

**НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА  
УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ**

Одлуком Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, на VI редовној седници одржаној 15.04.2016. године, број 15/146, именована је Комисија за преглед, оцену и одбрану докторске дисертације под насловом:

*„Имунофенотипска карактеризација ћелија акутне мијелоидне леукемије код одраслих и њена улога у дијагнози, праћењу и прогнози болести“.*

кандидата мр. сци. биол. Наде Крагуљац Куртовић, спец. имунобиолога, запослене на Клиници за хематологију Клиничког центра Србије у Београду. Ментори су Проф. др Биљана Божић Недељковић и Проф. др Нада Сувајцић-Вуковић.

Комисија је у саставу: Др Биљана Божић Недељковић, ванредни професор, Универзитет у Београду-Биолошки факултет и Др Нада Сувајцић-Вуковић, редовни професор, Универзитет у Београду-Медицински факултет, ментори и Др Наташа Тошић, виши научни сарадник, Универзитет у Београду-Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, члан. Сходно одлуци Већа, а после обављеног прегледа приложене докторске дисертације, подносимо Већу следећи

**ИЗВЕШТАЈ**

## I Биографија кандидата

Кандидат Нада Крагуљац Куртовић рођена је 1. Марта 1964. године у Скопљу. Основну и средњу школу је завршила у Београду. Биолошки факултет Универзитета у Београду, одсек Молекуларна биологија и физиологија, уписала је 1982/83 школске године, а дипломирала 1989. године са просечном оценом 9,27. Била је стипендиста Фонда за научни и уметнички подмладак Републике Србије, Министарства за Науку и Технологију у периоду 1989–1991. године. Од 1990. године је запослена у Институту за хематологију Клиничког центра Србије у Лабораторији за имунофенотипизацију и проточну цитометрију.

Последипломске специјалистичке студије на смеру Имунобиологија на Биолошком факултету Универзитета у Београду завршила је 1995. године стекавши звање спец. имунобиологије. Последипломске магистарске студије, смер Молекуларна биологија и биохемија, на истом факултету, завршила је 2005. године. Носилац је годишње награде Фондације Горан Љубијанкић за најбољи магистарски рад из области молекуларне биологије одбрањен у 2005. години.

Као истраживач сарадник, учесник је у пројекту „Ретке болести: молекуларна патофизиологија, дијагностички и терапијски модалитети и социјални, етички и правни аспекти“ - III 41004, потпројекат 4 „Молекуларногенетички и имунофенотипски маркери клонског преображаја матичних ћелија хематопоезе“ – 41004 Министарства науке и технолошког развоја Републике Србије (област Биомедицина, пројектни период 2011.-2016.).

У склопу едукације из области имунофенотипизације и проточне цитометрије, била је, по позиву, на тромесечном студијском боравку у Француској у унуверзитетској болници “Haut-Léveque” Université Victor Segalen, Bordeaux 2, CHU de Bordeaux, током 2006. године.

Члан је Хематолошке секције Српског лекарског друштва и Европског друштва за клиничку ћелијску анализу (ESCCA).

Као аутор/коаутор је објавила 45 стручних радова штампаних у целини у иностраним и домаћим часописима индексираним у СС/SCI, и учествовала је са саопштењима на великом броју међународних и домаћих конгреса.

## **II Технички подаци о написаној докторској дисертацији**

Прегледана докторска дисертација обухвата текст, слике, графиконе и табеле на укупно 335 страна. Рад садржи уводни део (48 страна), циљеве рада (1 страна), материјал и методе (31 страна), резултате (119 страна), дискусију (67 страна), закључак (7 страна), литературу са 171 коришћеном референцом (18 страна), и прилоге (44). Текст је допуњен са укупно 18 слика, 12 схема, 44 графикана и 81 табелом. Теза је прегледна и технички квалитетно припремљена. Докторска дисертација садржи сажетак на српском и енглеском језику, биографију кандидата, податке о комисији и списак скраћеница коришћених у тексту.

