

NAU NOM VE U MEDICINSKOG FAKULTETA  
UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Nau nog ve a Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 24. 09. 2015. godine, broj 4600/16, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

**„Prognosti ki faktori rane smrti i relapsa bolesti u akutnoj promijelocitnoj leukemiji“**

kandidata mr dr Mirjane Mitrovi , zaposlene na Medicinskom fakultetu u Beogradu kao aistent na katedri za internu medicinu i u Klini kom Centru Srbije u Beogradu, na Klinici za hematologiju. Mentor je Prof. dr Nada Suvajdži Vukovi .

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Biljana Mihaljevi , profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
2. Prof. dr Dragica Tomin, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
3. Nau ni savetnik dr Sonja Pavlovi , Institut za molekularnu genetiku i geneti ko inženjerstvo (IMGGI), Univerziteta u Beogradu.

Na osnovu analize priložene doktorske disertacije, komisija za ocenu završene doktorske disertacije jednoglasno podnosi Nau nom ve u Medicinskog fakulteta slede i

**IZVEŠTAJ**

**A) Prikaz sadržaja doktorske disertacije**

Doktorska disertacija mr sci Mirjane Mitrović napisana je na 130 strana i podeljena je na slede a poglavlja: Uvod, Ciljevi rada, Materijal i metode, Rezultati, Diskusija, Zaklju ci,

Literatura i Prilozi. U disertaciji se nalazi ukupno 15 slika, 30 dijagrama i 32 tabele. Doktorska disertacija tako e sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata, podatke o komisiji i spisak skra enica koriš enih u tekstu.

U **Uvodu** je definisana akutna promijelocitna leukemija (APL), na in njenog dijagnostikovanja i savremeni terapijski pristup, uz poseban osvrt na optimizaciju terapijskih protokola tokom poslednjih 20 godina. Osnovni uzroci neuspeha le enja bolesnika sa APL sa rana smrt (RS) i relaps bolesti (RB). Oba uzroka su u uvodu jasno definisana, uz opis evolucije definicije i RS i RB. Jasno su opisani uzroci RS i patofiziološki mehanizmi koji do nje dovode, uz poseban osvrt na hemoragijsku ranu smrt (HRS). Dat je uporedni pregled dosadašnjih literaturnih podataka u vezi prognoznih parametara za nastanak RS i RB, kao i strategija koje se predlažu za njihovu prevenciju. Tako e je naglašen zna aj pra enja (monitoringa) minimalne rezidualne bolesti (MRB).

**Ciljevi rada** su precizno definisani: utvr ivanje prediktivne vrednosti klini ko-laboratorijskih parametara (krvna slika, rutinski testovi hemostaze uz ISTH DIK skora (International Society of Thrombosis and Hemostasis Scoring System for disseminated intravascular coagulation), citološkog tipa bolesti, imunofenotipskih i molekularno-genetskih obeležja (izoforma *PML-RARA*, ekspresija Wilmsov tumor (*WT1*) gena i *FLT3-ITD* mutacije) za pojavu RS i RB. Ciljevi su tako e dizajniranje prognoznog skora za nastanak HRS, kao i utvr ivanje zna aja monitoringa ekspresije *WT1* gena kao markera MRB.

U poglavlju "**Materijal i metode**" navedeno je da je istraživanje sprovedeno u Klinici za hematologiju Klini kog centra Srbije i u Institutu za molekularnu genetiku i geneti ko inženjerstvo (IMGGI), Univerziteta u Beogradu. Precizno je opisan na in dijagnostike bolesnika koja je podrazumevala: kompletnu krvnu sliku ura enu na Coulter-ovom broja u; odre ivanje fibrinogena, protrombinskog vremena (PT), aktiviranog parcijalnog tromboplastinskog vremena (aPTT) odre ene na klasi nom koagulometru i D-dimera imunoturbodimetrijskom metodom; morfološku i citohemijsku analizu razmaza koštane srži obojenih po metodi May-Grunwald-Giemsma i mijeloperoksidazom; imunofenotipizaciju elija koštane srži odre enu na multikolornom proto nom citometru, direktnom imunofluorescentom tehnikom, sa komercijalnim monoklonalnim antitelima za ispitivanje

membranskih i intracelularnih antigena; klasi nu citogenetsku analizu metodom HG traka na nestimulisanoj koštanoj srži direktnom preparacijom a potom i dvadeset etvoro asovnom kultivacijom; testove molekularne genetike na uzorcima koštane srži: a. detekciju PML-RAR fuzionih transkripata standardizovanom RT-PCR metodom. b. detekciju *FLT3-ITD* i *FLT3-D835* mutacije PCR, odnosno PCR-RFLP (PCR -„restriction fragment lenght polymorphism“) metodom. c. ekspresiju *WT1* gena „real-time“ RQ-PCR metodom i primenom TaqMan tehnologije. Potom je opisan na in le enja bolesnika uz jasno definisanje pojmova RS i RB, kao i na in monitoringa MRB.

