

UNIVERZITET U BEOGRADU
MEDICINSKI FAKULTET

Marijana M. Virijević

PROGNOSTIČKI ZNAČAJ MUTACIJA U
GENIMA ZA IZOCITRAT DEHIDROGENAZU
1 (IDH1) I IZOCITRAT DEHIDROGENAZU 2
(IDH2) U AKUTNOJ MIJELOIDNOJ
LEUKEMIJI SA NORMALNIM KARIOTIPOM

doktorska disertacija

Beograd, 2017

UNIVERSITY OF BELGRADE
SCHOOL OF MEDICINE

Marijana M. Virijević

PROGNOSTIC IMPACT OF ISOCITRATE
DEHYDROGENASE 1 (IDH1) AND
ISOCITRATE DEHYDROGENASE 2 (IDH2)
MUTATIONS ON OUTCOME IN ACUTE
MYELOID LEUKEMIA WITH NORMAL
KARYOTYPE

doctoral dissertation

Belgrade, 2017

MENTOR:

Prof. dr Dragica Tomin, redovni profesor,
Medicinski fakultet u Beogradu, Univerziteta u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE:

- 1. Prof. dr Biljana Mihaljević**, redovni profesor,
Medicinski fakultet, Univerziteta u Beogradu
- 2. Prof. dr Nada Suvajdžić-Vuković**, redovni profesor,
Medicinski fakultet, Univerziteta u Beogradu
- 3. Prof. dr Predrag Đurđević**, vanredni profesor,
Fakultet medicinskih nauka, Univerziteta u Kragujevcu

Zahvaljujem se

Profesorki Dragici Tomin, mentoru ove doktorske disertacije i mom učitelju hematologije, na dragocnim stručnim savetima i sugestijama tokom izrade disertacije i stalnoj podršci u sticanju znanja i savlađivanju naučnih istraživanja u oblasti akutnih leukemija.

Profesorki Biljani Mihaljević, mom prvom mentoru na postdiploskim studijama, koja me je motivisala i podstakla da se bavim naučno-istraživačkim radom u oblasti hematologije.

Profesorki Nadi Suvadžić –Vuković, mom učitelju hematologije, na neizmernoj stručnoj pomoći i svakodnevnoj podršci tokom trajanja ovog istraživanja i izrade disertacije.

Dr Sonji Pavlović, naučnom savetniku, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo (IMGGI), koja je doprinela kreiranju i finalizaciji ove doktorske disertacije, zajedno sa svojim kolegama iz IMGGIa. Doktorska disertacija je urađena u okviru projekta Ministarstva prosvete i nauke, Republike Srbije, br. III 41004, period 2011-2016., naziv projekta: "Retke bolesti: molekularna patofiziologija, dijagnostički i terapijski modaliteti i socijalni, etički i pravni aspekti"; čiji je rukovodilac dr Sonja Pavlović.

Dr Nataši Tošić, višem naučnom saradniku, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo (IMGGI), Univerziteta u Beogradu i njenim kolegama na pomoći u analizi molekularnih markera kod bolesnika sa akutnom mijeloidnom leukemijom. Na prijateljskoj i stručnoj pomoći u tehničkoj realizaciji i obradi rezultata istraživanja.

Mojim kolegama sa I odeljenja i dijagnostičkog odseka, Klinike za hematologiju KCS koji su doprineli realizaciji ove doktorske disertacije.

Veliku zahvalnost dugujem svojoj porodici, na razumevanju i podršci tokom izrade ove doktorske disertacije.

Posvećeno mojoj porodici

Prognostički značaj mutacija u genima za izocitrat dehidrogenazu 1 (IDH1) i izocitrat dehidrogenazu 2 (IDH2) u akutnoj mijeloidnoj leukemiji sa normalnim kariotipom

Sažetak

Uvod: Mutacije u genima za izocitrat dehidrogenazu 1 i 2 (*IDH1* i *IDH2*) su česte rekurentne molekularne promene kod akutne mijeloidne leukemije sa normalnim kariotipom (AML-NK). Uticaj *IDH* mutacija na kliničke karakteristike i ishod lečenja kod AML-NK su u velikoj meri istražene, ali samo nekoliko studija je pratilo ove mutacije u toku bolesti.

Ciljevi: 1) Utvrđivanje učestalosti prisustva *IDH1* i *IDH2* mutacija kod bolesnika sa AML-NK; 2) Utvrđivanje uticaja prisustva *IDH1* i *IDH2* mutacija na učestalost i dužinu remisije, ukupno preživljavanje i 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); 3) 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.

Materijal i metodologija istraživanja: Uzorci od 110 starijih *de novo* AML-NK bolesnika bili su ispitani na *IDH1* i *IDH2* mutaciju. Ispitana je njihova povezanost sa drugim prognostičkim markerima i ishodom lečenja. Pored toga, praćena je stabilnost ovih mutacija u KR i recidivu.

Rezultati: *IDH* mutacije su nađene kod 25 (23%) bolesnika: *IDH1* je imalo 8 (7%) bolesnika, svi od njih su imali *IDH^{R132}*; *IDH2* je imalo 17 (16%) bolesnika (15 *IDH^{R140}*; 2 *IDH^{R172}*). *IDH⁺* bolesnici su imali viši broj trombocita ($p=0.024$), kao i veći procenat blasta u perifernoj krvi ($p=0.031$) u odnosu na *IDH⁻* bolesnike. *IDH⁺* bolesnici su imali nižu stopu KR u poređenju sa *IDH⁻* bolesnicima (44% vs 60%, $p=0.152$), ali to nije bilo statistički značajno. Osim toga, *IDH* mutacije su imale samo neznatan uticaj na trajanje remisije bez bolesti (*IDH⁺*-12 meseci vs *IDH⁻*-17 meseci; $p=0.091$), dok je ukupno preživljavanje (OS) *IDH⁺* bolesnika bilo kraće u poređenju sa *IDH⁻* bolesnicima (2 vs 7 meseci; $p=0.039$). Nepovoljan

uticaj *IDH* mutacije na OS je naročito bio očigledan kod bolesnika koji nisu imali *NPM1* mutaciju (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 u toku recidiva bolesti mutacija se ponovo javila.

Zaključak: *IDH* mutacije imaju lošu prognozu kod de novo AML - NK bolesnika. *IDH* mutacije su pokazale stabilnost u toku bolesti, te stoga mogu da budu korisni markeri za praćenje minimalne rezidualne bolesti kod bolesnika koji su izgubili *IDH* mutacije u KR.

Ključne reči: *IDH1* mutacija; *IDH2* mutacija; akutna mijeloidna leukemija; normalan kariotip

Naučna oblast: Interna medicina

Uža naučna oblast: Hematologija

Prognostic impact of isocitrate dehydrogenase 1 (IDH1) and isocitrate dehydrogenase 2 (IDH2) mutations on outcome in acute myeloid leukemia with normal karyotype

Summary

Background: Mutations in the isocitrate dehydrogenase 1 and 2 (*IDH1* and *IDH2*) genes are frequent recurrent molecular lesions in acute myeloid leukemia with normal karyotype (AML-NK). The effects of *IDH* mutations on clinical features and treatment outcome in AML-NK have been widely investigated, but only a few studies monitored these mutations during follow-up.

Aim: 1) To determine the frequency of presence of *IDH1* and *IDH2* mutations in patients with AML-NK; 2) To determine the effect of the presence of *IDH1* and *IDH2* mutations on duration of remission, overall survival and the association *IDH1* and *IDH2* mutations and other prognostic markers: blood parameters, the biochemical parameters, cytological disease type, immunophenotypic and molecular-genetic characteristics (*FLT3* and *NPM1* mutations); 3) To determine the stability *IDH1* and *IDH2* mutations in the course of the disease by comparing the samples at the start of the disease with samples during complete remission (CR), and in a relapse of the disease.

Material and methods: Samples from 110 adult *de novo* AML-NK patients were assessed for *IDH1* and *IDH2* mutations. Their association with other prognostic markers and outcome was analyzed. In addition, we monitored the stability of these mutations during CR and relapse.