## **III Предмет, циљ и основна хипотеза рада**

У уводном делу ове дисертације приказан је значај имунобиологије и имунолошких метода за испитивање процеса хематопоезе, посебно путем примене имунофенотипизације и мултипараметарске проточне цитофлуориметрије (ИМПЦ) у циљу дефинисања експресионих профила хуманих леукоцитних диференцијационих молекула (хЛДМ) на хематопоезним ћелијама. Дате су основе стандардне CD (*енгл.* Cluster of Differentiation) номенклатуре за класификацију хЛДМ и приказани су карактеристике главних молекула који су експримирани на ћелијама различитих хематопоезних лоза, а чији су експресиони обрасци испитивани на ћелијама акутне мијелоидне леукемије (АМЛ) у овој дисертацији. Такође је детаљно приказана онтогенеза ћелија мијелоидне лозе, кроз дефинисање експресионог профила хЛДМ који карактеришу сваку од лоза, и који су

детерминисани на генском нивоу, активним програмом диференцијације, и високо конзервисани у здравим ћелијама хематопоезног система.

У уводу дисертације су описане основне карактеристике акутне мијелоидне леукемије (АМЛ), које настају малигном трансформацијом хематопоезних матичних ћелија или прогенитора једне или више мијелоидних лоза. Приказана је такође молекуларна патогенеза АМЛ која значајно варира, и коју карактерише висок пролиферативни капацитет праћен оштећеном способношћу диференцијације и апоптозе, са последичном акумулацијом незрелих имунонекомпетентних ћелија (бласта) у коштаном сржи и другим органима и ткивима. Описане су поставке савременог модела леукемогенезе АМЛ, и њеног порекла из мале популације леукемијских матичних ћелија, способних за самообнављање, пролиферацију и ограничену диференцијацију у малигне бласте и зрелије мијелоидне прекурсоре. У даљем делу су приказане детаљне молекуларно-генетске карактеристике АМЛ, са посебним акцентом на гене који су испитивани у овој дисертацији код дела болесника са АМЛ, *NMP1*, *CEBPA*, *FLT3*, и њихову улогу у патогенези АМЛ.

У делу који се односи на имунобиологију АМЛ, приказана је савремена примена имунофенотипизације у дијагностици и класификацији АМЛ, уз објашњење њеног значаја у утврђивању експресионог профила хЛДМ на популацији леукемијских ћелија, што дефинише њихов имунофенотипски профил, на основу кога се одређује њихово линијско порекло, степен диференцираности у оквиру одређене хематопоезне лозе, као и имунофенотипске аберације у експресији хЛДМ које леукемијске ћелије испољавају. Приказан је стандардни методолошки приступ у имунофенотипизацији АМЛ, уз приказ препоручених панела моноклонских антитела, њихових комбинација, принципа МПЦ и метода за имунолошко селекционисање леукемијских ћелија применом комбинације CD45 молекула и ћелијске гранулације. Такође је приказан систем за имунолошку класификацију АМЛ. Објашњен је значај утврђивања типова имунофенотипских аберација у експресији хЛДМ на АМЛ, који представљају обележје малигног фенотипа леукемијских ћелија. Посебно је наглашен њихов значај за праћења

минималне резидуалне болести (МРБ) после лечења болесника хемиотерапијом, као и њихова улога у прогнози АМЛ.

У последњем делу увода је детаљно приказан систем за класификацију АМЛ који је предложила Светска Здравствена Организација (СЗО), и који је данас у стандардној употреби. СЗО систем је квалитативно нов систем за класификацију АМЛ којим се дефинишу специфични клиничко-биолошки ентитети, и он пружи бољу корелацију са прогнозом и биологијом болести. Осим цитоморфолошких карактеристика, овај класификациони систем је укључио и друге биолошке карактеристике леукемијских ћелија међу којима су имунофенотипске, цитогенетске и молекуларногенетске, удруживши их са клиничким карактеристикама болесника. Основна претпоставка у овом истраживању била је да имунофенотипска карактеризација леукемијских ћелија АМЛ одраслих, применом МПЦ, може да пружи специфичне информације о биологији леукемијских ћелија АМЛ. Ове информације могу имати утицај на прецизну дијагнозу и класификацију, прогнозу, као и процену одговора на примењену терапију детекцијом и квантификацијом МРБ. У том смислу су дефинисани и реализовани циљеви истраживања, који су укључивали: 1) Утврђивање имунофенотипског профила леукемијских ћелија болесника на дијагнози, уз утврђивање учесталости и типова аберација у експресији хЛДМ на леукемијским властима и прекурсорима гранулоцитне и моноцитне лозе и утврђивање степена хетерогености леукемијске популације АМЛ дефинисане на основу имунофенотипских карактеристика; 2) Имунолошка класификација болесника са АМЛ на дијагнози болести и корелација са цитоморфолошком и СЗО класификацијом; 3) Утврђивање имунофенотипских профила различитих ентитета АМЛ, дефинисаних према СЗО класификацији и међусобна корелација њихових имунофенотипских профила у циљу утврђивања специфичних имунофенотипских карактеристика појединачних ентитета; 4) Стандардизација методологије ИПЦМ за детекцију и квантификацију МРБ, засноване на присуству популација ћелија са имунофенотиповима специфичним за леукемијске ћелије (ИФСЛ); 5) Одређивање значаја експресије хЛДМ за предикцију одговора на индукциону терапију и укупно преживљавање болесника.