U poglavlju "**Rezultati**" detaljno su opisani i jasno predstavljeni svi dobijeni rezultati.

**Diskusija** je napisana jasno i pregledno, uz prikaz podataka drugih istraživanja sa uporednim pregledom dobijenih rezultata doktorske disertacije.

**Zaključci** sažeto prikazuju najvažnije nalaze koji su proistekli iz rezultata rada. Koriš ena **literatura** sadrži spisak od 123 reference.

## **B) Kratak opis postignutih rezultata**

U studijskoj grupi bolesnika RS je nastupila kod 22.67% bolesnika. Uzroci rane smrti bili su: krvarenje kod 59% bolesnika, diferencijacioni sindrom (DS) kod 23.5%, infekcija kod 2.67% i akutni infarkt miokarda kod 1.33%. Prediktori nastanka RS u univarijantnoj analizi bili su broj leukocita  $10 \times 10^9/L$ , opšte funkcionalno stanje sa vrednoš u ECOG skora 3, fibrinogen  $< 2 \text{ g/L}$ , PT  $< 50\%$ , ISTH DIK skor 6 i varijanrni oblik APL. Multivarijantna analiza identifikovala je leukocitozu, kao nezavisni prognozni faktor nastanka RS. Kako je krvarenje bilo naj eš i uzrok RS posebno su identifikovani prediktivni faktori. U univarijantnoj analizi za nastanak HRS zna ajni su bili: ECOG skor 3, vitalno ugrožavaju e krvarenje na prijemu, leukociti  $> 15 \times 10^9/$  i  $> 20 \times 10^9/L$ , fibrinogen  $< 2 \text{ g/L}$ , PT  $< 50\%$ , ISTH DIK skor 6 i ISTH DIK skor 7. Nezavisni prognozni parametri u multivarijantnoj analizi bili su: vitalno ugrožavaju e krvarenje na prijemu, leukociti  $> 20 \times 10^9/L$  i ISTH DIK skor 7. Na osnovu ovih rezultata dizajniran je prognozni skor za hemoragijsku ranu smrt: 0 poena su

dobijali bolesnici bez vitalno ugrožavajućeg krvarenja na prijemu, sa leukocitima  $< 20 \times 10^9/L$  i ISTH DIK skor  $< 7$ ; 1 poen bolesnici sa vitalno ugrožavajućim krvarenjem na prijemu i leukocitima  $> 20 \times 10^9/L$ ; 2 poena: ISTH DIK skor  $\geq 7$ . Na osnovu vrednosti skora bolesnici su klasifikovani u tri grupe: nizak rizik: 0 poena, umeren rizik: 1-2 poena i visok rizik: 3 poena. Uestalost RHS se značajno razlikovala između grupa: nizak rizik 2.4%, umeren 26.1%, visok rizik 100%.

Kompletnu remisiju (KR) postiglo je 77.33% bolesnika. Relaps APL je registrovan kod 13.79%, prosečno u 25. mesecu od postizanja KR (opseg 3 – 43 meseca). Bolesnici sa relapsom APL su imali prosečno veći broj leukocita na prezentaciji, često su ekspresirali CD56 antigen i *FLT3-ITD* mutaciju, kao i prekomernu ekspresiju *WT1* gena posle konsolidacije. Povećanje ekspresije *WT1* uočeno je takođe u uzorcima tokom relapsa ( $>1.5$  log u 2/6 (30%) relapsa,  $>1$  log kod 3/6 (50%) i  $<1$  log kod 1/6 (16.67%). U jednom slučaju porast ekspresije *WT1* gena je registrovan čak 6 meseci pre pojave *PML-RAR* pozitivnosti.

