

NAU NOM VE U MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Nau nogve aMedicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 15. 05. 2017. godine, broj 5940/10, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

„Prognosti ki zna aj mutacija u genima za izocitrat dehidrogenazu 1 (IDH1) i izocitrat dehidrogenazu 2 (IDH2) u akutnoj mijeloidnoj leukemiji sa normalnim kariotipom“

kandidat dr Marijane Virijevi, zaposlene na Medicinskom fakultetu u Beogradu kao asistent na katedri za internu medicinu i u Kliničkom Centru Srbije u Beogradu, na Klinici za hematologiju. Mentor je Prof. dr Dragica Tomin.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Biljana Mihaljevi, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
2. Prof. Dr Nada Suvajdži - Vukovi, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
3. Prof. dr Predrag Tur evi, vanredni profesor Medicinskog fakulteta u Kragujevcu

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 dr Marijane Virijevi napisana je ukupno 128 strana i podeljena je na sledeće poglavlja: uvod, ciljevi rada, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključak i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 35 tabela, 19 dijagrama i 5 slika. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata, podatke o komisiji i spisak skraćenicakorišćenih u tekstu.

U **uvodu** je definisana akutna mijeloidna leukemija (AML), na in njenog dijagnostikovanja i savremeni terapijski pristup, uz poseban osvrt na značaj genetskih mutacija u patogenezi i prognozi AML. Opisana je uloga genetskih mutacija u preciznijoj stratifikaciji rizika, sa posebnim osvrtom na AML bolesnika sa normalnim kariotipom (NK). Dat je uporedni pregled dosadašnjih literaturnih podataka u vezi prognozi kod značajne *IDH* mutacija. Tako je naglašen značaj *IDH* mutacija u praćenju (monitoringu) minimalne rezidualne bolesti (MRB).

Ciljevi rada su precizno definisani: utvrđivanje uestalosti prisustva *IDH1* i *IDH2* mutacija kod bolesnika sa AML-NK; utvrđivanje uticaja prisustva *IDH1* i *IDH2* mutacija na uсталost, dužinu remisije i ukupno preživljavanje; utvrđivanje povezanosti *IDH1* i *IDH2* mutacija i drugih prognostičkih markera: parametri krvne slike, biohemijski parametri, citološki tip bolesti, imunofenotipska i molekularno-genetska obeležja (*FLT3* i *NPM1* mutacije). Cilj rada je takođe bio utvrđivanje stabilnosti *IDH1* i *IDH2* mutacija u toku bolesti, poređenjem uzoraka na početku bolesti sa uzorcima u toku kompletne remisije (KR), odnosno u recidivu bolesti.

U poglavlju **materijal i metode** navedeno je da je istraživanje sprovedeno u Klinici za hematologiju Kliničkog centra Srbije i u Institutu za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo (IMGGI), Univerziteta u Beogradu. Precizno je opisan način dijagnostike bolesnika koja je podrazumevala: kompletnu krvnu sliku urađenu na Coulter-ovom brojaču; određivanje biohemijskih analiza (laktat dehidrogenaza), ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) statusa i HCT-CI skor (Hematopoietic cell transplantation (HCT)-specific comorbidity index); morfološku i citohemijsku analizu razmaza koštane srži obojenih po metodi May-Grunwald-Giemsa i mijeloperoksidazom; imunofenotipizaciju koštane srži određenu na multicolornom protokom citometru, direktnom imunofluorescentom tehnikom, sa komercijalnim monoklonalnim antitelima za ispitivanje membranskih i intracelularnih antigena; klasičnu citogenetsku analizu metodom HG traka na nestimulisanoj koštanoj srži direktnom preparacijom a potom i dvadeset etvoročasnou kultivacijom; testove molekularne genetike na uzorcima koštane srži: a) detekciju *IDH1* i *IDH2* mutacija PCR metodom i direktnim sekvenciranjem; b) detekciju *FLT3-ITD* i *FLT3-D835* PCR metodom, odnosno PCR-RFLP (PCR-engl., „restriction fragment length polymorphism“) metodom; c) detekcija mutacija u *NPM1* genu PCR metodom i direktnim sekvenciranjem.

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. Korišćena **literatura** sadrži spisak od 196 reference.