#### **IV Материјал и методе употребљене у раду**

У поглављу "Материјал и методе", наведено је да је испитивање спроведено на неселекционисаном узорку од 320 одраслих болесника са АМЛ на дијагнози болести, лечених на Клиници за хематологију КЦС. Испитивање је спроведено у две фазе, ретроспективно, у групи од 294 болесника, у циљу утврђивања значаја имунофенотипске карактеризације ћелија АМЛ за дијагнозу и прогнозу болести (период 2009.-2013. год.) и проспективно, у групи од 26 болесника, у циљу утврђивања значаја ИМПЦ за прећење МРБ (период 2014.-2015. год.). Детаљно су описани критеријуми за укључивање болесника у испитивање и типови узорака који су прикупљани током испитивања. Такође су описани критеријуми за прикупљање здравих контролних узорака коштане сржи (кс) и периферне крви (пк) који су коришћени за потребе добијања опсега референтних вредности за имунофенотипски дефинисане популације ћелија кс и пак. Методологија која је примењивана у овом испитивању је дата прегледно и детаљно је описана. Коришћене су савремене методе које се примењују у дијагностици АМЛ, уз посебан акценат на методологију ИМПЦ и молекуларно-генетске методе.

Протоколи у оквиру појединачних методологија су приказани детаљно, у посебним поглављима, а односили су се на: 1) цитоморфолошки метод за одређивање мијелограма и диференцијалне леукоцитне формуле на размазима кс и пак бојених техником May-Grunwald-Giemsa, као и допунским цитохемијским бојењима; 2) вишекolorну директну имунофлуоресцентну технику базирану на примени смеше од по четири директно коњугована мишја анти-хумана моноклонска антитета за испитивање широког панела ХЛМ; 3) мултипараметарску проточну цитофлуориметрију за анализу образаца експресије ХЛМ уз селекционисање ћелија од интереса на основу обрасца експресије CD45 молекула и ћелијске цитоплазматске гранулације; 4) цитогенетски метод за бојење метафазних хромозома, применом боје Giemsa и технике NG-трака; 5) методе молекуларне биологије за испитивање присуства генских мутација, које укључују изолација ДНК и/или РНК, умножавање жељених фрагмената ДНК и/или РНК методом ланчане реакције полимеразе (ПЦР) уз коришћење специјално дизајнираних прајмера за

сегменте испитиваних гена; анализа ПЦР резултата електрофорезом на полиакриламидним геловима; метод директног секвенционирања у случају *NPM1* гена; ПЦР и ПЦР-РФЛП метод у случају *FLT3* гена; метод фрагмент анализе у случају *CEBPA* гена; б) статистичка обрада добијених резултата.

Испитивање је спроведено у складу са Хелсиншком декларацијом, а одобрили су је Етички комитет Клиничког центра Србије у циљу испитивања болесника са АМЛ и Етички комитет Института за здравствну заштиту мајке и детета Србије “Др Вукан Чупић“, у циљу узимања и обраде узорака здравих контролних испитаника.

## **V Резултати истраживања**

Кандидат је детаљно описао резултате добијене експерименталним радом и статистичким анализама. У овом поглављу су приказани добијени подаци о основним клиничко-хематолошким, имунофенотипским и молекуларно генетским карактеристикама групе болесника са АМЛ.

