citoplazme podrazumevaju varijabilan stepen bazofilije i postojanje Auerovih štapića ali bez Goldžijeve zone. Izuzetak mogu da budu mijeloblasti u bolesnika sa AML i translokacijom t(8;21), gde je moguć nalaz diskretne Goldžijeve zone, sa ili bez Auerovih štapića, ali bez drugih odlika promijelocita.

Takođe, date su precizne preporuke za razlikovanje granuliranih blasta od promijelocita. Naime, glavna karakteristika normalnih promijelocita je jasno vidljiva Goldžijeva zona. Jedro je centralno postavljeno ali može biti i ekscentrično sa varijabilnim karakteristikama hromatina. Karakteristike displastičnih promijelocita su slabo razvijena Goldžijeva zona, hipo- ili hipergranuliranost, kao i grupisanje granula.

Karakteristike promijelocita su umerena bazofilija citoplazme sa brojnim azurofilnim granulama i ekscentrično postavljenim jedrom, oko koga se nalazi dobro definisani region Goldži zone (Vardiman *et al*, 2009).

Ćelijska linija	FAB tip	Zastupljenost
Mijeloidna	M0 - AML sa minimalnom diferencijacijom	3%-5%
	M1 - AML bez maturacije	15%-20%
	M2 - AML sa maturacijom	25%-30%
	M3 - Akutna promijelocitna leukemija hipergranularni oblik	10%-15%
	M3v - Akutna promijelocitna leukemija mikrogranularna varijanta	
Mijeloidna/ monocitna	M4 - Akutna mijelomonocitna leukemija	20%-30%
	M4eo - Akutna mijelomonocitna leukemija sa eozinofilijom	
Monocitna	M5a - Akutna monoblastna leukemija slabo diferentovana	2%-9%
	M5b - Akutna monoblastna leukemija diferentovana	
Eritroidna	M6 - Akutna eritroleukemija	3%-5%
Megakariocitna	M7 - Akutna megakarioblastna leukemija	3%-5%

Tabela 2. Klasifikacija i podtipovi akutnih mijeloidnih leukemija prema FAB preporukama

Primena citoloških i citohemijskih kriterijuma je u najvećeg broja bolesnika dovoljna za postavljanje dijagnoze leukemije. Ipak, u pojedinim okolnostima teško je samo na osnovu citoloških kriterijuma razlikovati mijeloblaste od limfoblasta, i mijelodisplazni sindrom od AML (Bennett *et al*, 2009).

Primena tehnologije monoklonskih antitela dovela je i do poboljšanja dijagnostičnih mogućnosti i preciznije podele akutnih mijeloidnih leukemija. Najveći značaj određivanja imunofenotipa je upravo u razlikovanju AML od ALL, kao i u prepoznavanju i definisanju bifenotipskih leukemija. Određivanje minimalne rezidualne bolesti praćenjem aberantnog fenotipa se pokazalo kao pouzdan način procene kvaliteta remisije i predviđanja ishoda lečenja, ali još uvek ne postoje preporuke za rane intervencije, odnosno, terapijske postupke pre pojave recidiva bolesti u ovih bolesnika (Buccisano *et al*, 2010; Rubnitz *et al*, 2010).

U najvećem broju slučajeva ekspresija antigena na mijeloblastima se javlja asinhrono, uz koekspresiju normalnih diferencijacijskih antigena. Samim tim, imunofenotip mijeloblasta je veoma retko u korelaciji sa citološkim i citohemijskim nalazima. Ipak, određene karakteristike pojedinih FAB tipova postoje, tako da se ekspresija ranih diferencijacijskih markera kao što su CD34, CD117 i terminalna deoksinukleotidtransferaza (TdT) češće ispoljeni kod nediferentovanih i slabije diferentovanih FAB tipova (FAB M0 i FAB M1). Donekle karakteristično za akutnu promijelocitnu leukemiju je izostanak CD33 i HLA-DR, dok FAB tip M4 ispoljava CD14.

Povezanost FAB tipova sa ekspresijom markera prikazana je na tabeli 3.

Marker	M0	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7
HLA-DR	++	++	+	-	++	++	+	-
CD11b	+	+	+	-	+++	+++	-	-
CD13	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+
CD14	-	+	+	-	+++	+++	-	-
CD15	-	-	+++	+	+	+	-	-
CD33	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
CD41, CD61	-	-	-	-	-	-	-	+++
Glikoforin	-	-	-	-	-	-	+++	-
TdT	++	+	+	-	-	-	-	-
CD117	+++	+++	++	+		++	++	+
CD2	+	+	-	++	++	-	-	-
CD7	+	+	-	-	-	-	-	++
CD19	+		++	-	-	-	-	-
CD34	+++	++	++	-	+	-	-	+

Tabela 3. Imunofenotipski markeri kod FAB tipova AML

Kriterijum za postavljanje dijagnoze AML prema preporukama SZO takođe je procenat blasta u kostnoj srži, pri čemu se definicija ali i procenat blasta (20%) razlikuju u odnosu na FAB podelu.

Iako postoji delimična korelacija FAB podele sa kariotipom (akutna promijelocitna leukemija, akutna mijelomonocitna leukemija sa eozinofilijom), citomorfološka i citohemijska ispitivanja su se vremenom pokazala kao nedovoljna za procenu ishoda lečenja, kao i za razumevanje heterogenosti AML.

Analiza ishoda lečenja ukazala je na potrebu da se *de novo* i sekundarne AML razmatraju kao različite podgrupe, što nije bilo predviđeno FAB klasifikacijom. Mehanizmi leukemogeneze i ishod lečenja se kod ovih AML razlikuju. Istovremeno sa uvođenjem FAB podele za AML, ista kooperativna grupa sačinila je i podelu mijelodisplaznih sindroma. Prema FAB preporukama, ukoliko je broj blasta u kostnoj srži bio manji od 30%, dijagnoza je, u zavisnosti od procenta blasta i drugih citoloških karakteristika, bila mijelodisplazni sindrom. Podaci dobijeni praćenjem toka bolesti pokazali su da bolesnici sa MDS-RAEBT, koji imaju procenat blasta 20%-29% zapravo imaju agresivnu klonsku bolest koja po svojim biološkim karakteristikama ima više zajedničkog sa AML. Naime, tok RAEBT i AML sa multilinijskom displazijom je isti, tako da ove kategorije klonskih hemopatija ne treba razdvajati u pogledu terapijskih pristupa.

Prema preporukama SZO definicija mijeloidni podrazumeva ćelije koje pripadaju granulocitnoj (neutrofili, eozinofili, bazofili), monocitno/makrofagnoj, eritroidnoj, megakariocitnoj i mastocitnoj lozi.

Određivanje procenta blasta se bazira na pregledu preparata koštane srži bojenih standardnim citološkim metodama. Određivanje procenta blasta imunohistochemijskim metodama ili protočnom citometrijom nije zamena za citološki pregled zbog mogućnosti pogrešne procene. Naime, svi mijeloblasti ne ekspimiraju CD34 antigen; tokom pripreme uzorka za analizu protočnom citometrijom moguće su greške usled hemodilucije ili drugih artefakata.

Zbog navedenog, po preporukama SZO usvojen je kriterijum od najmanje 20% blasta u koštanoj srži za dijagnozu AML. Samim tim, izmenjena je i podela mijelodisplaznih sindroma, tako da je kategorija RAEBT isključena.

I Akutna mijeloidna leukemija sa stalnim citogenetskim aberacijama
AML sa t(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i>
AML sa inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i>
APL sa t(15;17)(q22;q12); <i>PML-RARA</i>
AML sa t(9;11)(p22;q23); <i>MLLT3-MLL</i>
AML sa t(6;9)(p23;q34); <i>DEK-NUP214</i>
AML sa inv(3)(q21q26.2) or t(3;3)(q21;q26.2); <i>RPNI-EVII</i>
AML (megakarioblastna) sa t(1;22)(p13;q13); <i>RBM15-MKL1</i>
<i>Predloženi entitet: AML sa mutiranim genom za NPM1</i>
<i>Predloženi entitet: AML sa mutiranim genom za CEBPA</i>
II Akutna mijeloidna leukemija sa mijelodisplazijom
III Mijeloidne leukemije vezane za primenu terapije
IV Akutnamijeloidna leukemija koja nije drugačije klasifikovana
AML sa minimalnom diferencijacijom
AML bez sazrevanja
AML sa sazrevanja
Akutna mijelomonocitna leukemija
Akutna monoblastna/monocitna leukemija
Akutna eritroidna leukemija
Izolovana eritroidna leukemija
Eritroleukemija, eritroidna/mijeloidna
Akutna megakarioblastna leukemija
Akutna bazofilna leukemija
Akutna panmijeloza sa mijelofibrozmom
Mijeloidni sarkom
Mijeloproliferativna oboljenja kod osoba sa Daunovim sindromom
Tranzitorna abnormalna mijelopoeza
Mijeloidna leukemija kod osoba sa Daunovim sindromom
Blastična plazmocitoidna dendritična neoplazma

Tabela 4. Podela AML prema preporukama SZO 2008

Izdvajanjem pojedinih citogenetskih kategorija AML za bolesnike koje imaju neku od citogenetskih anomalija iz prve grupe, kriterijum za dijagnozu je sam citogenetski nalaz, odnosno, dijagnoza AML se može postaviti bez obzira na procenat blasta.

I Akutna mijeloidna leukemija sa stalnim citogenetskim aberacijama

U ovoj grupi AML nalaze se četiri entiteta AML koji najčešće nastaju kao *de novo* leukemije. Približno jedna trećina adultnih bolesnika se nalazi u ovoj grupi. Karakteristična je izrazita povezanost kariotipa i morfološkog nalaza u aspiratu kostne srži. Za razliku od klasifikacije SZO iz 2002. godine, za postavljanje dijagnoze AML sa t(9;11) ili drugim anomalijama 11q23 potrebno je da postoji više od 20% blasta u perifernoj krvi ili kostnoj srži.

II Akutna mijeloidna leukemija sa mijelodislazijom

U ovoj grupu su AML koje su nastale tokom evolucije mijelodislaznog sindroma. Uslov za postavljanje ove dijagnoze je postojanje MDS ili MDS/MPS najmanje šest meseci pre postavljanja dijagnoze leukemije.

Dileme u pogledu dijagnoze ovog podtipa leukemije nastaju kada se već postavi dijagnoza leukemije. S obzirom da i kod prognostički povoljnih tipova AML može postojati određeni stepen displazije u rezidualnoj hematopoezi, usvojen je kriterijum da pored najmanje 20% blasta, još i najmanje 50% ćelija moraju imati morfološke karakteristike displazije. Obzirom na arbitrarne kriterijume, preporučuje se da i citogenetika ima značajnu ulogu u klasifikaciji AML sa displastičnom hematopoezom.

III Mijeloidne leukemije vezane za primenu terapije

Za razliku od prethodnih podela, preporučuje se mijeloidne leukemije koje nastaju kao posledica primenjene citotoksične terapije više ne izdvajaju u odnosu na tip primenjene terapije, s obzirom na to da je njihovo biološko ponašanje slično.

IV Akutna mijeloidna leukemija koja nije drugačije definisana

U ovoj grupi se nalaze leukemije gde se u potpunosti primenjuju FAB kriterijumi za podelu i dijagnostiku, odnosno, definišu se prema dominantnoj ćelijskoj diferencijaciji mijeloblasta. Dijagnostičke specifičnosti postoje kod akutne eritroleukemije i akutne panmijeloze sa mijelofibrozmom.

Akutna eritroleukemija odlikuje se pretežno eritroidnom diferencijacijom, i to na takav način da postoji kontinuum koji ne može da se uvek uklopi u propozicije FAB klasifikacije. Naime, kada je mijeloblastna komponenta malo zastupljena nije moguće primeniti FAB preporuke. Podela Svetske zdravstvene organizacije izdvaja dva tipa eritroleukemija u zavisnosti od procenta mijeloblasta. Prvi tip je definisan citološkim nalazom najmanje 50% eritroidnih prekursora uz najmanje 20% mijeloblasta koji su neeritroidnog porekla. Ovaj tip eritroleukemije odgovara FAB M6 leukemiji. Drugi tip je eritroleukemija bez mijeloblastne komponente, gde više od 80% ćelija u kostnoj srži čine patološki eritroblasti u različitim fazama sazrevanja. Raniji nazivi za ove entitete su bili Di Gugliemova bolest, akutna eritremijska mijeloza ili minimalno diferentovana eritroleukemija.

Akutna panmijeloza sa mijelofibrozmom je redak klonalni poremećaj sa nepovoljnom prognozom. U nekih bolesnika je posledica evolucije akutne megakarioblastne leukemije, dok se u značajnog broja bolesnika javlja bez prehodnog kolonalnog poremećaja megakariocitne loze.

Bolje poznavanje kliničkih odlika AML kao i nova saznanja iz oblasti molekularne biologije dovela su do revizije postojeće klasifikacije i definisanja novih bioloških entiteta. Veliki izazov je bio definisanje novih genetskih aberacija u AML sa normalnim kariotipom, kod kojih ne postoje konzistentne citološke ili kliničke karakteristike, i to pre svega mutacije *FLT3*, *NPM1* i *CEBPA*. Ove genske anomalije imaju prognosni značaj. Mutacije navedenih gene mogu da se jave i udruženo, u istom leukemijskom klonu.

U grupi AML sa rekurentnim citogenetskim anomlijama zadržana su prethodna tri entiteta, uz napomenu da dodatne genetske lezije mogu da promene biološko ponašanje ovih entiteta. Naime, prisustvo mutacija u *KIT* onkogenu kod *CBF* leukemije sa $t(8;21)(q22;q22)$ u grupi adultnih bolesnika povezano je sa većom učestalošću recidiva i kraćim preživljavanjem; udruženost mutacija u *KIT* onkogenu nije uticala na ishod *CBF* leukemija sa $(inv16)(p13.1q22)$ (Cairoli *et al*, 2006). Kod pedijatrijskih bolesnika sa *CBF* leukemijom prisustvo mutacija u *KIT* onkogenu ne utiče na ishod lečenja (Pollard *et al*, 2010).

Zbog dobro definisanih bioloških karakteristika u ovu grupu su svrstane i leukemije sa translokacijama: $t(6;9)(p23;q34)$ (*DEK-NUP21*), $inv(3)(q21;q26.2)$ ili $t(3;3)(q21;q26.2)$ (*RPNI-EV11*) i $t(1;22)(p13;q13)$ (*RBM15-MKLI*).

Leukemije sa normalnim kariotipom i mutacijama u genima za *NPM1* i *CEBPA* su uključene u okvirne entitete (engl. provisional entity) klasifikacije SZO, dok se AML sa *FLT3* mutacijom ne izdvaja kao poseban entitet. Ipak, zbog prognoznog značaja preporučuje da mutacija *FLT3* uvek bude analizirana naročito ukoliko je u pitanju AML sa normalnim kariotipom.

Mijeloidne leukemije koje su posledica prethodne citostatske terapije (tAML) su i u novoj SZO klasifikaciji poseban entitet. Kako je za prognozu lečenja značajniji kariotip leukemijskog klona od podatka da li je tAML posledica primene inhibitora topo-II-izmoreze ili alkilišućih citostatika, za novu klasifikaciju SZO podaci o primenjenoj terapiji nisu relevantni.

U novoj klasifikaciji su u grupi mijeloidnih maligniteta uključeni i mijeloidni sarkom, mijeloidne proliferacije kod bolesnika sa Daunovim sindromom i blastična plazmocitoidna dendritična neoplazma.

Mijeloidni sarkom je ekstramedularna proliferacija jedne ili više mijeloidnih linija, koja narušava arhitekturu anatomske lokalizacije na kojoj se nalazi. Može da se javi istovremeno sa infiltracijom u kostnoj srži, ali i kao prvi znak recidiva. Mijeloidni sarkom može i da prethodi AML i tada se ova dijagnoza smatra ekvivalentom AML.

Mijeloidne neoplazme kod osoba sa Daunovim sindromom – tranzitorna abnormalna mijelopoieza i AML - imaju jedinstvene karakteristike, uključujući i mutaciju *GATA1*, zbog koje su izdvojeni kao poseban entitet.

Neoplazma koja vodi poreklo od plazmocitoidnih dendritičnih ćelija su po definiciji mijeloidni maligniteti. Najčešće započinju kao solitarni ili multipli nodusi u koži, koji se brzo šire i zahvataju perifernu krv i kostnu srž.

I.4.3 Podela AML u pedijatriji

Tradicionalno se AML kod dece klasifikuju prema FAB preporukama. Iako je i u populaciji bolesnika uzrasta do 18 godina jasno pokazano da kariotip AML ima značajnu ulogu u stratifikacij i ishodu lečenja, kriterijumi Svetske zdravstvene organizacije još uvek nisu prihvaćeni, s obzirom da postoje značajne biološke razlike u ispoljavanju, evoluciji i odgovoru na terapiju primarnih mijelodisplaznih sindroma i AML. Naime, klasifikacija MDS u pedijatrijskih bolesnika učinjena je prema modifikovanim preporukama FAB klasifikacije. Brojne dileme koje još uvek postoje kada je u pitanju precizna citološka i histopatološka dijagnostika ovih entiteta posledica su činjenice da je MDS kod dece značajno ređa bolest nego u populaciji odraslih bolesnika, ali i činjenice da za razliku od odraslih bolesnika, oko 30% dece sa MDS-om ima istovremeno i neku prateću konstitutivnu anomaliju.

Uobičajeni FAB tipovi MDS u pedijatrijskih bolesnika se mogu primeniti sa određenom rezervom, s obzirom na to da se neki tipovi MDS karakteristični za odrasle bolesnike u dece gotovo nikada ne javljaju, dok u dečijem uzrastu postoje oblici MDS koji se ne vidaju kod odraslih bolesnika. Naime, kod dece se veoma retko nalazi refrakterna anemija sa ring sideroblastima (RARS), dok 5q-sindrom u dece nikada nije opisan. S druge strane, postojeće podele ne uzimaju u razmatranje hematološke poremećaje kod dece sa Daunovim sindrom, dok se juvenilna mijelomonocitna leukemija (JMML) razmatra kao poseban entitet.

Jedna od najvažnijih izmena u podeli Svetske zdravstvene organizacije u odnosu na FAB podelu jeste procenat blasta u kostnoj srži na osnovu koga se postavlja dijagnoza AML. Naime, kategorija RAEBT kod dece ima drugačije biološke karakteristike i evoluciju u poređenju sa odraslim bolesnicima. Pokazano je da primena intenzivne citostatske terapije koja se koristi u indukcionom lečenju AML u ovih bolesnika dovodi do dugotrajnih aplazija bez postizanja kompletne hematološke remisije. S druge strane, *de novo* AML uglavnom ima povoljan odgovor na terapiju što znači da bi na osnovu do sada dostupnih podataka dijagnostički kriterijum za AML kod dece trebao da bude 30% mijeloblasta u kostnoj srži. Deca sa RAEBT nemaju bolje preživljavanje ukoliko se pre transplantacije primeni intenzivna hemioterapija. Podaci dobijeni praćenjem ove grupe bolesnika još su jedna potvrda da MDS i AML nisu kontinuum koji se razlikuje samo po procentu blasta u kostnoj srži već da predstavljaju biološki i patogenetski različite entitete. Ove razlike bi svakako trebalo da se ogledaju i u stratifikaciji ovih bolesnika kao i da imaju uticaja na izbor terapije.

1.5 Značaj kariotipa u stratifikaciji bolesnika sa AML

Podaci dobijeni ispitivanjem kariotipa AML daju pouzdane informacije o prognozi lečenja obolelih od AML. Metodama klasičnih citogenetskih ispitivanja moguće je dobiti podatke o citogenetskim anomalijama kod oko 30-40% bolesnika sa AML i prema tome izvršiti i adekvatnu stratifikaciju. Kod dece je procenat citogenetskih anomalija i veći nego u odraslih bolesnika (Look *et al*, 1997).

Određene specifičnosti kariotipa AML dečijeg doba zaslužuju posebne napomene. Rearanžmani u kojim učestvuje 11q23 (*MLL*) su veoma česti u prve dve godine života bez obzira na fenotip leukemije (oko 40%), a kasnije njihova učestalost opada (Ross *et al*, 2009).

Prema nalazu kariotipa u leukemijskim ćelijama bolesnici su svrstani u tri grupe rizika, i to povoljnu, intermedijernu i nepovoljnu grupu rizika za nastanak recidiva bolesti ili primarno rezistentnu bolest (Grimwade *et al*, 1998).

Stratifikacija na osnovu citogenetskih nalaza prikazana je u tabeli 5.

I Grupa povoljnog rizika	
Balansirani strukturni rearanžmani	t(15;17)(q22;q12-21) t(8;21)(q22;q22) inv(16)(p13q22)/t(16,16)(p13;q22)
II Grupa intermedijernog rizika	
Normalan kariotip	
Balansirani strukturni rearanžmani	t(9;11)(p22;q23)
Nebalansirani strukturni rearanžmani	del(7q) del(9q) del(11q) del(20q)
Numeričke aberacije	-Y +8 +11 +13 +21
III Grupa nepovoljnog rizika	
Kompleksni kariotip	
Balansirani strukturni rearnžamani	inv(3)(q21q26)/t(3;3)(q21;q26) t(6;9)(p23;q34) t(6;11)(q27;q23) t(11;19)(q23;p13.1)
Nebalansirani strukturni rearanžmani	del(5q)
Numeričke aberacije	-5 -7

Tabela 5 . Stratifikacija bolesnika sa AML na osnovu citogenetskog nalaza

Ukoliko uz neku od citogenetskih aberacija iz grupe povoljnog rizika postoje i druge citogenetske anomalije, ovi bolesnici se i dalje klasifikuju kao AML sa povoljnom prognozom, obzirom na to da postojanje dve ili više dodatnih citogenetskih aberacija ne menja ishod lečenja ovih bolesnika.

Iako je navedena stratifikacija rizika za recidiv AML danas u širokoj primeni, analiza povezanosti kariotipa leukemijskih ćelija i ishoda lečenja velikog broja bolesnika doprinela je razumevanju značenja pojedinih citogenetskih anomalija. Naime, bez obzira na napredak tehnika molekularne biologije, razumevanje signalnih puteva u normalnoj i klonskoj mijelopojezi, kao i mogućnostima primene ovih saznanja u kliničkom radu, kariotip iz leukemijskih ćelija ostaje i dalje nezamenljiv način za određivanje prognoze bolesti.

Bolesnici sa višestrukim citogenetskim anomalijama, odnosno, sa nalazom kompleksnih aberacija kariotipa imaju lošu prognozu (Schoch *et al*, 2001; Mrozek *et al*, 2004; Čolović, 2008). Definicija kompleksnih hromozomskih aberacija se razlikuje u pojedinim studijskim grupama, tako da neke definišu kompleksnu hromozomsku aberaciju kao najmanje pet nepovezanih citogenetskih promena (Grimwade *et al*, 1998; 2010), dok neke studijske grupe određuju postojanje tri citogenetske anomalije kao kriterijum (Schoch *et al*, 2001).

I u grupi bolesnika sa kompleksnim kariotipom moguće je napraviti precizniju stratifikaciju. Analizom ishoda lečenja pokazano je da je u grupi bolesnika sa kompleksnom kariotipom bolesnici sa monozomalnim kariotipom imaju veoma kratko preživljavanje. Monozomija bilo kog autozoma, a ne samo hromozoma 5 i 7, pokazatelj je loše prognoze (Breems *et al*, 2008).

Na osnovu navedenog predložena je novu stratifikaciju AML na osnovu kariotipa koja bi podrazumevala sledeće grupe:

I AML sa mutacija core binding faktora (*CBF* AML) koje imaju dobru prognozu

II AML sa normalnim kariotipom ili monozomijom hromozoma X ili Y su leukemije sa intermedijernom prognozom

III AML sa drugim hromozomskim aberacijama koje ne ispunjavaju kriterijume za monozomalni kariotip

IV AML sa monozomalnim kariotipom koje imaju veoma lošu prognozu

1.5.1 Kariotip u dece sa AML

Učestalost hromozomskih aberacija kod dece je veća nego u odraslih bolesnika. Pored kvantitativnih postoje i određene kvalitativne razlike koje su odraz različitih procesa leukemogeneze koji postoje kod dece i odraslih. Naime, $t(1;22)(p13;q13)$ koja je karakteristična za akutnu megakarioblastnu leukemiju javlja se samo u dece uzrasta do dve godine. Sa druge strane, karakteristične hromozomske aberacije kao što su $t(15;17)$ i $t(8;21)$ nisu opisane kod dece mlađe od godinu dana (Mrózek *et al*, 2004; Harrison *et al*, 2010).

Stratifikacija AML u dece na osnovu nalaza kariotipa se ne razlikuje značajno od one u odraslih bolesnika. Većina studijskih grupa klasifikuju akutnu promijelocitnu leukemiju i CBF leukemije (engl. **core binding factor**) u grupu povoljnog rizika. Pojedine studijske grupe klasifikuju i decu sa $t(9;11)$ u grupu povoljnog rizika. Sa druge strane, iako se tradicionalno smatra da bolesnici sa $t(8;21)$ spadaju u grupu povoljnog rizika, učestalost recidiva je zapravo slična kao kod bolesnika koji su u grupi intermedijernog rizika. Dobar ishod lečenja u ovoj grupi bolesnika objašnjava se uspešnom terapijom recidiva (Raimondi *et al*, 1999; Mrózek *et al*, 2008).

Dugo vremena je smatrano da su deca sa monozomijom 7 ili $del(7q)$ u grupi visokog rizika. Međutim, retrospektivna analiza pedijatrijskih bolesnika sa ovim citogenetskim nalazima pokazala je u pitanju heterogena grupa malignih hemopatija sa različitim prognozom. Naime, pokazano je da bolesnici sa $del(7q)$ imaju povoljniji ishod lečenja u poređenju sa bolesnicima koji imaju monozomiju 7, ali da u obe citogenetske kategorije na ukupno preživljavanje značajan uticaj imaju i pridružene citogenetske anomalije (Hasle *et al*, 2007).

I.6 Genetske promene i mogućnosti stratifikacije bolesnika sa AML i normalnim kariotipom

Bolesnici sa normalnim kariotipom čine najveću populaciju u okviru AML odraslih bolesnika i nalaze se u grupu intermedijernog rizika citogenetskih promena, odnosno, u grupu neklasifikovanih AML prema klasifikaciji SZO.

Mutacije gena, koji su po svojoj prirodi onkogeni ili geni koji kodiraju elemente signalnih puteva, mogu da pruže informacije o riziku za nastanak recidiva i doprinesu racionalnom postavljanju indikacija za lečenje transplantacijom matičnih ćelija hematopoeze.

Leukemogeneza je višestepeni proces, koji najčešće podrazumeva akumulaciju genetskih lezija, koje zatim dovode do nastanka matične ćelije leukemijskog kлона. Mutacije se prema funkcionalnim karakteristikama najčešće dele u dve klase: klasa I su mutacije koje dovode do aktivacije signalnih puteva i proliferativne prednosti leukemijskih progenitora. U ovu grupu se ubrajaju mutacije u *FLT3* i *RAS* genu. U klasu II se ubrajaju mutacije koje se nalaze u genima za transkripcione faktore koje dovode do zastoja u diferencijaciji. U ovu grupu se ubrajaju *CBF* mutacije i rearanžmani, zatim mutacije u genima *CEBPA*, *MLL* i nukleofosmin.

I.6.1 Nukleofosmin

Nukleofosmin (NPM), poznat i kao numatrin, B23 i NO38, je nukleolarni fosfoportein sa veoma kompleksnom strukturom i funkcijom. Prvobitno je otkriven kao nukleolarni fosfoprotein u granuliranim regionima nukleolusa. Uočeno je da se ekspresija nukleofosmina značajno povećava u odgovoru na različite mitogenske stimulse tako da su visoke koncentracije ovog proteina karakteristične za sve ćelije sa visokim mitotskim indeksom, uključujući i maligne ćelije. Povišena ekspresija nukleofosmina je registrovana kod bolesnika sa karcinomom želuca, ovarijuma, kolona i prostate. Kod bolesnika sa karcinomom mokraćne bešike uočena je povezanost povećane ekspresije nukleofosmina sa rizikom od recidiva i progresije bolesti (Grisendi *et al*, 2006).

Gen za nukleofosmin nalazi se na dugom kraku hromozoma 5 (5q35) i sastoji se od 12 eksona. Fuzioni produkti nukleofosmina nađeni su u velikom broju hematoloških malignih oboljenja kao što su akutne leukemije, hronične mijeloidne leukemije, mijelodisplazni sindromi i nehoćkinski limfomi (Grisendi *et al*, 2006).

Nukleofosmin se nalazi u svim tkivima i to u dve različite forme koje su posledica alternativne obrade primarnog transkripta: B23.1 je zastupljenija izoforma i sastoji se od 294 aminokiselinska ostatka, dok je B23.2 manje zastupljena, ima razgranatu strukturu i nedostaje mu jedan deo molekula sa C terminalnog kraja B23.1. Ove dve izoforme nukleofosmina imaju i različitu distribuciju u ćelijama: B23.1 je lokalizovan u granuliranom matriksu nukleolusa, koja sadrži preribozomalne partikule, dok se B23.2 izoform nalazi u nukleoplazmi (Hingorani *et al*, 2000).

Molekul nukleofosmina se sastoji iz nekoliko različitih domena, što mu omogućava da obavlja više različitih funkcija. N-terminalni deo molekula ima hidrofobnu strukturu i sadrži regione pomoću kojih je omogućena oligomerizacija molekula i funkcija šaperona. Naime, u fiziološkim uslovima preko 95% molekula nukleofosmina nalazi se u formi oligomera i u ćelijama koje nisu u deobi kao i u ćelijama koje se dele (Grisendi *et al*, 2006).

Nukleofosmin ima više različitih funkcija u ćeliji. Jedna od osnovnih uloga je u biogenezi ribozoma, zatim u održavanju stabilnosti genoma putem kontrole duplikacije centromera, kao i multiple interakcije sa tumorsupresorskim genima kao što su *p53* i *ARF* (Boli *et al*, 2009; Cheng *et al*, 2007).

Nukleofosmin učestvuje u formiranju ribozoma kao eksportni protein za 5S rRNK u citoplazmu, kao i u funkciji RNAze. Pored uloge u transportu nukleinskih kiselina, nukleofosmin ima i ulogu šaperona za proteine, a takođe, učestvuje i u transportu histona kao i u formiranju nukleosoma. Na ovaj način nukleofosmin posredno učestvuje u kontroli transkripcije gena, koja zavisi od stepena acetilacije histona. Vezivanjem nukleolarnih proteina nukleofosmin sprečava spontanu agregaciju proteina u jedarcima u toku biogeneze ribozoma (Maggi *et al*, 2008).