B) Kratak opis postignutih rezultata

IDH mutacije su detektovane kod 25 (23%) bolesnika sa AML-NK. Osam (7%) bolesnika je imalo *IDH1*, dok je sedamnaest (16%) bolesnika imalo *IDH2* mutaciju. *IDH*⁺ bolesnici su imali značajno veći broj trombocita ($p=0.024$), kao i veći procenat blasta u perifernoj krvi na početku bolesti ($p=0.031$), dok nije bilo značajne povezanosti sa starošću, brojem leukocita, procentom blasta u koštanoj srži, vrednostima hemoglobina i LDH u serumu. *IDH* mutacije nisu pokazale značajnu povezanost sa ispitivanim imunofenotipskim i molekularnim markerima (*FLT3-ITD*, *FLT3-D835* i *NPM1* mutacijom) blasta. U našoj studiji, stopa postizanja KR je bila 60% kod *IDH* bolesnika, dok je *IDH*⁺ bila nešto niža (44%), ali bez statistički značajne razlike ($p=0.152$). Multivarijantna analiza je izdvojila povećan broj leukocita $> 30 \times 10^9/l$ ($p=0.015$) kao najznačajniji faktor za manju stopu postizanja KR kod AML-NK bolesnika. Takođe, prisustvo *IDH* mutacija nije statistički značajno uticalo na ranu smrt (RS) ($p=0.310$), niti na nastanak recidiva ($p=0.250$) i pojavu refraktarnosti bolesti ($p=0.474$). Multivarijantna analiza je pokazala da je najznačajniji faktor rizika za refraktarnost bolesti bio povećan broj leukocita $> 30 \times 10^9/l$. Bolesnici koji su rano umrli imali su lošiji inicijalni ECOG status, prosečno veći procenat blasta u perifernoj krvi, *IDH2*⁺ ili obe (*IDH1/IDH2*) mutacije zajedno. Univarijantnom analizom su izdvojeni sledeći značajni prediktori za ukupno preživljavanje (eng. overall survival - OS) AML-NK bolesnika: starost > 55 godina, broj leukocita $> 30 \times 10^9/l$ i *IDH*⁺, pri čemu je broj leukocita $> 30 \times 10^9/l$ izdvojen kao najznačajniji faktor za OS. Medijana preživljavanja AML-NK bolesnika bila je 7.5 meseci (1 - 48 meseci), petogodišnji OS je bio 16.4%, dok je medijana preživljavanja bez znakova bolesti bila 12 meseci. Na ukupno preživljavanje kod AML-NK bolesnika značajno je uticao povišen broj leukocita $> 30 \times 10^9/L$ (3m vs 10m; $p=0.001$). Bolesnici koji su imali *FLT3-ITD* mutaciju značajno kraće su živeli u odnosu na bolesnike bez *FLT3-ITD* (3m vs 7m; $p=0.045$). Prisustvo *IDH1* i 2 mutacija zajedno je značajno uticalo na ukupno preživljavanje (OS) ($p=0.039$), a samo *IDH1*⁺ je uticala na DFS ($p=0.049$).

Od ukupnog broja bolesnika sa KR transplantirano je njih 15 (24.19%); kod 12 (80%) bolesnika je sprovedena alogena a kod 3 (20%) autologa transplantacija. Nije bilo statistički značajne razlike u preživljavanju *IDH*⁻ i *IDH*⁺ bolesnika koji su transplantirani, dok je statistički značajna razlika potvrđena između u transplantiranih i netransplantiranih bolesnika u grupi *IDH*⁺, AML-NK bolesnika (15 vs 2 meseci; p=0.006). Naime, transplantirani *IDH*⁺ AML-NK bolesnici su živeli značajno duže. Prisustvo *IDH* mutacija je pokazalo negativan uticaj na OS u *intermedijarnoj* podgrupi rizika (*FLT3-ITD-/NPM1-*) AML-NK bolesnika (5 vs 12 meseci; p=0.050).