### **C) Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature**

Uestalost RS u studijskoj grupi iznosila je 22.67%, dok su velike kooperativne studijske grupe (Sanz M i saradnici. *Blood* 2009;113:1875-91; Tallman MS i saradnici. *Blood* 2002;100:4298-302; Avvisati G i saradnici. *Blood* 2002;100:3141-6; Lo-Coco F i saradnici. *Blood*. 2004;104:392) za APL saopštile uestalost RS  $< 10\%$ . Međutim, u poslednje vreme, velike populacione studije i registri (američki - Park JH i saradnici. *Blood* 2011;118:1248-54, kanadski - Paulson K i saradnici. *Br J Haematol* 2014;166:660-6, švedski - Lehmann S i saradnici. *Leukemia* 2011;25:1128-34), kao i neki pojedinačni centri (Brazil - Jacomo RH i saradnici. *Haematologica* 2007;92:1431-2; Turska - Serefhanoglu S i saradnici. *Leuk Res* 2010;34:317-9; Tunis - Jeddi R i saradnici. *Hematology* 2010;15(4):204-9) saopštavaju znatno veću uestalost RS od oko 30%. Krvarenje je bilo uzrok RS kod 59% naših bolesnika, što je u skladu sa saopštenjima PETHEMA, GIMEMA, švedske, brazilske i Turske grupe u kojima je hemoragija kao uzrok RS registrovana kod: 50%, 54.5%, 41%, 60.5% i 65% bolesnika.

Identifikovanje klinički ko-laboratorijskih parametara na prezentaciji APL, koji imaju prognostički značaj za nastanak RS, omogućilo bi formiranje prognostičkog skora i rano otkrivanje bolesnika sa visokom rizikom za nastanak RS i eventualni preemtivni terapijski pristup. Prediktori RS, identifikovani univarijantnom analizom u studijskoj grupi, bili su: broj leukocita  $10 \times 10^9/L$ , ECOG  $\leq 3$ , fibrinogen  $< 2 \text{ g/L}$ , PT  $< 50\%$ , ISTH DIK skor  $\leq 6$  i varijantni tip bolesti. Multivarijantna analiza je identifikovala samo broj leukocita  $10 \times 10^9/L$  kao nezavisni prognostički faktor RS. Do sada su u literaturi identifikovani brojni prognostički faktori za nastanak RS. Naime, u švedskoj populacionoj studiji kao prediktori RS identifikovani: starost  $> 55$  godina, ECOG 3-4, broj leukocita  $> 10 \times 10^9/L$ , povišen kreatinin u serumu, povišena vrednost CRP i LDH u serumu, hipoalbuminemija i trombocitopenija. Sa druge strane, američka populaciona studija je identifikovala samo životnu dob  $> 55$  godina kao prediktivni faktor RS. Španska kooperativna grupa za APL je pak ukazala na značaj sledećih prediktivnih faktora za nastanak RS: povišena vrednost kreatinina u serumu, broj leukocita  $> 10 \times 10^9/L$ , starost  $> 60$  godina, muški pol, ECOG  $> 1$  i značajnu ekspresiju CD56 na leukemijskim promijelocitima (CD56 pozitivnost).

Sledeći primer PETHEMA grupe koja je analizirala prediktivne faktore za svaki uzrok RS ponaosob (De la Serna i saradnici. Blood 2008;111:3395-402), u studiji su analizirani prediktivni faktori za nastanak HRS. Sa druge strane, broj bolesnika umrlih usled DS i infekcije bio je isuviše mali za adekvatnu statističku analizu. Prediktori HRS, u univarijantnoj analizi, u studijskoj grupi bolesnika, bili su: loše opšte funkcionalno stanje - ECOG  $\geq 2$ , vitalno ugrožavajuće krvarenje na prijemu, broj leukocita  $> 20 \times 10^9/L$ , nivo fibrinogena u serumu  $< 2 \text{ g/L}$ , PT  $< 50\%$ , ISTH DIK skor  $\leq 6$  i ISTH DIK skor  $\geq 7$ . Međutim, u multivarijantnoj analizi nezavisnost su zadržali samo vitalno ugrožavajuće krvarenje prisutno na prijemu, broj leukocita  $> 20 \times 10^9/L$  i ISTH DIK skor  $\geq 7$ . Sa druge strane, prediktivni faktori za nastanak HRS, identifikovani u PETHEMA studijama multivarijantnom analizom su: povišen kreatinin u serumu, broj blasta u krvnoj slici  $> 30 \times 10^9/L$  i prisustvo koagulopatije. Sa druge strane, koreanska grupa autora ukazala je da su dvostruko povećana koncentracija LDH u serumu i nivo fibrinogena u serumu  $< 1.5 \text{ gr/L}$  prognostički faktori za nastanak HRS (Kim DY i saradnici. Leuk Res 2011;35:152-8). Napominjemo da u literaturi, do sada, nije

opisan skor koji bi ve na prezentaciji omogu io identifikovanje bolesnika sa APL i visokim rizikom od nastanka HRS.