На основу образаца експресије 44 хЛДМ, дефинисан је детаљан имунофенотипски профил популације бласта АМЛ, испитивана је ћелијска хетерогеност леукемијских популација АМЛ и њихов диференцијациони потенцијал. Имунофенотипске карактеристике леукемијских ћелија АМЛ су повезиване са биолошким, хематолошким и клиничким карактеристикама у циљу утврђивања њихове међусобне повезаности, уз утврђивање њиховог значаја за класификацију АМЛ. У једном делу испитивања, утврђивано је присуство и учесталост различитих типова аберантне експресије појединачних и/или група хЛДМ на леукемијским ћелијама АМЛ на дијагнози, уз оптимизацију методе за праћење резидуалних леукемијских популација у кс и пк током примене хемиотерапије. Праћена је и повезаност имунофенотипских карактеристика и одговора на терапију и дужину преживљавања болесника, у циљу процене њиховог прогностичког значаја за АМЛ одраслих.

На основу података добијених у овом испитивању, закључено је да ИМПЦ омогућава постављање дијагнозе АМЛ анализом кс код 98% болесника и то као независна дијагностичка метода. Квантификација леукемијских бласта у кс, посредством комбинације CD45 молекула и степена ћелијске гранулације (CD45/SSC диференцијал), показала је високу просечну вредност популације бласта кс на дијагнози АМЛ (64%), која је у позитивној линеарној корелацији са вредношћу популације бласта кс процењене цитоморфолошким методом. Такође је закључено да је процена леукемијске популације кс применом CD34 i/iли CD117 молекула мање сензитивна, пошто је учесталост њихове експресије нижа у АМЛ. Анализа популација ћелија кс болесника са АМЛ на презентацији применом CD45/SSC диференцијала, показала је значајно снижење популације гранулоцитних прекурсора, популације еозинофила, и популације лимфоцита у поређењу са вредностима здравих контрола. Популација Б-прекурсора кс је детектована код трећине болесника са АМЛ, и њена просечна вредност је значајно снижена у односу на здраву контролу.

На основу резултата овог испитивања дефинисане су прецизне имунофенотипске карактеристике популације леукемијских бласта АМЛ на дијагнози, које карактерише експресија три групе молекула, али са различитом учесталошћу – раних линијски неспецифичних молекула – HLA-DR, CD11a, CD62L, CD38, CD123, CD135, CD117, CD71, ( $\geq 80\%$ ), раних мијеломоноцитних диференцијационих молекула - CD13, CD33, CD114, cCD68 ( $\geq 93\%$ ), и касних мијеломоноцитних молекула - CD15, CD11b, CD11c, CD4, CD64, CD36, CD35 ( $< 60\%$ ). Такође је показано да је експресија хЛДМ на бластима АМЛ дерегулисана, на шта указује присуство бар једног од различитих видова имунофенотипских аберација код сваког болесника. Леукемијски бласти код 66% болесника показују истовремено присуство четири, пет или шест различитих типова имунофенотипских аберација у експресији хЛДМ. Испитивањем експресије пет хЛДМ (CD34, CD117, HLA-DR, CD13, CD33), утврђено је да су најучесталији типови имунофенотипских аберација "атипично повишен" (90%) или "атипично снижен" (76%) ниво експресије бар једног молекула, док је учесталост атипичног



одсуства експресије (42%) и матурационе асинхроније у експресији молекула (26%) ниже. Осим наведеног, ектопична експресија бар једног од лимфоидних молекула на бластима АМЛ је регистрована са знатном учесталашћу (57%), уз вишу експресију молекула CD56 (29%), CD7 (20%) и CD22 (14%) у односу на молекуле CD2, CD19, CD5 и cCD79a.

Истовремено испитивање популације гранулоцитних прекурсора код болесника са АМЛ, показало је такође присуство бар једног од различитих типова поремећаја код 55% болесника, што је укључивало имунофенотипске аберације у експресији хЛДМ (CD34<sup>+</sup>, CD135<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>, CD13<sup>high</sup>, CD33<sup>-</sup>, CD15<sup>hetero</sup>, cMPO<sup>p+</sup>, CD45<sup>high</sup>), ектопичну експресију молекула лимфоидне лозе (CD56, CD7, CD2, CD19), измењену ћелијску гранулацију и/или промене у ћелијском саставу (акумулација незрелијих форми). Сличне промене су откривене и на популацији моноцитних прекурсора код 39% болесника на дг АМЛ. Све наведене промене на популацији гранулоцитних и моноцитних прекурсора код ове популације представљају део леукемијске популације. Ови резултати су показали да су леукемијске популације болесника са АМЛ на дијагнози високо хетерогене по ћелијском саставу, при чему је код 55% болесника утврђено истовремено присуство популације леукемијских бласта и зрелијих леукемијских гранулоцитних и/или моноцитних прекурсора. Такође је код 34% болесника присутна популација леукемијских бласта са знацима диференцијације у првцу гранулоцитне и/или моноцитне лозе, док 11% болесника има само популацију бласта без диференцијације.