IDH mutacije su ispitivane sekvencionalno kod 19 *IDH*⁺ bolesnika koji su bili živi posle indukcije. Jedanaest (58%) je postiglo KR i 9/11 bolesnika je izgubilo *IDH* mutaciju. Ipak, dva bolesnika su zadržali *IDH*⁺, iako su postigli KR. Kod dva bolesnika koji su izgubili *IDH* mutaciju, mutacija se ponovo javila u toku recidiva bolesti. Ovi rezultati ukazuju na značajnu stabilnost *IDH* mutacija tokom lečenja AML (tokom KR, u recidivu, refraktarnoj bolesti).

C) Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

U našoj studiji, *IDH* mutacije su detektovane kod 25/110 (23%) bolesnika. U literaturi je takođe objavljena slika uestalost od 25–30% kod AML-NK bolesnika (Boissel i sar. 2010; Marcucci i sar. 2010; Zhou i sar. 2012; Im i sar. 2014; Yamaguchi i sar. 2014). Osmam (7%) bolesnika je imalo *IDH1* mutaciju, dok je 17 (16%) bolesnika je imalo *IDH2* mutaciju, što takođe odgovara drugim objavljenim rezultatima (Abbas i sar. 2010; Paschka i sar. 2010; Marcucci i sar. 2010), te podacima da se *IDH2* češće javlja od *IDH1* mutacije (Rakheja i sar. 2012). Naši bolesnici sa *IDH* mutacijama imali su veći broj trombocita i veći procenat blasta u perifernoj krvi u odnosu na bolesnike bez mutacija, što je u skladu sa prethodnim istraživanjima (Abbas i sar. 2010; Paschka i sar. 2010; Marcucci i sar. 2010). Ispitivanjem povezanosti između *IDH* mutacija i drugih genetskih markera kod AML-NK, kao što su *NPM1* i *FLT3*, nismo uočili statistički značajnu zastupljenost *NPM1*⁺ mutacije kod *IDH*⁺ bolesnika, što nije u saglasnosti sa literaturnim izveštajima, koji su opisali udružnost *IDH* mutacija sa *NPM1* mutacijom (Patel i sar. 2012; Abbas i sar. 2010; Paschka i sar. 2010;). Sa druge strane, *FLT3* mutacije su podjednako bile zastupljene između *IDH*⁺ i *IDH*⁻ bolesnika, što je u skladu sa drugim studijama (Abbas i sar. 2010; Paschka i sar. 2010; Boissel i sar. 2010). U objavljenim studijama je pokazano da nema statistički značajne povezanosti

izme u *IDH* mutacija i *FLT3-ITD* mutacije (Abbas i sar., 2010; Schnittger i sar., 2010, Mardis i sar., 2009).

U našoj studiji, *IDH* mutacijenisu uticale na stopu postizanja KR kod AML-NK bolesnika. Sli ni rezultati su objavljeni od strane Nomdedeu i sar.2012. Niska stopa postizanja KR kod AML-NK bolesnika sa *IDH* mutacijomsaopštena je u više radova (Boissel i sar. 2010; Marucci i sar. 2010; Yamaguchi i sar. 2014). U našoj studiji je pokazano da prisustvo *IDH* mutacija nije bilo statisti ki zna ajno povezano za u estaloš u recidiva, refraktarnosti AML i pojavom rane smrti, me u ispitivanim grupama sa i bez *IDH* mutacije. Me utim, povezanost *IDH* i stope pojave recidiva u AML-NK pokazana je u nekim studijama (Boissel i sar. 2010; Marucci i sar. 2010). Na ukupno preživljavanje kod AML-NK bolesnika zna ajno je uticao povišen broj leukocita $30 \times 10^9/L$, o emu govore i literaturni podaci (Rollig G.2015). Naši bolesnici sa *FLT3-ITD* mutacijom zna ajno kra e su živeli u odnosu na bolesnike bez *FLT3-ITD*, što je opisano i u literaturi (Bienz i sar. 2005; Santos i sar. 2009).

Prisustvo *IDH* mutacija je zna ajno uticalo na OS, dok nije imalo uticaj na dužinu trajanja remisije bez znakova bolesti (DFS) (*IDH*⁺- 12 meseci vs *IDH*- 17 meseci; p=0.090).Sa druge strane, prisustvo *IDH1*⁺ je uticalao na DFS tj bolesnici *IDH* su imali duže trajanje remisije bez bolesti u odnosu na *IDH*⁺ bolesnike (*IDH*⁺- 8m vs *IDH*- 17m; p=0.049). Ovo su potvrdila i ranija istraživanja (Pashka i sar. 2010, Boissel i sar. 2010; Marucci i sar. 2010;Nomdedéu i sar. 2012; Ravandi i sar. 2012).