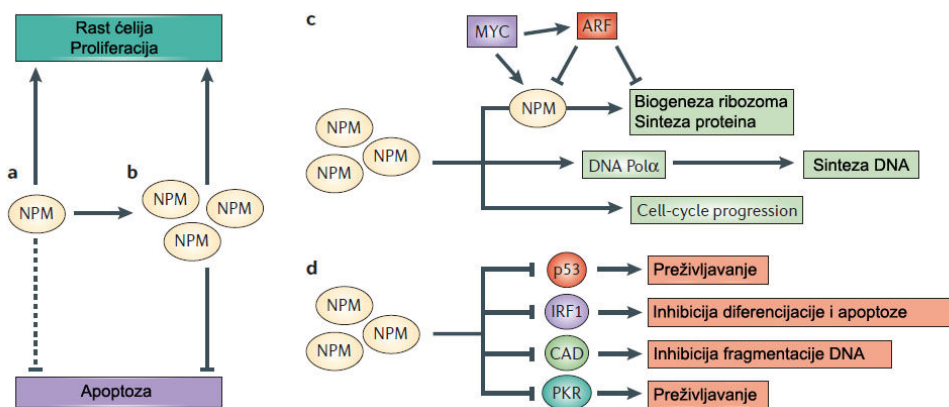
Genomska stabilnost se održava preko kontrole mehanizama za popravku DNK i kontrolom duplikacije centromera u toku mitoze. Inaktivacija nukleofosmina dovodi do nekontrolisane duplikacije centromera i nestabilnosti genoma. Nukleofosmin sprečava nekontrolisanu amplifikaciju centromera, što samim tim smanjuje rizik od transformacije ćelija. Miševi kojima je inaktiviran jedan gen za nukleofosmin (NPM^{-/-}) vremenom razvijaju poremećaj koji najviše odgovara mijelodisplaznom sindromu, a koji je posledica nekontrolisane duplikacije centromera (Grisendi *et al*, 2005). U ćelijama koje se ne dele nukleofosmin se vezuje za pojedinačne centrosome i posle fosforilacije pod dejstvom CDK2 ciklina odvaja se od centrosoma, omogućavajući odgovarajuću duplikaciju hromozoma (Okuda *et al*, 2000).

Nukleofosmin je sastavni deo odbrambenog, apoptoznog mehanizma koji se aktivira pod dejstvom različitih vidova stresa kao i onkogenih stimulusa. Pored povišenog stepena sinteze proteina zbog povećanog stvaranja ribozoma, aberantno povećana ekspresija nukleofosmina povećava verovatnoću preživljavanja ćelija inhibicijom proapoptotskih signalnih puteva. Ova funkcija se ostvaruje interakcijom sa p53, čiju stabilnost i aktivaciju nukleofosmin modifikuje (Weber *et al*, 1999). Protein p53 je tumor supresorski protein koji je od ključnog značaja za zaustavljanje deobe u ćelijama čiji je genetski materijal značajno oštećen ili kada postoji izražena nestabilnost genoma. Nivo p53 određen je aktivnošću ligaze MDM2 koja stalno razgrađuje p53. Prilikom oštećenja ćelije dolazi do oštećenja integriteta jedarceta i premeštanja nukleofosmina u citoplazmu, što dovodi do aktivacije p53 i zaustavljanja deobe ćelije. Stabilnost p53 je podržana i time što nukleofosmin vezuje i inhibira Mdm2 enzim koji inaktivira p53 (Colombo *et al*, 2002).

ARF svoj uticaj na ćelijsku proliferaciju ostvaruje i nezavisno od pomenutih signalnih puteva i to direktnom inhibicijom biogeneze ribozoma. Stabilizacija genoma ostvaruje se i interakcijom sa tumor supresorskim genom *ARF* (engl. alternate reading frame protein, p14^{arf}). Nukleofosmin stabilizuje *ARF* i određuje subcelularnu lokalizaciju u nukleolusu (Cheng *et al*, 2007).

Naime, ARF je nukleolarni protein koji je uključen u mehanizam zaustavljanja ćelijskog ciklusa kao deo odgovora na onkogene stimuluse. ARF inhibiše *MDM2*, koji je negativni regulator p53, što dovodi do stabilizacije p53 i njegove funkcije u zaustavljanju deobe ćelija koje su izložene potencijalno onkogenim stimulusima. Protein ARF je primarno nestrukturisan, i svoju tercijernu strukturu dobija vezujući se za različite supstrate. Vezivanjem za nukleofosmin u jedarcetu, usporava se razgradnja ARF proteazom-zavisnim i nezavisnim mehanizmima degradacije. U slučaju kada je gen za nukleofosmin mutiran, kao u AML sa normalnim kariotipom, izmenjeni nukleofosmin zadržava sposobnost vezivanja ARF, ali zbog svoje izmenjene lokalizacije smanjuje normalnu funkciju ARF i sposobnost da preko p53 dovede do prekida ćelijskog ciklusa. Takođe, i koncentracija ARF u nukleolusu je smanjena zbog dislokacije mutiranog nukleofosmina u citopolazmu, pa je na taj način ubrzana degradacija ARF u nukleolusu (Weber *et al*, 1999; Cheng *et al*, 2007).

U ćelijama gde je mutiran gen za nukleofosmin, smanjena aktivnost ovog proteina je posledica ne samo haploinsuficijencije, već i pojave da mutirani protein vezuje nemutirani nukleofosmin i na taj način smanjuje njegovu aktivnost (Grisendi *et al*, 2006).



Slika 4. Šematski prikaz signalnih puteva regulacije ćelijskog ciklusa u kojima učestvuje nukleofosmin

Tokom embrionalnog razvoja nukleofosmin je neophodan za normalnu embriogenezu. U eksperimentalnim modelima na miševima gde je inaktivisan gen za nukleofosmin dolazi do letalnih poremećaja u razvoju embriona (Grisendi *et al*, 2005).

Nukleofosmin je i značajan kao regulator ćelijskog ciklusa matičnih ćelija hematopoeze, i kao modifikator procesa koji nastaju kada su ćelije izložene stresu, odnosno, kao mehanizam kojim se smanjuje mogućnost nastanka oštećenja hromozoma (Li *et al*, 2006). Na eksperimentalnom modelu na životinjama (engl. zebrafish) pokazano je da ekspresija mutiranog nukleofosmina dovodi do ekspanzije matičnih ćelija hematopoeze kao i hematopoeznih progenitora (Bolli *et al*, 2010).

S obzirom na kompleksnu ulogu koju ima u kontroli ćelijskog ciklusa nukleofosmin spada u kategoriju gena koji su istovremeno i onkogeni i tumorsupresorski geni.

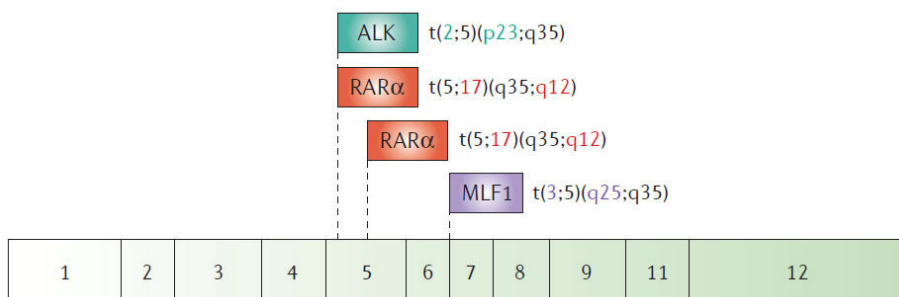
I.6.2. Nukleofosmin kao partnerski gen u onkogenim translokacijama

Nukleofosmin učestvuje i kao partnerski gen u nastanku translokacija koje se otkrivaju u malignim hematološkim oboljenjima.

U krupnoćelijskom anaplastičnom limfomu kod oko 85% bolesnika nalazi se t(2;5)(p23;q35), koja je na molekularnom nivou okarakterisana fuzijom ALK (anaplastic lymphoma kinase) proteina, čiji se gen nalazi na hromozomu 2, i nukleofosmina (Morris *et al*, 1994).

Recipročna translokacija t(5;17) opisana je u bolesnika sa akutnom promijelocitnom leukemijom. Ova translokacija dovodi do nastanka fuzionisanog genskog produkta između nukleofosmina i α receptora za retinoičnu kiselinu (RAR α). Morfološki, promijelocitna leukemija sa t(5;17) ima iste karakteristike kao i promijelocitna leukemija sa t(15;17); kao i *PMR-RAR α* , *NMP-RAR α* modulira ekspresiju gena zavisnih od retinoida tako da je i u ovih bolesnika zabeležen povoljan odgovor na terapiju *all-trans* retinoičnom kiselinom (ATRA) (Grimwade *et al*, 2000; Okazuka *et al*, 2007).

Pored navedenog, nukleofosmin je i deo fuzionog proteina kod AML bolesnika sa translokacijom t(3;5)(q25;q35). Partnerski region na hromozomu 3 označen je kao *MLF1* (myelodysplasia/myeloid leukemia factor 1). Ova translokacija se nalazi u svim FAB podtipovima AML, ali najčešće kod FAB M6. Bolesnici sa ovom citogenetskom anomalijom često imaju preleukemijsku fazu i loš ishod lečenja konvencionalnom terapijom (Raimondi *et al*, 1989; Falini *et al*, 2007) .



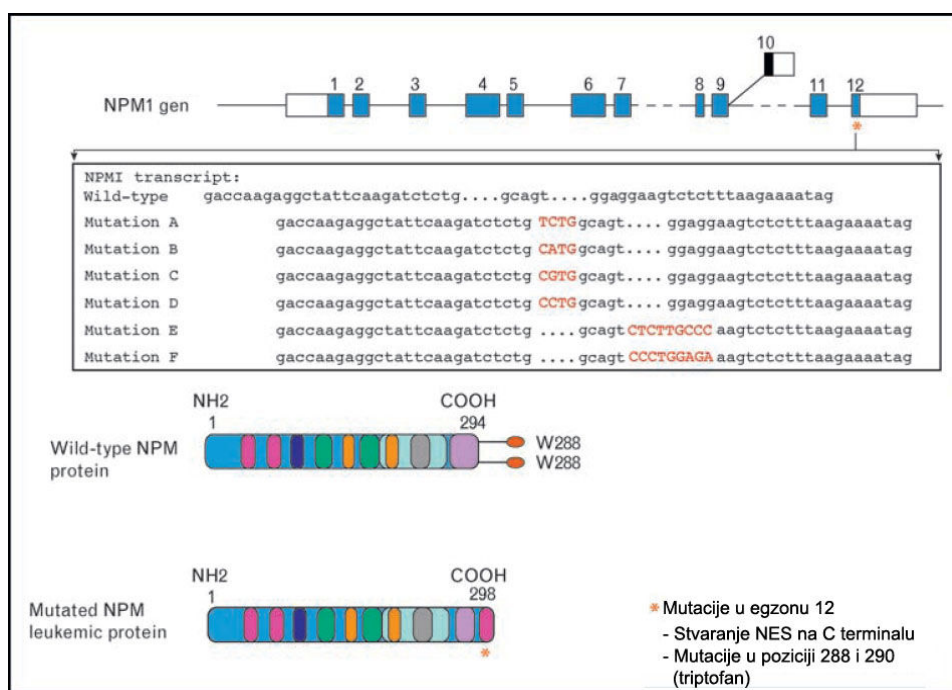
Slika 5. Partnerski geni nukleofosmina u hematopoeznin malignim oboljenjima

1.6.3. AML sa mutiranim nukleofosminom u citoplazmi (NPMc⁺ AML)

Falini i saradnici su 2005. godine publikovali otkriće da je mutacija gena za nukleofosmin najčešća mutacija u odraslih bolesnika sa AML i normalnim kariotipom (Falini *et al*, 2005). Ideja za traganjem za mutiranim nukleofosminom u AML potekla je od imunohistohemijske identifikacije mutiranog nukleofosmina u krupnoćelijskim anaplastičnim limfomima. S obzirom da se aberantni molekul nalazi u citoplazmi imunohistohemijska detekcija je iskorišćena kao skrining za detekciju mutiranog nukleofosmina u velikom broju malignih oboljenja. Na ovaj način je otkriveno da AML sa normalnim kariotipom sadrže u velikom procentu mutirani nukleofosmin. Sekvencioniranjem gena ova hipoteza je i potvrđena (Falini *et al*, 2006).

Analizom velikog broja uzoraka tkiva utvrđeno je da je mutirani *NPM1* karakterističan za *de novo* AML, mada je opisan i kod bolesnika sa tAML (Andersen *et al*, 2008; Falini *et al*, 2008). Mutacije u genu za nukleofosmin ne nalaze se u drugim hematopoezskim malignitetima, kao ni u solidnim tumorima (Rau *et al*, 2009).

Mutacija u genu *NPM1* je heterozigotna, što znači da je drugi alel, *wild-type* gen, funkcionalan. Gotovo sve mutacije u genu za nukleofosmin detektovane su u eksonu 12, uz veoma retko nađene mutacije u eksonima 9 i 11. Do danas je opisano oko 40 molekularnih varijanti, pri čemu je više od 95% lokalizovano u poziciji 960 (Chen *et al*, 2006). Najčešći tip mutacije (označen i kao tip A) sastoji se od duplikacije TCTG tetranukleotida u poziciji 956 do 959. Mutacije tip B i D su zastupljene kod znatno manjeg broja obolelih. Nezavisno od tipa mutacije, sve imaju za posledicu izmenjen C terminalni kraj molekula, zbog čega i nastaje premeštanje u citoplazmu. Naime, svi tipovi mutacija dovode do pomeranja okvira čitanja gena (engl. frame shift), tako da izostaje translacija triptofana, koji je neophodan za lokalizaciju nukleofosmina u jedru (Chen *et al*, 2006; Grumittc *et al*, 2008). Najčešće mutacije u genu za nukleofosmin prikazane su na slici 6.



Slika 6 . Mutacije u genu za nukleofosmin

Mutacije *NPM1* su stabilne i mogu da služe kao marker minimalne rezidualne bolesti; gubitak mutacije *NPM1* u recidivu AML je veoma redak i uglavnom povezan sa pojavom aberantnog kariotipa (Falini *et al*, 2008; Meloni *et al*, 2009).

NPM⁺ AML najčešće u odraslih bolesnika odgovaraju FAB tipovima M4 i M5, dok su po pravilu većina ovih leukemija negativne za antigen CD34, a pokazuju izrazitu pozitivnost za CD33 (Rau *et al*, 2009).

Mutirani gen za nukleofosmin se najčešće nalazi kod AML sa normalnim kariotipom (85% bolesnika) (Falini *et al*, 2008). Najčešći udruženi aberantni kariotipovi su +8, +4, +21, -Y, i del(9q). Ova grupa bolesnika imala je iste odlike kao i NPM⁺ bolesnici, kao i istu verovatnoću preživljavanja. Ovakvi rezultati ukazuju da su navedene citogenetske anomalije sekundarni događaji, a da je mutacija gena za nukleofosmin primarni pokretač procesa leukemogeneze (Haferlach *et al*, 2009).

Osim ITD mutacija u *FLT3* (*FLT3-ITD*), koje se u značajnom procentu javljaju udruženo sa mutiranim nukleofosminom, mutacije u genima *p53*, *RAS* i *MLL* ne nalaze se u AML NPM⁺ (Chen *et al*, 2006).

Poreklo leukemija se vezuje za zajednički mijeloidni progenitor s obzirom na podatak da se ovaj mutirani protein ne nalazi u B i T limfocitima (Martelli *et al*, 2008). Alternativno objašnjenje je da matična ćelija leukemogeneze kod NPM⁺ leukemija predstavlja zapravo pluripotentni hematopoetski progenitor. Leukemija s mutiranim nukleofosminom odlikuje i aberantna ekspresija određenih *HOX* gena, koji su karakteristični za samoobnavljanje matičnih ćelija (Pasqualucci *et al*, 2006; Martelli *et al*, 2008; Mullighan *et al*, 2007).

Iako se *NPM1* mutacije javljaju u svim FAB tipovima što još uvek ne dozvoljava definitivno uključivanje u klasifikaciju SZO kao definitivni entitet, leukemije sa mutiranim nukleofosminom pokazuju čitav niz bioloških karakteristika koje izdvajaju ovaj tip AML (Garzon *et al*, 2008).

AML NPM⁺ imaju i zajedničke imunofenotipske karakteristike, i to: izraženu ekspresiju mijeloperoksidaze i CD33, uz izostanak ekspresije drugih mijelomonocitnih antigena. Takođe, progenitorski markeri kao što su CD34, CD133 i HLA-DR nisu eksprimirani (Kern *et al*, 2009).

Leukemije sa monocitnom i mijelomonocitnom diferencijacijom pokazuju pozitivnost za čitav niz drugih mijelomonocitnih markera kao i HLA-DR. Analizirajući ovu grupu bolesnika sa navedenim fenotipom pokazano je da su svi imali mutirani nukleofosmin tip A, kao i da se po ostalim kliničkim i hematološkim karakteristikama uklapaju u profil do sada publikovanih bolesnika sa AML NPM⁺ (Kern *et al*, 2009).

Leukemije sa normalnim kariotipom i mutiranim nukleofosminom imaju i zajedničke kliničke karakteristike: češće su u osoba ženskog pola, zatim kod osoba sa većim brojem leukocita i većim procentom blasta u kostnoj srži u trenutku postavljanja dijagnoze. Učestalost mutacija raste sa uzrastom bolesnika, tako da se kod dece nalaze samo u 2-8% AML sa normalnim kariotipom; istovremeno, u dece su i češće manje tipične mutacije (koje ne pripadaju tipu A) (Thiede *et al*, 2007).

Pored zajedničkih kliničkih karakteristika, specifičnog imunofenotipa, i postojanja aktivacije *HOX* gena, AML sa NPM⁺ imaju još jednu zajedničku karakteristiku koja ih izdvaja kao posebnu podgrupu AML i koja se odnosi na postojanje posebnog mehanizma regulacije preko mikro RNA.

Mikro RNA (miRNA) su nekodirajuće ribonukleinske kiseline veličine 19-25 nukleotida, koje su jedan od najvažnijih epigenetskih regulatora. Svoju funkciju ostvaruju modifikacijom ekspresije informacione RNA, dovodeći do njihove razgradnje ili inhibicije translacije. Kod AML NPM⁺ postoje posebne profil miRNA, koje zapravo učestvuju u regulaciji ekspresije *HOX* gena (Garzon *et al*, 2008; Yendamuri *et al*, 2009).

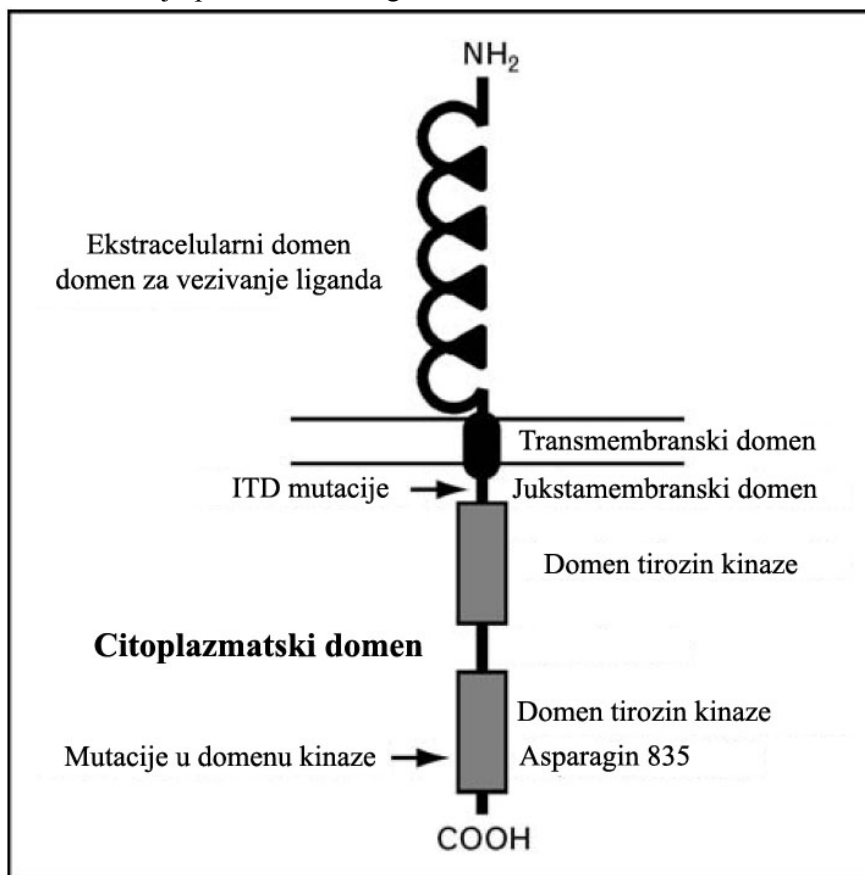
I.6.4 FMS slična tirozin kinaza 3 (FLT3) i FLT3 ligand (FL)

FLT3 (FLK2 – fetal liver kinase 2) je transmembranski receptor koji se sastoji od 993 aminokiselinska ostatka, a poseduje aktivnost tirozin kinaze. Gen za ovaj protein nalazi se na hromozomu 13q12. Receptor je otkriven početkom devedesetih godina XX veka prvo na animalnim eksperimentalnim modelima (miševi), a nekoliko godina kasnije dokazan je i kod ljudi (Gilliland *et al*, 2002).

Receptor je kompleksne strukture i pripada grupi III tirozin kinaznih receptora (TKR). U ovoj grupu su i receptori za monocitni faktor rasta (M-CSF, FMS), Steel faktor (KIT) i faktore rasta izolovane iz trombocita A i B (engl. platelet derived growth factors – PDGF A i B) (Agnes *et al*, 1994).

Receptor se sastoji od ekstracelularnog domena koji ima 5 domena sličnih imunoglobulinima, transmembranski, jukstamembranski domen kao i dva intraćelijska domena koji imaju aktivnost tirozin kinaze i međusobno su povezani (Abu-Duhier *et al*, 2001). Šematski prikaz FLT3 receptora prikazan je na slici 6.

Vezivanjem liganda (FL) dolazi do dimerizacije receptora i aktivacije enzimskog domena koji funkcioniše kao tirozin kinaza. Nishodni signalni putevi koje aktivira FLT3 stvaraju proliferativne signale.

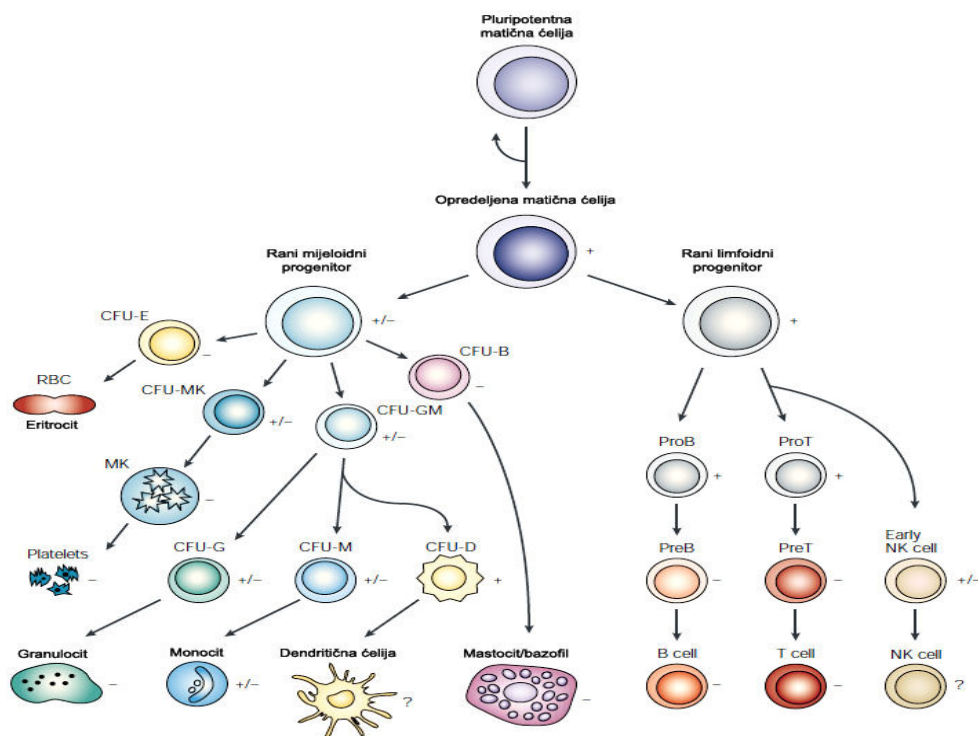


Slika 7. Šematski prikaz FLT3 receptora

Ekspresija FLT3 je ograničena na rane mijeloidne i limfodne progenitore, ali izostaje u ćelijama megakariocitne loze, bazofilima i u eritroidnoj lozi.

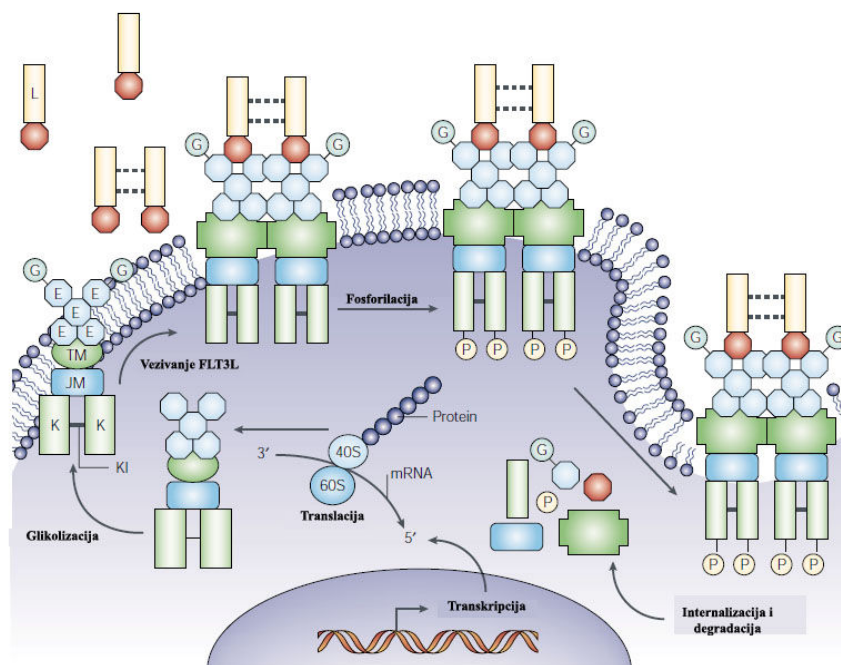
U akutnim leukemijama takođe se nalazi ekspresija FLT3 kao i u normalnoj hematopoezi (Čolovic *et al*, 2007). Ekspresija FLT3 nalazi se kod 70-90% bolesnika s AML, zatim kod bolesnika s ALL (pre B common fenotip).

Kod bolesnika s hroničnom granulocitnom leukemijom ovaj receptor nije ekspimiran, iako matična ćelija leukemogeneze CML potiče od matične ćelije hematopoeze. Naime, tokom diferencijacije dolazi do smanjenja i postepenog izostanka ekspresije FLT3. U bolesnika s hroničnom limfocitnom leukemijom (HLL) ekspresija FLT3 izostaje s obzirom da do leukemijske transformacije dolazi u opredeljenim limfoidnim progenitorima (Yokota *et al*, 1997; Gilliland *et al*, 2002; Stirewalt *et al*, 2002). Ekspresija FLT3 receptora tokom hematopoeze prikazana je na slici 7.



Slika 8. Šematski prikaz ekspresije receptora FLT3 tokom hematopoeze

Informaciona RNK za FLT3 ligand (FL) se nalazi u velikom broju hematopoeznih i nehematopoeznih tkiva. Po hemijskoj strukturi FL je protein koji je vezan za ćelijsku membranu, ali može da se nađe i u solubilnoj formi, posle protelize (Wodnar-Filipowicz *et al*, 2003). Iako je iRNK za FL široko distribuirana, FL protein se nalazi u ćelijama strome kostne srži i u T limfocitima. Zajedno sa Steel faktorom, FL utiče na regulaciju broja matičnih ćelija hematopoeze. Veoma je značajan uticaj FL na broj dendritičnih ćelija, što pruža mogućnost za korišćenje ovog proteina i u terapijske svrhe (imunoterapija tumora). Za razliku od trombopoetina i steel faktora, čija je sekrecija konstantna, nivoi FL su inducibilni i značajno se povećavaju u stanjima deplecije hematopoeznog tkiva (Gilliland *et al*, 2002; Wodnar-Filipowicz *et al*, 2003). Za razliku od mutacija u genu za receptor, mutacije u genu za FL u malignim hemopatijama do sada nisu opisane.



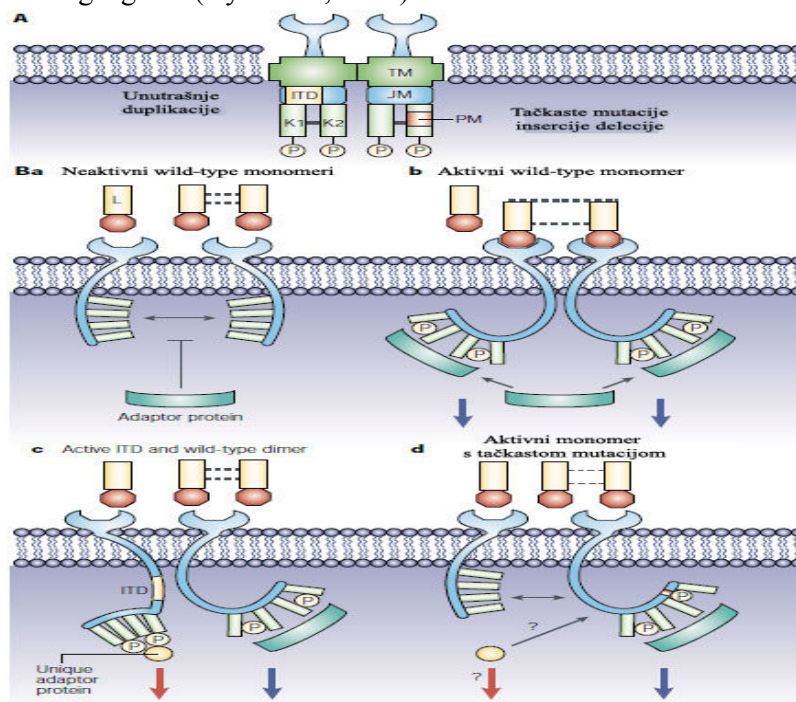
Slika 9 . Šematski prikaz aktivacije FLT3 receptora

Mutacije u genu za FLT3 receptor, opisane 1996. godine, su druga po učestalosti mutacija u obolelih od AML (15-30%), a nalaze se i u mijelodisplznim sindromima (5-10%) kao i akutnoj limfoblastnoj leukemiji (1-3%). Detektovane su dve vrste FLT3 mutacija:

- ITD (engl. internal tandem duplications) u kojima dolazi do duplikacije u jukstamembranskom domenu u eksonima 14 i 15,
- TKD (engl. tyrosin kinase domain) gde se javlja tačkasta missens mutacija u eksonu 20. Najčešće se radi o supstituciji nukleotida (GAT→TAT), što dovodi do zamene asparagina tirozinom (D835Y).

U najvećeg broja obolelih postoji samo jedna FLT3 mutacija, mada je moguća i njihova udružena pojava.

Posledica ovih mutacija je konstitutivna aktivacija receptora, što dovodi do stalnog proliferativnog signala (Kyoj *et al*, 2002).



Slika 10. Šematski prikaz uticaja mutacija FLT3 receptora i posledice stalnog proliferativnog signala

Klinički značaj *FLT3/ITD* mutacije je jasan – prisustvo mutacije je povezano sa leukocitozom, većim procentom blasta u koštanoj srži, kao i udruženošću sa nekim citogenetskim nalazima (normalan kariotip, prisustvo t(15;17) i t(6;9)). Značaj ove mutacije je u činjenici da bolesnici imaju značajno lošije sveukupno preživljavanje u poređenju sa bolesnicima kojima bez mutacija. Učestalost *FLT3/ITD* mutacije zavisi od životnog doba, pri čemu se u pedijatrijskih bolesnika nalazi kod 5-15%, a kod adultnih i do 30 % (Reindl *et al*, 2006).

Uticaoj *FLT3/TKD* mutacija na ishod lečenja nije jasno definisan. Prema podacima dobijenim analizom adultnih bolesnika TKD mutacije nemaju nepovoljnog uticaja na ishod ili su pokazatelj dobre prognoze; kod dece je učestalost nedovoljna za statističku obradu (Bacher *et al*, 2007; Mead *et al*, 2007; Liang *et al*, 2003).