Посебан део овог рада се односио на упоређивање резултата имунолошке и цитоморфолошке класификације болесника са АМЛ, где је показана потпуна сагласност налаза код 66% болесника, делимична сагласност код 7% болесника и одсуство сагласности код 27% болесника. Настале разлике су најчешће последица мање сензитивности цитоморфолошког метода у идентификацији леукемијских ћелија моноцитног порекла у поређењу са ИПЦМ.

У погледу степена сагласности између имунолошке класификације болесника са АМЛ и дијагнозе према СЗО класификацији, потпуна сагласност је

утврђена код 68% болесника, уз највећу сагласност у неклассификованој АМЛ (АМЛ-НОС) од 96%. Знатно нижа сагласност је утврђена у типовима АМЛ са знацима мијелодисплазије (АМЛ-МДС) (44%) и АМЛ са специфичним генетским поремећајима (АМЛ-РГП) (42%), због одсуства карактеристичног имунофенотипског профила који би указао на присуство специфичних цитогенетских и/или молекуларно-генетских аберација у њиховом геному.

Тип АМЛ-РГП је откривен са учесталошћу од 37,4% у нашој групи болесника са АМЛ, при чему је допринос имунофенотипске класификације коначној дијагнози највећи у случају акутне промијелоцитне леукемије (АПЛ) (100%), АМЛ са  $t(8;21)$  (83%) и АМЛ са  $inv16/t(16;16)$  (40%). У овом делу резултата су описани детаљни имунофенотипски профили популација леукемијских бласта свих ентитета АМЛ-РГП и наглашене су њихове специфичне клиничко-биолошке карактеристике.

Тип АМЛ-МДС је регистрован са учесталошћу од 14,6% у нашој групи АМЛ и карактерише га популација мијелобласта са високом учесталошћу ектопичне експресије лимфоидних молекула (68%), а посебно CD56, CD7 и CD22. Допринос предикцији овог ентитета посебно дају резултати ИМПЦ који се односе на присуство поремећаја у популацији гранулоцитних прекурсора (хипогранулација, блок у сазревању до неутрофила и имунофенотипске аберације у експресији хЛДМ).

Тип АМЛ-НОС је најучесталији у нашој групи болесника са АМЛ (48%), при чему се допринос имунофенотипске класификације коначној дијагнози различитих суптипова креће у опсегу 84%-100%. У овом делу резултата су описани детаљни имунофенотипски профили популација леукемијских бласта свих суптипова АМЛ-НОС и наглашене су њихове специфичне клиничко-биолошке карактеристике.

Трећи аспект испитивања у овој дисертацији односио се на примену ИПЦМ у праћењу МРБ код болесника после лечења индукционом и консолидационом терапијом. Присуство МРБ је испитивано применом једне (42%) или две (58%) комбинације ИФСЛ по болеснику. Најучесталије комбинације ИФСЛ су засноване