Results: *IDH* mutations were found in 25 (23%) patients: *IDH1* in 8 (7%), all of them *IDH^{R132}*; *IDH2* in 17 (16%) patients (15 *IDH^{R140}*; 2 *IDH^{R172}*). *IDH⁺* patients had higher platelet counts ($p=0.024$), as well as a higher percentage of peripheral blood blasts ($p=0.031$) than *IDH⁻* patients. They tended to have a lower CR rate compared to *IDH⁻* patients (44% vs 60%, $p=0.152$), but this was not statistically significant. Moreover, *IDH* mutations had only a slight impact on disease free survival (*IDH⁺*-12 months vs *IDH⁻*-17 months; $p=0.091$), but

overall survival (OS) of our *IDH*⁺ patients was shorter in comparison with *IDH*⁻ patients (2 vs 7 months; p=0.039). The adverse effect of *IDH* mutations on OS was particularly evident in those lacking the *NPM1* mutation (5 vs 12 months, p=0.050). *IDH* mutations were studied sequentially in 19 *IDH*⁺ patients who were alive after induction. Eleven (58%) of them achieved CR and 9/11 patients lost the *IDH* mutation. However, two patients retained it, although they achieved CR. Two patients who lost their *IDH* mutation, regained it during relapse.

Conclusion: We found that *IDH* mutations confer a poor prognosis in *de novo* AML-NK patients. *IDH* mutations showed stability during the course of the disease and they could be useful markers for minimal residual disease monitoring in patients who lose *IDH* mutations in CR.

Keywords: *IDH1* mutation; *IDH2* mutation; Acute Myeloid Leukemia; Normal Karyotype

Research area: Internal medicine

Area of special interest: Hematology

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Epidemiologija.....	1
1.2. Istorijat.....	2
1.3. Etiologija.....	3
1.4. Patogeneza.....	4
1.4.1. Genetske i epigenetske promene kod AML bolesnika.....	4
1.4.2. Genske mutacije i njihova uloga u patogenezi AML.....	7
1.4.2.1. Mutacije gena koji utiču na preživljavanje ćelije i njenu proliferaciju	7
1.4.2.2. Mutacije koje dovode do poremećaja diferencijacije.....	9
1.4.2.3. Druge mutacije koje učestvuju u patogenezi AML.....	10
1.4.2.4. Mutacije gena koje dovode do epigenetskih promena.....	11
1.5. Klasifikacija.....	15
1.6. Dijagnoza.....	17
1.6.1. Morfologija.....	17
1.6.2. Imunofenotipizacija AML.....	19
1.6.3. Citogenetska analiza.....	20
1.6.4. RT-PCR (reverse transcriptase-polymerase chain reaction).....	20
1.7. Klinička slika.....	21
1.8. Lečenje.....	22
1.8.1. Indukciono lečenje.....	22
1.8.2. Postremisiono lečenje.....	23
1.8.2.1. Konsolidacija sa intenzivnom hemioterapijom.....	23
1.8.2.2. Alogena TMČH kod bolesnika sa AML.....	25
1.8.2.3. Autologa TMČH kod bolesnika sa AML.....	29
1.8.3. Terapija održavanja kod bolesnika sa AML.....	29
1.8.4. Lečenje bolesnika nepodobnih za intezivnu terapiju.....	29
1.8.5. Lečenje recidiva i primarno refraktarne AML.....	30

1.8.6. Nove terapijske strategije.....	31
1.9. Praćenje minimalne rezidualne bolesti.....	33
1.10. Tok i prognoza AML.....	36
1.10.1. Procena odgovora na primenjeno lečenje.....	36
1.10.2. Recidiv i primarno refraktarna AML.....	37
1.10.3. Rana smrt.....	38
1.11. Prognostički faktori kod AML bolesnika.....	39
1.11.1. Prognostički značaj IDH mutacija.....	42
2. CILJ RADA.....	43
3. MATERIJAL I METODOLOGIJA ISTRAŽIVANJA.....	44
3.1. Klinička i hematološka ispitivanja.....	44
3.2. Morfološka i citohemijska razmaza koštane srži.....	45
3.3. Imunofenotipizacija protočnom citometrijom.....	45
3.3.1. Monoklonska antitela.....	46
3.3.2. Metod direktne višekolorne imunofluorescencije.....	46
3.3.3. Merenje i analiza uzorka metodom multiparametarske protočne citometrije...	47
3.4. Klasična citogenetska analiza metodom HG traka.....	49
3.5. Molekularno getska istraživanja.....	50
3.5.1. Reakcija lančanog umnožavanja DNK PCR.....	51
3.5.2. Detekcija <i>FLT3/ITD</i> mutacije.....	51
3.5.3. Detekcija <i>FLT3/D835</i> mutacije.....	52
3.5.4. Detekcija mutacija u <i>NPM1</i> genu.....	53
3.5.5. Detekcija mutacija u <i>IDH1</i> genu.....	54
3.5.6. Detekcija mutacija u <i>IDH2</i> genu.....	55
3.5.7. Analiza DNK na agaroznom gelu.....	55
3.5.8. Analiza DNK na poliakrilamidnom gelu.....	56
3.5.9. Bojenje poliakrilamidnih gelova srebronitratom.....	56
3.5.10. Sekvenciranje PCR produkata.....	56
3.6. Lečenje AML bolesnika.....	58
3.7. Statistička analiza.....	59

4. REZULTATI.....	60
4.1. Demografske osobine bolesnika.....	60
4.1.1. Distribucija bolesnika prema polu.....	60
4.1.2. Distribucija bolesnika prema životnoj dobi.....	60
4.2. Kliničke osobine bolesnika.....	61
4.2.1. Prezentacija bolesnika sa AML-NK pri dijagnozi.....	61
4.2.2. Distribucija bolesnika prema opštem funkcionalnom stanju.....	61
4.2.3. Distribucija bolesnika prema komorbiditetnom indeksu (HCT-CI).....	62
4.3. Laboratorijski nalazi.....	63
4.4. FAB podtipovi AML-NK bolesnika.....	64
4.5. Imunofenotipske karakteristike AML-NK bolesnika.....	65
4.6. Molekularne karakteristike AML-NK bolesnika.....	66
4.7. Molekularne podgrupe rizika AML-NK bolesnika.....	66
4.8. Učestalost <i>IDH1</i> i <i>IDH2</i> mutacija kod AML-NK bolesnika.....	67
4.9. Kliničke karakteristike AML-NK bolesnika sa <i>IDH</i> mutacijom.....	68
4.9.1. Kliničke karakteristike AML-NK bolesnika sa <i>IDH1</i> i <i>IDH2</i> mutacijom.....	69
4.9.2. Imunofenotipske karakteristike AML-NK bolesnika sa <i>IDH</i> mutacijom.....	70
4.9.3. Povezanost <i>IDH</i> mutacija sa drugim molekularnim markerima.....	72
4.9.4. Molekularne podgrupe rizika AML-NK bolesnika sa <i>IDH1</i> i <i>IDH2</i> mutacijom.....	72
4.10. Analiza lečenja AML-NK bolesnika.....	73
4.10.1. Rezultati indukcionog lečenja.....	74
4.10.2. Rana smrt.....	75
4.10.3. Recidiv i refraktarnost bolesti.....	77
4.11. Uticaj <i>IDH1</i> i <i>IDH2</i> mutacija na ishod bolesti.....	82
4.12. Analiza preživljavanja.....	83
4.12.1. Analiza preživljavanja u odnosu na <i>IDH1</i> i <i>IDH2</i> mutacije.....	88
4.12.2. Analiza preživljavanja kod transplantiranih bolesnika sa <i>IDH</i> mutacijom.....	89
4.12.3. Analiza preživljavanja u odnosu na molekularne podgrupe rizika.....	91
4.13. Praćenje AML-NK bolesnika sa <i>IDH</i> mutacijom.....	93