Izdvajanje grupe bolesnika sa većom verovatnoćom lošijeg ishoda lečenja omogućuje da se u ovih bolesnika planiraju drugi načini lečenja, pre svega transplantacija matičnih ćelija hematopoeze. Ipak, i u grupi bolesnika s *FLT3* mutacijama ishod lečenja je varijabilan. Na ishod lečenja utiču pridružene citogenetske anomalije (*FLT3* mutacije ne menjaju dobre rezultate lečenja kod bolesnika s akutnom promijelocitnom leukemijom, mada postoji trend ka većoj učestalosti relapsa). Od prognosnog značaja je ne samo nalaz mutiranog *FLT3* već i odnos mutiranog/normalnog *FLT3/ITD* (engl.wild type, wt- normalan). Naime, u bolesnika kojima nedostaje *wtFLT3* ishod lečenja je lošiji (Whitman *et al*, 2001).

Pored mogućnosti da se bolesnici s AML preciznije stratifikuju, otkriće *FLT3* mutacija je i jedan od načina za primenu ciljane terapije. Naime, inhibicija mutiranog, konstitutivno aktivnog FLT3 receptora moguća je primenom inhibitora tirozin kinaze, monoklonskih antitela ili modulacijom HSP 90 (engl. heat shock protein) (Levis *et al*, 2004; Li *et al*, 2004; Knapper *et al*, 2007).

S obzirom na to da ove mutacije mogu da se jave *de novo* u recidivu bolesti ili da nestanu u recidivu, jasno je da su ove mutacije sekundarni događaji u leukemogenezi.

I.7 Ostale genske promene u AML

I.7.1 C-KIT

Kit protoonkogen se nalazi na hromosomu 4q12 i kodira protein koji je membranski receptor za stem cell factor (SCF). Po vezivanju liganda dolazi do dimerizacija i transfosforilacije, što ima za posledicu aktivaciju signalnih puteva koji regulišu proliferaciju, diferencijaciju, kao i inhibiciju apoptoze matičnih ćelija hematopoze. Mutacije dovode do stalne aktivacije receptora, a češće se nalaze u *CBF* AML i AML sa trizomijom hromosoma 4. Mutacija *C KIT* nije opisana u AML sa kompleksnim kariotipom kao ni sa translokacijom t(15;17) (Motyckova *et al*, 2010).

Pokazano je da u *CBF* AML mutacija *C-KIT D816* i mutacija u eksonu 8 su pokazatelji veće verovatnoće za nastanak recidiva bolesti. Mutacije koje dovode do konstitutivne aktivnosti receptora su potencijalna meta za lečenje inhibitorima tirozin kinaze (Cairolì *et al*, 2006). Mutacije *C-KIT* onkogeni nemaju uticaja na ishod lečenja dece sa AML (Pollard *et al*, 2010).

I.7.2 RAS

RAS onkogeni su familija proteina koji vezuju guaninske nukleotide i regulišu prenos signala sa velikog broja transmembranskih receptora (FLT3, c-KIT), i samim tim uzimaju učešća u regulaciji proliferacije, diferencijacije i apoptoze (Karnoub *et al*, 2009). Mutacije *N-RAS* i *K-RAS* onkogeni se nalaze kod 10-15%, odnosno, oko 5% bolesnika sa AML. Mutacije *RAS* onkogeni nisu povezane sa ishodom lečenja AML. Međutim, mijeloblasti s *RAS* mutacijama su senzitivniji na visoke doze citozin arabinozida, tako da nalaz ove mutacije ukazuje da kao postremisionu terapiju treba primeniti ovaj vid lečenja umesto alogene transplantacije (Neubauer *et al*, 2008; Young *et al*, 2009).

I.7.3 CEBPA

Gen *CEBPA* se nalazi na hromosomu 19q13.1 a njegov proteinski produkt je transkripcioni faktor sa regulatornom funkcijom u održavanju ravnoteže između proliferacije i diferencijacije. U hematopoezi *CEBPA* ima vodeću ulogu u ranim stadijumima mijeloidne diferencijacije i najviše je eksprimira u mijelomonocitnim ćelijama (Foran *et al*, 2010). Ekspresija ovog transkripcionog faktora počinje od progenitora koji su opredeljeni za mijeloidnu lozu i povećava se tokom diferencijacije granulocita. CEBPA svoju ulogu realizuje direktnim dejstvom na genom (smanjuje *c-MYC* ekspresiju čime podstiče diferencijaciju granulocita), a sa drugim genima kao što su CBF sinergistički učestvuje u stimulaciji diferencijacije. Takođe, efekte ispoljava i dejstvom na proteinske sekvence tako što inhibiše proliferaciju vezujući se za cikline. Gubitak funkcije CEBPA promovise leukemogenezu tako što izostaje mijeloidna diferencijacija (Koschmieder *et al*, 2009). Iako nije uočena korelacija sa kliničkim i hematološkim parametrima, jasno je pokazano da bolesnici sa AML i *CEBPA* mutacijom imaju povoljniju prognozu i duže preživljavanje. Podaci iz kliničkih studija naročito ukazuju na povoljan ishod kod bolesnika koji su lečeni visokim dozama citozin arabinozida. Mutacije u *CEBPA* mogu da se jave i kao *germ line*, kada nastaje porodično, odnosno nasledna sklonost za razvoj AML (Marcucci *et al*, 2008).

I.7.4 TP53

Tumor supresorski gen označen kao *TP53* nalazi se na hromosomu 17.p13. Hipoksija i oštećenja DNK aktivira *TP53*. Protein P53 ima ulogu transkripcionog faktora koji aktivira gene koji pokreću reparaciju DNK, apoptozu ili zaustavljaju ćelijski ciklus. Kod *de novo* AML *TP53* je mutiran kod oko 10% bolesnika, a znatno češće se nalazi kod sekundarnih MDS i AML, sa učestalošću 30-50%. Mutacija *TP53* je povezana sa nalazom kompleksnih citogenetskih anomalija (Haferlach *et al*, 2009). Rezistencija na hemioterapiju je česta pojava kod AML sa mutiranim *TP53*, tako da je određivanje ove mutacije je značajno kao jedna od indikacija za lečenje transplantacijom matičnom ćelijama hematopoeze.

I.7.5 ERG

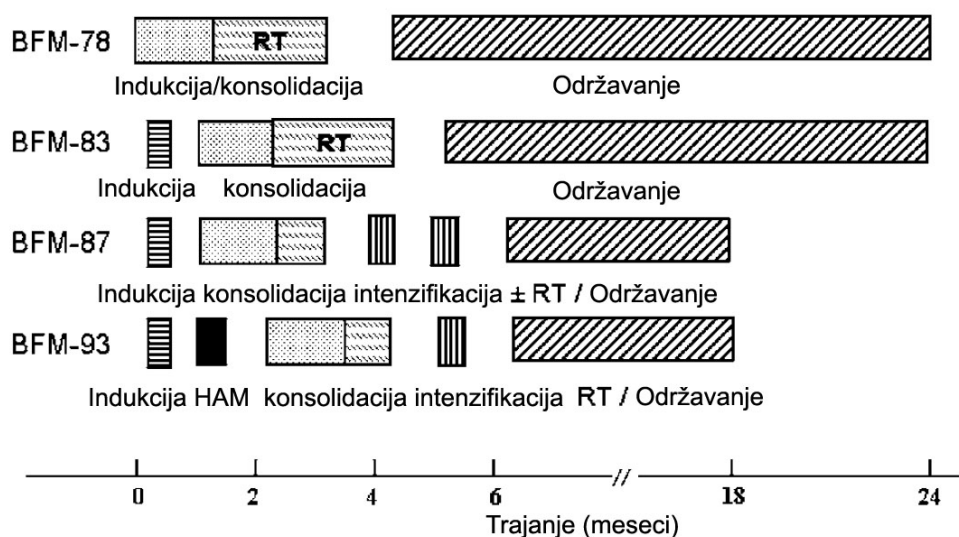
Gen *ERG* se nalazi na hromosomu 21q22 i kodira efektore signalnih puteva koji učestvuju u proliferaciji, diferencijaciji i apoptozi. Citogenetski i molekularni rearanžmani ovog gena sreću se u leukemijama i solidnim tumorima (Juingov sarkom, karcinom prostate). Ekspresija *ERG* gena kod AML sa normalnim kariotipom je pokazatelj loše prognoze (Metzeler *et al*, 2009). Pored nukleofosmina i *FLT3*, analiza ovog genetskog markera značajno doprinosi stratifikaciji AML sa normalnim kariotipom. Naime, kod bolesnika koji su *FLT3*⁻/*NPM*⁺ i imaju nisku ekspresiju *ERG* dvogodišnje preživljavanje je oko 70% (Marcucci *et al*, 2007).

I.8 Lečenje AML

Lečenje AML obuhvata indukcionu fazu, koja ima za cilj ostvarenje hematološke remisije i postremisonu fazu lečenja koja podrazumeva primenu nekoliko ciklusa intenzivne hemioterapije. U određenim indikacijama lečenje se nastavlja autologom ili alogenom transplantacijom matičnm ćelijama hematopoeze.

Standardni način indukcione terapije pedijatrijskih bolesnika je primena kontinuirane infuzije citozin arabinozida tokom prva dva dana, a tokom narednih pet dana primenjuje se ista doza u kratkim bolusima na dvanaest sati. Pored navedenog, u indukciji se primenjuju antraciklini i vepesid. Po postizanju remisije, primenjuje se četiri ciklusa intenzivne hemioterapije.

Protokoli BFM studijske grupe u terapiju uključuju i fazu održavanja, koja se sprovodi primenom 6-tioguanina i citozin arabinozidom u malim dozama (40mg/m² tokom četiri dana svakih mesec dana).



Slika 11. Šematski prikaz lečenja pedijatrijskih AML prema BFM protokolima

Terapija održavanja remisije malim dozama citozin arabinozida se sve više napušta zbog toksičnosti i indukcije rezistencije, tako da većina studijskih grupa u SAD i neke evropske grupe (Francuska) više ne primenjuju terapiju održavanja. Jedini izuzetak je akutna promijelocitna leukemija, jedini tip AML za koji je nedvosmisleno dokazano poboljšanje rezultata lečenja produženom primenom 6-merkaptopurina i metotreksata. Shvatanja o potrebi za profilaktičkim zračenjem centralnog nervnog sistema takođe se razlikuju između BFM grupe i američkih studijskih grupa.

Studijske grupe iz Sjedinjenih Američkih Država kreirale su takozvanu intenzivnu sekvencijalnu indukciju primenom DCTER protokola, pri čemu se 4 ciklusa hemioterapije primenjuju u razmaku od 10 dana bez obzira na parametre krvne slike. Iako je u ovoj grupi bolesnika smrtnost vezana za toksične efekte, odnosno, posledice duboke aplazije, bila veća nego u grupi bolesnika u kojih je terapija primenjivana po oporavku parametara krvne slike, ukupno preživljavanje je značajno bolje (Woods *et al*, 1996).

Dosadašnji rezultati ukazuju da autologa transplantacija matičnih ćelija hematooze nema prednosti u odnosu na intenzivnu hemioterapiju u obolelih od AML (uz izuzetak akutne promijelocitne leukemije) (Cassileth *et al*, 1998; Woods *et al*, 2006).

Lečenje akutne promijelocitne leukemije se značajno razlikuje od terapije ostalih tipova AML. Standardni deo protokola je *all* trans retinoična kiselina (ATRA), koja dovodi do diferencijacije patoloških promijelocita. Kombinacijom *all* trans retinoične kiseline i hemioterapije moguće je ostvariti dugogodišnje molekularne remisije, uz značajno smanjenje rizika od hemoragijskih komplikacija. Pedijatrijski protokoli se takođe baziraju na primeni ovog leka, s tim da se ATRA primenjuje u manjoj dozi ($25\text{mg}/\text{m}^2$) nego u odraslih bolesnika ($40\text{mg}/\text{m}^2$) zbog češćih neželjenih efekata u centralnom nervnom sistemu (pseudotumor cerebri). U terapiji novootkrivenih bolesnika značajno mesto ima aresentriksid, koji se može bezbedno primenjivati i kod dece (George *et al*, 2004). S obzirom na povoljan odgovor na hemioterapiju, ni recidivi APL u većini centara nisu indikacija za lečenje alogenom transplantacijom koštane srži (Dvorak *et al*, 2008).

Zbog izraženih toksičnih komplikacija hemioterapije, u dece sa Daunovim sindromom primenjuju se posebno prilagođeni hemioterapijski protokoli sa smanjenim dozama citostatika.

Standardni oblik indukcione terapije odraslih bolesnika je kontinuirana primena citozina arabinozida tokom sedam dana i tri doze antraciklina, tzv. 7+3 protokol. Modifikacije ovog hemioterapijskog pristupa dodavanjem različitih citostatika nisu doprinele poboljšanju originalnih rezultata u sveukupnom preživljavanju (Wells *et al*, 1994).

Indikacije za alogenu transplantaciju matičnih ćelija hematopoeze još uvek nisu jednoznačno i precizno definisane. Naime, indikacije se donekle razlikuju u protokolima studijskih grupa iz Evrope i Sjedinjenih Američkih Država. Evropske grupe se zalažu za stratifikaciju AML i transplantaciju u bolesnika visokog rizika, zatim primarno rezistentne bolesti ili u recidivu, dok se u SAD alogena transplantacija preporučuje u bolesnika koji imaju srodnog HLA identičnog davaoca matičnih ćelija hematopoeze (Creutzig *et al*, 2002; Chen *et al*, 2002). Iako je alogena transplantacija definitivno najuspešniji oblik antileukemijske terapije (najbolji DFS – engl. disease free survival), visok mortalitet vezan za samu proceduru (engl. TRM - transplant related mortality) ovaj vid lečenja nije optimalni izbor za sve obolele od AML.

Naime, u grupi transplantiranih bolesnika ukupno preživljavanje bez znakova bolesti, odnosno, mala stopa recidiva AML posle transplantacije nije istovremeno značila i bolje sveukupno preživljavanje (engl. overall survival) zbog toksičnosti vezane za sam postupak alogene transplantacije, kao i smrtne ishode koji su nastali kao posledica bolesti kalema protiv domaćina. Definitivno mesto alogene transplantacije matičnih ćelija hematopoeze biće određeno poboljšanjem suportivne terapije i smanjenjem TRM, ali i preciznijom stratifikacijom AML. Takođe, razvoj neablativnih kondicionih režima pruža mogućnost da se transplantacijom leče i kategorije bolesnika za koje su standardni mijeloablativni režimi neprihvatljivo toksični (Shmoni *et al*, 2005; Lodewyck *et al*, 2008).

I.8.1 Nove mogućnosti u lečenju AML

Poznavanje molekularnih mehanizama leukemogeneze dovelo je i do kreiranja antileukemijskih lekova čije se dejstvo ne zasniva na neselektivnoj citotoksičnosti. Novi načini lečenja AML obuhvataju primenu imunoterapije, farmakološku kontrolu signalnih puteva i epigenetsku terapiju.

Primena humanizovanog monoklonskog antitela na CD33, konjugovanog sa kaliheamicinom (gemtuzumab ozogamicin - GO), jedan je od vidova neablativne terapije AML. Ovaj antigen je ekspimiran na mijeloblastima ali ne i na matičnoj ćeliji hematopoeze, na čemu se zasniva njegoa specifičnost. U toku su studije u kojima se ispituje efekat indukcionog režima kome je dodat GO (Kell *et al*, 2003).

Inhibitori Flt3 receptora su se takođe pokazali aktivnin *in vivo*, ali samo sa hemioterapijom, kao inhibitori fraensil transferaze koji su aktivni kod osoba sa mutacijama *RAS* onkogeni. Lekovi koji utiču na represiju i derepresiju gena su inhibitori histon deacetilaze i inhibitori metilacije DNK (Clark *et al* 2003; Shipley *et al*, 2009).

II CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Značaj ispitivanja molekulsko-genskih markera u bolesnika sa AML je višestruk. Stratifikacija na osnovu kariotipa je još uvek jedan od najpreciznijih načina za procenu rizika od nastanka recidiva, odnosno za procenu verovatnoće ukupnog preživljavanja. Značajan broj odraslih bolesnika (45%) i nešto manje pedijatrijskih bolesnika imaju normalan kariotip i samim tim se nalaze u grupi srednjeg rizika. Verovatnoća petogodišnjeg preživljavanja u ovoj grupi rizika kreće od 24% do 42% (Mrózek *et al*, 2007), što je indirektni dokaz njene biološke heterogenosti. Analiza molekulsko-genskih markera u ovoj grupi bolesnika pomaže preciznijoj stratifikaciji, što znači i optimalan izbor postremisione terapije.

Pojedini molekulsko-genskih markeri se koriste u praćenju minimalne rezidualne bolesti što pruža mogućnost za preduzimanje terapijskih postupaka i pre nastanka hematološkog recidiva.

Nova saznanja dovela su i do novih terapijske pristupa primenom lekova koji deluju kao molekularni terapeutici.

Ciljevi rada su:

1. Ispitivanje demografskih parametara (životna dob i pol) u grupi pedijatrijskih i odraslih bolesnika sa AML
2. Ispitivanje zastupljenosti, međusobne povezanosti kliničkih karakteristika i standardnih laboratorijskih analiza pri postavljanju dijagnoze i njihovog uticaja na ishod lečenja
3. Ispitivanje citoloških i imunofenotipskih osobina leukemijskih ćelija i podela AML prema MIC i FAB preporukama
4. Ispitivanje učestalosti citogenetskih anomalija, i njihovog prognosnog značaja

5. Ispitivanje učestalosti mutacije *FLT3/ITD* u dece i odraslih bolesnika i njen prognosni značaj
6. Ispitivanje učestalosti mutacije *FLT3/TKD* u dece i odraslih bolesnika i njen prognosni značaj
7. Ispitivanje učestalosti mutacija *NPM1* u dece i odraslih bolesnika i njen prognosni značaj
8. Ispitivanje učestalosti remisije i ukupnog preživljavanja u bolesnika sa različitim oblicima AML i u zavisnosti od postojanja ispitivanih molekulsko-genskih markera
9. Mogućnost korišćenja ispitivanih molekulsko-genskih markera kao markera minimalne rezidualne bolesti

III MATERIJAL I METODE ISTRAŽIVANJA

III.1 Bolesnici

Studijom su obuhvaćene dve grupe bolesnika. Jednu grupu su sačinjavala 42 pedijatrijska bolesnika u kojih je dijagnoza AML postavljena i koji su lečeni u Univerzitetskoj dečjoj klinici u Beogradu i u Institutu za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije u Beogradu. Dijagnoza AML postavljena je na osnovu kriterijuma BFM studijske grupe za lečenje AML, dok je terapija sprovedena prema protokolima AML BFM 98 i AIDA.

Drugu grupu su sačinjavali odrasli bolesnici (92) dijagnostikovani i lečeni na Klinici za hematologiju Kliničkog centra Srbije. Dijagnoza AML postavljena je na osnovu citoloških, imunofenotipskih i genetičkih kriterijuma prema preporukama FAB i SZO. Terapija u adultnih bolesnika sprovedena je prema protokolima 7+3, ADE, AIDA, LALA i PETHEMA.

III.2 Klinička ispitivanja

Analiza i predmet statističke obrade i grupi pedijatrijskih i odraslih bolesnika bile su sledeće laboratorijske i kliničke karakteristike: pol, životno doba, broj leukocita, hepatomegalija, splenomegalija, limfadenopatija i nalaz hemoragijskog sindroma.

Broj leukocita, kao i ostalih hematoloških parametara određivan je na aparatima za automatsko određivanje broja krvnih elemenata, izražavan je u standardnim jedinicama.

III.3 Citološka ispitivanja

Citološka analiza kostne srži rađena je iz uzoraka koji su dobijeni sternalnom punkcijom (odrasli bolesnici) ili iz gornjeg prednjeg ili zadnjeg ilijačnog grebena kod dece. Analiza je određivana na osnovu standardnog MGG bojenja (May Grunawald Giemsa). Istom metodom bojenja analiziran je i procenat blasta i perifernoj krvi.

III.4 Imunofenotipska analiza

Imunofenotipska analiza je rađena metodom protočne citometrije sa sledećim panelom monoklonskih antitela: CD13, CD33, MPO, HLA DR, CD14, CD15, CD117, CD34, CD7, CD19.

U nekih pedijatrijskih bolesnika korišćena je tehnika određivanja imunofenotipa na pločici metodom alkalna fosfataza-anti alkalna fosfataza (APAAP).

III.5 Citogenetska ispitivanja

U citogenetskoj analizi uzoraka kostne srži u obe grupe bolesnika korišćena je standardna tehnika G traka, a rezultati ispitivanja su prikazani u skladu sa međunarodnim sistemom nomenklature (Mitelman).

III.6 Molekulsko-genetska ispitivanja

U određivanju prisustva mutacija korišćeni su uzorci periferne krvi, aspirata kostne srži kao i uzorci razmaza kostne srži.

III.6.1 Izolacija DNK iz periferne krvi/kostne srži

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

Protokol;

- na dno tube sipati 20 µl proteinaze K (20 mg/ml), dodati 200 µl uzorka, 200 µl pufera AL i promešati vorteksovanjem
- inkubirati u vodenom kupatilu 10 min/56°C
- dodati 200 µl 96-100% etanola i promešati vorteksovanjem
- ovako pripremljen uzorak naneti na QIAamp Mini spin kolonicu i centrifugirati na 8 000 rpm/1 min
- kolonicu isprati sa 500 µl pufera AW1, centrifugirati na 8 000 rpm/1 min
- kolonicu isprati sa 500 µl pufera AW2, centrifugirati na 13 000 rpm/3 min
- na kraju prebaciti kolonicu u čistu tubu, dodati 200 µl pufera AE i centrifugirati na 8 000 rpm/1 min

III.6.2 Izolacija mononuklearnih ćelija iz aspirata kostne srži ili periferne krvi

Protokol;

- na dno sterilne epruvete zapremine 10 ml sipati 3 ml Ficoll-Plaque PLUS (GE Healthcare), a zatim na ovaj gradijent naneti 4 ml razblaženog uzorka (1:1, uzorak:fiziološki rastvor)
- centrifugirati na 1 500 g/25 min na sobnoj temperaturi, u kliničkoj centrifugi, bez kočenja
- nakon centrifugiranja, pipetom prebaciti „buffy coat“ interfazu koja je sastavljena od mononuklearnih ćelija u novu sterilnu epruvetu
- isprati dva puta u PBS-u. Nakon svakog ispiranja sledi centrifugiranje na 1 500 g/15 min
- talog resuspendovati u TRIzol®-u (Invitrogen)

III.6.3 Izolacija DNK iz mononuklearnih ćelija

Iz mononuklearnih ćelija koje su resuspendovane u TRIzol®-u (Invitrogen), pored izolacije RNK može se paralelno vršiti i izolacija DNK.

Protokol;

- nakon lize ćelija, dodavanja 200 µl hloroforman i centrifugiranja na 12 000 rcf/15 min/+4°C pojavljuju se jasno odvojene faze; DNK se nalazi u donjoj, obojenoj, organskoj fazi
- pažljivo ukloniti ostatke vodene faze
- precipitirati DNK iz interfaze i organske faze dodavanjem 300 µl 100% etanola. Promešati invertovanjem tube i ostaviti da stoji na sobnoj temperaturi 3-5 min
- nakon centrifugiranja na 2 000rcf/5 min/+4°C, ukloniti supernatant (koji sadrži proteine) i opati talog dva puta dodavanjem 1 ml rastvora koji sadrži 0,1 M Na-citrat i 10% etanol (wash-solution).U toku svakog ispiranja omogućiti da DNK stoji najmanje 30 min na sobnoj temperaturi, nakon čega sledi centrifugiranje na 2 000rcf/5 min/+4°C
- resuspendovati talog u 1,5-2 ml 75% etanola i ostaviti da stoji 10-20 min na sobnoj temperaturi
- Nakon ponovnog centrifugiranja 2 000rcf/5 min/+4°C, odbaciti supernatant i osušiti talog na sobnoj temperaturi
- talog rastvoriti u 8 mM NaOH

III.7 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), prajmeri (oligonukleotidi komplementarni krajevima sekvence koja se kopira), nukleotidi (gradivni elementi DNK), *Taq* polimeraza (termostabilna DNK polimeraza koja katalizuje ugradnju nukleotida po principu komplementarnosti sa matricom), joni magnezijuma i pufer (neophodni za optimalni rad *Taq* polimeraze).

PCR-RFLP (eng. Polymerase chain reaction - Restriction fragment length polymorphism) je metoda koja se koristi za direktnu detekciju mutacije koja menja, stvara novo ili ukida postojeće mesto prepoznavanja nekog restriktionog enzima.

III.7.1 Utvrđivanje *FLT3/ITD* mutacije

Reakciona smeša zapremine 30 μ l, sastojala se od sledećih elemenata; 100-300ng DNK, 1x PCR pufer, 1x Q-solution, dNTP (2 mM finalno), MgCl₂ (2,75 mM finalno), prajmeri 14F i 15R (Tabela 5.) (350 mM finalno) i 2U HotStarTaq®DNA Polimerase (Qiagen, Nemačka).

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

Tabela 1. Sekvence prajmera za detekciju i sekvenciranje FLT3/ITD, FLT3/D835 i NPM1 mutacija

Temperaturni profil PCR reakcije

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

Analiza dobijenih PCR produkata je vršena elektroforezom na 4% agaroznom gelu. Očekivana dužina wt PCR produkta je 325 bp. Postojanje *FLT3/ITD* mutacije je praćeno prisustvom dodatnog PCR produkta veće dužine.

III.7.2 Utvrđivanje *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 – aktivacija HotStarTaq polimeraze
2. 35 ciklusa;
 - 1 min/95°C – denaturacija
 - 1 min/58°C – aniling
 - 2 min/72°C – elongacija
3. 10 min/72°C – finalna elongacija

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

Smeša za digestiju sadrži sledeće komponente:

- 10 µl PCR produkta
- 1 x pufer R
- 20n U *EcoRV* (Fermentas)

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

III.7.3 Utvrđivanje mutacija u *NPM1*

Reakciona smeša zapremine 50 µl, sastojala se od sledećih elemenata; 100 – 300 ng DNK, 1x PCR pufer, 1x Q-solution, dNTP (0,3 mM finalno), MgCl₂ (2,25 mM finalno), prajmeri NPM1-F i NPM1-R (Tabela 4.) (500 mM finalno) i 2U HotStarTaq®DNA Polimerase (Qiagen, Nemačka).

Temperaturni profil PCR reakcije

4. 15 min – aktivacija HotStarTaq polimeraze
5. 35 ciklusa;
 - 1 min/95°C – denaturacija
 - 1 min/60°C – aniling
 - 2 min/72°C – elongacija
6. 10 min/72°C – finalna elongacija

Nakon PCR amplifikacije izvršeno je prečišćavanje na koloni (QIAquick PCR Purification kit, Qiagen) prema uputstvu proizvođača. Nakon toga je izvršena reakcija sekvenciranja upotrebom NPM1_1112R prajmera (Tabela 5.)

III.8 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).

III.9 Analiza DNK na poliakrilamidnom gelu

Fragmenti DNK su razdvajani na nedenaturišućem 8% poliakrilamidnom gelu (Akrlamid: N,N-metilenbisakrilamid (29:1) (30% w/v), 100mM Tris, 83mM borna kiselina, 1mM EDTA pH 8; 0,1% (w/v) amonijumpersulfat, 0,01% (v/v) TEMED). Elektroforeza je tekla pri naponu od 10 V/cm u 1xTBE puferu (100mM Tris, 83 mM borna kiselina, 1mM EDTA pH 8). Po završetku elektroforeze, gelovi su bojeni srebronitratom.

III.10 Bojenje poliakrilamidnih gelova srebronitratom

Vizuelizacija DNK na poliakrilamidnim gelovima vršena je bojenjem srebronitratom. Poliakrilamidni gelovi su, nakon elektroforeze, najpre fiksirani 30 minuta u rastvoru 10% etanola i 0,5% sirćetne kiseline. Nakon toga, gelovi su bojani u 0,1% rastvoru srebronitrata 10 minuta. Višak srebra je uklanjan ispiranjem najpre u bidestilovanoj vodi, a zatim u razvijaču, koji je bio sledećeg sastava: 1,5% natrijumhidroksid, 0,01% natrijumborhidrid i 0,048% formaldehid. Gelovi su u razvijaču držani 20 minuta. Fiksiranje dobijenih traka vršeno je potapanjem gelova u 0,75% rastvor natrijumbikarbonata.

III.11 Sekvenciranje PCR produkata

Sekvenciranje DNK je rađeno BigDye™ Terminators Version 3.1 Ready Reaction Kit-om (Applied Biosystems) kapilarnom elektroforezom na automatskom sekvenceru (3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems). Ovaj kit omogućava sekvenciranje u PCR reakciji u kojoj se pored deoksinukleotida koriste i 2',3'-dideoksinukleotidi (Sanger F, 1977). DNK polimeraza kopira jedan lanac DNK matrice ugrađujući nukleotide na 3' kraj prajmera sve dok u rastući lanac ne ugradi neki od dideoksinukleotida. Dideoksinukleotidi nemaju OH-grupu na 3' poziciji, zbog čega nemaju sposobnost vezivanja sledećeg nukleotida, pa njihovom ugradnjom dolazi do terminacije polimerizacije. Reakcije se rade sa samo jednim prajmerom (asimetrični PCR) tako da se dobija serija fragmenata različitih dužina koji se završavaju dideoksinukleotidom. Svaki od 4 dideoksinukleotida obeležen je različitom fluorescentnom bojom čime je omogućena detekcija fragmenata u sekvenceru. Za razliku od kitova u kojima su dideoksinukleotidi obeleženi jednom istom fluorescentnom bojom, ovaj kit omogućava da se sekvenciranje jednog uzorka radi u jednoj PCR reakciji umesto u četiri odvojene.

Smeša za sekvenciranje finalne zapremine 8 μ l sadrži sledeće komponente:

- 3-20 ng prečišćenog PCR produkta (za dužine 200-1000 bp)
- 3,2 pmol prajmera za sekvenciranje
- 3 μ l Ready Reaction Mix (Applied Biosystems)

Temperaturni profili PCR reakcije za sekvenciranje:

1. 1 min/ 96°C
2. 25 ciklusa;
 - 10 sec/96°C
 - 5 sec/50°C
 - 4 min/60°C
3. 4°C/ ∞

Posle završene reakcije sekvenciranja uzorci su prečišćavani Na-acetatnom precipitacijom. U uzorke se doda 40 μ l Na-acetata, promućka se i centrifugira 20 min na 13000 rpm, posle čega se supernatant uklanja. Talogu se doda 200 μ l 70% etanola i centrifugira 10 min na 13000 rpm, posle čega se supernatant uklanja. Ovaj korak se ponavlja još jednom. Nakon drugog ispiranja etanolom talog je neophodno u potpunosti osušiti. Osušeni talog se rastvara u 25 μ l HiDi i celokupna količina se nanosi na plejt za sekvenciranje.

III.12 Statističke metode

U prikazivanju i obradi rezultata korišćene su sledeće metode:

Od metoda deskriptivne statistike korišćene su: aritmetička sredina i medijana od srednjih vrednosti i od mera varijabiliteta standardna devijacija i interval varijacije. Relativni brojevi su korišćeni u svim tabelama.

U analizi rezultata, u zavisnosti od prirode samih varijabli, korišćeni su Studentov t test kod parametarskih podataka i Mann - Whitneyev test sume rangova za poređenje razlike između dve grupe neparametarskih podataka po jednom obeležju.

Kada je bilo više od dva obeležja, primenjena je ili parametarska ili neparametarska analiza varijansnog količnika (ANOVA).

Za analizu dva atributivna obeležja korišćen je Pearsonov χ kvadrat test u obliku tablica kontingencije, a za analizu tri i više obeležja Fisherovu analizu varijanse za proporcije.