на аберантној експресији молекула лимфоидне лозе (CD7, CD56, CD19, CD22) (46%), на матурационој асинхронији у експресији молекула (CD64, CD15) (27%), или на аберацијама у обрасцима експресије леукоцитних молекула (CD34/CD117/HLA-DR) (17%). Истовремено су тестирани узорци кс и пк болесника, при чему је показано да су узорци кс сензитивнији и да представљају примарне узорке за анализу МРБ применом ИПЦМ. Применом ове методологије, показана је висока учесталост МРБ код наших болесника са АМЛ у комплетној цитоморфолошкој ремисији (КР) после лечења индукционом (69%) и консолидационом (50%) терапијом. Показано је да је испитивање присуства МРБ после индукционе терапије од примарног значаја за селекционисање високоризичних болесника за настанак релапса болести. Наиме, већина болесника који су током праћења развили релапс имали су МРБ+ статус после индукционе терапије (82%). Осим тога, показано је да су болесници који имају МРБ+ статус у кс на нивоу  $\geq 0,1\%$  ћелија са једром после индукције, у групи високог ризика за појаву релапса. Специфичан део испитивања МРБ је био посвећен испитивању промена у пулу мијелоидних прогенитора кс/пк болесника после лечења, у коме је показано да само повећање пула мијелоидних прогенитора у кс/пк није поуздан индикатор присуства леукемијских ћелија, већ може бити последица регенеративног процеса у одељку здраве хематопоезе. Код већине болесника са АМЛ после примене хемиотрапије, долази до опоравка гранулоцитних и моноцитних прекурсора како у односу на ћелијски састав, тако и у односу на заступљенист ових популација у кс и пк. Такође је показано да је популација Б-прекурсора значајно снижена после индукционе терапије, што има за последицу значајно вишеструко снижење популације Б-лимфоцита у кс и пк болесника и после индукционе и после консолидационе терапије. Спор опоравак после хемиотерапије карактерише и популацију НК-лимфоцита пк болесника са АМЛ, чија је вредност значајно снижена после индукционе и консолидационе терапије. Ово указује да болесници са АМЛ у периоду регенерације кс имају снижену имунокомпетентност у погледу хуморалне и урођене НК имуности.

Четврти ниво испитивања у овој дисертацији односио се на испитивање значаја хЛДМ у прогнози АМЛ. У том смислу је показано да је учесталост ране смрти у нашој групи болесника са АМЛ висока (31%), и да је повезана са присуством специфичних клиничко-биолошких карактеристика ( $Le \geq 30 \times 10^9/l$ ,  $LDH > 2000 U/l$ , бласти пк  $> 55\%$   $Le$ , бласти кс  $> 70\%$  Нћ,  $FLT3-d835^{mut}$ ,  $NPM1^{mut}$ ) ( $p < 0,05$ ), као и са присуством ране моноцитне диференцијације леукемијских бласта и експресијом CD22 молекула на бластима ( $CD11b^+/CD11a^+/CD36^+/CD117^{P+}/cMPO^{P+}/CD22^+$ ). Такође је показано да је већа инциденца КР повезана са присуством специфичних клиничко-биолошких карактеристика ( $Le < 30 \times 10^9/l$ ,  $Hb > 95 g/dl$ , бласти пк  $< 34\%$   $Le$ , нормалан кариотип, одсуство мутација  $FLT3-ITD$ ,  $ELN$  повољна и средње повољна група ризика) ( $p < 0,05$ ), као и са одсуством имунофенотипских карактеристика моноцитне диференцијације и ниском експресијом CD22 молекула на популацији бласта  $CD38^+/cMPO^+/CD123^{P+}/CD11b^{P+}/CD4^{P+}/CD22^{P+}$ ).

Инциденца релапса болести у нашој групи болесника износи 45%, и не разликује се значајно између различитих типова АМЛ. Нижа инциденца релапса је повезана са присуством веће популације  $CD117^+$  леукемијских бласта у кс на дијагнози и присуством мутације у  $CEBPA$  гену. У погледу дужине КР, униваријантна анализа је као прогностичке параметре, издвојила експресију групе леукоцитних молекула према специфичним обрасцима на популацији леукемијских бласта ( $CD45^{+low/med}$ ,  $CD13^{+med/high}$  и  $CD64^{+low}$ ). Притом су издвојени и параметри који доприносе краћем трајању КС, међу којим су експресија групе моноцитних диференцијационих молекула ( $CD36^+/CD11b^+/cLizozim^+$ ) и експресија CD56 молекула на популацији бласта. Мултиваријантна анализа је издвојила образац експресије молекула  $CD45^{+low/med}$  као једини прогностички независан имунофенотипски маркер повезан са дужином КР код болесника са АМЛ.

У погледу укупног преживљавања болесника са АМЛ, мултиваријантна анализа је издвојила неколико независних прогностичких параметара: старост

болесника  $\geq 60$  год. ( $p=0,000$ ), број  $Le \geq 30 \times 10^9/l$ , као и експресија молекула CD7, CD22 и/или CD34 на леукемијским бластима.

**Део Дискусија** је написан јасно и прегледно, уз приказ података других истраживања са упоредним прегледом и анализом података из ове докторске дисертације.