5. DISKUSIJA.....	95
6. ZAKLJUČCI.....	105
7. LITERATURA.....	107

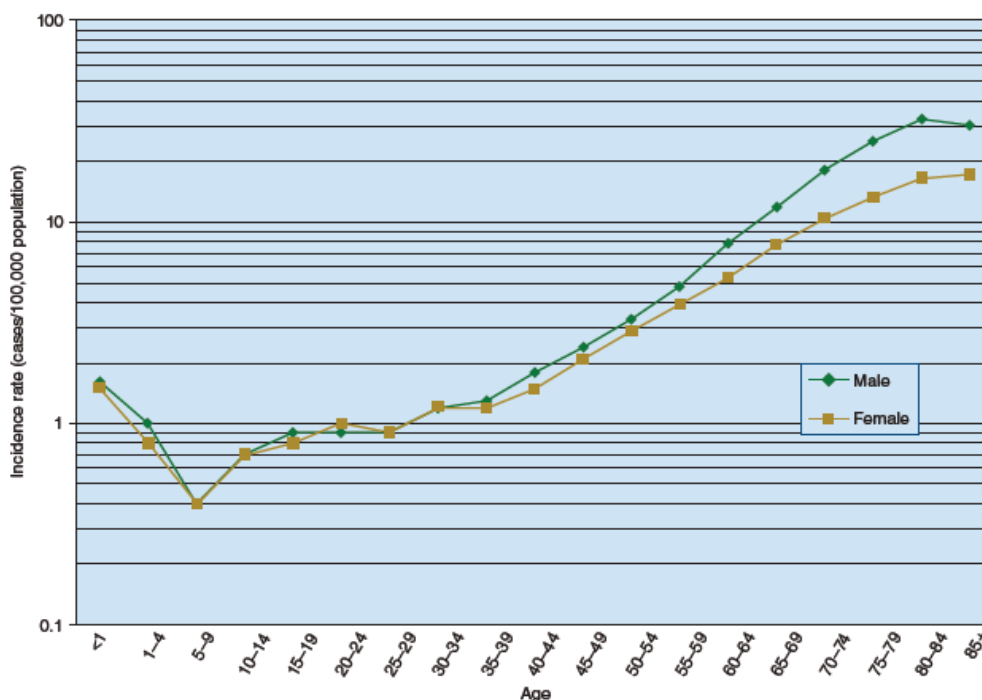
1. UVOD

Akutna mijeloidna leukemija (AML) je heterogena klonalna maligna bolest hematopoeznog tkiva u kojoj nezrele ćelije hematopoeze proliferišu i akumuliraju se u koštanoj srži, perifernoj krvi i drugim tkivima. Ove maligne ćelije postepeno zamenjuju i inhibiraju rast i sazrevanje normalnih predhodnika eritroidne, mijeloidne i megakariocitne loze (1).

Nekada je pre 50 godina AML bila neizlečiva bolest, dok je sada izlečiva kod 35 do 40% bolesnika koji su mlađi od 60 godina i kod 5 do 15% bolesnika starijih od 60 godina. Tokom proteklih nekoliko decenija učinjen je veliki napredak u razumevanju genetske a poslednjih nekoliko godina i molekularne heterogenosti AML a uveliko je u toku njihova primena u cilju poboljšanja lečenja AML bolesnika (2).

1.1. Epidemiologija

Akutna mijeloidna leukemija (AML) je retka maligna bolest hematopoeznog tkiva, uglavnom starijih bolesnika. Godišnja incidenca AML je 3-5 na 100.000 stanovnika (3). Prosečna starost AML bolesnika pri dijagnozi je oko 65–70 godina i u 80 % slučajeva je zastupljena kod starijih ljudi. Incidenca AML kod dece mlađe od 1 godinu je prosečno 1.5 na 100.000 smanjujući se na 0.4 na 100.000 kod dece uzrasta 5 do 9 godina, postepeno se povećava na 1 osobu na 100.000 stanovnika do starosti od 25 godina, a nakon toga se povećava eksponencijalno dok stopa ne dosegne 25 na 100.000 osoba kod osamdesetogodišnjaka (Slika 1.) (4).



Slika 1. Godišnja incidenca AML prema godinama starosti bolesnika

Preuzeto iz: Xie M. i sar. Age-related mutations associated with clonal hematopoietic expansion and malignancies. *Nat Med*, 2014,20:1472-78.

1.2. Istorijat

Rana istorija leukemija datira od pre 200 i više godina. Tada je Peter Cullen je 1811. godine opisao slučaj akutnog splenitisa i neobjašnjivo mlečne krvi. Alfred Velpea je 1825. godine opisao simptome leukemije i njihovu povezanost sa povećanim brojem leukocita. John Bennett je 1845. godine bolest nazvao *leucocithemia*, na osnovu mikroskopskog nalaza velikog broja leukocita. Iste godine, Rudolf Virchov je uočio poremećeni balans između leukocita i eritrocita u krvi. On je 1847. godine nazvao ovu bolest „leukemija”. Henry Fuller je 1846. godine prikazao prvu mikroskopsku dijagnozu bolesnika sa leukemijom (5). Potom je, Neumann 1878. godine, pretpostavio da je koštana srž mesto gde se stvaraju krvne ćelije i prvi upotrebio termin mijeloidna leukemija. Ehrlichovim uvođenjem bojenja sa anilinskim

bojama razmaza krvi, uz Naegeleov opis mijeloblasta i mijelocita i Hirschfielddovo otkriće o zajedničkom poreklu eritrocita i leukocita postavljen je temelj za naše sadašnje razumevanje ove bolesti (6). Iako je Theodor Boveri ukazao na ključnu ulogu hromozomskih aberacija u razvoju karcinoma 1914. godine, niz tehničkih dostignuća 1950. godine je bio potreban da bi se omogućilo ispitivanje hromozoma ćelija humanog karcinoma. Potom dolazi do identifikacije pojedinih hromozoma i mesta u kojima dolazi do prekida i formiranja translokacija, inverzija ili delecija (6). Ova citogenetska otkrića inicirala su eru istraživanja leukemija zasnovanoj ne samo na izgledu ćelija pod mikroskopom, već i na genetskom poremećaju. Upotpunjavanje ljudskog genoma omogućilo je dalju bolju specifičniju indentifikaciju genetskih promena.

Ovaj napredak je doprineo boljem razumevanju molekularne patologije specifičnih podvrsta leukemija, poboljšanju dijagnostičkih i prognostičkih metoda za proučavanje AML, kao i identifikaciji molekularnih markera i poboljšanju lečenja primenom ciljne terapije.

1.3. Etiologija

Etiologija za većinu AML bolesnika je nejasna. Međutim, poznato je da se nekoliko faktora rizika može povezati sa razvojem AML: izloženost faktorima spoljašnje sredine i hemioterapijskim lekovima, predhodne hematološke i druge bolesti, urođeni sindromi. Samo je za četiri faktora životne sredine potvrđeno da su uzročnici AML: izloženost visokim dozama zračenja (7), hronična izloženost visokim dozama benzena (8), hronično pušenje (9) i hemioterapijski lekovi (10). Osobe izložene organskim rastvaračima, naftnim derivatima, pesticidima i herbicidima mogu biti pod visokim rizikom za nastanak AML. Povećana incidenca AML uočena je kod bolesnika koji su primali hemioterapiju za maligne i nemaligne bolesti. AML nastala posle prethodnog lečenja (therapy related-myeloid neoplasms (t-AML)) najčešće se javlja nakon primene bilo alkilirajućih lekova ili topoizomeraza II inhibitora (11). T-AML koja je povezana sa alkilirajućim lekovima obično predhodi period mijelodisplazije koji se karakteriše anemijom, neutropenijom ili trombocitopenijom. Citogenetske promene se javljaju na hromozomima 7, 5 i 8 pored drugih kompleksnih genetskih promena kod 50% do 90% bolesnika (11). T-AML koje su povezane sa *topoizomeraza II inhibitorima* ne

predhodi mijelodisplastična faza i odlikuju se kraćim periodom latencije manje od 2 do 3 godine (12). Povezane su sa hromozomskim rearanžmanima na hromozomima 3, 11 i 21 i karakterišu se balansiranom translokacijom koja obuhvata 11q23 rearažman. Ishod lečenja ovih bolesnika je daleko lošiji u odnosu na bolesnike sa de novo AML koji imaju slične kliničke i citogenske abnormalnosti.

AML može nastati usled progresije drugih klonalnih bolesti multipotentene matične ćelije hematopoeze uključujući hroničnu mijeloidnu leukemiju, hroničnu mijelomonocitnu leukemiju, hroničnu neutrofilnu leukemiju, policitemiju veru, primarnu mijelofibrozu, esencijalnu trombocitemiju, mijelodisplastični sindrom (MDS), paroksizmalnu noćnu hemoglobinuriju (6). Takođe, bolesnici mogu imati bolesti koje imaju predispoziciju ka nastanku AML, kao što su neke hematološke bolesti: aplastična anemija, multipli mijelom, Langerhansova histiocitoza i druge bolesti poput imunih bolesti štitne žlezde, poliendokrinih sindroma i AIDSa (13,14). Kod urođenih bolesti je zastupljeno nekoliko patogenetskih vrsta genetskih poremećaja, kao što su: oštećenje DNK reparacionih mehanizama (Fankonijeva anemija); osetljivost gena koja dovodi do drugih mutacija (porodični trombocitni poremećaji); oštećenja tumor- supresor gena (kongenitalna diskeratoza) i drugi (6).