Za analizu ishoda i preživljavanja primenjena je Kaplan Majerova metoda i Log rank test.

Svi statistički testovi su posmatrani na nivou značajnosti nulte hipoteze od $p < 0.05$. Statistička analiza je urađena na PC računaru primenom licenciranog statističkog paketa, SPSS.

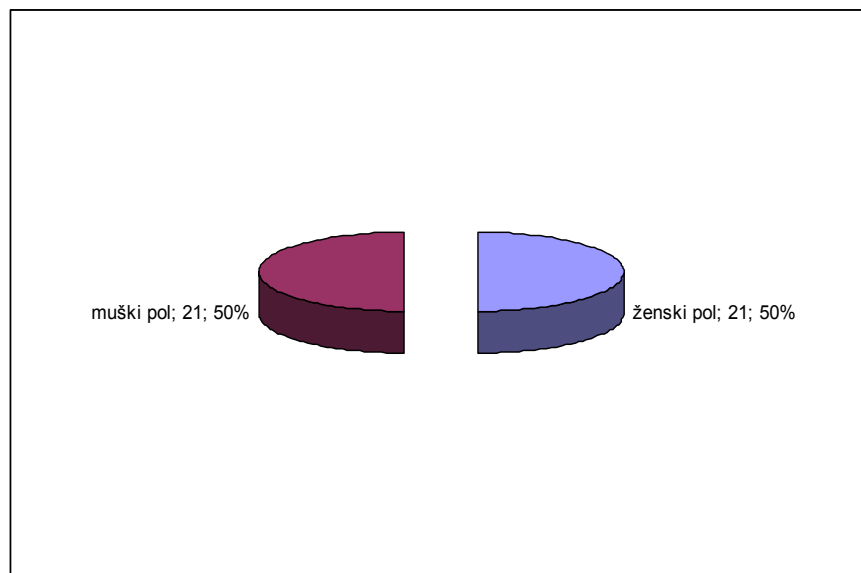
IV REZULTATI ISPITIVANJA

IV.1 Rezultati ispitivanja u grupi pedijatrijskih bolesnika

U grupi pedijatrijskih bolesnika nalazilo se 42 ispitanika koji su lečeni u Univerzitetnoj dečijoj klinici i Institutu za zdravstvenu zaštitu majke i deteta u Beogradu.

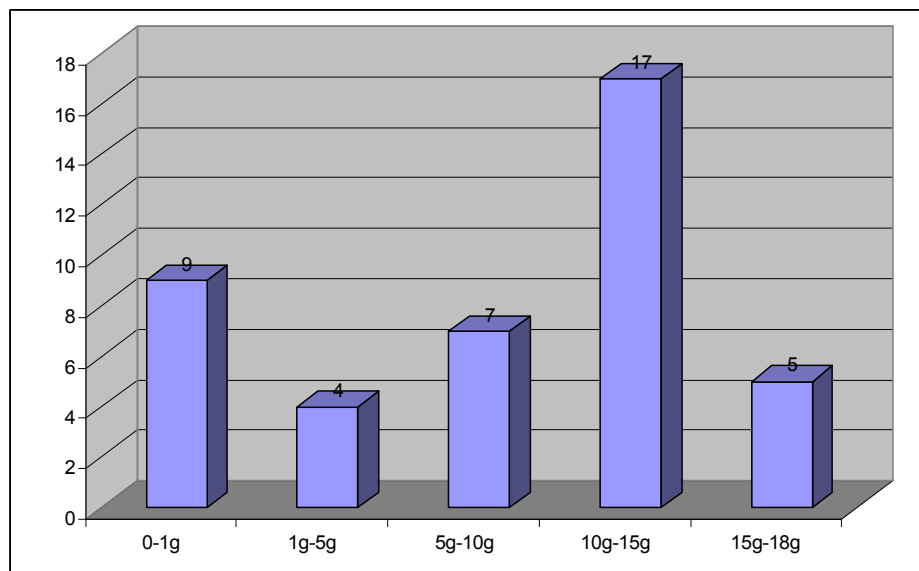
IV.1.1 Raspodela prema polu i uzrastu u grupi pedijatrijskih bolesnika

U grupi pedijatrijskih bolesnika polovi su bili zastupljeni sa podjednakom učestalošću (grafikon 1).



Grafikon 1. Zastupljenost polova u dece sa akutnom mijeloidnom leukemijom

Uzrast pedijatrijskih bolesnika sa AML se kretao od 9 meseci do 18 godina, prosečne starosti 8,4 godine (grafikon 2). Medijana je bila 9,5 godina. Muška deca su bila prosečne starosti 8,2 godina, a ženska 8,7 godina. Nije nađena statistički značajna razlika u uzrastu muške i ženske dece ($p=0.804$).



Grafikon 2. Distribucija frekvencija prema uzrastu u grupi pedijatrijskih bolesnika sa AML

IV.1.2 Hematološke karakteristike u grupi pedijatrijskih bolesnika

Inicijalni broj leukocita se kretao od 1,4 do $275 \times 10^9/L$, prosečno $59,367 \pm 11,188 \times 10^9/L$, SD $2508 \times 10^9/L$, Medijana $21 \times 10^9/L$. Više od polovine dece (25 tj 60%) ima inicijalno manje od $50 \times 10^9/L$ leukocita, 10 (24%) dece ima od $50 - 100 \times 10^9/L$, a preko $100 \times 10^9/L$ leukocita je dijagnostikovano u 7 (16%) dece. Broj leukocita u odnosu na uzrast i pol nije bio statistički značajan.

IV.1.3 Raspodela prema FAB podeli u grupi pedijatrijskih bolesnika

Distribucija pedijatrijskih bolesnika u odnosu na FAB tipove, kao i demografske i hematološke karakteristike prikazane su na tabeli 1.

FAB	Broj bolesnika	%	Pol muški/ženski	Godine (X)	Srednji broj leukocita($X 10^9/L$)
M1	5	11,9%	5/0	11,7	62199
M2	15	35,7%	5/10	9,9	56213
M3	6	14,3%	4/2	10,6	27000
M4	10	23,8%	5/5	6,0	76790
M5	2	4,8%	0/2	9,6	8500
M6	1	2,4%	1/0	1	33400
M7	3	7,1%	½	1,3	119800

Tabela 1. Zastupljenost FAB tipova u grupi pedijatrijskih bolesnika i povezanost sa polom, uzrastom i brojem leukocita.

Statističkom analizom nađeno je da povezanost pol i broj leukocita nije bila statistički značajna ($p=0,579$). FAB tipovi M6 i M7 su dijagnostikovani kod dece mlađeg uzrasta u poređenju sa ostalim FAB kategorijama i ta razlika je bila statistički značajna ($p=0.22$).

IV.1.4 Učestalost i raspodela citogenetskih anomalija u grupi pedijatrijskih bolesnika sa AML

U pedijatrijskih bolesnika analiza kariotipa je urađena u 30 bolesnika (71%). U devet bolesnika kariotip nije rađen, dok kod tri bolesnika nije bilo dovoljno mitoza za analizu. Patološki kariotip je nađen u 19 (63%) pedijatrijskih bolesnika (tabela 2).

IV.1.5 Molekulska genetska ispitivanja

FLT3 mutacije su analizirane u 42 dece sa AML. Mutacije *FLT3* su detektovane u 4/42 bolesnika (9.5%). Učestalost mutacija *FLT3/ITD* i *D835Y* su bile iste, 2/42 (4.7%).

Nije postojala statistički značajna razlika po uzrastu i polu između bolesnika sa *FLT3* mutacijom i bolesnika koji nisu bili nosioci ove mutacije. ($p=0.06$ i $p=0.068$).

Srednji broj leukocita u dece koja su bila nosioci *FLT3/ITD* mutacije je $158.6 \times 10^9/L$ ($67.2 - 250 \times 10^9/L$). Broj leukocita je bio statistički značajno veći u poređenju sa bolesnicima koji nisu bili nosioci mutacije *FLT3* ($p=0,002$).

U dece sa *D835Y* mutacijom srednji broj leukocita je $69,3 \times 10^9/L$ (69 i $69,7 \times 10^9/L$). *D835Y* mutacija je dijagnostikovana kod jednog bolesnika sa $t(11;17)$ i rezistentnom bolesti koji je lečen transplantacijom kostne srži i koji je umro nakon 19 meseci od postavljanja dijagnoze. Drugi bolesnik sa *D835Y* je žensko dete starosti 10 godina, sa inicijalnim brojem leukocita $69,7 \times 10^9/L$, FAB M2, normalnim kariotipom, koja je nakon 18 meseci od postavljanja dijagnoze razvila medularni recidiv. U recidivu bolesti dijagnostikovana je *FLT3/ITD* mutacija.

U dece koja nisu bila nosioci *FLT3* mutacije srednji broj leukocita je $53,6 \times 10^9/L$ (od $1,4$ do $275 \times 10^9/L$). Prema FAB kriterijumima, M2 tip je bio najčešći. Remisija nakon indukcionog lečenja nije postignuta u 4 od 30 ispitivane dece. U dece koja su bili nosioci *FLT3* mutacije u dvoje nije postignuta remisija nakon indukcionog lečenja.

Postojala je statistička značajnost u postizanju remisije nakon indukcionog lečenja u dece koja su bila nosioci *FLT3* mutacije ($P=0,012$).

Karakteristike pedijatrijskih bolesnika sa i bez mutacija *FLT3* prikazani su u tabeli 2.

	FLT3/ ITD+	D835Y+	FLT3 -
Broj bolesnika	2	2	38
Pol			
ženski	1	2	18
muški	1	0	20
Prosečan uzrast (god)	10,2(10,1-10,4)	7,7(6,8-9,4)	8,4
FAB			
M1			5
M2	1	1	13
M3	1(M3v)		5
M4		1	9
M5			2
M6			1
M7			3
Srednji broj leukocita (x 10⁹/L)	158,6	69,3	53,6
Patološki kariotip	1 [t(15,17)]	1 [t(11,17)(q23,21)]	17
Kariotip nema	1		11
Normalan kariotip		1	10
Nema remisije nakon indukcije	1	1	4

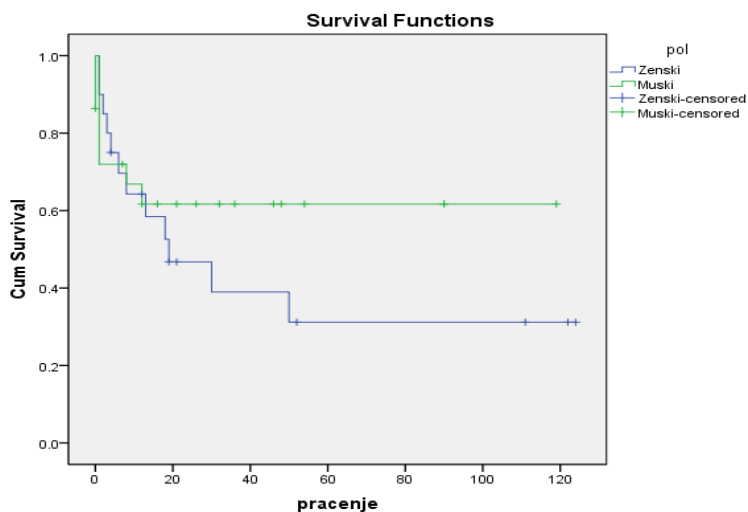
Tabela 2. Karakteristike pedijatrijskih bolesnika sa mutacijama u genu za FLT3

Mutacija u genu za nukleofosmin utvrđena je u 1/37 ispitivanih bolesnika, što predstavlja učestalost od 2,7%. Mutacija je bila tipa Q, i kao i ostale mutacije ovog gena bila je heterozigotna. Radilo se o inserciji 4 bazna para (4bp) na poziciji 964 do 965. Za razliku od do sada opisane mutacije tipa Q gde su 4bp sastava AGGA, insercioni segment kod našeg pacijenta je bio sastava CGGA. Sekvenca aminokiselina je ipak bila ista kao i u do sada opisanom tipu Q mutacije.

Mutacija je detektovana u bolesnika sa FAB M4 i translokacijom t(11;17)(q23;21). U istog bolesnika nađena je i *FLT3/TKD* mutacija. Bolest je bila rezistentna na primenjenu terapiju, uključujući i alogenu transplantaciju kostne srži. Do smrtnog ishoda došlo je 19 meseci od postavljanja dijagnoze.

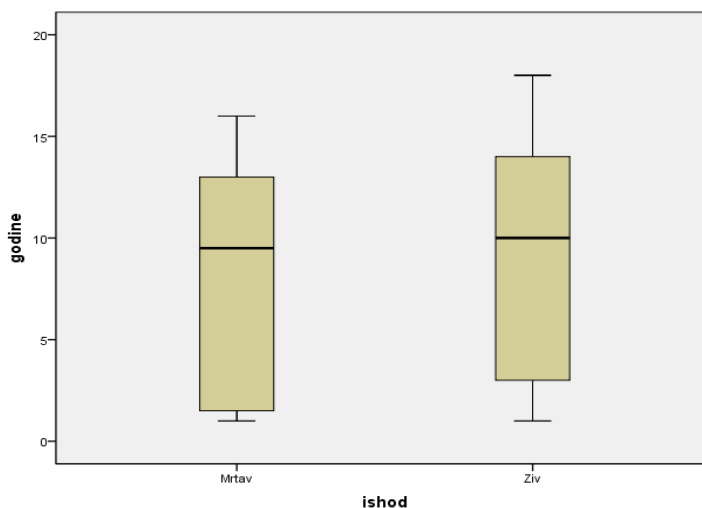
IV.1.6 Analiza preživljavanja u grupi pedijatrijskih bolesnika

Verovatnoća preživljavanja u grupi dece nije bila statistički značajno povezana sa polom, mada je nađen trend boljeg ishoda lečenja kod dečaka ($p=0,370$) (grafikon 3).



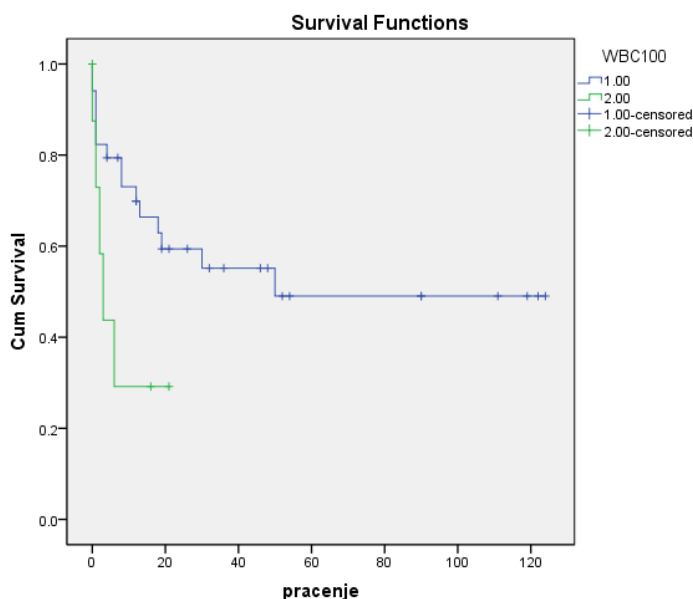
Grafikon 3. Kaplan Majerova kriva verovatnoće preživljavanja prema polu u grupi pedijatrijskih bolesnika

Kao i pol, uzrast pedijatrijskih bolesnika nije bio statistički značajno povezan sa ishodom lečenja (grafikon 4).



Grafikon 4. Povezanost uzrasta i ishoda lečenja u dece

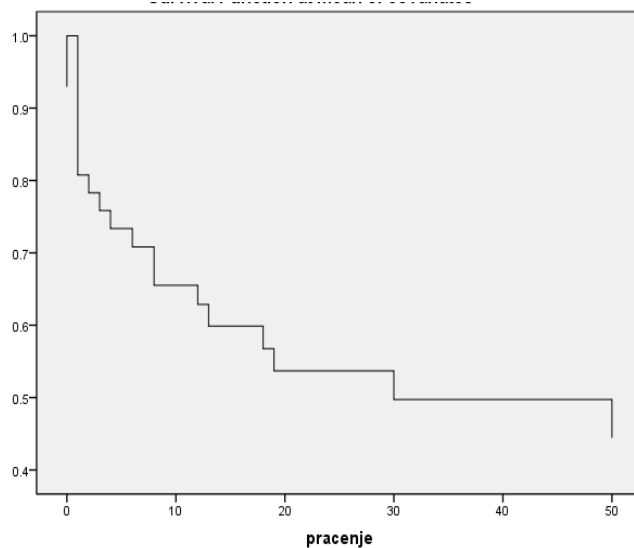
Postoji statistički značajna razlika u preživljavanju u odnosu na inicijalni broj leukocita. Naime, deca koja su pri postavljanju dijagnoze imala broj leukocita $< 100 \times 10^9/l$ imala su srednju vrednost preživljavanja od 68 meseci, dok su deca sa inicijalnim brojem leukocita $> 100 \times 10^9/l$ imala srednju vrednost preživljavanja od 7,8 meseci. Ova razlika je statistički značajna, $p=0,043$.



Grafikon 5. Kaplan Majerova kriva verovatnoće preživljavanja pedijatrijskih bolesnika u odnosu na inicijalni broj leukocita

Postojanje *FLT3* mutacija takođe je imalo uticaja na verovatnoću preživljavanja u ovoj grupi bolesnika. Deca sa *FLT3* mutacijama su imala srednju vrednost preživljavanja od 28,1 mesec, dok je u dece bez *FLT3* mutacija srednja vrednost preživljavanja iznosila 62,4 meseca. Usled malog broja analiziranih bolesnika ova razlika nije bila statistički značajna.

Ukupna verovatnoća preživljavanja u grupi pedijatrijskih bolesnika iznosila je 45% (grafikon 6).



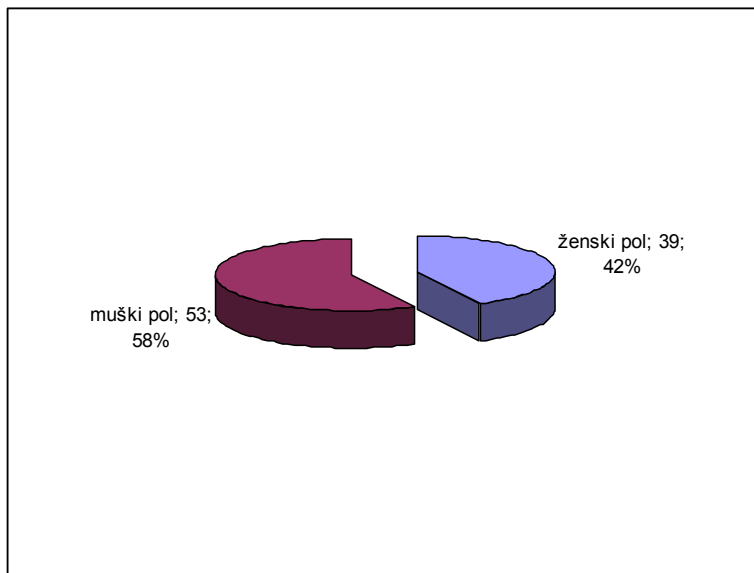
Grafikon 6. Kaplan Majerova kriva verovatnoće ukupnog preživljavanja pedijatrijskih bolesnika

IV.2 Rezultati ispitivanja u grupi odraslih bolesnika

U grupi odraslih bolesnika nalazilo se 92 ispitanika obolelih od *de novo* AML. Dijagnostika i lečenje su sprovedeni u Klinici za hematologiju Kliničkog centra Srbije u Beogradu.

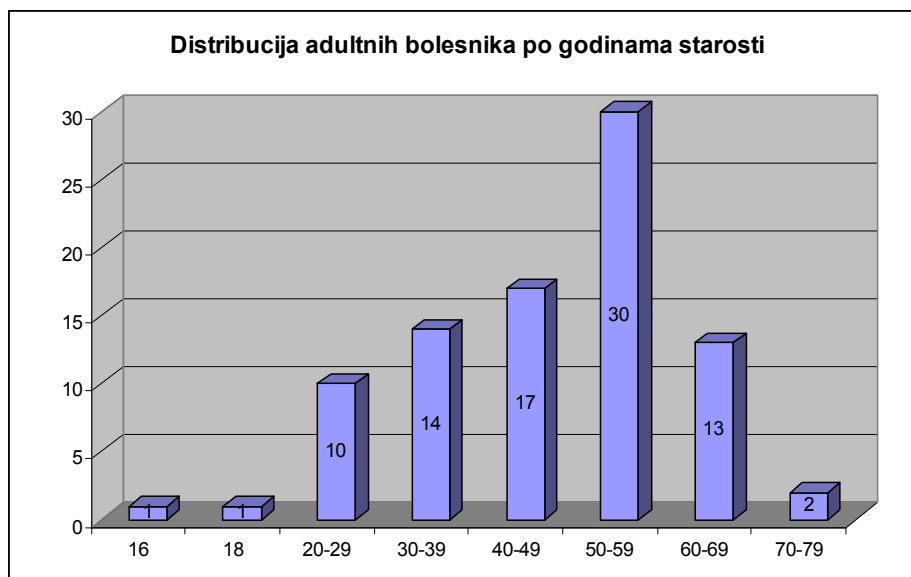
IV.2.1 Raspodela prema polu i uzrastu u grupi odraslih bolesnika

U grupi odraslih bolesnika sa AML bilo je 58 % muškaraca i 42% žena. Raspodela prema polu je prikazana na grafikonu 1. Iako je u grupi odraslih bilo više osoba muškog pola, razlika nije bila statistički značajna.



Grafikon 1. Raspodela odraslih bolesnika sa AML prema polu

Životna dob obolelih kretala se u rasponu od 16 do 75 godina; medijana životnog doba je bila 50 godina (SD 13,74). Najveći broj ispitanika bio je u grupi od 50 do 59 godina. Raspodela životnog doba bolesnika prikazana je na grafikonu 2.



Grafikon 2. Raspodela učestalosti odraslih bolesnika prema starosnim kategorijama

U ovoj grupi bolesnika su pri postavljanju dijagnoze analizirani i klinički parametri hemoragijski sindromia, hepatomegalija, splenomegalija limfadenopatija.

Hemoragijski sindrom je nađen u 26 bolesnika (28,9%), hepatomegalija u 29 bolesnika (32,2%), splenomegalija u 30 bolesnika (33,3%) i limfadenopatija u 11 bolesnika (11,4%) (tabela 1).

Ispitivana karakteristika	Broj	Procenat
Hemoragijski sindrom	26	28,9
Splenomegalija	30	33,3
Hepatomegalija	29	32,2
Limfadenopatija	11	12,4
Hemoglobin		
< 100 g/L	29	31,5
≥ 100 g/L	63	68,4
Leukociti		
> 10	42	45,6
10-49	21	22,8
50-99	8	8,6
< 100	21	22,8
Trombociti		
< 20	15	16,6
20 -49	37	41,1
50-99	18	20,0
100-150	10	11,1
> 150	10	11,1
LDH		
< 450	29	31,5
≥ 450	63	68,5

Tabela 1. Opšti podaci ispitivane grupe odraslih bolesnika

IV.2.2 Hematološke karakteristike u grupi odraslih bolesnika

Hematološke karakteristike u grupi odraslih bolesnika prikazane su u tabeli 1.

Ispitivana karakteristika	\bar{x}	SD	min	max
Hemoglobin g/L	92	16,72	54	138
Eritrociti $\times 10^{12}/L$	3,0	0,64	1,70	4,50
Leukociti $\times 10^9/L$	13,2	49,69	0,60	203,0
Trombociti $\times 10^9/L$	44,0	65,23	6,0	411,0
Blasti u perifernoj krvi (%)	43,16	31,38	0,00	99,0
Blasti u koštanoj srži (%)	76,0	21,77	20,00	90,0

Hematološka ispitivanja pokazala su da je u ovoj grupi bolesnika srednja vrednost koncentracije hemoglobina iznosila 92 g/l, minimalna koncentracija je bila 54 g/l a maksimalna 138 g/l (SD 16,72). Koncentracija hemoglobina > 100 g/l je nađena u 29 bolesnika, što predstavlja 31,5% ispitanika.

Broj leukocita se nalazio u rasponu od 0,60 do 203.0 X10⁹/l, medijana 13,2X10⁹/L (SD 49,69). Procenat blasta u perifernoj krvi se kretao u rasponu od 0 do 99%, medijana 43,16%, (SD 31,38%). Srednja vrednost blasta u koštanoj srži je bila 76% (SD 21,77), a kretala se u rasponu 20 – 90%.

Nađena je statistički značajna korelacija između povišenog broja blasta u perifernoj krvi i većeg broja leukocita, sniženog broja trombocita (p=0,045) i povišene aktivnosti LDH (p=0,001).

IV.2.3 FAB podtipovi AML

Prema FAB podeli bifenotipska leukemija je nađena kod 5 bolesnika (5,4%), M0 kod 6 bolesnika (6,5%), M1 kod 13 bolesnika (14,2%), M2 kod 30 bolesnika (32,7%), M3 kod 9 bolesnika (9,8%), M4 kod 19 bolesnika (20,6%), M4eo kod 1 bolesnika (1%), M5a kod 7 bolesnika (7,6%), M6 kod 2 bolesnika (2,2%).

Dijagnoza bifenotipske, minimalno diferentovane i megakarioblastne leukemije postavljena je na osnovu imunofenotipskog nalaza.

Učestalost pozitivnosti ispitivanih antigena na membrani mijeloblasta prikazana je na tabeli 2.

Ispitivana karakteristika	Broj	Procenat
CD13	79/83	95,2
CD33	53/84	63,1
CD117	53/80	66,3
MPO	65/75	86,7
CD34	53/84	63,1
CD7	29/81	35,8
CD15	33/80	41,3
CD19	15/69	21,7

Tabela 2. Raspodela učestalosti membranskih markera na mijeloblastima

Povezanost ekspresije membranskih antigena povezana je sa pripadnošću određenoj FAB grupi. Najčešće je nađena ekspresija CD13 antigena i to kod 95,2% ispitanika. Limfoidni marker CD19 je nađen kod 21,7% ispitanika; CD7 koji je istovremeno i limfoidni marker, ali i pokazatelj nezrelog fenotipa leukemije nađen je kod 35,8% obolelih.

Izostanak ekspresije CD34 bio je povezan sa FAB tipovima M1, M2, M3 i M5 ($p=0,023$); ekspresija MPO bila je povezana sa FAB tipovima M1, M2, M3 i M4 ($p=0,022$); ekspresija CD7 bila je povezana sa FAB tipovima M0 i M1, dok je izostala kod bolesnika sa M3; izostanak ekspresije CD15 bio je povezan sa FAB tipovima M0, M1, M4, M5 i bifenotipskim leukemijama.

Analiza povezanosti ispitivanih molekularno – genetskih markera i FAB tipova AML pokazala je da je najveća učestalost mutacija *FLT3* nađena kod FAB tipa M2 i M4. Mutacije *FLT3* i nukleofosmin nisu nađene u FAB tipovima M6 i M7.

Učestalost molekularno-genetskih markera i FAB tipova prikazana je u tabeli 3.

FAB tip	FLT3-ITD	FLT3-TKD	NPM1
M0	2 (12,5%)	/	/
M1	2 (12,5%)	1 (11,1%)	5 (38,5%)
M2	4 (25%)	3 (33,3%)	3 (23,1%)
M3	1 (6,25%)	1 (11,1%)	/
M4	4 (25%)	3 (33,3%)	2 (15,3%)
M5	2 (12,5%)	1 (11,1%)	3 (23,1%)
M6	/	/	/
M7	/	/	/
bifenotipska	1 (6,25%)	/	/

Tabela 3. Raspodela ispitivanih molekularno genetskih markera kod pojedinih FAB tipova AML

IV.2.4 Analiza citogenetskih nalaza

Od 92 bolesnika rezultat kariotipa je dobijen u 79 bolesnika. U 8 bolesnika citogenetska analiza nije uspjela, dok za 5 bolesnika nedostaju podaci. Normalan kariotip je nađen u 43/79 ispitanika (54,4%).

Standardni rizik	16 (20,3%)
Srednji rizik	51 (64,5%)
Visoki rizik	12 (15,2%)

Tabela 4. Stratifikacija bolesnika prema citogenetskim grupama rizika

IV.2.5 Molsko genetski markeri u odraslih bolesnika sa AML

U grupi odraslih bolesnika ispitivana je učestalost mutacija *FLT3* (*ITD* i *TKD* mutacije) i u genu za nukleofosmin. Mutacije *FLT3* nađene su kod 25/92 bolesnika (27,1%) dok su mutacije u genu za nukleofosmin nađene kod 13/92 bolesnika (14,1 %).

Povezanost nalaza molekularno genetičkih markera sa FAB tipom AML i citogenetskim nalazom prikazana je u tabeli 5.

FAB tip	Broj pacijenata	citogenetika	<i>FLT3/ITD</i> ⁺	<i>FLT3/TKD</i> ⁺	<i>NPM1</i> ⁺
M0	6				
	4	Normalan	1	/	/
	2	neuspela	1	/	/
M1	12				
	9	Normalan	2	1	5
	1	t(9;22)	/	/	/
	2	neuspela	/	/	/
M2	29				
	17	Normalan	2	3	3
	8	Aberantan	1	/	/
	2	t(8;21)	/	/	/
	1	t(9;22)	/	/	/
	1	neuspeo	/	1	
M3	10				
	10	t(15;17)	1	1	/
M4	20				
	8	Aberantan	1	/	/
	6	Inv16	/	2	1
	5	Normalan	3	1	/
	1	Neuspeo	/	/	1
M5	8				
	5	Normalan	3	/	2
	2	Neuspeo	/	/	1
	1	Aberantan	/	/	/
M6	2				
	1	Normalan	/	/	/
	1	neuspeo	/	/	/
Bifenotipska	5				
	3	Normalan	1	/	/
	1	t(9;22)	/	/	/
	1	Aberantan	/	/	/

Tabela 5. Zastupljenost mutacija *FLT3* i *NPM* prema FAB tipovima i citogenetskom nalazu

Mutacije u ispitivanim genima nađene su u svim FAB podtipovima AML osim u M6. U analiziranoj grupi bolesnika nije bilo akutne megakarioblastne leukemije tako da podaci za ovaj FAB tip nedostaju.

U grupi bolesnika sa mutacijom *FLT3* nije bilo značajne razlike u raspodeli prema polu. Mutacija *FLT3/ITD* je nađena u 16/25 bolesnika a *FLT3/TKD* u 9/25 bolesnika. Istovremeni nalaz *FLT3/ITD* i *TKD* mutacije nije postojao u ovoj grupi ispitanika. Karakteristike bolesnika sa mutacijama *FLT3* prikazane su u tabeli 6.

		FLT3/ ITD+	FLT3/D835Y+	
Broj bolesnika		16	9	
Pol	ženski	6	4	
	muški	9	4	
FAB				
M0		2		
M1		2	1	
M2		4	1	
M3			2	
M4		4	3	
M5		2	1	
M6		/	/	
M7		/	/	
bifenotipska		1		
Srednji broj leukocita (x 10⁹/L)		110,8	68,8	
patološki kariotip		2	4	
Kariotip nema		1	2	
Normalan kariotip		12	2	
Nema remisije nakon indukcije		9	5	

Tabela 6. Karakteristike bolesnika sa mutacijama u genu za *FLT3*.