Relaps APL dijagnostikovao je kod 18.74% bolesnika u studiji le enih protokolom PETHEMA LPA 99 i 7.4% bolesnika le enih PETHEMA LPA 2005 protokolom. Navedeni rezultati su u skladu sa rezultatima le enja španske kooperativne grupe PETHEMA LPA 2005, koja je saopštila etvorogodišnju u estalost relapsa od 9%, što je statisti ki zna ajno manje od 11%, koliko iznosi stopa relapsa tokom le enja protokolom PETHEMA LPA 99. Trend smanjenja stope relapsa u grupi bolesnika le enih novijim protokolom je posledica intenzivnijeg konsolidacionog le enja visokoriznih bolesnika (Sanz M i saradnici. Blood 2010;115:5137-46). Ispitivanje prognoznih faktora za postizanje druge kompletne remisije (KR2) ograni eno je malim brojem bolesnika, kako u okviru studijske grupe doktorske disertacije, tako i u drugim studijama.

U doktorskoj disertaciji prediktori relapsa u trenutku dijagnoze APL, bili su broj leukocita  $10 \times 10^9/L$ , *FLT3-ITD* pozitivnost i CD56 pozitivnost. U PETHEMA-GIMEMA studiji izvršena je analiza ve eg broja klini ko-labatorijskih parametara u pogledu prediktivne vrednosti za nastanak relapsa. Kao zna ajni su izdvojeni samo broj leukocita i trombocita. Na osnovu njih dizajniran je Sanzov skor koji je zadržao zna ajnost i u svim narednim PETHEMA studijama (Sanz M i saradnici. Blood 2000;96:1247-53). U studijama drugih grupa leukociti su uvek imali prediktivnu vrednost, što nije uvek bio slu aj i sa Sanzovim skorom. Univarijantne analize razli itih studija identifikovale su i starost 60 godina, varijantni tip bolesti, bcr3 tip transkripta, *FLT3-ITD* mutaciju i CD56 pozitivnost kao prediktivne faktore za nastanak relapsa APL (Tallman MS I saradnici. Blood 2002;100:4298-302; Montesinos P i saradnici. Blood 2011;117:1799-805; Breccia M i saradnici. Leuk Res 2014;38:194-7; Barragan E i saradnici. Haematologica 2011;96:1470-7; Lou Y i saradnici. Ann Hematol 2014;93:941-8).

Koliko nam je poznato, doktorska disertacija je zasada jedina studija koja je pratila nivo ekspresije WT1 gena u APL i to po ev od dijagnoze, tokom indukcije, konsolidacionog le enja, terapije održavanja kao i po završetku le enja, u okviru pra enja MRB.

#### **D) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije**

1. Mitrovic M, Suvajdzic N, Bogdanovic A, Kurtovic NK, Sretenovic A, Elezovic I, Tomin D. International Society of Thrombosis and Hemostasis Scoring System for disseminated intravascular coagulation score: a new predictor of hemorrhagic early death in acute promyelocytic leukemia. *Med Oncol* 2013;30(1):478-84.
2. Mitrovic M, Suvajdzic N, Elezovic I, Bogdanovic A, Djordjevic V, Miljic P, Djunic I, Gvozdenov M, Colovic N, Virijevic M, Lekovic D, Vidovic A, Tomin D. Thrombotic events in acute promyelocytic leukemia. *Thromb Res* 2015;135(4):588-93.

#### **E) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)**

Doktorska disertacija „**Prognozni faktori rane smrti i relapsa bolesti u akutnoj promijelocitnoj leukemiji**“ dr Mirjane Mitrović predstavlja originalni naučni doprinos u razumevanju prediktivnih faktora za razvoj RS i RB u APL. Svi identifikovani faktori a posebno prognozni skor razvijen u ovoj studiji omogućavaju otkrivanje bolesnika sa visokim rizikom za nastanak RS i RB, koji zahtevaju intenzivnije lečenje.

Ova doktorska disertacija je urađena prema svim principima naučnog istraživanja. Ciljevi su bili precizno definisani, naučni pristup je bio originalan i pažljivo izabran, a metodologija rada je bila savremena. Rezultati su pregledno i sistematično prikazani i diskutovani, a iz njih su izvedeni odgovarajući i zaključci.

Na osnovu svega navedenog, a imajući u vidu dosadašnji naučni rad kandidata, komisija predlaže Naučnom vešću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju dr Mirjane Mitrović i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 25.10.2015.

lanovi Komisije:

Prof. dr Biljana Mihaljevi

---

Prof. dr Dragica Tomin

---

nau ni savetnik dr Sonja Pavlovi

---

Mentor:

Prof. dr Nada Suvajdži -Vukovi

---