1.4. Patogeneza

1.4.1. Genetske i epigenetske promene kod AML bolesnika

Akutna mijeloidna leukemija je heterogena bolest koja se javlja kao posledica stečenih genetskih promena u matičnoj ćeliji hematopoeze, kako mutacija gena tako i promena u ekspresiji gena. U osnovi patogeneze AML su brojne genetske i epigenetske promene koje dovode do poremećaja u mehanizmima diferencijacije, proliferacije i apoptoze. Napredak u molekularnim istraživanjima je znatno poboljšao razumevanje leukemogeneze kod AML. Prema hipotezi "2- hit model" za razvoj AML neophodno je prisustvo najmanje dve mutacije gena iz klase I i II (15, 16). Mutacije klase I gena, kao što su *RAS*, *FLT3*, *KIT*, *PTPN11* i *JAK2*, koji kontrolišu ćelijsku proliferaciju i apoptozu, intracelularne signalne puteve poput tirozin kinaza dovode do povećane proliferacije i / ili inhibicije apoptoze.

Mutacije klasa II gena, kao što su: t(15;17)/PML-RARA, inv(16)/CBFB-MYH11 i t(8;21)/RUNX1-RUNX1T1 fuzije i MLL/PTD, CEBPA, AML1/RUNX1, koji su povezani sa blokadom u sazrevanju preko genetskih promena u transkripcionim faktorima imaju odlučujuću ulogu u diferencijaciji ćelija za vreme mijeloidne hematopoeze. Iako klasične mutacije ostaju osnovni događaji kod AML, koristeći tehnike nove generacije sekvenciranja otkrivene su nove genetske aberacije koje su doprinele boljem rasvetljavanju leukemogeneze kod AML (17). Otkriće novog spektra mutacija (od kojih se mnoge od njih prirodno ne uklapaju ni u jednu od prethodno opisane dve grupe mutacija) doprinelo je da "2- hit model" nije više upotrebljiv. Potvrđeno je da su epigenetski poremećaji, pored genetskih promena, takođe krucijalni u patogenezi AML (18). Epigenetske aberacije mogu biti uključene u regulaciju DNA metilacije (kao što su mutacije u DNMT3A, TET2, IDH1, i IDH2) ili u druge tipove regulatornih mehanizama hromatina i modifikacije histona (MLL fuzije, MLL-PTD i mutacije u genima ASKSL1 i EZH2) (19). Prema studiji "The Cancer Genome Atlas" genske mutacije kod AML se mogu klasifikovati u devet glavnih genetskih kategorija na osnovu vrste gena pogođenih mutacijom (Tabela 1.) (17).

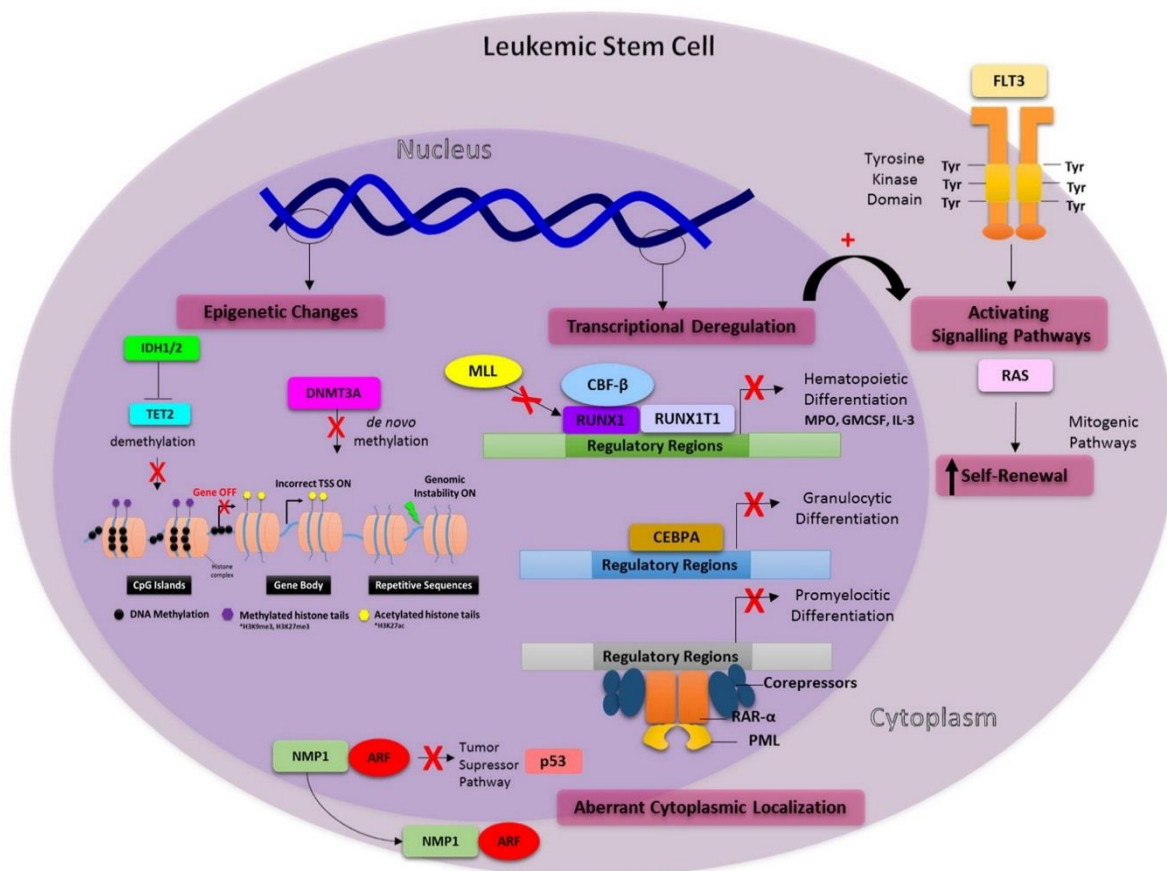
Tabela 1. Kategorizacija i učestalost mutacija prema TCGA

Kategorije		%
Fuzioni transkripcioni faktori	<i>PML-RARα; CBFB-MYH11; RUNX1-RUNX1T1; PICALM-MLLT10</i>	18
<i>NPM1</i> mutacije		27
Tumor supresor geni	<i>TP53; WT1; PHF6</i>	16
DNA metilacije	<i>DNMT3A; DNMT3B; DNMT1; TET1; TET2 IDH1; IDH2</i>	44
Aktivirajuće tirozin kinaze	<i>FLT3; KIT; druge tirozin kinaze; Serin-treonine kinaze; KRAS/NRAS; PTPs</i>	59
Mijeloidni transkripcioni faktori	<i>RUNX1; CEBPA; drugi mijeloidni transkripcioni faktori</i>	22
Hromatin modifikatori	<i>MLL fuzije; MLL-PTD; NUP98-NSD1; ASXL1 EZH2; KDM6A;</i>	30
Kohezioni kompleks	<i>STAG2; SMC1A; SMC3; RAD21</i>	13
Splajsozomski kompleks	<i>U2AF1; SRSF2; SF3B1</i>	14

TCGA- The Cancer Genome Atlas

Preuzeto iz: Cancer Genome Atlas Research Network. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. N Engl J Med. 2013;368:2059–2074.

Neki od gena u kojima su identifikovane mutacije koji mogu imati ulogu u patofiziološkim procesima u AML ili prognostički značaj opisane su u daljem tekstu. U tom kontekstu, molekularni mehanizmi uključeni u razvoj AML prikazani su na slici 2 (40).