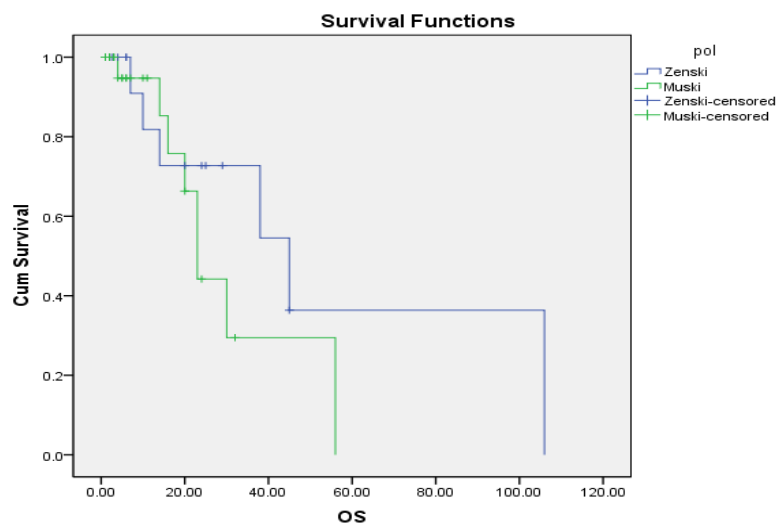
Pored prosečno većeg broja leukocita u poređenju sa bolesnicima koji nisu bili nosioci mutacije *FLT3*, prosečan broj blasta u perifernoj krvi u grupi *FLT3*⁺ bolesnika je bio 57% a u kostnoj srži 73,7%.

Istovremeno postojanje mutacija *FLT3* i nukleofosmin nađeno je u 9 bolesnika. U 5 bolesnika postojala je mutacija *FLT3/ITD* i mutacija u genu za nukleofosmin tip A; u jednog bolesnika nađena je mutacija *FLT3/ITD* i mutacija u genu za nukleofosmin tip D, dok se u jednog bolesnika radilo o retkoj mutaciji tipa K. U tri bolesnika nađeno je postojanje udruženosti mutacija *FLT3/TKD* i nukleofosmin mutacije tipa A.

IV.2.6 Analiza preživljavanja adultnih bolesnika sa AML

Ispitivani demografski pokazatelji (pol i životno doba) imali su u ovoj grupi ispitanika uticaja na verovatnoću preživljavanja.

Osobe ženskog pola su imale statistički značajno veću verovatnoću dužeg preživljavanja ($p=0,046$). Medijana preživljavanja osoba ženskog pola je bila 56,4 meseca (25,2 - 87,6 meseci), dok je medijana preživljavanja osoba muškog pola iznosila 30,9 meseci (19,2 – 42,6 meseci).

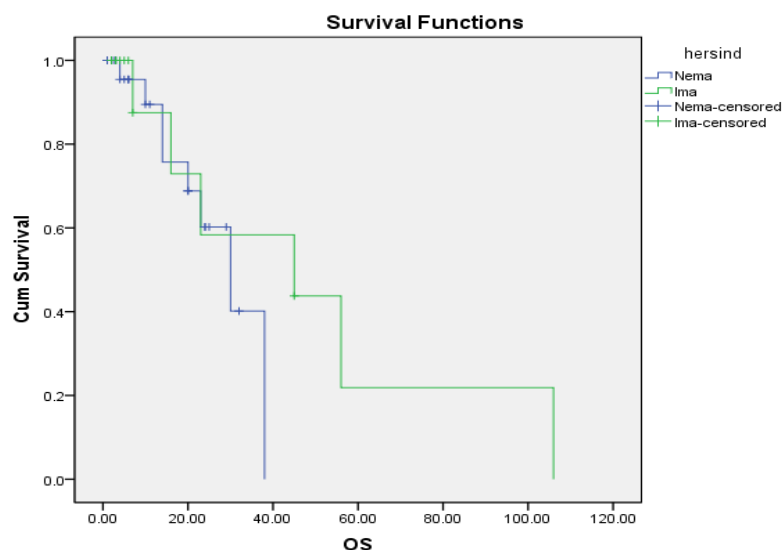


Grafikon 1 . Kaplan Majerova kriva verovatnoće preživljavanja u odnosu na pol; cenzorisanih: ženski pol 13, muški pol 20.

Pored pola, uticaj na verovatnoću preživljavanja je imala i životna dob bolesnika, pri čemu je manja verovatnoća povoljnog ishoda postojala kod osoba starijeg životnog doba ($p=0,025$).

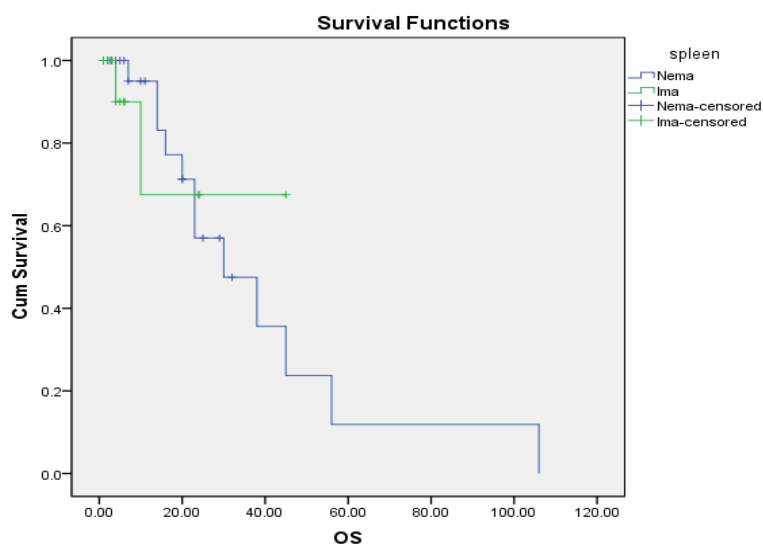
Pored demografskih, i određene kliničke karakteristike su imale uticaj na verovatnoću preživljavanja.

Hemoragijski sindrom kao inicijalna klinička manifestacija je nađen kod 26 bolesnika (28,9%). Nije nađena statistički značajna povezanost sa drugim kliničkim i laboratorijskim nalazima; iako povezanost sa verovatnoćom preživljavanja nije bila statistički značajna ($p=0,367$), postoji trend ka boljem ishodu kod bolesnika sa ovim kliničkim nalazom.



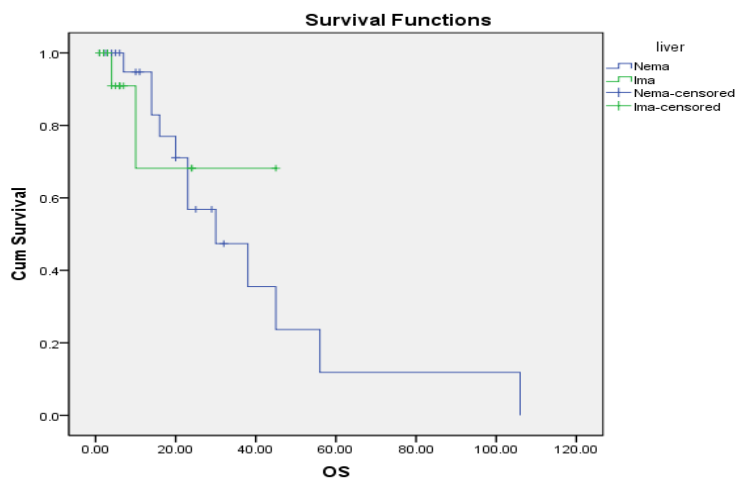
Grafikon 2. Kaplan Majerova kriva verovatnoće preživljavanja u odnosu na postojanje hemoragijskog sindroma; cenzorisanih: bez hemoragijskog sindroma 23; sa hemoragijskim sindromom 10.

Splenomegalija je nađena u 30 bolesnika (33,3%). Povezanost ishoda lečenja i splenomegalije nije bila statistički značajna, mada je nađen trend ($p=0,051$) ka većoj verovatnoći boljeg ishoda kod bolesnika bez splenomegalije.



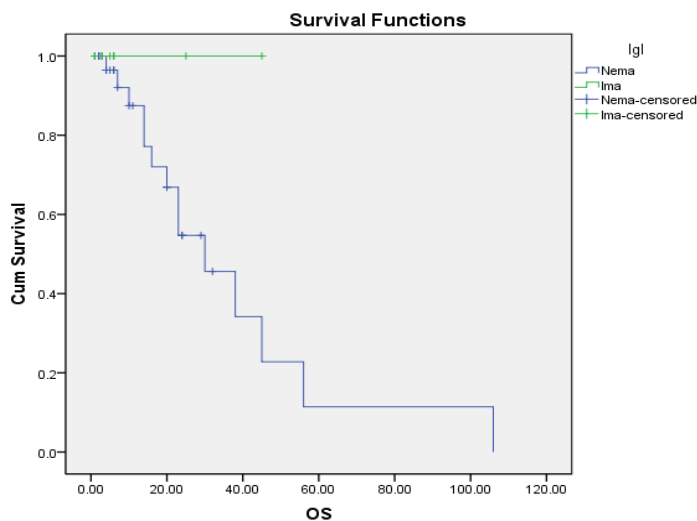
Grafikon 3. Kaplan Majerova kriva verovatnoće preživljavanja u odnosu na postojanje splenomegalije; cenzorisanih: bez splenomegalije 20; sa splenomegalijom 13.

Hepatomegalija je nađena u 29 bolesnika (32,2%). Bolesnici sa ovim kliničkim nalazom imali su statistički značajno manju verovatnoću preživljavanja ($p=0,018$).



Grafikon 4. Kaplan Majerova kriva verovatnoće preživljavanja u odnosu na postojanje hepatomegalije; cenzorisanih: bez hepatomegalije 17; sa hepatomegalijom 16.

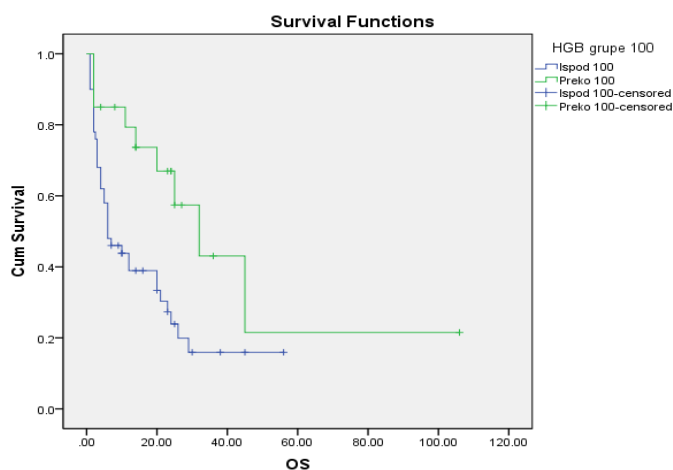
Limfadenopatija je nađena u 11 bolesnika (12,4 %) bolesnika. Iako je u pitanju mali broj bolesnika, nađena je statistički značajna povezanost limfadenopatije sa nepovoljnim ishodom lečenja ($p=0,015$).



Grafikon 5. Kaplan Majerova kriva verovatnoće preživljavanja u odnosu na postojanje limfadenopatije; cenzorisanih: bez limfadenoptije 26; sa limfadenopatijom 7.

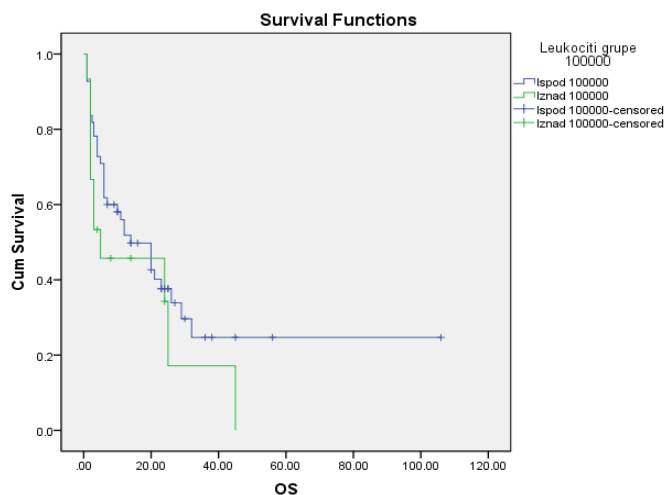
Neke od ispitivanih opštih laboratorijskih karakteristika bile su statistički povezane sa verovatnoćom preživljavanja.

Koncentracija hemoglobina $>100\text{g/l}$ u trenutku postavljanja dijagnoze je bila povezana sa većom verovatnoćom preživljavanja ($p=0,01$). Bolesnici sa koncentracijom hemoglobina $< 100\text{g/l}$ pri postavljanju dijagnoze imali su srednje preživljavanje od 16,9 meseci (11,1 – 22,8 meseci) dok je u bolesnika sa hemoglobinom iznad 100g/l srednje preživljavanje iznosilo 42,5 meseci (17,8 – 68,2 meseca).



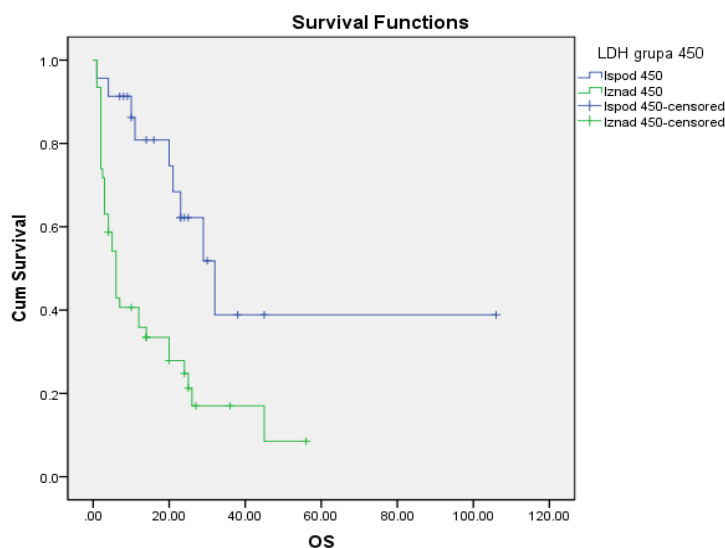
Grafikon 6. Kaplan Majerova kriva verovatnoće preživljavanja u odnosu na koncentraciju hemoglobina $\geq 100\text{g/l}$ i $<100\text{g/l}$; cenzorisanih: hemoglobin $\geq 100\text{g/l}$ 11; $<100\text{g/l}$ 13.

Vrednost broja leukocita pri postavljanju dijagnoze kada su analizirane grupe bolesnika sa $\leq 100 \times 10^9$ leukocita ili $> 100 \times 10^9$ leukocita nije bila statistički značajno povezana sa verovatnoćom preživljavanja ($p=0,248$). Na grafikonu je uočljiv brz pad krive koja označava verovatnoću preživljavanja kod bolesnika sa hiperleukocitozom, što je posledica rane smrtnosti zbog komplikacija vezanih za visok broj leukocita.



Grafikon 7. Kaplan Majerova kriva verovatnoće preživljavanja u odnosu na broj leukocita $\geq 100 \times 10^9/L$ i $< 100 \times 10^9/L$; cenzorisanih: leukociti $\geq 100 \times 10^9/L$ 4, leukociti $< 100g/l$ 20.

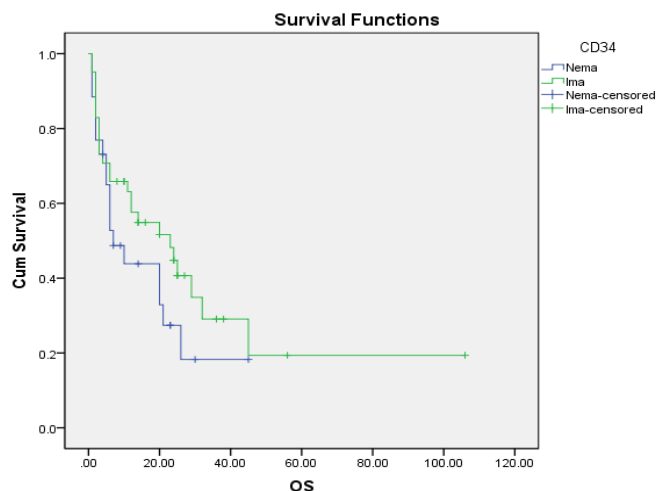
Normalna vrednost LDH statistički je značajno povezana sa većom verovatnoćom preživljavanja. Medijana preživljavanja bolesnika sa normalnim vrednostima LDH bila je 53, 6 meseci (29,3 – 77,9 meseci), dok je medijana preživljavanja bolesnika sa povišenim vrednostima LDH iznosila 15,3 meseca (9,7 - 20,9 meseci), $p=0,01$.



Grafikon 8. Kaplan Majerova kriva verovatnoće preživljavanja u odnosu na vrednost LDH ≥ 450 i < 450 ; cenzorisanih: ≥ 450 10, < 450 14.

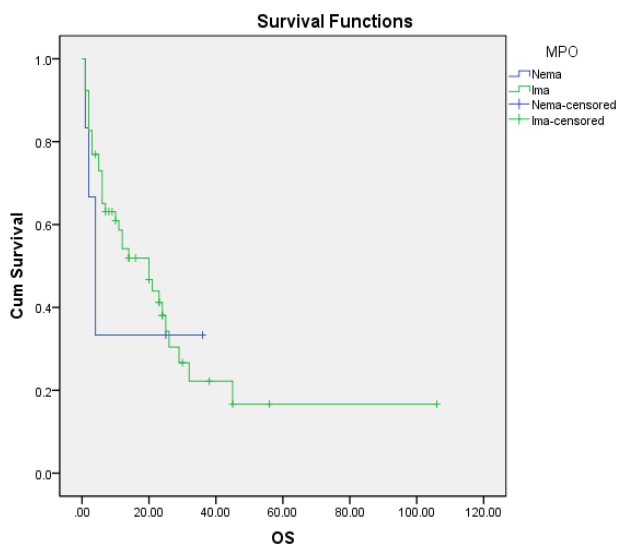
Analiza ekspresije fenotipskih markera na mijeloblastima ukazala je da pojedini markeri nisu bili povezani sa ishodom bolesti i verovatnoćom preživljavanja.

Medijana preživljavanja bolesnika koji su bili pozitivni na CD34 je iznosila 34 meseca (18,3 – 49,7 meseci), dok je medijana preživljavanja bolesnika u kojih je izostala ekspresija CD34 iznosila 16,3 meseca (9,6 – 23 meseca), $p=0,206$.



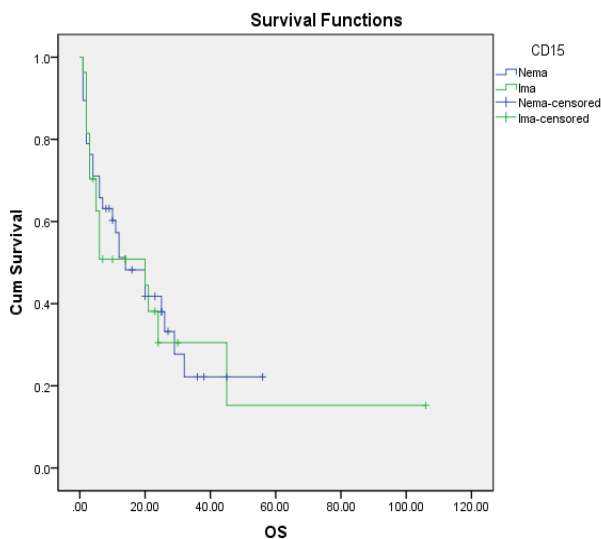
Grafikon 9. Kaplan Majerova kriva verovatnoće preživljavanja u odnosu na ekspresiju CD34; cenzorisanih: CD34 neg. 26, CD34 poz. 41.

Ekspresija mijeloperoksidaze (MPO) nije bila statistički značajno povezana sa ishodom lečenja ($p=0,672$). Medijana preživljavanja bolesnika sa ekspresijom MPO iznosila je 30,1 mesec (17,7 – 42,6 meseci), dok je u bolesnika u kojih je izostajala ekspresija MPO medijana preživljavanja iznosila 13,8 meseci (1,2 – 26,4 meseca).



Grafikon 10. Kaplan Majerova kriva verovatnoće preživljavanja u odnosu na ekspresiju MPO; cenzorisanih MPO neg. 2, MPO poz. 18.

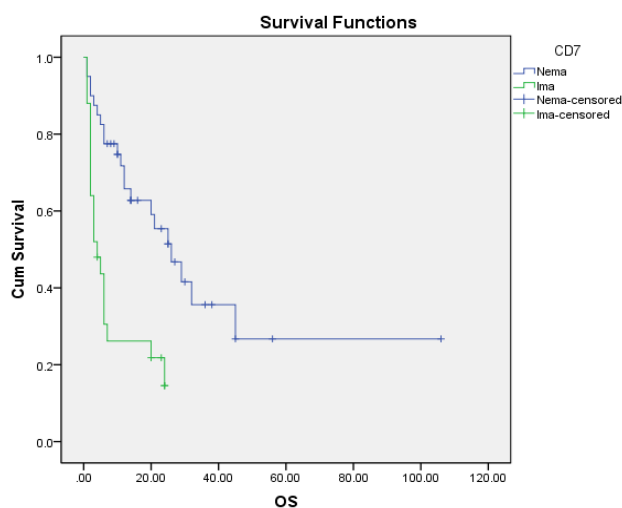
Ekspresija markera CD15 nije uticala na verovatnoću preživljavanja u ovoj grupi bolesnika ($p=0,791$). Medijana preživljavanja u bolesnika koji su bili pozitivni za CD15 je iznosila 29,2 meseca (10,4 – 48 meseci), dok je u bolesnika koji su bili negativni za CD15 medijana preživljavanja iznosila 22,1 mesec (14,9 – 29,3 meseci).



Grafikon 11. Kaplan Majerova kriva verovatnoće preživljavanja u odnosu na ekspresiju CD15; cenzorisanih CD15 neg. 13, CD15 poz. 10.

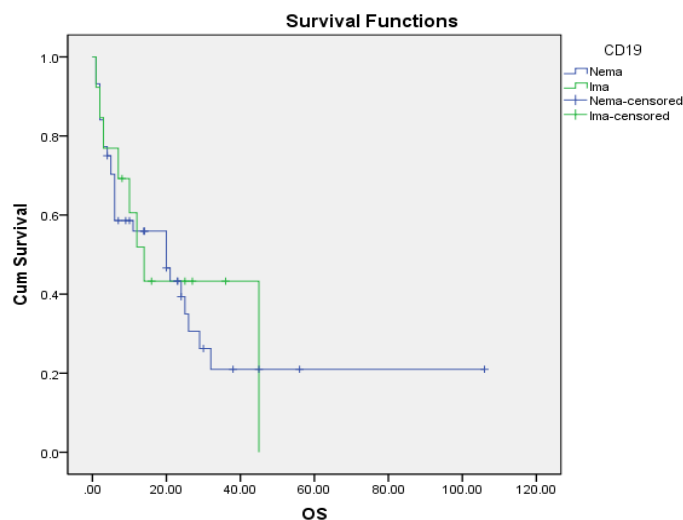
Za razliku od prethodno navedenih, ekspresija limfoidnog markera CD7 bila je statistički visoko značajno povezana sa manjom verovatnoćom preživljavanja ($p=0,001$).

Medijana preživljavanja bolesnika koji su bili CD7 pozitivni iznosila je 8,5 meseci (4,8 – 12,2 meseca), dok je srednje vreme preživljavanja u bolesnika u kojih je izostajala ekspresija CD7 iznosilo 41,9 meseci (25,1 – 58,7 meseci).



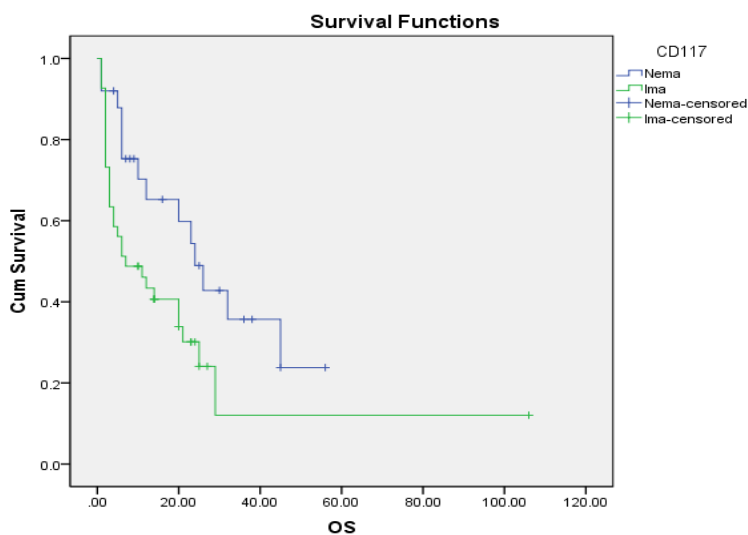
Grafikon 12. Kaplan Majerova kriva verovatnoće preživljavanja u odnosu na ekspresiju CD7; cenzorisanih CD7 neg. 19, CD7 poz. 5.

U ovoj grupi bolesnika ispitivan je i uticaj limfoidnog markera CD19 na verovatnoću preživljavanja, i pri tome nije nađen statistički značajna povezanost ekspresije ovog markera sa ishodom bolesti. Naime, medijana preživljavanja CD19 pozitivnih bolesnika iznosila je 23,5 meseci (12,1 – 34,9 meseci), dok je u CD19 negativnih bolesnika iznosila 32,7 meseci (18,5 – 46,9 meseci)



Grafikon 13. Kaplan Majerova kriva verovatnoće preživljavanja u odnosu na ekspresiju CD19; cenzorisanih CD7 neg. 16, CD7 poz. 5.

Ekspresija markera CD117 bila je statistički značajno povezana sa manjom verovatnoćom preživljavanja ($p=0,033$). Bolesnici u kojih je izostajala ekspresija ovog markera imali su srednje vreme preživljavanja od 28,3 meseca (19,5 – 37,1 meseci), dok su bolesnici sa ekspresijom CD117 imali srednje vreme preživljavanja od 22,4 meseca (6,7 – 38,2 meseca).

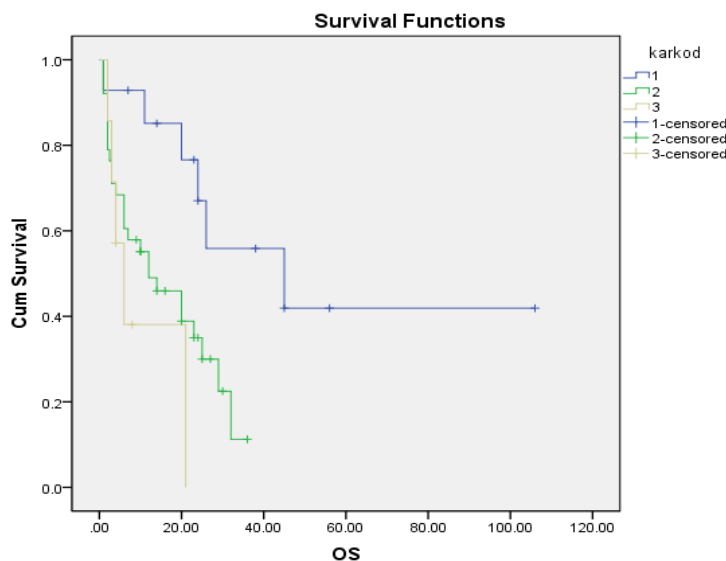


Grafikon 14. Kaplan Majerova kriva verovatnoće preživljavanja u odnosu na ekspresiju CD117; cenzorisanih CD117 neg. 14, CD117 poz. 29.

Ispitivanjem uticaja citogenetskog nalaza na ishod lečenja dobijeni su sledeći rezultati:

- medijana preživljavanja bolesnika u grupi kariotipa povoljnog rizika je 58,5 meseci (32,4 – 82,6 meseci)
- medijana preživljavanja bolesnika u grupi kariotipa srednjeg rizika je 16,1 mesec (11,8 -20,4 meseci)
- medijana preživljavanja bolesnika u grupi kariotipa nepovoljnog rizika je 10,4 meseci (3 . 17,8 meseci)

Postoji statistički značajna razlika u preživljavanju bolesnika podeljenih u grupe rizika prema nalazu kariotipa ($p=0,013$). Razlika u preživljavanju između grupe srednjeg i visokog rizika nije bila statistički značajna ($p>0,05$), dok je grupa standardnog rizika imala statistički značajno bolje preživljavanje od grupe bolesnika sa srednjim i visokim rizikom.



Grafikon 15. Kaplan Majerova kriva verovatnoće preživljavanja u odnosu na startifikaciju u prema nalazu kariotipa.

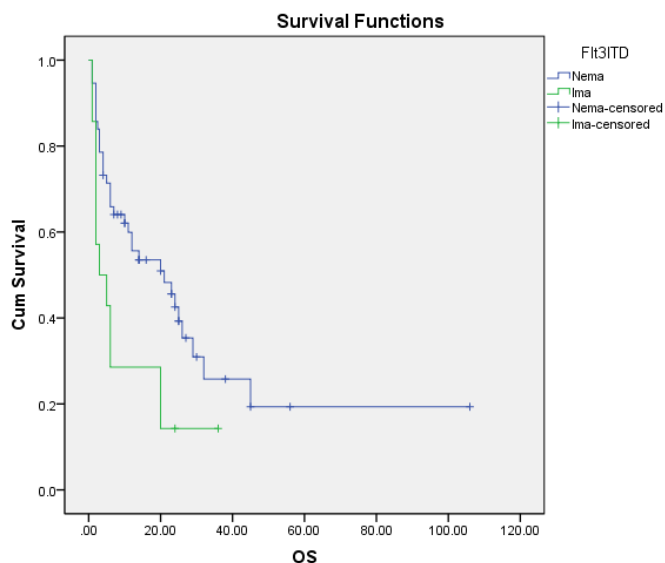
Legenda: 1 - grupa standardnog rizika, 2 - grupa srednjeg rizika, 3 - grupa visokog rizika;

Cenzorisanih: standardni rizik 8, intermedijerni rizik 26, visoki rizik 7.

Kao molekularni genetski markeri sa potencijalnim uticajem na ishod lečenja u ovoj grupi adultnih bolesnika su ispitivane i mutacije *FLT3* i *NPM1*. Dobijeni su sledeći rezultati:

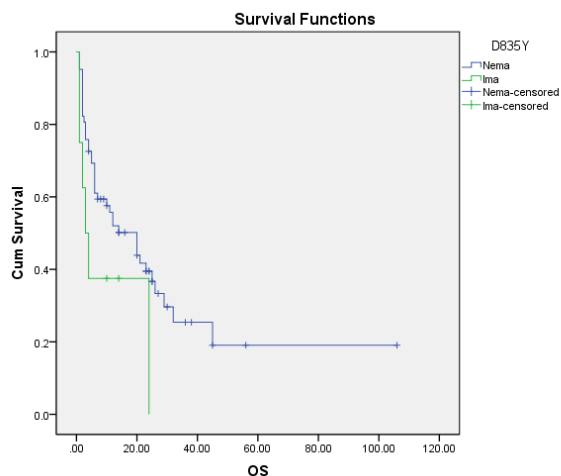
Mutacija *FLT3/ITD* bila je statistički značajno povezana sa dužinom preživljavanja ($p=0,008$), i to tako da su nosioci ove mutacije imali kraće srednje preživljavanje.

Medijana preživljavanja u grupi bolesnika *FLT3/ITD*⁺ je bila 10,1 mesec (3,7 – 16,5 meseci), dok je u grupi bolesnika koji su bili *FLT3/ITD*⁻ iznosila 33 meseca (19,6 – 46,3 meseci).



Grafikon 16. Kaplan Majerova kriva verovatnoće preživljavanja u odnosu na mutacioni status *FLT3/ITD*; cenzorisanih: *FLT3/ITD*⁻ 22, *FLT3/ITD*⁺ 2.