Me u, *IDH*⁺ bolesnicima, stopa OS kod onih kod kojih je sprovedena alogena TM H je bila zna ajno viša u odnosu na one koji nisu le eni transplantacijom. Ovo su tako e uo ili i Yamaguchi i sar. 2014, koji su utvrdili da alogena TM H može poboljšati OS kod mla ih pacijenata sa *IDH* mutacijom.Kada smo primenili molekularnu klasifikaciju koja je bazirana na prisustvu/odsustvu *NPM1* i *FLT3* mutacije u našoj grupi bolesnika, uo ili smo da je prisustvo *IDH* mutacija imalo loš uticaj naOS bolesnika sa intermedijarnom subgrupom rizika (*NPM1*/*FLT3-ITD*). Istovetni zaklju ak su imali i drugi autori(Yamaguchi i sar. 2012; Schnittger i sar. 2010) i govori o koristi od testiranja *IDH* mutacija u grupi AML-NK bolesnika. Naši rezultati ukazuju na zna ajnu stabilnost *IDH* mutacija za vreme le enja AML. U literaturi je tako e pokazano je da su *IDH1* i *IDH2* mutacije relativno stabilne i da pokazuju direktnu korelaciju sa statusom bolesti (Gross i sar. 2010; Jeziskova i sar. 2010; Chou i sar. 2010).

Naša studija predstavlja prvo ispitivanje prognosti kog zna aja *IDH1* i *IDH2* mutacija koje je sprovedeno u bolesnika sa AML-NK u Srbiji.

D) Objavljeni radovi koji ine deo doktorske disertacije

Virijevic M, Karan-DjurasevicT, MarjanovicI, TosicN, MitrovicM, DjunicI, ColovicN, VidovicA, Suvajdzic-VukovicN, TominD, Pavlovic S. **Somatic mutations ofisocitrate dehydrogenases 1 and 2 are prognostic and follow-up markers in patients with acute myeloid leukemia with normal karyotype**, Radiology and Oncology, (2016); 50(4):385-393.

E) Zaklju ak (obrazloženje nau nog doprinosa)

Doktorska disertacija „**Prognosti ki zna aj mutacija u genima za izocitrat dehidrogenazu 1 (*IDH1*) i izocitrat dehidrogenazu 2 (*IDH2*) u akutnoj mijeloidnoj leukemiji sa normalnim kariotipom**“ dr Marijane Virijevi , predstavlja originalni nau ni doprinos koji se ogleda u identifikaciji novih prognoznih faktora kod bolesnika sa AML-NK. Sprovedeno istraživanje je pokazalo da bi odre ivanje molekularnih markera poput *IDH1* i *IDH2* doprinelo preciznijoj stratifikaciji rizika AML-NK, ime bi se ve pri dijagnozi izdvojila grupa sa visokim rizikom za nastanak recidiva i refraktarnoš u na le enje. Zbog dokazane stabilnosti u toku bolesti,*IDH* mutacije se mogu koristiti kao molekularni marker detekcije MRB, što bi moglo biti posebno važno ukoliko bi se u svakodnu praksuuvelo le enje sa ihibitorima *IDH*.

Ova doktorska disertacija je ura ena prema svim principima nau nog istraživanja. Ciljevi su precizno definisani, nau ni pristup je originalan i pažljivo izabran, a metodologija rada je savremena. Rezultati su pregledno i sistemati no prikazani i diskutovani, a iz njih su izvedeni odgovaraju i zaklju ci.

Na osnovu svega navedenog, i imaju i u vidu dosadašnji nau ni rad kandidata, komisija predlaže Nau nom ve u Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju dr Marijane Virijevi i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 25.05.2017.

Članovi Komisije:

Prof. dr Biljana MIhaljevi

Prof. dr Nada Suvajdži -Vukovi

Prof. dr Predrag Čurčević

Mentor:

Prof. dr Dragica Tomin