Slika 2. Molekularni mehanizmi uključeni u patogenezu AML i uloga genskih mutacija u leukemijskoj ćeliji. **Jedro:** epigenetske promene i deregulacija transkripcije menja ekspresioni profil gena. *DNMT3A*, *IDH1/2* i *TET2* mutacije koje indukuju promene DNK metilacije i modifikaciju histone. *IDH1/2* mutacije inhibiraju samo *TET2*; *CEBPA* mutacije i aberantne fuzije gena kao što su *MLL*, *RUNX1-RUNX1T1* i *PML-RAR α* remete transkripciju gena hematopoezne i mijeloidne diferencijacije vezivanjem za regulatorne regione. Ovi događaji dovode do aktivacije signalnih puteva preživljavanja i stimulišu samoobnavljanje. **Citoplazma:** *FLT3* mutacije indukuju aktivaciju mitogenih signalnih puteva uključujući proliferacione faktore kao što je *RAS* koji povećavaju samoobnavljanje. *NMP1* mutacija blokira tumor supresor signalne puteve.

Preuzeto iz: Prada-Arismendy J i saradnici. Molecular biomarkers in acute myeloid leukemia. Blood Rev. 2017; 31(1):63-76.

1.4.2. Genske mutacije i njihova uloga u patogenezi AML

1.4.2.1. Mutacije gena koji utiču na preživljavanje ćelije i njenu proliferaciju

Blokada procesa diferencijacije je samo jedan od koraka ka razvoju kompletnog leukemijskog fenotipa. Maligni klon mora da poseduje dodatnu selektivnu prednost u odnosu na normalne ćelije da bi postao dominantan. Proliferativna prednost leukemijskog klona se najčešće postiže aktivacijom tirozin kinaznih receptora. U ovu grupu genskih mutacija ubrajaju se mutacije klase I gena, kao što su *RAS*, *FLT3*, *KIT*, *PTPN11* i *JAK2* (39).

Mutacije u *Fms-Like Tyrosine Kinase 3 (FLT3)* genu

FLT3 gen pripada III klasi receptora tirozin kinaze, takođe poznat kao kinaza 1 matičnih ćelija (STK1) ili fetalna kinaza jetre 2 (Flk2). *FLT3* je transmembranski–receptor, ekspimiran u progenitornim ćelijama hematopoeze, koji reguliše diferencijaciju i proliferaciju ovih ćelija (20). *FLT3* postoji u monomernom, nefosforilisanom stanju. Kada se receptor veže sa *FLT* ligandom, dolazi do njegove homodimerizacije. Ova dimerizacija receptora aktivira domen tirozin kinaze, dovodeći do fosforilacije različitih mesta u interćelijskom domenu, koji zauzvrat izaziva regrutovanje i aktivaciju nekih proteina, što rezultira kaskadom reakcija fosforilacije, koja kulminira u aktiviranju MAP kinaze, STAT i AKT/PI3 kinaze signalnih transdukcionih puteva. Ovi putevi pokreću niz događaja uključenih u regulaciju ćelijske diferencijacije, proliferacije, apoptoze i preživljavanje ćelija (21). Za vreme normalne hematopoeze, povećanje nivoa *FLT3* ekspresije određuje strogu hijerarhiju unutar odeljaka matičnih ćelija i progenitora hematopoeze, koji je povezan sa limfoidnim i mijeloidnom potencijalom; na takav način da su neke prekursor ćelije koje ekspimiraju visoke nivoe *FLT3* dovode do porasta limfocita, granulocita i makrofaga, ali smanjenja eritromegakariocitnog potencijala (22). Najvažnija mutacija pronađena u ovom genu je internal tandem duplikacija (*FLT3-ITD*), koja nije samo najčešća mutacija, već je najviše uključena u AML prognozu. Ova mutacija čini *FLT3* kinazu konstitutivno aktivnom (23). *FLT3-ITD* je uočena kod otprilike 30–40% of AML bolesnika. Nekoliko studija je

potvrdilo da je *FLT3* mutacija povezana sa lošom prognozom i visokim procentom blasta kod bolesnika sa AML, sugerišući da su ove mutacije uključene u progresiju bolesti (24-26).

RAS mutacije

RAS onkogeni kodiraju familiju transmembranskih proteina koji regulišu signalno provođenje vezujući različite membranske receptore. Na taj način, *RAS* proteini igraju važnu ulogu u regulaciji procesa proliferacije, diferencijacije i apoptoze. Mutacije u *RAS* genima su uključene u patogenezu AML (27). Konstitutivna aktivacija ovih proteina koja se javlja kao posledica prisustva tačkastih mutacija u *RAS* genu, remeti ove važne ćelijske procese. *RAS* mutacije su prisutne kod 5-15% svih AML slučajeva. Kod AML bolesnika koji su nosioci *inv (16)* frekvencija ovih mutacija dostiže i 35% (27).

c-KIT mutacije

KIT gen je lociran na hromozomu 4q11-12, koji kodira 145-kDa transmembranskih receptor tirozin kinaza tipa III podgrupe (28). *KIT* je eksprimiran u hematopoeznim ćelijama, mastocitima, melanocitima, germinativnim i intersticijalnim ćelijama (28). Nakon vezivanja liganda faktora matične ćelije za ekstracelularne domene imunoglobulina, dolazi do homodimerizacije i autofosforilacije *KITa* na Y568 i Y570 tirozinskih ostataka jukstamembranskog domena, koji aktivira donji silazni signalni put uključen u proliferaciju, diferencijaciju i preživljavanje (28). Zbog nastanka tačkastih mutacija u kinaznom domenu *KITa* dolazi do ligand nezavisne aktivacije *KIT* signalizacije, što vodi nekontrolisanoj proliferaciji i otpornosti na apoptozu (29). Ukupna učestalost ovih mutacija kod AML bolesnika je relativno mala (2-8%), osim kod CBF (core binding factor) AML (AML sa translokacijom *t(8;21)* i *inv(16)*), gde se učestalost ovih mutacija kreće od 12 do 22%. *C-KIT* mutacije su visoko rizične za nastanak recidiva kod bolesnika sa CBF AML (29).

1.4.2.2. Mutacije koje dovode do poremećaja diferencijacije

AML se karakteriše postojanjem blokade u procesu diferencijacije mijeloidnih progenitora ka zrelim monocitima, odnosno granulocitima. Ova blokada je uzrokovana prisustvom aberantne ekspresije normalnih transkripcionih faktora ili nastankom abnormalnih, hibridnih transkripcionih faktora. Promene u funkciji pojedinih transkripcionih faktora najčešće su uzrokovane prisustvom rekurentnih hromozomskih translokacija. Translokacije najčešće pogađaju transkripcione faktore kao što su: *CBF* fuzioni geni *RUNX1/RUNX1T1* i *CBFB/MYH11*, *PML-RAR α* , kao i mutacije u *CEBPA* genu i *AML1/RUNX1* i *MLL* (30).

***CEBPA* (CCAAT-/enhancer binding protein alpha) mutacije**

CEBPA gen kodira factor transkripcije koji inhibira proliferaciju i stoga se smatra tumor supresor genom (31). U hematopoeznom tkivu *CEBPA* je eksprimiran isključivo u mijelomonocitnim ćelijama. Ekspresija ovog gena je povećana za vreme granulocitne diferencijacije i uslovna ekspresija *CEBPA* gena je dovoljna da aktivira diferencijaciju neutrofila (32). Mutacije u ovom genu uočene su kod 7–11% AML bolesnika, od kojih 45% ima *CEBPA* jednostruku-mutaciju, dok je 55% sa *CEBPA* duplom-mutacijom. Bolesnici sa *CEBPA* sa duplom mutacijom imaju bolje 8- godišnje ukupno preživljavanje, u poređenju sa onima sa singl-mutacijom ili one bez (33).

***MLL* (Mixed Lineage Leukemia) gen**

MLL gen je lociran na hromozomu 11q23 kodira protein koji ima aktivnost histon metiltransferaze koja koordiniše modifikaciju hromatina kao deo regulatornog kompleksa koji ima ulogu u epigenetskoj regulaciji transkripcije i bitan je za embrioni razvoj i hematopoezu (34). *MLL* gen ima leukemogeni efekat samo nakon fuzije sa nizom partnerskih gena, uključujući *AF4*, *AF9*, *ENL*, *AF10* i *ELL* (35). *MLL* fuzioni geni aktiviraju gene kao što su *HoxA9* i *HoxA10*, koji su nishodno regulisani kod *MLL* leukemija. Kod odraslih AML-

NK bolesnika, učestalost *MLL* rearanžmana je 11%. Sekundarne ili t-AML takođe, eksprimitraju *MLL* rearanžmane sa učestalošću 5–10% od svih *MLL* leukemija. Uglavnom, bolesnici sa *MLL* rearanžmanom imaju lošu prognozu i leče se prema protokolima za visoko rizične bolesnike (36).