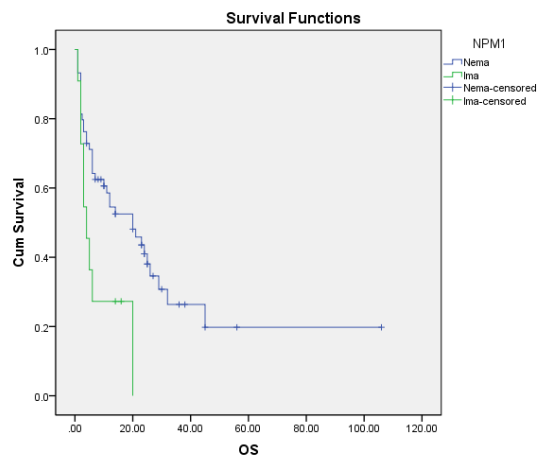
Mutacija *FLT3/TKD* (*D835Y*) nije bila statistički značajno povezana sa verovatnoćom preživljavanja ($p=0,097$). Medijana preživljavanja bolesnika koji su bili *FLT3/TKD*⁺ je bila 10,3 meseca (2,3 – 18,4 meseca), dok je u *FLT3/TKD*⁻ bolesnika medijana preživljavanja iznosila 31,7 meseci (19,3 – 44,2 meseca).



Grafikon 17. Kaplan Majerova kriva verovatnoće preživljavanja u odnosu na mutacioni status *FLT3/TKD*; cenzorisanih: *FLT3/TKD*⁻ 22, *FLT3/TKD*⁺ 2.

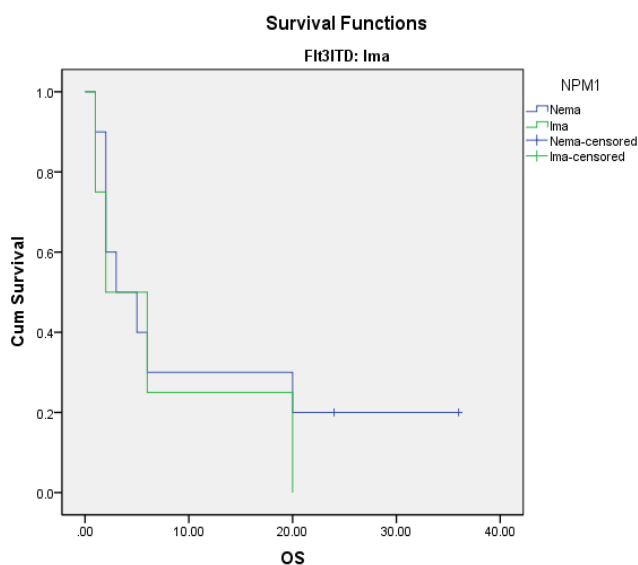
Analiza mutacija *NPM1* dala je sledeće rezultate. Najveći broj nađenih mutacija pripadao je tipu A, u jednog bolesnika je nađena mutacija tipa D, u je u jednog bolesnika detektovana mutacija tipa K.

Medijana preživljavanja bolesnika sa mutiranim genom za nukleofosmin (*NPM1*⁺) je iznosila 7,8 meseci (3 – 12,5 meseci) dok je medijana preživljavanja u bolesnika sa normalnim genom za nukleofosmin (*NPM1*⁻) iznosila 32,9 meseci (20 – 45,8 meseci); ova razlika je statistički značajna ($p=0,021$).



Grafikon 18. Kaplan Majerova kriva verovatnoće preživljavanja u odnosu na mutacioni status *NPM1*; cenzorisanih: *NPM1*⁻ 22, *NPM1*⁺ 2.

Analizom verovatnoće preživljavanja grupe bolesnika u kojih je postojala istovremeno mutacija *FLT3* i *NPM1* dobijeni su sledeći rezultati. Naime, u bolesnika koji su *FLT3*⁺/*NPM1*⁻ medijana preživljavanja je iznosila 11,3 meseci (2,9 – 19,6 meseci); u bolesnika koji su *FLT3*⁺/*NPM1*⁺ medijana preživljavanja je iznosila 7,2 meseca (0 – 15,8 meseci); razlika u medijani preživljavanja ove dve grupe bolesnika nije bila statistički značajna ($p=0,60$).

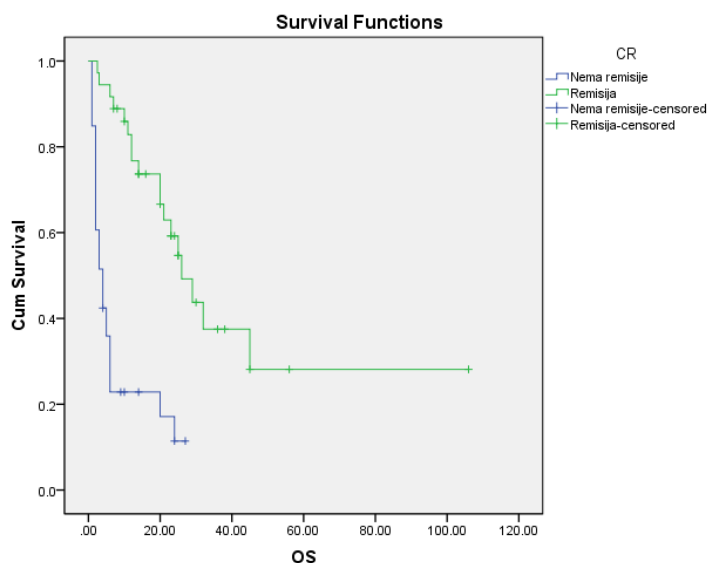


Grafikon 19. Kaplan Majerova kriva verovatnoće preživljavanja u odnosu na mutacioni status *FLT3/TKD*; cenzorisanih: *FLT3/NPM1*⁻ 2, *FLT3/NPM1*⁺ 0.

Analiza preživljavanja u odnosu na način lečenja

Analizom protokola 3+7 i ADE nađeno je da ne postoji statistički značajna razlika u medijani preživljavanja u odnosu na primenjeni modalitet lečenja.

Za razliku od vrste protkola, postizanje kompletne remisije je bilo statistički visoko značajno povezano sa dužom medijanom preživljavanja ($p=0,0001$). U bolesnika koji nisu postigli kompletu remisiju medijana preživljavanja je iznosila 7,9 meseci (4,7 – 11,2 meseci), dok je u bolesnika sa ostvarenom kompletnom remisijom medijana preživljavanja iznosila 45,5 meseci (28,1 – 62,8 meseca).



Grafikon 20. Kaplan Majerova kriva verovatnoće preživljavanja u odnosu na remisioni status; cenzorisanih: bez remisije 6, postignuta remisija 18.

Nađena je statistički značajna povezanost mutacije *FLT3/ITD* sa izostankom postizanja kompletne remisije ($p=0,006$), dok mutacija *FLT3/TKD* nije bila statistički značajno povezana sa postizanjem remisije ($p=0,226$).

Daljom univarijantnom analizom kliničkih i laboratorijskih pokazatelja pokazana je statistički značajna povezanost izostanka kompletne remisije sa starijim životnim dobom ($p= 0,014$), splenomegalijom ($p=0,017$), hepatomegalijom ($p=0,006$), vrednošću LDH iznad 450 j/l ($p=0,00$) i ekspresijom antigena CD7 ($p=0,003$).

V DISKUSIJA

U studiji su analizirani klinički i laboratorijski podaci, kao i njihov uticaj na ishod lečenja kod 92 odrasla i 42 pedijatrijska bolesnika s AML.

Ispitivanje je sprovedeno delom prospektivno a delom retrospektivno. Dobijeni rezultati ukazuju da se radi u obe grupe o neselekcionisanim bolesnicima, s obzirom na to da su rezultati analize demografskih, kliničkih i bioloških pokazatelja u skladu sa podacima iz literature (Grimwade *et al*, 2001; Creutzig *et al*, 2005).

U grupi pedijatrijskih bolesnika nije bilo bolesnika sa minimalno diferentovanom (FAB M0) i bifenotipskom leukemijom jer je fenotip u većine dece određivan imunohistohemijskom metodom APAAP, u kojoj je korišćen ograničen panel monoklonskih antitela.

Srednji uzrast u grupi pedijatrijskih bolesnika je bio 9,5 godina; uzrast u ovoj grupi bolesnika nije bio statistički povezan sa ishodom lečenja. Distribucija prema polu je bila ista i nije bilo značajne razlike u preživljavanju dečaka i devojčica.

Svi FAB tipovi sa izuzetkom M0 su bili zastupljeni i nije nađena statistički značajna razlika u preživljavanju u odnosu na FAB tip. U ovoj grupi bolesnika nije bilo statistički značajne povezanosti FAB tipa i broja leukocita; nađena je značajno veća učestalost FAB tipova M6 i M7 kod dece mlađeg uzrasta ($p=0,022$).

Mutacije u genu za nukleofosmin u grupi pedijatrijskih bolesnika nađene su kod 1/37 pacijenta, što predstavlja učestalost od 2,7%. Ovakav nalaz je u skladu sa učestalošću $NPM1^+$ AML kod dece koji su publikovali i drugi autori (tabela 1).

Autor	Broj analiziranih bolesnika	Broj bolesnika sa $NPM1^+$
Hollink et al (2009)	297	25 (8,4%)
Mulligan et al (2007)	93	6,4%
Brown et al (2007)	295	8%
Shimada et al (2007)	33	0
Thiede et al (2007)	75	12%
Chou et al (2006)	47	1 (2,1%)
Cazzaniga et al (2005)	107	7 (6,5%)

Tabela 1. Usporedna analiza učestalosti $NPM1^+$ AML u dece

Podaci o učestalosti mutacija u genu za nukleofosmin, kao i njihovom značaju, do sada su publikovani u manjem broju studija u poređenju sa odraslim bolesnicima. Analiza dobijenih podataka većine autora daje slične rezultate kada se radi o uzrastu dece u kom se nalaze AML $NPM1^+$. Naime, u uzrastu ispod tri godine u AML, bez obzira na citogenetski nalaz, mutacije u genu za nukleofosmin nisu nađene; najčešće se AML $NPM1^+$ nalaze kod dece koja su starija od deset godina.

Ovakva raspodela učestalosti verovatno ima više razloga. U dece sa AML učestalost normalnog kariotipa je oko 20% dok se kod adultnih bolesnika normalan kariotip nalazi kod oko 50-60% pacijenata. Kako se AML $NPM1^+$ najčešće javlja u bolesnika sa normalnim kariotipom, očekivano je naći manju učestalost ovog genetičkog markera u dece sa AML. Međutim, u do sada analiziranim serijama pedijatrijskih bolesnika učestalost AML $NPM1^+$ u grupi dece sa normalnim kariotipom je oko 20%, za razliku od 6-8% kada se posmatra učestalost cele grupe. Ipak, i sa ovako izdvojenom kohortom pacijenata učestalost AML $NPM1^+$ je još uvek manja u pedijatrijskoj populaciji. Različitosti u mehanizmima leukemogeneze kod odraslih bolesnika i dece verovatno da imaju uticaja na ređu zastupljenost AML $NPM1^+$ u dece. Naime, u ranom uzrastu su od značaja genetske promene koje se pod dejstvom faktora sredine dešavaju *in utero*, a takođe, ni kompleks bioloških mehanizama koji učestvuju u popravci DNK nije sasvim kompetentan (Colovic *et al*, 2006). Pored navedenog, jedna od pretpostavki je da su potencijalne matične ćelije leukemogeneze u dece mlađeg uzrasta manje osetljive na uzroke koji dovode do mutacija u genu za nukleofosmin. Činjenica da učestalost AML $NPM1^+$ linerano raste posle dvadesete godine života ukazuje da ove mutacije imaju dug latentni period do formiranje leukemijskog klona, za šta su neophodne i druge genetske promene (Chou *et al*, 2006).

Pored životnog doba pacijenata, izvesno je da i rasna pripadnost određuje učestalost mutiranog nukleofosmina u AML dečijeg doba. Manju incidencu koja odgovara nalazima naše studije našli su i autori koji su ispitali učestalost mutacija u genu za nukleofosmin kod dece sa AML koja su azijskog porekla (Chou *et al*, 2006; Shimada *et al*, 2007).

Pojedini autori nisu nalazili prevagu bolesnika ženskog pola, kao ni povezanost sa inicijalnim hematološkim nalazima (povišen broj leukocita), karakterističnu za odrasle bolesnike sa AML *NPM1*⁺ (Cazzaniga *et al*, 2005, Hollink *et al*, 2009).

Analizom povezanosti sa FAB tipovima pokazano je da se kod dece mutacije u genu za nukleofosmin ne javljaju u FAB tipovima M4 i M5, za razliku od adultnih bolesnika, gde su ovi FAB tipovi najčešće nosioci mutiranog nukleofosmina. Naime, mijelomonocitna i monoblastna leukemija se češće javljaju kod dece mlađeg uzrasta, gde dominira nalaz rearanžmana MLL gena.

Analiza preživljavanja dece sa AML *NPM1*⁺ je pokazala da ova podgrupa ima statistički značajno veću verovatnoću preživljavanja u poređenju sa bolesnicima sa AML i normalnim kariotipom koji su *NPM1*⁻. Naime, Hollink i saradnici (Nemačka i Danska grupa za lečenje AML kod dece) su pokazali bolji EFS (eng. Event free survival) ali ne i statistički značajno bolji OS (engl. overall survival). U ovoj studiji postojanje mutacija *FLT3* nije negativno uticalo na ishod lečenja. Rezultati Browna i saradnika (grupa za lečenje pedijatrijskih AML u Sjedinjenim Američkim Državama) su pokazali bolje i EFS (66±10% prema 39±4%) i OS (68±10% prema 56±4%).

Rezultati uticaja pridruženih mutacija *FLT3* su kontraverzni, čemu delimično doprinosi i relativno mali broj bolesnika, ali i različiti načini lečenja.

Pored znatno manje učestalosti AML *NPM1*⁺ u dece u poređenju sa odraslim bolesnicima, značajna razlika postoji i u odnosu na tip mutacija u genu za nukleofosmin (Cazzaniga *et al*, 2005; Thiede *et al*, 2007; Krstovski *et al*, 2009). Naime, u odraslih bolesnika najveća je učestalost mutacija tipa A. U dece su znatno češće mutacije tipa B i D. U našeg pacijenta je detektovana mutacija tipa Q, što se uklapa u literaturne podatke.

U odraslih bolesnika najčešća se nalazi mutacija u genu za nukleofosmin tip A; nalaz ove mutacije povezan je sa boljom prognozom. Međutim, mutacije koje ne pripadaju tipu A prema rezultatima Koha i saradnika (Koh *et al*, 2009) su povezane sa nepovoljnim ishodom lečenja.

Obzirom na ove podatke, može se objasniti nepovoljan ishod lečenja kod naše bolesnice, koja je pored mutacije u genu za nukleofosmin tipa Q, bila i nosilac mutacije *FLT3/TKD*. Isti tip mutacije u genu za nukleofosmin kod ove bolesnice je detektovan i u recidivu bolesti, dok je u mutacionom statusu *FLT3* došlo do promene iz *FLT3/TKD* u *FLT3/ITD*.

Stabilnost mutacija u genu za nukleofosmin ukazuje da se radi o ranom genetskom događaju u nastanku leukemijskog klona. Klinički značaj ove pojave je u činjenici da se mutacija u genu za nukleofosmin može koristiti kao marker minimalne rezidualne bolesti. Praćenjem broja kopija mutiranog gena metodom kvantitativnog PCR Schnittger i saradnici su dokazali da je porast broja kopija ili izostanak očekivanog smanjenja po primenjenoj terapiji u multivarijantnoj analizi pokazatelj nepovoljne prognoze (Schnittger *et al*, 2009).

U grupi pedijatrijskih bolesnika mutacije *FLT3* su nađene kod ukupno 4/42 bolesnika, odnosno 9,5%. Zastupljenost *FLT3/ITD* i *FLT3/TKD* je bila podjednaka (po dva pacijenta), i iznosila je po 4,7%.

Podaci iz literaure ukazuju da je učestalost mutacija *FLT3* u dece manja nego u odraslih bolesnika i nalazi se u rasponu 5,3%-16,5%. (tabela 2).

Autor	Broj pacijenata	Broj bolesnika sa <i>FLT3/ITD</i>	Broj bolesnika sa <i>FLT3/D835</i>
Iwai i sar (1999)	94	5(5,3%)	
Xu i sar. (1999)	87	12(13,8%)	
Kondo i sar. (1999)	64	7 (11%)	
Meshinchi i sar (2001)	91	15 (16,5%)	
Liang i sar. (2002)	80	9 (11,3%)	
Arrigoni (2002)	45	10 (22,2%)	
Zwaan i sar. (2003)	234	27 (11,5%)	
Kang i sar (2005)	61	4 (6,6%)	2(3.3%)
Meshinchi i sar (2006)	630	77	42(6.7%)
Liang I sar (2003)	91	14 (15,4%)	3(3.3%)

Tabela 2. Usporedna analiza učestalosti mutacija *FLT3* u dece sa AML

Učestalost mutacija *FLT3* se povećava sa uzrastom bolesnika. Naime, mutacije *FLT3* nisu nađene u dece mlađe od tri godine, dok se njihova učestalost povećava kod dece starijeg uzrasta i adolescenata. U dece uzrasta do 5 godina njihova učestalost iznosi 5%, što je u skladu i sa našim rezultatima. Postepeni porast učestalosti mutacija *FLT3* ukazuje na različite mehanizme leukemogeneze u dece u odnosu na odrasle osobe. Mutacije *FLT3/ITD* dovode do konstitutivne aktivacije tirozin kinaznog receptora i samim to do neprestane aktivacije signalnih puteva koji usmeravaju ćeliju ka deobi. Ipak, činjenica da se mutacioni status može promeniti u recidivu bolesti (gubitak mutiranog *FLT3*), kao i da u eksperimentalnim modelima sama mutacija *FLT3/ITD* nije dovoljna da izazove leukemiju, ukazuju da se radi o sekundarnom događaju u leukemogenezi (Small *et al*, 2006).

Nalaz citogenetskih anomalija u dece tokom prve godine života razlikuje se od dece starijeg uzrasta po znatno većoj učestalosti rearanžmana 11q23 (*MLL*). Tokom prve godine života ove citogenetske anomalije nalaze se u oko 50% (Harrison *et al*, 2010). Rezultati epidemioloških studija ukazuju na značajnu povezanost promena u *MLL* genu sa izloženošću inhibitorima topo II izomeraze koja se događa *in utero*. Supstance koje dovode do inhibicije topo II izomeraze u određenom kritičnom momentu hematopoeze (pretpostavlja se da je to prelazak hematopoeze iz žumančane kese u jetru) su toksini, lekovi i supstance koje se nalaze u hrani (Ross *et al*, 2008).

U dece starijeg uzrasta i odraslih bolesnika sa AML leukemogenza se može objasniti modelom „two hit“ hipoteze. Naime, Knudson i saradnici su istražujući etiologiju retinoblastoma pretpostavili da je za nastanak maligne ćelije neophodna udruženost dve genetske lezije, pri čemu prva dovodi do poremećaja diferencijacije a druga do proliferativne prednosti (Knudson *et al*, 1971).

Prema ovom modelu za nastanak leukemijskog klona neophodna je akumulacija genetskih oštećenja – mutacija u genima, koji se prema svojoj funkciji dele na klasu I i klasu II. Mutacije klase I dovode do povećanog proliferativnog potencijala i/ili prednosti u preživljavanju leukemijskih ćelija. U ovu grupu spadaju *FLT3* i *RAS*. Klasa II mutacija obuhvata promene u genima koji dovode do prekida u diferencijaciji. U ovu grupu spadaju fuzionisani genski segmenti kao što su *PML/RAR α* , *AML1/ETO* i rearanžmani *MLL* (Gilliland *et al*, 2002).

Moguće objašnjenje za manju učestalost mutacija *NPM1* u dece je imanja osetljivost potencijalnih matičnih ćelija leukemogeneze kod dece mlađeg uzrasta na događaje koji dovode do mutacija u genu za nukleofosmin.

Učestalost mutacija *FLT3/TKD* je značajno manje zastupljena kako u dece tako i u odraslih bolesnika sa AML, iznosi od 3-7% (Thiede *et al*, 2002; Liang *et al*, 2003). U našoj grupi ispitanika mutacija *FLT3/TKD* nađena je kod 4,7% bolesnika, što odgovara i nalazima drugih autora. Pacijenti koji nose ovu mutaciju su značajno heterogeniji prema kliničko demografskim karakteristikama, inicijalnim laboratorijskim nalazima AML kao i prognozi lečenja u poređenju sa kohortom bolesnika u kojih je nađena mutacija *FLT3/ITD* (Lacayo *et al*, 2004).

Analizom povezanosti mutacionog statusa nađena je značajna povezanost mutacije *FLT3/ITD* sa povišenim brojem leukocita u našoj grupi bolesnika, što odgovara rezultatima drugih autora (Meshinchi *et al*, 2001, Zwaan *et al*, 2003, Colovic *et al*, 2007).

Rezultati većine pedijatrijskih studija ukazuju da je mutacija *FLT3/ITD* povezana sa starijim uzrastom, većim brojem leukocita, normalnim kariotipom, M1, M2 i M3 tipovima po FAB-u kao i neuspehom indukciono terapije i lošim ishodom (Meshinchi *et al*, 2001, Zwaan *et al*, 2003). U analiziranoj grupi bolesnika ovakve karakteristike su nađene kod jednog bolesnika.

Uticao mutacije *FLT3/TKD* na ishod lečenja je prema rezultatima i pedijatrijskih i adultnih studija mnogo manje jasan u poređenju sa mutacijom *FLT3/ITD* (Liang *et al*, 2003). U oba tipa mutacija *FLT3* posledica je izmenjeni receptor koji je konstitutivno aktivan, tako da nezavisno od liganda dolazi do dimerizacije i autofosforilacije. Posledica ovih događaja je aktivacija signalnog puta STAT5. Različita biološka ispoljavanja *ITD* i *TKD* mutacija posledica su činjenice da recetor *FLT3/TKD* ispoljava manji stepen autofosforilacije i slabiju aktivaciju STAT5 (Reindl *et al*, 2006).

U dva bolesnika iz naše grupe sa mutacijom *FLT3/TKD* nađen je povišen broj leukocita pri postavljanju dijagnoze i u oba bolesnika lečenje je imalo nepovoljan ishod.

U jednog bolesnika nađena je translokacija t(11,17)(q23;q21) a klinički tok bolesti odlikovala je potpuna rezistencija na hemioterapiju. Do smrtnog ishoda došlo je zbog relapsa bolesti posle alogene transplantacije kostne srži. Kod drugog bolesnika došlo je do pojave recidiva bolesti posle godinu dana, kada je registrovana i promena mutacionog statusa *FLT3*.

Činjenica da je kod jednog od naših bolesnika došlo do promene mutacionog statusa FLT3 (TKD → ITD) u recidivu bolesti govori u prilog da ovaj genetički marker nije pogodan za praćenje minimalne rezidualne bolesti. Slični rezultati dobijeni su i praćenjem adultne grupe pacijenata sa AML (Čolović *et al*, 2007; McCormick *et al*, 2010).

U grupi pedijatrijskih bolesnika nađena je statistički značajna razlika u odgovoru na indukcionu terapiju u zavisnosti od postojanja mutacija FLT3. Izostanak kompletne remisije u grupi bolesnika sa mutiranim FLT3 nađen je kod 2/4 bolesnika, dok je kod bolesnika bez mutacije FLT3 izostanak remisije nađen kod 4/30 bolesnika ($p=0,047$).

Jasna povezanost mutacija FLT3 sa nepovoljnim ishodom lečenja (Iwai *et al*, 1999; Zwaan *et al*, 2003) opravdava preporuku da ovaj genetski marker bude deo obaveznog dijagnostičkog postupka kod dece sa AML. Na ovaj način je moguća preciznija stratifikacija, naročito kod bolesnika sa normalnim kariotipom. Pored navedenog, konstitutivno aktivna tirozin kinaza u FLT3 receptoru je meta za delovanje tirozin kinaznih inhibitora. Dosadašnja primena sorafeniba sa indukcijom hemioterapijom pružila je ohrabrujuće rezultate (Metzelder *et al*, 2009; Ravandi F *et al*, 2010.).

U protokolu AML BFM 2004 mutacija FLT3/ITD je kriterijum za klasifikaciju bolesnika u grupu visokog rizika, koja se leči intenzivnijom hemioterapijom (liposomalni daunorubicin u većim dozama od konvencionalnog, 2-hlordeoksiadenozin u konsolidaciji HR pacienata). Ovakav način stratifikacije je delimično doprineo da rezultati lečenja dece po ovom protokolu budu bolji u poređenju sa AML BFM 98 studijom (Creutzig *et al*, 2010).

Veća učestalost genetskih markera u odraslih bolesnika sa AML, kao i veća učestalost AML uopšte, doprinela je da u ovoj grupi bolesnika je moguće doneti preciznije zaključke o njihovom značaju za definisanje grupa rizika. Primena molekulske-genetskih markera naročito se pokazala korisnom kod bolesnika sa normalnim kariotipom. Pre primene molekulske markere u stratifikaciji ove grupe bolesnika u grupi srednjeg rizika nalazilo se 50-70% bolesnika sa AML, dok je danans intermedijerni rizik zastupljen sa 25-30% (Grimwade *et al*, 2009).

Za razliku od pedijatrijskih bolesnika, demografski pokazatelji kao što su godine života imali su uticaja na verovatnoću preživljavanja; starije životno doba i muški pol su definisali podgrupu bolesnika sa kraćim srednjim vremenom preživljavanja.

Takođe, analizirane kliničke karakteristike kao što su hemoragijski sindroma, splenomegalija, hepatomegalija i limfadenopatija; kao nepovoljni prognostički pokazatelji u ovoj grupi bolesnika izdvojeni su splenomegalija i limfadenopatija. Takođe, vrednost koncentracije hemoglobina $>100\text{g/l}$ i aktivnost laktatne dehidrogenaze $<450\text{ j/l}$ bili su povezani sa kraćim srednjim vremenom preživljavanja. U ovoj grupi bolesnika broj leukocita $<100 \times 10^9/\text{l}$ nije bio statistički značajno povezan sa verovatnoćom preživljavanja.

Nalaz kariotipa je u ovoj grupi adultnih ispitanika bio, uz mutacioni status *FLT3*, jedan od najznačajnijih prognostičkih pokazatelja. Naime, grupa bolesnika sa citogenetskim aberacijama koje su pripadale kategoriji standardnog rizika imala je statistički značajno duže preživljavanje u poređenju sa grupom bolesnika koji su pripadali kategoriji srednjeg i visokog rizika. U ovoj grupi ispitanika nije bilo statistički značajne razlike u verovatnoći preživljavanja između bolesnika koji su pripadali grupama srednjeg i visokog rizika. Slične rezultate kod nas je publikovala Čolović N, 2008.

Analizirana je i povezanost ekspresije diferencijacijskih markera na mijeloblastima sa verovatnoćom preživljavanja.

Povezanost ekspresije antigena sa CD7 sa mutacijom *FLT3/ITD* nađena je i u ovoj grupi ispitanika, što je u skladu sa nalazima drugih autora (Rausei-Mills *et al*, 2008; Chauhan *et al*, 2010). Antigen CD7 pripada superfamiliji imunoglobulinskih receptora, koji je normalno eksprimiran na T limfocitima i timocitima. Aberantna ekspresija ovog antigena na mijeloblastima ukazuje da je matična ćelija leukemogeneze nastala na ranim stadijumima hematopoetskih prekursora. Samim tim, češći nalaz mutacije *FLT3/ITD* u ovih bolesnika ukazuje da je klon nastao u ranim fazama hematopoeze. Ekspresija CD7 antigena u ovoj grupi bolesnika bila je statistički značajno povezana sa FAB tipovima M0 i M1, dok je zostajala kod M3 ($p=0,048$). Ekspresija CD7 je bila povezana i sa manjom verovatnoćom postizanja remisije, kao i sa kraćim preživljavanjem.

Membranski antigen CD117 je receptor sa aktivnošću tirozin kinaze, koji je kodiran protoonkogenom *c-kit*. Ekspresija ovog antigena nije povezana sa određenim FAB tipom, ali je specifična za mijeloidne leukemije. U zdravih osoba eksprimiran je na oko 2-4% ćelija u koštanoj srži, i to uglavnom CD34+ ćelija. Ekspresija ovog markera u našoj grupi ispitanika bila je statistički značajno povezana sa kraćim vremenom preživljavanja. Iste rezultate dobili su i Čolović N i saradnici. Za razliku od naših rezultata, u studijama kako odraslih tako i pedijatrijskih bolesnika, ekspresija CD117 nije imala prognostički značaj (Schwartz *et al*, 1999;. Smith *et al*, 1994).

Analizom učestalosti mutacija u genu za nukleofosmin u grupi odraslih ispitanika nađena je učestalost od 13/92 (14,1%), što je manje u poređenju sa literaturnim podacima (tabela 3).

Autor	Broj pacijenata	Broj (%) $NPM1^{mut}$
Schnittiger, 2005	401	212 (52,9%)
Chau, 2006	126	32 (25,4%)
Thiede, 2006	1485	408 (27,5%)
Wu, 2007	86	29 (33,7%)
Yan, 2007	156	54 (28,2%)
Boonthimat, 2008	400	105(26,5%)
Ruan, 2009	220	36 (16,4%)
Ahmad, 2009	161	38 (23,6%)
Becker, 2010	148	82 (56%)

Tabela 3. Uporedna analiza učestalosti AML $NPM1^{+}$ kod odraslih bolesnika

U ovoj grupi bilo je 6 žena i 7 muškaraca. Prema podacima iz literature u grupi bolesnika sa AML i $NPM1^{mut}$ dominiraju žene; kako se radi o serijama od više stotina bolesnika, naš uzorak nije dovoljno reprezentativan. Životna dob kod bolesnika iz ove grupe kretala se u rasponu od 20 do 69 godina, medijana 51,2 godine; medijana leukocita u trenutku postavljanja dijagnoze bila je $50,7 \times 10^9/l$. ($2,9 - 150 \times 10^9/l$)

Citogenetska analiza je uspeła kod 10/13 bolesnika iz ove grupe. Normalan kariotip je nađen kod 9/10 bolesnika, što je u skladu sa podacima iz literature. Odsustvo rekurentnih citogenetskih aberacija je potvrđeno kao pravilo kod bolesnika sa mutiranim nukleofosminom i jedan je od razloga za izdvajanje ove grupe bolesnika kao poseban biološki entitet (Falini *et al*, 2008). Jedini aberantan kariotip sa mutacijom u genu za nukleofosmin nađen je u našoj grupi ispitanika kod bolesnika sa hromosomskom aberacijom *inv(16)*; u ovog bolesnika nađena je i mutacija *FLT3/TKD*. Bolesnik je postigao kompletnu remisiju. Ipak, postoje podaci o sporadičnim nalazima udruženosti rekurentnih citogenetskih anomalija sa mutacijom u genu za nukleofosmin, uključujući i *inv(16)* (Thiede *et al*, 2006). Isti autor je pronašao i veoma retku udruženost mutiranog nukleofosmina sa kompleksnim citogenetskim anomalijama, kao i izostanak ovog molekularno genetičkog markera kod bolesnika sa *t(15;17)*. Podaci dobijeni u našoj grupi ispitanika su u skladu sa ovom velikom studijom.

U našoj grupi ispitanika udruženost sa mutacijama *FLT3* nađena je u 7/13 bolesnika (7,6%), i to u 4 bolesnika *FLT3/ITD* i u tri bolesnika *FLT3/TKD*.

U ovoj grupi bolesnika kompletna remisija je postignuta kod 7/13 bolesnika.