**Закључци** сажето приказују најважније налазе који су проистекли из резултата рада.

## **VI Научни допринос**

Научни допринос докторске тезе има два аспекта посматрања. Први се односи на допринос кандидата у методолошком смислу, како у експерименталном делу тако и у специфичном дизајну студије и обради резултата. Други се односи на откривање специфичних биолошких карактеристика леукемијских популација АМЛ на дијагнози, какве су ћелијска хетерогеност, ограничен диференцијациони потенцијал до ступњева млађих гранулоцитних и моноцитних прекурсора, утврђивање степена имунофенотипских аберација у експресији хЛДМ на популацији леукемијских бласта, али и популацијама гранулоцитних и моноцитних прекурсора кс. Са друге стране, утврђени су детаљни имунофенотипски профили популације бласта различитих типова и суптипова АМЛ, испитивањем 44 различита хЛДМ, што је отворило могућност за прецизнију имунофенотипску селекцију леукемијских ћелија АМЛ у сврху прецизније дијагностике, праћења, прогнозе и примене нових имунотерапеутика. Резултати ове тезе су показали и значај испитивања образаца експресије хЛДМ у још прецизнијој карактеризацији леукемијских популација ћелија АМЛ, као и значај ових испитивања у погледу прогнозе, где се издваја молекул CD45 као независан прогнозни маркер дужине КР. Према доступним литературним подацима, приказани резултати, који се односе на значај ИМПЦ за дијагнозу АМЛ, представљају прву студију у АМЛ у којој је

примењен систем CD45/SSC диференцијала не само за квантификацију и анализу имунофенотипских карактеристика популације леукемијских бласта у кс, већ и за процену свих популација кс које су присутне на дијагнози. Посебно нов аспект ове анализе је и могућност анализе ретких популација кс болесника, какви су Б-прекурсори, или анализа и праћење нивоа популација и субпопулација лимфоцита кс и пк, са важном клиничком импликацијом за процену имунолошког статуса болесника на дг болести и током лечења. Овакво свеобухватно истраживање имунофенотипских карактеристика АМЛ код одраслих, према нашем сазнању, код нас су први пут успостављени и успешно изведени.

### **Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:**

#### **Б1. Радови у часописима међународног значаја: М23**

I.Djunic I, Virijevec M, Djurasinovic V, Novkovic A, Colovic N, Kraguljac Kurtovic N, Vidovic A, Suvajdzic Vukovic N, Tomin D. Prognostic significance of CD56 antigen expression in patients with acute myeloid leukemia. Medical Oncology 2012;29:2077-2082.

### **VII Закључно мишљење и предлог**

Написана докторска теза под називом: „*Имунофенотипска карактеризација ћелија акутне мијелоидне леукемије код одраслих и њена улога у дијагнози, праћењу и прогнози болести*“, представља оригинални научни рад који се базира на јасно издвојеним циљевима на основу исцрпне консултације литературе. У раду су коришћене све савремене методе имунофенотипизације и мултипараметарске проточне цитофлуориметрије и савремене методе молекуларне генетике. Експерименти су, притом, урађени по свим критеријумима научно истраживачког рада. Методологију за имунофенотипску квантификацију резидуалних леукемијских ћелија применом мултипараметарске проточне цитофлуориметрије (ИМПЦ) кандидат је са успехом успоставила.

Сматрамо да ће добијени резултати имати важну улогу у разумевању имунобиолошких карактеристика АМЛ, ћелијске хетерогености леукемијских популација ћелија и степена очуваности њиховог диференцијационог потенцијала, што може имати значаја у разматрању нових дијагностичких, предиктивних и терапијских приступа. Резултати ове тезе су показали значај испитивања образаца експресије хЛДМ у прогностички АМЛ, међу којима се издваја молекул CD45 као независан прогнози маркер дужине КР.

Као чланови Комисије за преглед, оцену и одбрану докторске дисертације мр Наде Крагуљац Куртовић, на основу свега изложеног, предлажемо Већу да усвоји овај Извештај и кандидату одобри одбрану докторске дисертације.

У Београду, 04. 08. 2016. год.

Чланови Комисије:

---

Др Биљана Божић Недељковић  
ванредни професор, Биолошки факултет  
Универзитет у Београду

---

Нада Сувајцић-Вуковић  
редовни професор, Медицински факултет  
Универзитет у Београду

---

Др Наташа Тошић  
виши научни сарадник  
Институт за молекуларну генетику и  
генетичко инжењерство