***CBF* (Core binding factor) kompleks**

CBF-AML se karakterišu prisustvom ili t(8;21) ili inv(16)/t(16;16), koje nastaju fuzijom *RUNX1-RUNX1T1(AML1-ETO)* i *CBFB-MYH11* gena (37). *CBF-AML* je jedan od najčešćih citogenetskih podtipova *AML*, jer t(8;21) i inv(16) zajedno čine oko 15–20% de novo *AML* slučajeva, pretežno kod mlađih bolesnika (38). *CBF* kompleks je heterodimer koji se sastoji iz dva proteina, *CBFβ* i *AML-1* i ima ulogu u procesima rane hematopoeze. Navedene translokacije rezultuju u *AML/ETO* i *CBFβ/MYH11* fuzionim proteinima koji deluju kao dominantno negativni inhibitori transkripcije zavisne od *CBF* i dovode do smanjenja ekspresije pojedinih gena koji se nalaze pod kontrolom *AML1* proteina (39).

***PML-RARα* (retinoic acid receptor-α)**

Akutna promijelocitna leukemija (*APL*) je pravi primer blokade diferencijacije. Naime, t(15;17) koja je prisutna u oko 98% slučajeva *APL*, dovodi do stvaranja *PML-RARα* fuzinog proteina koji deluje kao dominantno negativni inhibitor *RARα*. Poremećaj funkcije *RARα* transkripcionog faktora izaziva efikasnu blokadu granulocitne diferencijacije na stadijumu promijelocita (39).

1.4.2.3. Druge mutacije koje su učestvuju u patogenezi *AML*

***NPM1* (Nucleophosmin) mutacija**

NPM1 je šaperon protein koji cirkuliše između jedra i citoplazme i uključen je u mnogobrojne funkcije kao što su: skupljanje ribozomalnih proteina i transport, kontrola

duplikacije centrozoma i regulacija tumor supresor interaktivnih proteina (40). Krećući se između ćelijskih odeljaka, *NPM1* učestvuje u različitim ćelijskim procesima kao što su transport pre-ribosomalnih partikula i biogeneza ribozoma, održavanje genomske stabilnosti, kao i regulaciji DNA transkripcije. Uzimajući u obzir da *NPM1* funkcioniše kao tumor supresor gen, bilo koja mutacija koja utiče na njegov transport između jezgra i citoplazme može biti kritična u malignoj transformaciji (40). *NPM1* mutacije su najzastupljenije mutacije kod AML, javljaju se kod 25%–30% bolesnika, sa predominacijom kod žena (41). *NPM1* mutacije dovode do aberantne ekspresije *NPM1* proteina u citoplazmi i jedru, stimulišući mijeloidnu proliferaciju i razvoj leukemije (42, 43). Klinički, mutacija je povezana sa monocitnom morfologijom i u odsustvu *FLT3-ITD* mutacije, predviđa povoljniju prognozu. Razlog za povoljno preživljavanje ostaje nejasan, premda je pronađeno da su *NPM1* mutacije hemosenzitivne na intenzivnu hemioterapiju kod mladih i starih, što može objasniti povoljan ishod (44). *NPM1* mutacije su povezane sa rekurentnim genetskim abnormalnostima kao što su: +8, *DNMT3A*, *FLT3-ITD* (40%), *FLT3-TKD* (10%–15%) i *IDH* mutacije (25%) (44, 45).

WT1 (Wilms' Tumor 1) mutacija

WT1 gen, koji kodira transkripcioni faktor, je eksprimiran na matičnim ćelijama hematopoeze i učestvuje u regulaciji ćelijskog rasta i diferencijacije. (46). Mutacije u *WT1* genu su pronađene kod oko 7-13% AML-NK bolesnika (47, 48). Precizna uloga *WT1* mutacija u leukemogenezi ostaje da se definiše. Hromozomska abnormalnost t(7;11)(p15;15) je blisko povezana sa *WT1* mutacijom (47). Takođe, *WT1* mutacije su povezane sa *FLT3/ITD* i *CEBPA* mutacijama (47,49). *WT1* mutacija je nezavistan loš prognostički faktor kod AML-NK kao i kod svih AML bolesnika (48,49), iako su prijavljeni i drugačiji rezultati (47,50).

1.4.2.4. Mutacije gena koje dovode do epigenetskih promena

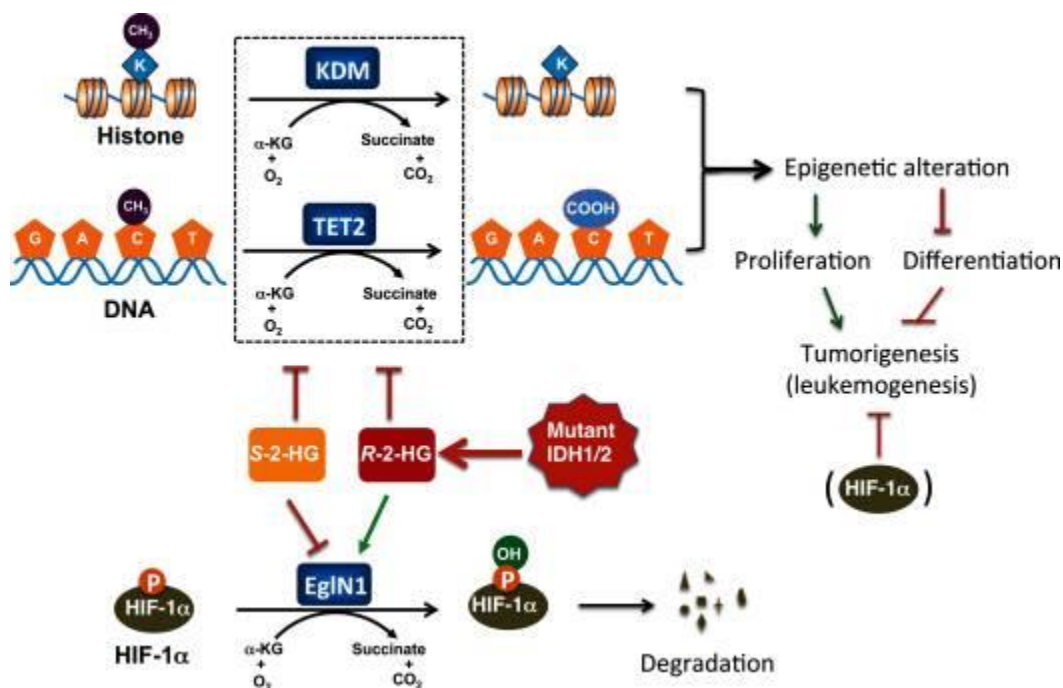
Za razliku od genetskih abnormalnosti koje dovode do promene u DNA sekvencama, epigenetske promene dovode do aberantne ekspresije gena (51, 52). Epigenetska regulacija

podrazumeva DNA metilaciju, modifikaciju histona, remodelovanje hromatitina i regulaciju microRNA ekspresije (51, 52). Prema poslednjim istraživanjima mutacije gena koje su povezane sa epigenetskim modifikacijama, kao što su: *IDH1*, *IDH2*, *TET2*, *ASXL1* i *DNMT3A*, detektovane kod AML bolesnika igraju važnu ulogu u ranim fazama leukemogeneze i tokom razvoja AML (53).