Analiza verovatnoće preživljavanja u našoj grupi ispitanika pokazala je kraće preživljavanje *NPM1*⁺ bolesnika, bez obzira na udruženost sa mutacijama *FLT3*. Za razliku od naših rezultata, najveći broj studija (Schnittger *et al*, 2005) ukazuje da su bolesnici sa mutiranim nukleofosminom imali bolji ishod lečenja u poređenju sa grupom koja je imala nemutirani gen. Dalje, ukoliko je postojala udruženost mutacija *FLT3/ITD* i *NPM1* povoljan prognostički uticaj mutiranog nukleofosmina je izostajao. Neslaganje naših rezultata sa literaturnim podacima najverovatnije je posledica malog uzorka.

Iako se navodi da bolesnici sa genotipom *NPM1*⁺/*FLT3-ITD*⁻ imaju dobru prognozu, odnosno da nisu kandidati za lečenje alogenom transplantacijom kostne srži (Schlenk *et al*, 2008) treba imati u vidu da je ovaj stav, koji je prihvaćen u većini transplantacionih centara, baziran na rezultatima lečenja svega 38 bolesnika koji su imali donora.

U literaturi se navodi povećana ekspresija CD33 ali izostaje ili je smanjena CD34 kod AML *NPM1*⁺. U našoj grupi odraslih bolesnika nije bilo statistički značajne povezanosti ekspresije diferencijacijskih markera CD33 ($p=0,379$) CD34 ($p=0,065$) sa nalazom mutacija za nukleofosmin.

Mutacije *FLT3* su nađene kod ukupno 25/92 (27,1%) bolesnika i to *FLT3/ITD* u 17,4%, a *FLT3/TKD* kod 7,6%. Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima studija iz literature, gde se navodi da je učestalost mutacija *FLT3/ITD* 17-30% (Rombouts *et al*, 2000; Fröhling *et al*, 2002; Ahmad *et al*, 2010), dok je učestalost mutacije *FLT3/TKD* mutacije nađena kod 7,6% bolesnika (Thiede *et al*, 2002; Čolović 2007).

Analizirana je povezanost *FLT3/ITD* mutacionog statusa sa kliničkim i hematološkim parametrima u trenutku postavljanja dijagnoze. Podaci iz literature ukazuju da bolesnici sa mutacijom *FLT3* imaju veći broj leukocita kao i veći procenat blasta u koštanoj srži (Tiede *et al*, 2002; Kottaridis *et al*, 2001; Schnittger *et al*, 2002). U našoj grupi odraslih bolesnika nivo statističke značajnosti nađen je za procenat blasta u perifernoj krvi (*FLT3/ITD*⁺ bolesnici su imali veći procenat blasta) i izostankom ekspresije antigena CD34 (*FLT3/ITD*⁺ bolesnici su bili češće CD34 negativni). Povezanost *FLT3/ITD*⁺ statusa sa hepatosplenomegalijom, ostalim hematološkim parametrima, polom i godinama nije bila statistički značajna.

Bolesnici su klasifikovani u FAB grupe prema postojećim preporukama (Benett, 1985). Najveća učestalost mutacija *FLT3* mutacija nađena je kod FAB tipova M4 i M5 (10/25), što odgovara i nalazima drugih autora (Tiede *et al*, 2002).

Uticaj mutacija *FLT3* je dobro definisan kao pokazatelj lošijeg ishoda lečenja kod adultnih bolesnika sa APL. Akutna promijelocitna leukemija (APL) se izdvaja po nizu specifičnosti pre svega u molekularnoj patogenezi što je dovelo i do različitog načina lečenja ovih bolesnika. Pored navedenog, bolesnici sa APL imaju i znatno bolji ishod lečenja u poređenju sa ostalim kategorijama adultnih AML. Rezultati uticaja mutacija *FLT3* na ishod lečenja bolesnika sa APL su do sada bili kontroverzni. Među glavnim razlozima navodi se srazmerno mali broj ovih bolesnika (učestalost je oko 10-15% od svih AML). Meta analizom do sada publikovanih rezultata, kojom je obuhvaćeno 1063 bolesnika iz 11 kliničkih studija, ustanovljeno je da mutacija *FLT3/ITD* ima nepovoljan uticaj na sveukupno preživljavanje ove grupe bolesnika. (Beitinjaneh *et al*, 2010). Kao i u drugim oblicima AML, mutacija *FLT3/ITD* je bila povezana sa povišenim brojem leukocita kod bolesnika sa APL. Leukocitoza je, uz praćenje minimalne rezidualne bolesti, jedan od kriterijuma na osnovu kojih se APL svrstava u kategoriju visokog rizika.

Uticaj mutacije *FLT3/TKD* je ispitivan u 2 od 11 studija. Dobijeni podaci nisu postigli statističku značajnost, ali je zapažen trend ka manjoj verovatnoći sveukupnog preživljavanja (Beitinjaneh *et al*, 2010). U ovoj grupi bolesnika zastupljenost bolesnika sa APL je bila 10,8% a mutacija *FLT3/ITD* je nađena kod 10%. Pored uticaja na ishod lečenja, u pedijatrijskih bolesnika sa APL mutacija *FLT3/ITD* povezana je i sa smrtnim ishodom u toku indukcije (Kunty *et al*, 2010).

Od otkrića mutacija u genu za *FLT3* receptor 1996. godine do danas je sakupljeno puno podataka koji ukazuju na veliki značaj ovog molekularnog genetskog markera za stratifikaciju bolesnika, ali i kao potencijalnu metu za antileukemijsku terapiju blokadom stalne aktivnosti mutiranog receptora. Uticaj na odluku o optimalnom postremisionom načinu lečenja takođe možemo doneti uz poznavanje promena u *FLT3*.

Promene u *FLT3* najčešće su segmentne duplikacije fragmenta u jukstamembranskom regionu (ITD), a ove promene se nalaze u egzonomima 14 i 15. Učestalost ovog tipa genetskih promena progresivno se povećava sa starošću pacijenata. Takođe, dužina duplikovanog segmenta je veoma varijabilna (Schnittger *et al*, 2002).

Pored varijabilnosti u dužini duplikovanog segmenta, odnos mutiranog i normalnog genskog segmenta može imati prognostički značaj (Zwaan *et al*, 2002). Rezultati naših autora (Tošić 2010) ukazuju da dužina duplikovanog segmenta kao ni stepen ekspresije *FLT3* nisu uticali na ishod lečenja.

Uticao mutacije *FLT3/ITD* na ishod lečenja je do danas dobro poznat. Drugi tip mutacije su missense tačkaste mutacije u domenu tirozin kinaze (TKD – tyrosin kinase domain) ili ALP – activation loop mutations. Učestalost ovog tipa mutacije ista u svim starosnim grupama bolesnika sa AML (Meshinchi *et al*, 2006). Iako je patofiziologija poremećaja kod obe mutacije ista, mutacije *TKD* izgleda da imaju drugačije biološke samim tim i drugačije kliničke posledice. Naime, *TKD* mutacija dovodi do aktivacije drugih signalnih puteva kao i do nastanka drugačijeg biološkog odgovora.

Ova klinička zapažanja su i u skladu sa rezultatima eksperimentalnih modela na životinjama. Naime, miševi sa mutacijom *ITD* pretežno razvijaju mijeloproliferativne poremećaje, dok miševi koji nose mutaciju *TKD* razvijaju limfoproliferativnu bolest (Grundler *et al*, 2005).

S obzirom na to da je nalaz mutacije *FLT3 ITD* u svim studijama pokazao na lošiji ishod lečenja u ovih bolesnika, bolji rezultati lečenja mogu se postići primenom alogene transplantacije kostne srži u prvoj remisiji. Poboľšano ukupno preživljavanje i pedijatrijskih i odraslih bolesnika sa mutacijom *FLT3 ITD* ukoliko su lećeni transplantacijom kostnesrži pokazali su Meshinch i sradnici, a ukoliko se alogena transplantacija primeni u prvoj remisiji ishod lećenja bolesnika sa mutacijom *FLT3/ITD* se ne razlikuje od grupe koja nema mutaciju *FLT3* (DeZern *et al*, 2010). Alternativni postremisioni naćin lećenja za bolesnike koji su *FLT3/ITD*⁺ a koji nemaju davaoca bila bi autologa transplantacija, obzirom na to da je pokazano da je autologa transplantacija u prvoj remisiji efikasnija od konvencionalne hemioterapije (Singh *et al*, 2010).

Znaćajan napredak u razumevanju molekularne patogeneze AML još uvek nije istim tempom doveo i do poboljšanja rezultata lećenja. Dugotrajne remisije, odnosno izlećenje AML, moguće je u 35% odraslih bolesnika koji su uključeni klinićke studije. U grupi bolesnika starijih od 60 godina poboljšanja u rezultatu lećenja gotovo da i nema, sa izuzetkom APL, koja ima dobru prognozu bez obzira na životno doba.

Ipak, iako je dugo vremena smatrano da je konvencionalna hemioetrapija postigla maksimum efikasnosti, a da težište poboljšanja treba tražiti u imunoterapiji, transplantaciji kao i primeni lekova koji modifikuju aktivnost signalnih puteva vezanih za proliferaciju i diferencijaciju, novija saznanja ukazuju da još uvek postoji mogućnost za poboljšanje rezultata lečenja. Naime, povećanjem doze daunorubicina sa standardnih $45\text{mg}/\text{m}^2$ na $90\text{mg}/\text{m}^2$ postignuti su veći procenti kompletnih remisija kao i bolje sveukupno preživljavanje (Fernandez *et al*, 2009).

Druga mogućnost je primena ciljane terapije u vidu inhibitora konstitutivno aktivne tirozin kinaze koja je kodirana mutiranim ili neadekvatno eksprimiranim produktom *FLT3*.

In vitro je ispitana i dokazana aktivnost velikog broja supstanci koje imaju ovakvu aktivnost. U kliničkim studijama razmatra se primena CEP 701, PKC 412 i sorafeniba.

CEP 702 (lestaurtinib) je inhibitor autofosforilacije kako mutiranih tako i normalnih FLT 3 receptora. Kao mono terapija CEP 702 je pokazao nezadovoljavajuću aktivnost (smanjenje broja blasta ali bez postizanja kompletne remisije). *In vitro* je pokazano sinergističko dejstvo sa hemioterapijom tako da se u kliničkim studijama ispituje efikasnost ovakve kombinacije, kod bolesnika sa *de novo* AML i u recidivu bolesti.

PKC 412 ima sličan profil delovanja kao i lestaurtinib – kao monoterapija dovodi do smanjenja procenta blasta, ali ne i do kompletne remisije. U toku su randomizovane studije o efikasnosti ovog leka kada se primenjuje zajedno sa hemioterapijom.

Aktivnost inhibitora FLT3 kinaze pokazuje i lek sorafenib, koji pored konstitutivno aktivne FLT3/ITD kinaze, inhibira i niz drugih kinaza koji mogu imati kliničkog značaja u lečenju leukemija kinaza (RAF, PDGFR, VEGFR). Ovaj lek je u Evropi i Americi odobren za lečenje karcinoma jetre i bubrega. Klinički podaci ukazuju na aktivnost sorafeniba kod *de novo* bolesnika sa mutacijom *FLT3/ITD*, ali i kod bolesnika u recidivu ili primarno rezistentnih na terapiju (Inaba *et al*, 2010). Naročito je zanimljiva mogućnost primene sorafeniba i kod bolesnika kod kojih je predviđena ili urađena alogena transplantacija kosne srži. Za razliku od prethodno navedenih supstanci, sorafenib je efikasan i kada se primeni kao monoterapija (Metzelder *et al*, 2009).

Uticaj navedenih genetskih lezija na ishod lečenja AML mogu da modifikuju i mutacije u drugim genima. Tako, mutacija u genu za izocitrat dehidrogenazu (IDH) je doprinoseći faktor lošem ishodu bolesnika sa genotipom *FLT3ITD/NPM1*⁺, što je nalaz koji može da doprinese donošenju racionalnijih terapijskih odluka (Schittiger *et al*, 2010).

Nalaz mutiranog nukleofosmina ima ne samo prognostički već i potencijalno terapijski značaj. Naime, kod bolesnika koji istovremeno imaju i mutaciju *IDH* i *NPM1* dodatak *all* trans retinoične kiseline može da poboljša rezultate lečenja (Pascha *et al*, 2010; Kutny *et al*, 2010).

Hipoteza „two-hit“ govori o neophodnosti udruženog delovanja genetičkih promena (Klase I i II mutacija) koje dovode do stvaranja leukemijskog klon. Udruženo leukemogeno delovanje mutacija *NPM1* i *FLT3/ITD* mutacija pokazano je i na animalnim eksperimentalnim modelima (Rau *et al*, 2010).

Bolje poznavanje veoma kompleksnih mehanizama genetskih promena *FLT3* verovatno će u narednim godinama doprineti i razvoju posebno prilagođene terapije za različite vrste genetskih lezija.

VI ZAKLJUČAK

Na osnovu rezultata ispitivanja kojim je obuhvaćeno 42 pedijatrijska i 92 odrasla bolesnika u kojih su ispitivane kliničke, hematološke, imunološke, citogenetske i molekularne odlike AML zaključeno je sledeće:

1. Uzrast i pol u dece nisu značajno uticali na verovatnoću preživljavanja, za razliku od odraslih bolesnika u kojih su starije životno doba i muški pol bili povezani sa kraćim preživljavanjem.

2. Splenomegalija, limfadenopatija, anemija i povišena aktivnost LDH u grupi odraslih bolesnika bili su statistički značajno povezani sa kraćim preživljavanjem

3. U grupi odraslih bolesnika neki fenotipski markeri imali su prognostički značaj; ekspresija CD7 i CD117 bila je statistički veoma značajno povezana sa izostankom remisije i kraćim vremenom preživljavanja

4. Citogenetska analiza je jedan od najznačajnijih prognoznih faktora u grupi odraslih bolesnika. Bolesnici u grupi standardnog rizika imali su statistički značajno bolje preživljavanje u poređenju sa bolesnicima koji su pripadali grupi srednjeg i visokog rizika; nije bilo značajne razlike u preživljavanju bolesnika u grupi srednjeg i visokog rizika.

U grupi pedijatrijskih bolesnika citogenetski nalaz nije bio značajno povezan sa verovatnoćom preživljavanja.

5. U grupi pedijatrijskih bolesnika mutacije *FLT3* nađene su sa učestalošću od 9,5% (4/42); frekvencije ispitivanih mutacija *FLT3* su bile podjednake - po 4,7% bolesnika (2/42) su imali *FLT3/ITD* i *FLT3/TKD*. Mutacije *FLT3* su povezane sa leukocitozom i izostankom remisije.

6. Mutacija *NPM1* nađena je kod 2,7% (1/37) pedijatrijskih bolesnika. Nađena mutacija je tipa Q.

7. Ista mutacija u genu za nukleofosmin je nađena i u recidivu bolesti 19 meseci od postavljanja dijagnoze; ovaj nalaz opravdava potencijalnu ulogu *NPM1* kao markera minimalne rezidualne bolesti.

8. U grupi odraslih bolesnika mutacije *FLT3* nađene su sa učestalošću od 27,1% (25/92 bolesnika); mutacija *FLT3/ITD* nađena je kod 17,4% (16/92 bolesnika), dok je mutacija *FLT3/TKD* nađena sa učestalošću 9,8% (9/92 bolesnika)

9. U odraslih bolesnika mutacije *FLT3* statistički su bile značajno vezane sa CD34⁺, što je u skladu i sa nalazima drugih autora;

10. Mutacija *FLT3/ITD* je visoko značajan nepovoljan prognostički faktor dužine preživljavanja u odraslih bolesnika; mutacija *FLT3/TKD* u ovoj grupi bolesnika nije imala prognostički značaj.

11. Učestalost mutacija u genu za nukleofosmin u odraslih bolesnika je 14,1 % (13/92 bolesnika). Kod najvećeg broja bolesnika detektovana je mutacija tipa A, dok su u po jednog bolesnika detektovane mutacije tip K i tip D. .

12. Odrasli bolesnici koji su bili nosioci mutacija u genu za nukleofosmin imali su statistički značajno kraće preživljavanje u odnosu na bolesnike koji nisu bili nosioci ove mutacije; statistički značajna razlika je postojala i kada su iz analize izuzeti bolesnici sa mutacijama *FLT3*.

13. Tip hemioterapije odraslih bolesnika nije bio statistički značajno povezan sa verovatnoćom postizanja remisije kao ni verovatnoćom preživljavanja

14. Ostvarivanje kompletne hematološke remisije je bilo statistički visoko značajno povezano sa medijanom preživljavanja

15. U grupi odraslih bolesnika univarijantna analiza pokazala je statistički značajnu povezanost izostanka remisije sa: starijim životnim dobom, splenomegalijom, hepatomegalijom, anemijom, povišenom aktivnošću laktatne dehidrogenaze, ekspresijom markera CD7 i mutacijom *FLT3/ITD*.

16. Mutacije *NPM1* i *FLT3* su veoma retke u pedijatrijskih bolesnika zbog čega njihovo određivanje u ovih bolesnika nema prognostički značaj kao ni značaj za određivanje minimalne rezidualne bolesti kao kod odraslih.

VII LITERATURA

1. Abramovich C, Pineault N, Ohta H, Humphries RK. Hox genes: from leukemia to hematopoietic stem cell expansion. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1044:109-16.
2. Abu-Duhier FM, Goodeve AC, Wilson GA, Care RS, Peake IR, Reilly JT. Genomic structure of human FLT3: implications for mutational analysis. *Br J Haematol* 2001; 13:1076-7.
3. Agnès F, Shamoon B, Dina C, Rosnet O, Birnbaum D, Galibert F. Genomic structure of the downstream part of the human FLT3 gene: exon/intron structure conservation among genes encoding receptor tyrosine kinases (RTK) of subclass III. *Gene* 1994; 145(2):283-8.
4. Alcalay M, Tiacci E, Bergomas R, Bigerna B, Venturini E, Minardi SP et al. Acute myeloid leukemia bearing cytoplasmic nucleophosmin (NPMc+ AML) shows a distinct gene expression profile characterized by up-regulation of genes involved in stem-cell maintenance. *Blood* 2005; 106:899-902.
5. Amsellem S, Pflumio F, Bardinet D, Izac B, Charneau P, Romeo PH et al. Ex vivo expansion of human hematopoietic stem cells by direct delivery of the HOXB4 homeoprotein. *Nat Med* 2003; 9:1423-7.
6. Andersen MT, Andersen MK, Christiansen DH, Pedersen-Bjergaard J. NPM1 mutations in therapy-related acute myeloid leukemia with uncharacteristic features. *Leukemia* 2008; 22:951-5.
7. Andreeff M, Ruvolo V, Gadgil S, Zeng C, Coombes K, Chen W et al. HOX expression patterns identify a common signature for favorable AML. *Leukemia* 2008; 22:2041-7.
8. Arceci RJ. Acute myeloid leukemia. *SIOP educational book* 2007; 30-7.
9. Argiropoulos B, Humphries RK. Hox genes in hematopoiesis and leukemogenesis. *Oncogene* 2007; 26:6766-76
10. Armstrong SA, Staunton JE, Silverman LB, Pieters R, den Boer ML, Minden MD et al. MLL translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia. *Nat Genet* 2002; 30:41-7.
11. Awan A, Malcolm Taylor G, Gokhale DA, Dearden SP, Will A, Stevens RF, Birch JM, Eden T. Increased frequency of Fanconi anemia group C genetic variants in children with sporadic acute myeloid leukemia. *Blood* 1998; 91:4813-4
12. Beitinjaneh A, Jang S, Roukoz H, Majhail NS. 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.
13. Belson M, Kingsley B, Holmes A. Risk factors for acute leukemia in children: a review. *Environ Health Perspect* 2007; 115:138-45.
14. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med* 1985; 103:620-5.
15. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C. Criteria for the diagnosis of acute leukemia of megakaryocyte lineage (M7). A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med* 1985; 103:460-2.

16. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C. Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukaemia (AML-M0). *Br J Haematol* 1991; 78:325-9.
17. Bennett JM, Orazi A. Diagnostic criteria to distinguish hypocellular acute myeloid leukemia from hypocellular myelodysplastic syndromes and aplastic anemia: recommendations for a standardized approach. *Haematologica* 2009; 94:264-8.
18. Bienz M, Ludwig M, Leibundgut EO, Mueller BU, Ratschiller D, Solenthaler M et al. Risk assessment in patients with acute myeloid leukemia and a normal karyotype. *Clin Cancer Res* 2005; 11:1416-24.
19. Bolli N, De Marco MF, Martelli MP, Bigerna B, Pucciarini A, Rossi R et al. A dose-dependent tug of war involving the NPM1 leukaemic mutant, nucleophosmin, and ARF. *Leukemia* 2009; 23:501-9.
20. Bolli N, Payne EM, Grabher C, Lee JS, Johnston AB, Falini B et al. Expression of the cytoplasmic NPM1 mutant (NPMc+) causes the expansion of hematopoietic cells in zebrafish. *Blood* 2010; 115:3329-40.
21. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 1997; 3:730-7.
22. Bonnet D. Normal and leukaemic stem cells. *Br J Haematol* 2005; 130:469-79.
23. Breems DA, Van Putten WL, De Greef GE, Van Zelderren-Bhola SL, Gerssen-Schoorl KB, Mellink CH et al. Monosomal karyotype in acute myeloid leukemia: a better indicator of poor prognosis than a complex karyotype. *J Clin Oncol* 2008; 26:4791-7.
24. Brown P, McIntyre E, Rau R, Meshinchi S, Lacayo N, Dahl G et al. The incidence and clinical significance of nucleophosmin mutations in childhood AML. *Blood* 2007; 110:979-85.
25. Brown P, Meshinchi S, Levis M, Alonzo TA, Gerbing R, Lange B, Arceci R, Small D. Pediatric AML primary samples with FLT3/ITD mutations are preferentially killed by FLT3 inhibition. *Blood* 2004; 104:1841-9.
26. Cairoli R, Beghini A, Grillo G, Nadali G, Elice F, Ripamonti CB et al. Prognostic impact of c-KIT mutations in core binding factor leukemias: an Italian retrospective study. *Blood* 2006; 107:3463-8.
27. Cassileth PA, Harrington DP, Appelbaum FR, Lazarus HM, Rowe JM, Paietta E et al. Chemotherapy compared with autologous or allogeneic bone marrow transplantation in the management of acute myeloid leukemia in first remission. *N Engl J Med* 1998; 339:1649-56.
28. Cazzaniga G, Dell'Oro MG, Mecucci C, Giarin E, Masetti R, Rossi V et al. Nucleophosmin mutations in childhood acute myelogenous leukemia with normal karyotype. *Blood* 2005; 106:1419-22.
29. Chauhan PS, Bhushan B, Mishra AK, Singh LC, Saluja S, Verma S et al. Mutation of FLT3 gene in acute myeloid leukemia with normal cytogenetics and its association with clinical and immunophenotypic features. *Med Oncol* 2010 Mar 31 [Epub ahead of print].
30. Chen AR, Alonzo TA, Woods WG, Arceci RJ. Current controversies: which patients with acute myeloid leukaemia should receive a bone marrow transplantation? - an American view. *Br J Haematol* 2002; 118:378-84.
31. Chen W, Rassidakis GZ, Medeiros LJ. Nucleophosmin gene mutations in acute myeloid leukemia. *Arch Pathol Lab Med* 2006; 130:1687-92.

32. Cheng K, Grisendi S, Clohessy JG, Majid S, Bernardi R, Sportoletti P, Pandolfi PP. The leukemia-associated cytoplasmic nucleophosmin mutant is an oncogene with paradoxical functions: Arf inactivation and induction of cellular senescence. *Oncogene* 2007; 26:7391-400.
33. Chou WC, Tang JL, Lin LI, Yao M, Tsay W, Chen CY et al. Nucleophosmin mutations in de novo acute myeloid leukemia: the age-dependent incidences and the stability during disease evolution. *Cancer Res* 2006; 66:3310-6.
34. Clark J, Bernman J, Look T. Myeloid leukemia, myelodysplasia, and myeloproliferative disease in children. In: Orkin SH et al, editors. *Oncology of Infancy and Childhood*. 1th ed. Philadelphia: Sunders Elsevier; 2009.p.331-416.
35. Clark JJ, Smith FO, Arceci RJ. Update in childhood acute myeloid leukemia: recent developments in the molecular basis of disease and novel therapies. *Curr Opin Hematol* 2003; 10:31-9.
36. Colombo E, Marine JC, Danovi D, Falini B, Pelicci PG. Nucleophosmin regulates the stability and transcriptional activity of p53. *Nat Cell Biol* 2002; 4:529-33.
37. Colovic M, Jankovic G, Suvajdzic N, Kraguljac N. Cytologically distinct acute leukemia in sibs exposed to the same leukemogen. *Haematologia* 1996; 27:209-10.
38. Colovic N, Tosic N, Aveic S, Djuric M, Milic N, Bumbasirevic V, Colovic M, Pavlovic S. Importance of early detection and follow-up of FLT3 mutations in patients with acute myeloid leukemia. *Ann Hematol* 2007; 86:741-7.
39. Colović N, Colović M, Cemerikić V, Terzić T, Ivanović S, Skender M, Bosković D. Granulocytic sarcoma of the brain in a patient with acute myeloid leukemia. *Acta Chir Iugosl* 2004; 5:129-31.
40. Creutzig U, Reinhardt D, Diekamp S, Dworzak M, Stary J, Zimmermann M. AML patients with Down syndrome have a high cure rate with AML-BFM therapy with reduced dose intensity. *Leukemia* 2005; 19:1355-60.
41. Creutzig U, Reinhardt D. Current controversies: which patients with acute myeloid leukaemia should receive a bone marrow transplantation? - a European view. *Br J Haematol* 2002; 118:365-77.
42. Creutzig U, Zimmermann M, Dworzak M, Bourquin J, Neuhoff C, Sander A et al. Study BFM AML 2004: improved survival in childhood acute myeloid leukemia without increased toxicity. *Blood* 2010; 116:83.
43. Creutzig U, Zimmermann M, Ritter J, Reinhardt D, Hermann J, Henze G et al. Treatment strategies and long-term results in paediatric patients treated in four consecutive AML-BFM trials. *Leukemia* 2005; 19:2030-42.
44. Čolović N. Značaj karotipskih anomalija u prognozi akutne mijeloidne leukemije. Rad iz uže specijalizacije. Medicinski fakultet u Beogradu; 2008.g.
45. Čolović M, Janković G. Maligne bolesti krvi. Zavod za udžbenike I nastavna sredstva Beograd 1999; 81-119.
46. Čolović N. Značaj FLT3 mutacija u akutnoj mijeloidnoj leukemiji i korelacija sa citološkim, citogenetskim i imunofenotipskim osobinama. Doktorska disertacija. Medicinski fakultet u Beogradu; 2006. godina.
47. DeZern A, Sung A, Kim S, Tsai H, Kowalski J, Smith B et al. Patients with FLT3/ITD AML may benefit from allogeneic transplant in first remission: outcomes from a consecutive series of patients at a single institution. *Blood* 2010; 116:869.

48. Dixon N, Kishnani PS, Zimmerman S. Clinical manifestations of hematologic and oncologic disorders in patients with Down syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2006; 142:149-57.
49. Döhner H. Implication of the Molecular Characterization of Acute Myeloid Leukemia. *Hematology* 2007; 412-419
50. Dokal I. Fanconi anemia is a highly penetrant cancer susceptibility syndrome. *Haematologica* 2008; 93:486-8.
51. Dombret H, Chastang C, Fenaux P, Reiffers J, Bordessoule D, Bouabdallah R et al. A controlled study of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in elderly patients after treatment for acute myelogenous leukemia. *AML Cooperative Study Group. N Engl J Med* 1995; 332:1678-83.
52. Dombret H, Raffoux E, Gardin C. New insights in the management of elderly patients with acute myeloid leukemia. *Curr Opin Oncol* 2009; 21:589-93.
53. Dvorak CC, Agarwal R, Dahl GV, Gregory JJ, Feusner JH. Hematopoietic stem cell transplant for pediatric acute promyelocytic leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant* 2008; 14:824-30.
54. Elezović I. Fibrinoliza i fibrinogenoliza u akutnoj leukemiji. Doktorska teza. Medicinski fakultet Beograd; 1994.g.
55. Emanuel PD. Juvenile myelomonocytic leukemia and chronic myelomonocytic leukemia. *Leukemia*. 2008; 22:1335-42.
56. Estey E, Döhner H. Acute myeloid leukaemia. *Lancet* 2006; 368:1894-907.
57. Falini B, Martelli MP, Bolli N, Bonasso R, Ghia E, Pallotta MT et al. Immunohistochemistry predicts nucleophosmin (NPM) mutations in acute myeloid leukemia. *Blood* 2006; 108:1999-2005.
58. Falini B, Martelli MP, Mecucci C, Liso A, Bolli N, Bigerna B, Pucciarini A, Pileri S, Meloni G, Martelli MF, Haferlach T, Schnittger S. Cytoplasmic mutated nucleophosmin is stable in primary leukemic cells and in a xenotransplant model of NPMc+ acute myeloid leukemia in SCID mice. *Haematologica* 2008; 93:775-9.
59. Falini B, Mecucci C, Saglio G, Lo Coco F, Diverio D, Brown P et al. NPM1 mutations and cytoplasmic nucleophosmin are mutually exclusive of recurrent genetic abnormalities: a comparative analysis of 2562 patients with acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2008; 93:439-42.
60. Falini B, Mecucci C, Tiacci E, Alcalay M, Rosati R, Pasqualucci L. Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *N Engl J Med*. 2005; 352:254-66.
61. Falini B, Nicoletti I, Bolli N, Martelli MP, Liso A, Gorello P et al. Translocations and mutations involving the nucleophosmin (NPM1) gene in lymphomas and leukemias. *Haematologica* 2007; 92:519-32.
62. Falini B. Therapy-related acute myeloid leukaemia with mutated *NPM1*: treatment induced or *de novo* in origin? *Leukemia* 2008; 22: 891-2.
63. Fernandez HF, Sun Z, Yao X, Litzow MR, Luger SM, Paietta EM. Anthracycline dose intensification in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2009; 361:1249-59.
64. Ferreira R, Ohneda K, Yamamoto M, Philipsen S. GATA1 function, a paradigm for transcription factors in hematopoiesis. *Mol Cell Biol* 2005; 25:1215-27.
65. Foran JM. New prognostic markers in acute myeloid leukemia: perspective from the clinic. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2010; 2010:47-55.