IDH 1 (izocitrat dehidrogenaza 1) i IDH2 (izocitrat dehidrogenaza 2) mutacije

IDH1 i *IDH2* su geni koji kodiraju NADP (redukovani nikotinamid adenin dinukleotid fosfat) -zavisne izocitrat dehidrogenaze, koje se nalaze u citoplazmi i mitohondrijama. Ovi enzimi imaju ulogu u metabolizmu glukoze, masnih kiselina, i glutamina i doprinose održavanju normalnog ćelijskog redukciono-oksidativnog statusa. Citoplazmatski *IDH1* i njegov mitohondrijalni ekvivalent *IDH2* katalizuju oksidativnu konverziju izocitrata u α -ketoglutarat (α -KG), konvertujući NADP u redukovani NADP (NADPH) (54). Reakcija katalizovana *IDH1* i *IDH2* se smatra jednom od samo tri glavna mehanizma proizvodnje NADPH u ćelijama sisara (5). NADPH je glavni nosilac redukovanih ekvivalenata u ćelijama. To obezbeđuje redukciju ključnih reakcija u brojnim makromolekularnim biosintetskim putevima i sistemima koji štite od oksidativnog stresa. *IDH1* i *IDH2* mutacije su heterozigoti i tipično pogađaju arginin prisutan na katalitičnom mestu enzima; arginine 132 kod *IDH1* i arginin 140 ili 172 kod *IDH2*. Mutirani enzim stiče neomorfnu funkciju, koji konvertuje α -KG u 2-hidroksiglutarat (2-HG), za koji se smatra da je onkometabolit koji ima ulogu u tumorogenezi (55). Povećan nivo 2-HG kod *IDH1* i *IDH2* mutirane ćelije dovodi do inhibicije funkcije *TET2* (Ten Eleven Translocation), što dovodi do DNK hipermetilacije fenotipa i blokira demetilaciju histona inhibiranjem histon demetilaze. *IDH1/IDH2* i *TET2* mutacije se međusobno isključuju, verovatno zbog preklapanja biološkog efekata (56). Ove mutacije utiču na demetilaciju histona procesom blokiranja, time blokiraju diferencijaciju matičnih ćelija hematopoeze i indukuju klonalnu proliferaciju progenitora hematopoeze (57,58). Jedan od predloženih modela tumorogeneze izazavane mutacijom metaboličkih enzima *IDH1/IDH2* gde dolazi do inhibicije α -KG-zavisnih dioksigenaza (*TET2* i lizin demetilaza (KDM) i nastanka onkometabolita 2-HG, što

dovodi dalje do epigenetskih promena i u DNA i histonima, promena genske ekspresije i onkogene transformacije prikazan je na slici 3 (59).



Slika 3. Model tumorogeneze

Preuzeto iz: Ye D i saradnici. R-2-hydroxyglutarate as the key effector of *IDH* mutations promoting oncogenesis, *Cancer Cell*. 2013; 23(3): 274–276.

***TET2* (ten–eleven translocation) mutacije**

TET2 protein katalizuje konverziju 5-metil citozina (5-mC) DNK u 5-hidroksi metil citozin (5-hmC), sa gvožđem i α -KG kao kofaktorima, što ukazuje na ulogu *TET2* u DNK metilaciji (60). *TET2* mutacije dovode do globalne DNK hipermetilacije (61). *TET2* mutacije dovode do prekida mijeloidne diferencijacije i povezane su sa smanjenim nivoom 5hmC, što sugeriše kritičnu ulogu ovog proteina u mijeloidnoj transformaciji (62). Nedavne studije su

pokazale da je inaktivacija *TET2* prisutna u preleukemijskim matičnim ćelijama hematopoeze (MČH) i odnosi se na klonalnu proliferaciju, zato je to rani događaj leukemogeneze kod AML (63). *TET2* mutacije su prisutne u oko 10–20% AML (64). Klinička ispitivanja povezuju *TET2* mutacije sa smanjenim ukupnim preživljavanjem kod bolesnika sa intermedijarnim rizikom (65).

***ASXL1* (Additional sex comb-like 1) mutacija**

Mutacije *ASXL1* gena su nađene kod oko 5-30% bolesnika sa AML (66). *ASXL-1* ima modulatoreni efekat na epigenom (67). Stoga, gubitak *ASXL-1* ekspresije kod mijeloidnih neoplazmi dovodi do prekomerne ekspresije leukemija-promovišućih gena (67). Prognostički značaj *ASXL-1* mutacija kod AML je manje jasan. Neke studije su pokazale da *TET2*, *ASXL-1* mutacije imaju posebno lošu prognozu kod povoljne grupe rizika AML (68). U studiji, Pratcorona i sar. pokazana značajna povezanost lošeg preživljavanja i *ASXL-1* mutacije što se posebno odnosilo na intermedijarnu grupu rizika (66).

***DNMT3A* (DNA methyltransferase 3 genes) mutacije**

DNMT3A gen, koji kodira enzim DNA metiltransferazu 3A pripada porodici DNMTs i katalizuje dodatak metil grupe citozinu CpG dinukleotidu (69). *DNMT3A* mutacije su prisutne u preleukemijskoj MČH i smatraju se ranim događajem u patogenezi AML (70). Većina mutacija javlja se na R882 amino kiselini. Iako *DNMT3A* je direktno povezan sa DNK metilacijom, pravi značaj ove mutacija na leukemogenezu ostaje nepoznat. *DNMT3A* mutacije su prijavljene kod 18–22% AML bolesnika, sa najvećom učestalošću od 30–37% kod AML-NK. Većina studija je pokazalo nepovoljan uticaj na ishod bolesti, sa značajnim smanjenjem ukupnog preživljavanja kod bolesnika sa *DNMT3A* mutacijama (71,72).

1.5. Klasifikacija

Francusko-američko-britanska (FAB) klasifikacija predstavlja prvi pokušaj da se napravi razlika između različitih tipova AML. Uvedena je 1976. godine i definiše osam podtipova (M0-M7) na osnovu morfoloških i citohemijskih karakteristika leukemijskih ćelija (73). Tokom proteklih godina bilo je nekoliko različitih klasifikacija AML zasnovanih na etiologiji, morfologiji, imunofenotipu i genetici. Klasifikacija AML Svetske zdravstvene organizacije (SZO), zamenila je stari francuski-američko-britanski sistem klasifikacije i postala osnovni modalitet klasifikacije AML danas. Klasifikacija SZO iz 2008. godine (74), u koju su inkorporirani novi genetički podaci zajedno sa morfološkom, imunofenotipskom i kliničkom prezentacijom, indentifikuje sedam grupa AML: (1) AML sa rekurentnim genetičkim poremećajima (*RUNX1-RUNX1T1* t(8;21)(q22;q22), *CBFB-MYH11* inv(16)(p13.1q22), t(16;16)(p13.1;q22), *PML-RARA* t(15,17)(q22;q12), *MLL* 11q23, *itd.*) i sa genskim mutacijama (NPM1 i CEBPA mutacije); (2) AML sa znacima mijelodisplazije; (3) AML nastale posle prethodnog lečenja; (4) AML, neklasifikovane (NOS) (slično FAB klasifikaciji M0–M7 sa drugima kao što su: akutna megakarioblastna leukemija, akutna panmijeloza sa mijelofibrozmom i čista eritroleukemija); (5) Mijeloidni sarkom; (6) Mijeloidna proliferacija u Daunovom sindromu; i (7) Neoplazma blastnih plazmacitoidnih dendritskih ćelija (2). U aktuelnoj revidiranoj SZO klasifikaciji AML iz 2016. učinjeno je nekoliko promena u postojećim kategorijama bolesti (Tabela 2.) (75). Promene se odnose na grupu AML sa rekurentnim poremećajima i to najpre na molekularnu osnovu AML sa inv(3)(q21.3q26.2) ili t(3;3)(q21.3;q26.2) tj genske mutacije *GATA2*, *MECOM* (*EVI1*). Potom uvedena su dva nova privremena entiteta "AML sa BCR-ABL1" i "AML sa *RUNX1* mutacijom". Dok su AML sa NPM1 mutacijom i AML sa bialelnom CEBPA mutacijom definitivno uvršćeni u klasifikaciju (76). Predhodna podgrupa AML u kategoriji neklasifikovana AML, akutna eritroidna leukemija je izbačena dok je uvedena podgrupa čista eritroidna leukemija (>80% eritroblasta sa $\geq 30\%$ proeritroblasta).