66. Frankel AE, Weir MA, Hall PD, Hogge DE, Rizzieri DA. Diphtheria toxin-interleukin 3 fusin protein therapy of patients with elderly or relapsed/refractory acute myeloid leukemia (AML)[abstract]. *J Clin Oncol* 2006; 24: 6569.
67. Fröhling S, Schlenk RF, Breitruck J, Benner A, Kreitmeier S, Tobis K et al. Prognostic significance of activating FLT3 mutations in younger adults (16 to 60 years) with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the AML Study Group Ulm. *Blood* 2002; 100:4372-80.
68. Fröhling S, Scholl C, Bansal D, Huntly BJ. HOX gene regulation in acute myeloid leukemia: CDX marks the spot? *Cell Cycle* 2007; 6:2241-5.
69. Garcia-Fernández J. The genesis and evolution of homeobox gene clusters. *Nat Rev Genet* 2005; 6:881-92.
70. Garzon R, Garofalo M, Martelli MP, Briesewitz R, Wang L, Fernandez-Cymering C et al. Distinctive microRNA signature of acute myeloid leukemia bearing cytoplasmic mutated nucleophosmin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105:3945-50.
71. George B, Mathews V, Poonkuzhali B, Shaji RV, Srivastava A, Chandy M. Treatment of children with newly diagnosed acute promyelocytic leukemia with arsenic trioxide: a single center experience. *Leukemia* 2004; 18:1587-90.
72. Gilliland DG, Griffin JD. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood* 2002; 100:1532-42.
73. Gluckman E. Radiosensitivity in Fanconi anemia: application to the conditioning for bone marrow transplantation. *Radiother Oncol* 1990; 18 Suppl 1:88-93.
74. Greaves M. Molecular genetics, natural history and the demise of childhood leukaemia. *Eur J Cancer* 1999; 35:1941-53.
75. Grier DG, Thompson A, Kwasniewska A, McGonigle GJ, Halliday HL, Lappin TR. The pathophysiology of HOX genes and their role in cancer. *J Pathol* 2005; 205:154-71.
76. Grimwade D, Biondi A, Mozziconacci MJ, Hagemeijer A, Berger R, Neat M, et al. Characterization of acute promyelocytic leukemia cases lacking the classic t(15;17): results of the European Working Party. Groupe Francais de Cytogenetique Hematologique, Groupe de Francais d'Hematologie Cellulaire, UK Cancer Cytogenetics Group and BIOMED 1 European Community-Concerted Action "Molecular Cytogenetic Diagnosis in Haematological Malignancies". *Blood* 2000; 96:1297-308.
77. Grimwade D, Hills RK. Independent prognostic factors for AML outcome. *Hematology AM Soc Hematol Educ Program* 2009; 385-95.
78. Grisendi S, Bernardi R, Rossi M, Cheng K, Khandker L, Manova K et al. Role of nucleophosmin in embryonic development and tumorigenesis. *Nature* 2005; 437:147-53
79. Grisendi S, Mecucci C, Falini B, Pandolfi PP. Nucleophosmin and cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; 6:493-505.
80. Grummitt CG, Townsley FM, Johnson CM, Warren AJ, Bycroft M. Structural consequences of nucleophosmin mutations in acute myeloid leukemia. *J Biol Chem* 2008; 283:23326-32.
81. Gundestrup M, Storm HH. Radiation-induced acute myeloid leukaemia and other cancers in commercial jet cockpit crew: a population-based cohort study. *Lancet* 1999; 354:2029-31.

-
82. Gutmann DH. The neurofibromatoses: when less is more. *Hum Mol Genet* 2001; 10:747-55.
 83. Haferlach C, Dicker F, Herholz H, Schnittger S, Kern W, Haferlach T. Mutations of the TP53 gene in acute myeloid leukemia are strongly associated with a complex aberrant karyotype. *Leukemia* 2008; 22:1539-41.
 84. Haferlach C, Mecucci C, Schnittger S, Kohlmann A, Mancini M, Cuneo A et al. AML with mutated NPM1 carrying a normal or aberrant karyotype show overlapping biological, pathological, immunophenotypic, and prognostic features. *Blood* 2009; 114:3024-32
 85. Harrison CJ, Hills RK, Moorman AV, Grimwade DJ, Hann I, Webb DK et al. Cytogenetics of childhood acute myeloid leukemia: United Kingdom Medical Research Council Treatment trials AML 10 and 12. *J Clin Oncol* 2010; 28:2674-81.
 86. Hasle H, Abrahamsson J, Arola M, Karow A, O'Marcaigh A, Reinhardt D et al. Myeloid leukemia in children 4 years or older with Down syndrome often lacks GATA1 mutation and cytogenetics and risk of relapse are more akin to sporadic AML. *Leukemia* 2008; 22:1428-30.
 87. Hasle H, Alonzo TA, Auvrignon A, Behar C, Chang M, Creutzig U et al. Monosomy 7 and deletion 7q in children and adolescents with acute myeloid leukemia: an international retrospective study. *Blood* 2007; 109:4641-7.
 88. Hasle H. Pattern of malignant disorders in individuals with Down's syndrome. *Lancet Oncol* 2001; 2:429-36.
 89. Hingorani K, Szebeni A, Olson MO. Mapping the Functional Domains of Nucleolar Protein B23*. *J Biol Chem* 2000; 275: 24451-7.
 90. Hollink IH, Zwaan CM, Zimmermann M, Arentsen-Peters TC, Pieters R, Cloos J et al. Favorable prognostic impact of NPM1 gene mutations in childhood acute myeloid leukemia, with emphasis on cytogenetically normal AML. *Leukemia* 2009; 23:262-70.
 91. Hunger SP, McGavran L, Meltesen L, Parker NB, Kassenbrock CK, Bitter MA. Oncogenesis in utero: fetal death due to acute myelogenous leukaemia with an MLL translocation. *Br J Haematol* 1998; 103:539-42.
 92. Inaba H, Rubintz J, Coustain-Smith E, Li L, Furmanski B, Mascara G et al. Clinical activity, pharmacokinetics and pharmacodynamics of sorafenib in pediatric acute myeloid leukemia. *Blood* 2010; 116:469.
 93. Iversen PO, Wiig H. Tumor necrosis factor alpha and adiponectin in bone marrow interstitial fluid from patients with acute myeloid leukemia inhibit normal hematopoiesis. *Clin Cancer Res* 2005; 11:6793-9.

 94. Iwai T, Yokota S, Nakao M, Okamoto T, Taniwaki M, Onodera N et al. Internal tandem duplication of the FLT3 gene and clinical evaluation in childhood acute myeloid leukemia. The Children's Cancer and Leukemia Study Group, Japan. *Leukemia* 1999; 13:38-43.
 95. James W. Vardiman, Nancy Lee Harris, and Richard D. Brunning. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* 2002; 100:2292-2302.
-

96. Jamieson CH, Ailles LE, Dylla SJ, Muijtjens M, Jones C, Zehnder JL et al. Granulocyte-macrophage progenitors as candidate leukemic stem cells in blast-crisis CML. *N Engl J Med* 2004; 351:657-67.
97. Janic D, Jovanovic N, Dokmanovic L, Brasanac D, Smoljanic Z, Lazic J, Rodic P. Myeloid sarcoma presenting with bilateral proptosis and kidney infiltration. *Pediatr Hematol Oncol* 2007; 24:141-8.
98. Jin L, Hope KJ, Zhai Q, Smadja-Joffe F, Dick JE. Targeting of CD44 eradicates human acute myeloid leukemic stem cells. *Nat Med* 2006; 12:1167-74.
99. Jin L, Lee EM, Ramshaw HS, Busfield SJ, Peoppl AG, Wilkinson L et al. Monoclonal antibody-mediated targeting of CD123, IL-3 receptor alpha chain, eliminates human acute myeloid leukemic stem cells. *Cell Stem Cell* 2009; 5:31-42.
100. Jordan CT, Upchurch D, Szilvassy SJ, Guzman ML, Howard DS, Pettigrew AL et al. The interleukin-3 receptor alpha chain is a unique marker for human acute myelogenous leukemia stem cells. *Leukemia* 2000; 14:1777-84.
101. Jordan TC, Guzman ML, Noble M. Cancer Stem Cells. *N Engl J Med* 2006; 355:1253-61.
102. Juliusson G, Antunovic P, Derolf A, Lehmann S, Möllgård L, Stockelberg D et al. Age and acute myeloid leukemia: real world data on decision to treat and outcomes from the Swedish Acute Leukemia Registry. *Blood* 2009; 113:4179-87
103. Karnoub A, Weinberg R. Ras oncogenes: split personalities. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9:517-31.
104. Kell WJ, Burnett AK, Chopra R, Yin JA, Clark RE, Rohatiner A, et al. A feasibility study of simultaneous administration of gemtuzumab ozogamicin with intensive chemotherapy in induction and consolidation in younger patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2003; 102:4277-83.
105. Kern W, Haferlach C, Bacher U, Haferlach T, Schnittger S. Flow cytometric identification of acute myeloid leukemia with limited differentiation and NPM1 type A mutation: a new biologically defined entity. *Leukemia* 2009; 23:1361-4.
106. Kiyoi H, Ohno R, Ueda R, Saito H, Naoe T. Mechanism of constitutive activation of FLT3 with internal tandem duplication in the juxtamembrane domain. *Oncogene* 2002; 21:2555-63.
107. Klump H, Schiedlmeier B, Baum C. Control of self-renewal and differentiation of hematopoietic stem cells: HOXB4 on the threshold. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1044:6-15.
108. Knapper S. FLT3 inhibition in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2007; 138:687-99.
109. Knudson AG Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1971; 68:820-3.
110. Kottaridis PD, Gale RE, Frew ME, Harrison G, Langabeer SE, Belton AA et al. The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials. *Blood* 2001; 98:1752-9.
111. Krstovski N, Tosic N, Janic D, Dokmanovic L, Kuzmanovic M, Spasovski V, Pavlovic S. Incidence of FLT3 and nucleophosmin gene mutations in childhood

-
- acute myeloid leukemia: Serbian experience and the review of the literature. *Med Oncol* 2010; 27:6405.
112. Kuntz M, Moser B, Gregory J, Woods W, Feusner J, Mesinchi M. FLT3 mutations are prevalent and are significantly associated with induction death in pediatric acute promyelocytic leukemia. A report from the Childrens Oncology Group. *Blood* 2010; 116:331.
 113. Kutny M, Collins S, Loeb K, Walter R, Meshinchi S. All trans retinoic acid causes extensive differentiation in the NPM mutant Non APL leukemic cell line OCT-AML3. *Blood* 2010; 116: 1354
 114. Lacayo NJ, Meshinchi S, Kinnunen P, Yu R, Wang Y, Stuber CM, Douglas L et al. Gene expression profiles at diagnosis in de novo childhood AML patients identify FLT3 mutations with good clinical outcomes. *Blood* 2004; 104:2646-54.
 115. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*. 1994; 367:645-8.
 116. Leith CP, Kopecky KJ, Godwin J, McConnell T, Slovak ML, Chen IM et al. Acute myeloid leukemia in the elderly: assessment of multidrug resistance (MDR1) and cytogenetics distinguishes biologic subgroups with remarkably distinct responses to standard chemotherapy. A Southwest Oncology Group study. *Blood* 1997; 89:3323-9.
 117. Levis M, Pham R, Smith BD, Small D. In vitro studies of a FLT3 inhibitor combined with chemotherapy: sequence of administration is important to achieve synergistic cytotoxic effects. *Blood* 2004; 104:1145-50.
 118. Li J, Sejas DP, Rani R, Koretsky T, Bagby GC, Pang Q. Nucleophosmin regulates cell cycle progression and stress response in hematopoietic stem/progenitor cells. *J Biol Chem* 2006; 281:16536-45.
 119. Li Y, Li H, Wang MN, Lu D, Bassi R, Wu Y et al. Suppression of leukemia expressing wild-type or ITD-mutant FLT3 receptor by a fully human anti-FLT3 neutralizing antibody. *Blood* 2004; 104:1137-44.
 120. Liang DC, Shih LY, Hung IJ, Yang CP, Chen SH, Jaing TH et al. FLT3-TKD mutation in childhood acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2003; 17:883-6.
 121. Lodewyck T, Cornelissen JJ. Allogeneic stem cell transplantation in acute myeloid leukemia: a risk-adapted approach. *Blood Rev* 2008; 22:293-302.
 122. Look AT. Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. *Science* 1997; 278:1059-64.
 123. LoPiccolo J, Blumenthal GM, Bernstein WB, Dennis PA. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway: effective combinations and clinical considerations. *Drug Resist Upda* 2008; 11:32-50.
 124. Löwenberg B. Acute myeloid leukemia: the challenge of capturing disease variety. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2008:1-11.
 125. Maggi LB Jr, Kuchenruether M, Dadey DY, Schwoppe RM, Grisendi S, Townsend RR, Pandolfi PP, Weber JD. Nucleophosmin serves as a rate-limiting nuclear export chaperone for the Mammalian ribosome. *Mol Cell Biol* 2008; 28:7050-65.
 126. Marcucci G, Maharry K, Whitman SP, Vukosavljevic T, Paschka P, Langer C et al. High expression levels of the ETS-related gene, ERG, predict adverse outcome and improve molecular risk-based classification of cytogenetically
-

-
- normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B Study. *J Clin Oncol* 2007; 25:3337-43.
127. Martelli AM, Evangelisti C, Chiarini F, Grimaldi C, Cappellini A, Ognibene A, McCubrey JA. The emerging role of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin signaling network in normal myelopoiesis and leukemogenesis. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1803:991-1002.
128. Martelli AM, Evangelisti C, Chiarini F, Grimaldi C, Manzoli L, McCubrey JA. Targeting the PI3K/AKT/mTOR signaling network in acute myelogenous leukemia. *Expert Opin Investig Drugs* 2009; 18:1333-49.
129. Martelli MP, Manes N, Pettirossi V, Liso A, Pacini R, Mannucci R et al. Absence of nucleophosmin leukaemic mutants in B and T cells from AML with NPM1 mutations: implications for the cell of origin of NPMc+ AML. *Leukemia* 2008; 22:195-8.
130. Martin MG, Abboud CN. Induction therapy for elderly patients with acute myeloid leukemia. *Blood Rev* 2008; 22:311-20.
131. Matasar MJ, Ritchie EK, Consedine N, Magai C, Neugut AI. Incidence rates of acute promyelocytic leukemia among Hispanics, blacks, Asians, and non-Hispanic whites in the United States. *Eur J Cancer Prev* 2006; 15:367-70
132. McCormick SR, McCormick MJ, Grutkoski PS, Ducker GS, Banerji N, Higgins RR et al. FLT3 mutations at diagnosis and relapse in acute myeloid leukemia: cytogenetic and pathologic correlations, including cuplike blast morphology. *Arch Pathol Lab Med* 2010; 134:1143-51.
133. Mehta PA, Ileri T, Harris RE, Williams DA, Mo J, Smolarek T, Auerbach AD, Kelly P, Davies SM. Chemotherapy for myeloid malignancy in children with Fanconi anemia. *Pediatr Blood Cancer* 2007; 48:668-72.
134. Meloni G, Mancini M, Gianfelici V, Martelli MP, Foa R, Falini B. Late relapse of acute myeloid leukemia with mutated NPM1 after eight years: evidence of NPM1 mutation stability. *Haematologica* 2009; 94:298-300.
135. Meshinchi S, Woods WG, Stirewalt DL, Sweetser DA, Buckley JD, Tjoa TK et al. Prevalence and prognostic significance of Flt3 internal tandem duplication in pediatric acute myeloid leukemia. *Blood* 2001; 97:89-94.
136. Metzelder S, Wang Y, Wollmer E, Wanzel M, Teichler S, Chaturvedi A et al. Compassionate use of sorafenib in FLT3-ITD-positive acute myeloid leukemia: sustained regression before and after allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 2009; 113:6567-71.
137. Metzeler KH, Dufour A, Benthous T, Hummel M, Sauerland MC, Heinecke A et al. ERG expression is an independent prognostic factor and allows refined risk stratification in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a comprehensive analysis of ERG, MN1, and BAALC transcript levels using oligonucleotide microarrays. *J Clin Oncol* 2009; 27:5031-8.
138. Miller K, Daoust P. Clinical manifestations of acute myeloid leukemia. In: Hoffman R, Benz E, Shattil s, Furie B, Cohen H, Silberstein L, McGlave P, editors. *Hematology. Basic principles and practice*. Philadelphia, Elsevier; 2005: p.1071-97.
-

139. Minami Y, Stuart SA, Ikawa T, Jiang Y, Banno A, Hunton IC et al. BCR-ABL-transformed GMP as myeloid leukemic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105:17967-72.
140. Moore MA, Chung KY, Plasilova M, Schuringa JJ, Shieh JH, Zhou P et al. NUP98 dysregulation in myeloid leukemogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1106:114-42.
141. Mori H, Colman SM, Xiao Z, Ford AM, Healy LE, Donaldson C, Hows JM, Navarrete C, Greaves M. Chromosome translocations and covert leukemic clones are generated during normal fetal development. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99:8242-7.
142. Morris SW, Kirstein MN, Valentine MB, Dittmer KG, Shapiro DN, Saltman DL et al. Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science* 1994; 263:1281-416.
143. Motyckova G, Stone RM. The role of molecular tests in acute myelogenous leukemia treatment decisions. *Curr Hematol Malig Rep* 2010; 5:109-17.
144. Mrózek K, Heerema NA, Bloomfield CD. Cytogenetics in acute leukemia. *Blood Rev* 2004; 18:115-36.
145. Mrózek K, Marcucci G, Paschka P, Whitman SP, Bloomfield CD. Clinical relevance of mutations and gene-expression changes in adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics: are we ready for a prognostically prioritized molecular classification? *Blood* 2007; 109:431-48.
146. Mullighan CG, Kennedy A, Zhou X, Radtke I, Phillips LA, Shurtleff SA, Downing JR. Pediatric acute myeloid leukemia with NPM1 mutations is characterized by a gene expression profile with dysregulated HOX gene expression distinct from MLL-rearranged leukemias. *Leukemia* 2007; 21:2000-9.
147. Muñoz L, Nomdedéu JF, López O, Carnicer MJ, Bellido M, Aventín A et al. Interleukin-3 receptor alpha chain (CD123) is widely expressed in hematologic malignancies. *Haematologica* 2001; 86:1261-9.
148. *Nat Rev Cancer* 2003; 3:650-65.
149. Okazuka K, Masuko M, Seki Y, Hama H, Honma N, Furukawa T et al. Successful all-trans retinoic acid treatment of acute promyelocytic leukemia in a patient with NPM/RAR fusion. *Int J Hematol* 2007; 86:246-9.
150. Okuda M, Horn HF, Tarapore P, Tokuyama Y, Smulian AG, Chan PK et al. Nucleophosmin/B23 is a target of CDK2/cyclin E in centrosome duplication. *Cell* 2000; 103:127-40.
151. Palmqvist L, Argiropoulos B, Pineault N, Abramovich C, Sly LM, Krystal G et al. The Flt3 receptor tyrosine kinase collaborates with NUP98-HOX fusions in acute myeloid leukemia. *Blood* 2006; 108:1030-6.
152. Pascha P, Schlenk R, Ibanez M, Kagias A, Bullinger L, Gaidzik V et al. Isocitrate dehydrogenase gene mutations in elderly patients with acute myeloid leukemia (AML) and outcome after treatment with ALL trans retinoic acid : A study of the German-Austrian AML study group. *Blood* 2010;
153. Pasqualucci L, Liso A, Martelli MP, Bolli N, Pacini R, Tabarrini A et al. Mutated nucleophosmin detects clonal multilineage involvement in acute myeloid leukemia: Impact on WHO classification. *Blood* 2006; 108:4146-55.

154. Pevny L, Lin CS, D'Agati V, Simon MC, Orkin SH, Costantini F. Development of hematopoietic cells lacking transcription factor GATA-1. *Development* 1995; 121:163-72.
155. Piekarz RL, Bates SE. Epigenetic modifiers: basic understanding and clinical development. *Clin Cancer Res* 2009; 15:3918-26.
156. Pollard JA, Alonzo TA, Gerbing RB, Ho PA, Zeng R, Ravindranath Y et al. Prevalence and prognostic significance of KIT mutations in pediatric patients with core binding factor AML enrolled on serial pediatric cooperative trials for de novo AML. *Blood* 2010; 115:2372-9.
157. Raimondi SC, Chang MN, Ravindranath Y, Behm FG, Gresik MV, Steuber CP et al. Chromosomal abnormalities in 478 children with acute myeloid leukemia: clinical characteristics and treatment outcome in a cooperative pediatric oncology group study-POG 8821. *Blood* 1999; 94:3707-16.
158. Raimondi SC, Dube ID, Valentine MB, Mirro J Jr, Watt HJ, Larson RA, et al. Clinicopathologic manifestations and breakpoints of the t(3;5) in patients with acute nonlymphocytic leukemia. *Leukemia* 1989; 3:42-7.
159. Rau R, Brown P. Nucleophosmin (NPM1) mutations in adult and childhood acute myeloid leukaemia: towards definition of a new leukaemia entity. *Hematol Oncol* 2009
160. Rau R, Magoon D, McIntyre E, Li L, Greenblatt S, Huso D et al. Cytoplasmic nucleophosmin (NPMc+) mutations and FMS like tyrosin kinase 3 (FLT3) internal tandem duplication (ITD) mutations cooperate to cause leukemia in the mouse model. *Blood* 2010; 116: 68
161. Rausei-Mills V, Chang KL, Gaal KK, Weiss LM, Huang Q. Aberrant expression of CD7 in myeloblasts is highly associated with de novo acute myeloid leukemias with FLT3/ITD mutation. *Am J Clin Pathol* 2008; 129:624-9.
162. Ravandi F, Cortes JE, Jones D, Faderl S, Garcia-Manero G, Konopleva MY et al. Phase I/II study of combination therapy with sorafenib, idarubicin, and cytarabine in younger patients with acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2010; 28:1856-62.
163. Récher C, Beyne-Rauzy O, Demur C, Chicanne G, Dos Santos C, Mas VM et al. Antileukemic activity of rapamycin in acute myeloid leukemia. *Blood* 2005; 105:2527-34.
164. Reindl C, Bagrintseva K, Vempati S, Schnittger S, Ellwart JW, Wenig K et al. Point mutations in the juxtamembrane domain of FLT3 define a new class of activating mutations in AML. *Blood* 2006; 107:3700-7.
165. Reinhardt D, Creutzig U. Isolated myelosarcoma in children--update and review. *Leuk Lymphoma* 2002; 43:565-74.
166. Rice KL, Licht JD. HOX deregulation in acute myeloid leukemia. *J Clin Invest* 2007; 117:865-8.
167. Rombouts WJ, Blokland I, Löwenberg B, Ploemacher RE Biological characteristics and prognosis of adult acute myeloid leukemia with internal tandem duplications in the Flt3 gene. *Leukemia* 2000; 14:675-83.
168. Ross JA. Environmental and genetic susceptibility to MLL-defined infant leukemia. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2008; 39:83-6.
169. Rubnitz JE, Inaba H, Dahl G, Ribeiro RC, Bowman WP, Taub J et al. Minimal residual disease-directed therapy for childhood acute myeloid leukaemia: results of the AML02 multicentre trial. *Lancet Oncol* 2010; 11:543-52.

170. Sanz MA, Grimwade D, Tallman MS, Lowenberg B, Fenaux P, Estey EH et al. Management of acute promyelocytic leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* 2009; 113:1875-91.
171. Sanz MA, Vellenga E, Rayón C, Díaz-Mediavilla J, Rivas C, Amutio E et al. All-trans retinoic acid and anthracycline monochemotherapy for the treatment of elderly patients with acute promyelocytic leukemia. *Blood*. 2004; 104:3490-3.
172. Schittiger S, Haferlach C, Alpermann T, Kern W, Haferlach T. IDH mutations can be detected in 28.7% of all normal karyotype AML and have unfavourable impact on NPM1+/FLT3ITD⁻ genotype. *Blood* 2010; 116: 102.
173. Schlenk RF, Döhner K, Krauter J, Fröhling S, Corbacioglu A, Bullinger L et al. Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2008; 358:1909-18.
174. Schnittger S, Kern W, Tschulik C, Weiss T, Dicker F, Falini B, Haferlach C, Haferlach T. Minimal residual disease levels assessed by NPM1 mutation-specific RQ-PCR provide important prognostic information in AML. *Blood* 2009; 114:2220-31.
175. Schnittger S, Schoch C, Dugas M, Kern W, Staib P, Wuchter C et al. Analysis of FLT3 length mutations in 1003 patients with acute myeloid leukemia: correlation to cytogenetics, FAB subtype, and prognosis in the AMLCG study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease. *Blood* 2002; 100:59-66
176. Schnittger S, Schoch C, Kern W, Mecucci C, Tschulik C, Martelli MF et al. Nucleophosmin gene mutations are predictors of favorable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *Blood* 2005; 106:3733-9.
177. Schoch C, Haferlach T, Haase D, Fonatsch C, Löffler H, Schlegelberger B, Staib P, Sauerland MC, Heinecke A, Büchner T, Hiddemann W; German AML Cooperative Study Group. Patients with de novo acute myeloid leukaemia and complex karyotype aberrations show a poor prognosis despite intensive treatment: a study of 90 patients. *Br J Haematol* 2001; 112:118-26.
178. Schwartz S, Heinecke A, Zimmermann M, Creutzig U, Schoch C, Harbott J et al. Expression of the C-kit receptor (CD117) is a feature of almost all subtypes of de novo acute myeloblastic leukemia (AML), including cytogenetically good-risk AML, and lacks prognostic significance. *Leuk Lymphoma* 1999; 34:85-94.
179. Shimada A, Taki T, Kubota C, Tawa A, Horibe K, Tsuchida M et al. No nucleophosmin mutations in pediatric acute myeloid leukemia with normal karyotype: a study of the Japanese Childhood AML Cooperative Study Group. *Leukemia* 2007; 21:1307.
180. Shimoni A, Nagler A. Allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation in patients with acute myeloid leukemia in first complete remission: new answers for an old question. *Leukemia* 2005; 19:891-3.
181. Shipley JL, Butera JN. Acute myelogenous leukemia. *Exp Hematol* 2009; 37:649-58.
182. Singh H, Werner L, DeAngelo D, Amerin P, Wadleigh M, Ballen K et al. Comparison of high dose chemotherapy with autologous stem cell rescue versus consolidation therapy for patients <60 with cytogenetically normal AML and FLT3 ITD. *Blood* 2010; 116:1462
183. Small D. FLT3 mutations: biology and treatment. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2006; 178-84.

184. Smith FO, Broudy VC, Zsebo KM, Lampkin BC, Buckley CV, Buckley JD. Cell surface expression of c-kit receptors by childhood acute myeloid leukemia blasts is not of prognostic value: a report from the Childrens Cancer Group. *Blood* 1994; 84:847-52.
185. Smith MT, McHale CM, Wiemels JL, Zhang L, Wiencke JK, Zheng S et al. Molecular biomarkers for the study of childhood leukemia. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005; 206:237-45.
186. Stirewalt DL, Radich JP. The role of FLT3 in haematopoietic malignancies.
187. Stock W. Controversies in treatment of AML: case-based discussion. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2006; 185-91.
188. Suzuki R, Onizuka M, Kojima M, Shimada M, Okamura K, Fukagawa S et al. Prognostic significance of FLT3 internal tandem duplication and NPM1 mutations in acute myeloid leukemia in an unselected patient population. *Int J Hematol* 2007; 86:422-8.
189. Tallman MS, Abutalib SA, Altman JK. The double hazard of thrombophilia and bleeding in acute promyelocytic leukemia. *Semin Thromb Hemos* 2007; 33:330-8.
190. Tallman MS, Gilliland DG, Rowe JM. Drug therapy for acute myeloid leukemia. *Blood* 2005; 106:1154-63.
191. Tartaglia M, Niemeyer CM, Fragale A, Song X, Buechner J, Jung A et al. Somatic mutations in PTPN11 in juvenile myelomonocytic leukemia, myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. *Nat Gene*. 2003; 34:148-50.
192. Thiede C, Creutzig E, Reinhardt D, Ehninger G, Creutzig U. Different types of NPM1 mutations in children and adults: evidence for an effect of patient age on the prevalence of the TCTG-tandem duplication in NPM1-exon 12. *Leukemia* 2007; 21:366-7.
193. Tosić N, Stojiljković M, Colović N, Colović M, Pavlović S. Acute myeloid leukemia with NUP98-HOXC13 fusion and FLT3 internal tandem duplication mutation: case report and literature review. *Cancer Genet Cytogenet* 2009; 193:98-103
194. van Rhenen A, Feller N, Kelder A, Westra AH, Rombouts E, Zweegman S et al. High stem cell frequency in acute myeloid leukemia at diagnosis predicts high minimal residual disease and poor survival. *Clin Cancer Res* 2005; 11:6520-7.
195. Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* 2002; 100:2292-302.
196. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 2009; 114:937-51.
197. Vyas P, Ault K, Jackson CW, Orkin SH, Shivdasani RA. Consequences of GATA-1 deficiency in megakaryocytes and platelets. *Blood* 1999; 93:2867-75.
198. Weber JD, Taylor LJ, Roussel MF, Sherr CJ, Bar-Sagi D. Nucleolar Arf sequesters Mdm2 and activates p53. *Nat Cell Biol* 1999; 1:20-6.
199. Wiemels JL, Xiao Z, Buffler PA, Maia AT, Ma X, Dicks BM et al. In utero origin of t(8;21) AML1-ETO translocations in childhood acute myeloid leukemia. *Blood* 2002; 99:3801-5.

-
200. Wodnar-Filipowicz A. Flt3 ligand: role in control of hematopoietic and immune functions of the bone marrow. *News Physiol Sci* 2003; 18:247-51.
 201. Woods WG, Kobrinsky N, Buckley JD, Lee JW, Sanders J, Neudorf S. Timed-sequential induction therapy improves postremission outcome in acute myeloid leukemia: a report from the Children's Cancer Group. *Blood* 1996; 87:4979-89.
 202. Woods WG, Neudorf S, Gold S, Sanders J, Buckley JD, Barnard DR, Dusenbery K, DeSwarte J, Arthur DC, Lange BJ, Kobrinsky NL; Children's Cancer Group. A comparison of allogeneic bone marrow transplantation, autologous bone marrow transplantation, and aggressive chemotherapy in children with acute myeloid leukemia in remission. *Blood* 2001; 97:56-62
 203. Xavier AC, Ge Y, Taub JW. Down syndrome and malignancies: a unique clinical relationship: a paper from the 2008 william beaumont hospital symposium on molecular pathology. *J Mol Diagn* 2009; 11:371-80.
 204. Yendamuri S, Calin GA. The role of microRNA in human leukemia: a review. *Leukemia* 2009; 23:1257-63.
 205. Yokota S, Kiyoi H, Nakao M, Iwai T, Misawa S, Okuda T et al. Internal tandem duplication of the FLT3 gene is preferentially seen in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome among various hematological malignancies. A study on a large series of patients and cell lines. *Leukemia* 1997; 11:1605-9.
 206. Zwaan CM, Meshinchi S, Radich JP, Veerman AJ, Huismans DR, Munske L et al. FLT3 internal tandem duplication in 234 children with acute myeloid leukemia: prognostic significance and relation to cellular drug resistance. *Blood* 2003; 102:2387-94.

Dr Miloš Kuzmanović je rođen 1966. godine u Beogradu, gde je završio osnovnu i srednju školu. Medicinski fakultet u Beogradu je upisao 1986.g. a diplomirao 1992.g Magistarsku tezu "Citomofrološke I citogenetske odlike kostne i srži i periferne krvi u dece sa primarnim mijelodisplaznim sindromom" odbranio je decembra 1999.g.

Od 1994.g. zaposlen na Pedijatrijskoj klinici Instituta za zdravstvenu zaštitu majke i deteta u Beogradu. Od početka speijalističkog staža član je Službe za hematoonkologiju Instituta. Specijalistički ispit iz pedijatrije položio je 1998.g. Od decembra 2008.g. obavlja dužnost Načelnika Službe za hematoonkologiju.

U zvanje asistenta na predmetu Pedijatrija izabran je 2004. godine. Prognostički značaj mutacija gena za nukleofosmin u akutnim leukemijama kod dece", mentor prof.dr Milica Čolović odobrena je 2006.g..

Član je Međunarodnog udruženja za dečiju onkologiju (SIOP), Međunarodnog udruženja za trombozu i hemostazu (ISTH), Evropskog udruženja hematologa (EHA) i Američkog udruženja hematologa (ASH).

Kandidat
Dr Miloš Kuzmanović

Изјава о ауторству

Потписани-а Dr Miloš Kuzmanović

број уписа _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Prognostički značaj mutacija gena za nukleofosmin u
akutnim leukemijama u dece

- 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, 04.12.2012



Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Dr Miloš Kuzmanović

Број уписа _____

Студијски програм _____

Наслов рада Prognosistički značaj mutacija gena za nukleofosmin
~~u akutnim leukemijama u dece~~

Ментор Prof.dr Milica Čolović

Потписани Dr Miloš Kuzmanović

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, 04.12.2012.g.



Изјава о коришћењу

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

Prognostički značaj mutacija gena za nukleofosmin u akutnim leukemijama u decē

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).

Потпис докторанда

У Београду, 04.12.2012.g.