Tabela 2. Klasifikacija AML prema SZO 2016

Mijeloidne neoplazme sa germinativnom predispozicijom (tabela 3)
AML i srodne neoplazme
AML sa rekurentnim genetskim poremećajima
AML sa t(8;21)(q22;q22.1); <i>RUNX1-RUNX1T1</i>
AML sa inv(16)(p13.1q22) ili t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i>
APL sa <i>PML-RARA</i>
AML sa t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>MLLT3-KMT2A</i>
AML sa t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i>
AML sa inv(3)(q21.3q26.2) ili t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2, MECOM (EV11)</i>
AML (megakarioblastna) sa t(1;22)(p13.3;q13.3); <i>RBM15-MKLI</i>
<i>Privremeni entitet: AML sa BCR-ABL1</i>
AML sa <i>NPM1</i> mutacijom
AML sa bialelnom <i>CEBPA</i> mutacijom
<i>Privremeni entitet: AML sa RUNX1 mutacijom</i>
AML sa znacima mijelodisplazije
AML nastala posle prethodnog lečenja
AML, neklasifikovana
AML minimalno diferentovana
AML bez sazrevanja
AML sa sazrevanja
Akutna mijelomonocitna leukemija
Akutna monoblastna/monocitna leukemija
Čista eritroleukemija
Akutna megakarioblastna leukemija
Acute bazofilna leukemija
Acute panmijeloza sa mijelofibrozmom
Mijeloidni sarkom
Mijeloidna proliferacija u Daunovom sindromu
Tranzitorni poremećaj mijelopoeze(TAM)
Mijeloidna leukemija u Daunovom sindromu
Neoplazma blastičnih plasmacitoidnih dendritičnih ćelija

Potpuno nova kategorija “Mijeloidne neoplazme sa germinativnom predispozicijom” uključena je u klasifikaciju zato je su neki slučajevi AML i MDS nastali iz urođenih ili de novo germinativnih mutacija (Tabela 3.)(75).

Tabela 3. SZO klasifikacija mijeloidnih neoplazmi sa germinativnom predispozicijom

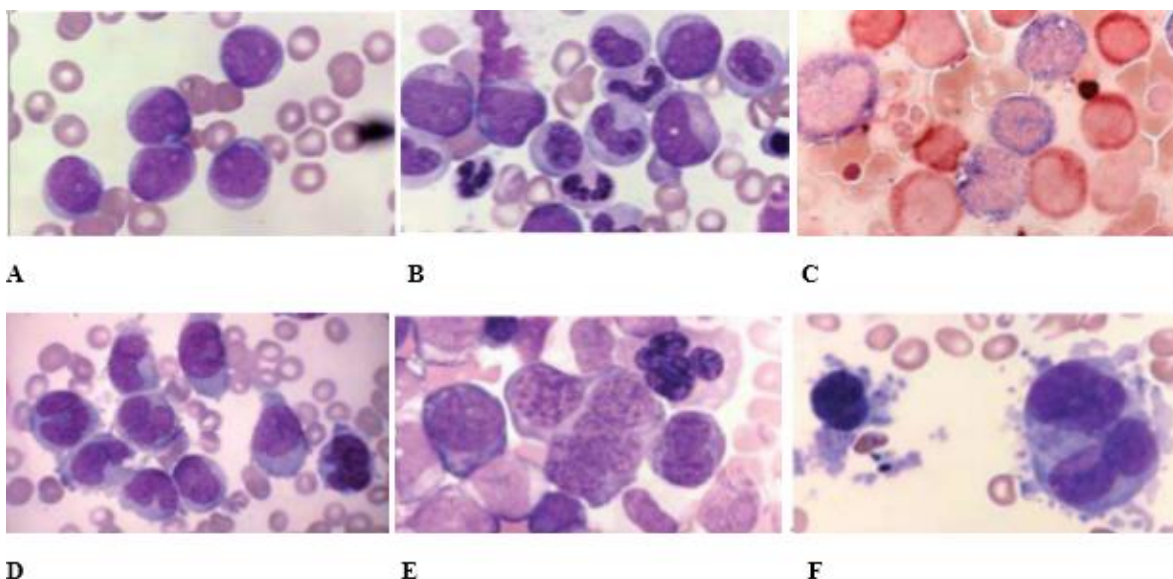
Mijeloidne neoplazme sa germinativnom predispozicijom bez prisutne disfunkcije organa
AML sa germinativnom CEBPA mutacijom
Mijeloidne neoplazme sa germinativnom DDX41 mutacijom
Mijeloidne neoplazme sa germinativnom predispozicijom i predhodnim poremećajem trombocita
AML sa germinativnom RUNX1 mutacijom
AML sa germinativnom ANKRD26 mutacijom
AML sa germinativnom ETV6 mutacijom
Mijeloidne neoplazme sa germinativnom predispozicijom i drugim organskim poremećajima
AML sa germinativnom GATA2 mutacijom
Mijeloidne neoplazme sa sindromom oštećenja košane srži
Juvenilna mijelomonocitna leukemija sa neurofibromatozom, Noonanov sindrom ili Noonanov sindrom slični poremećaji
Mijeloidne neoplazme u Noonom sindromu
Mijeloidne neoplazme u Daunovom sindromu

1.6. Dijagnoza

1.6.1. Morfologija

Aspiracija koštane srži je deo rutinske dijagnostike kod bolesnika sa sumnjom na AML. Biopsija koštane srži se sprovodi u slučajevima kada je punkcija suva (punctio sicca). Uzorci krvi i koštane srži se morfološki pregledaju korišćenjem bojenja po May-Grünwald-Giemsa ili Wright-Giemsa. Preporučuje se da se najmanje 200 leukocita uzorka krvi i 500 jedarnih ćelija koštane srži iz broji. Za dijagnozu AML, potrebno je da u krvi i koštanoj srži bude ≥ 20 blasta, izuzetak su AML sa t(15;17), t(8;21), inv(16) or t(16;16) i u nekim

slučajevima eritroleukemija (77). Za indentifikaciju ćelijskih linija u nekim zemljama se i dalje oslanja na citohemijska bojenja: mijeloperoksidaza (MPO) ili Sudan black B (SBB) i nespecifična esteraza (NSE). Detekcijom MPO ($\geq 3\%$ blasta) ukazuje na mijeloidnu diferencijaciju, ali njegovo odsustvo ne isključuje mijeloidne linije, jer rani mijeloblasti i monoblasti mogu biti MPO negativni. NSE bojenje pokazuje difuznu citoplazmatsku aktivnost u monoblastima ($>80\%$ pozitivni) i monocitima ($>20\%$ pozitivni). Kod akutne eritroidne leukemije, periodic acid- Schiff (PAS) bojenje može pokazati velike PAS pozitivne vezikule. Bojenje gvožđa omogućća detekciju gvožđa, normalnih sideroblasta prstenastih sideroblasta (78) (slika 4).



Slika 4. Podtipovi AML (periferna krv i koštana srž) **A.** AML bez maturacije (periferna krv) **B.** AML sa maturacijom (periferna krv) **C.** Akutna mijelomonocitna leukemija (periferna krv) **D.** Akutna monocitna leukemija (periferna krv) **E.** Akutna eritroidna leukemija (koštana srž) **F.** Akutna megakarioblastna leukemija (koštana srž).

Preuzeto iz: Liesveld JL and Lichtman MA. Acute myeloid leukemia. In Kaushansky K, Prchal JT, Press OW, Lichtman MA, Levi M, Burns LJ. Williams Hematology 9th Edition, 2015: 1373-1436.

1.6.2. Imunofenotipizacija AML

Imunofenotipizacija AML se sprovodi korišćenjem multiparametarskog (obično najmanje 3 do 4 boje) protočnog citometra korišćenjem panela membranskih i citoplazmatskih markera, čime se određuju ćelijske linije kod novodijagnostikovanih akutnih leukemija (Tabela 4.) (79, 80). Ne postoji opšti konsenzus o graničnoj vrednosti pozitivnog markera za dijagnozu akutne leukemije. Za većinu markera, uobičajeno se koristi kriterijum pozitivnosti $\geq 20\%$ od leukemijskih ćelija (80), dok se za izabrane markere (npr citoplazmatski CD3, MPO, TdT, CD34, CD117) primenjuje niža granična vrednost od 10%. Kvantifikacija ekspresije nekoliko površinskih i citoplazmatskih antigena je neophodna za određivanje linijske pripadnosti; dijagnozu akutnih leukemija mešovitih linija (MPAL) a omogućava i merenje minimalne rezidualne bolesti (MRB). Imunofenotipizacija je potrebna da bi se postavila dijagnoza AML sa minimalnom diferencijacijom, akutne megakarioblastne leukemije i akutne leukemije neutvrđenih ćelijskih linija. AML minimalno diferentovana eksprimira antigene rane hematopoeze (npr. CD34, CD38, i HLA-DR) i nedostatak većine markera mijeloidnog i monocitnog sazrevanja. Ako je MPO citohemijski negativan, detekcija intracitoplazmatskih MPO antigena može biti pozitivna protočnom citometrijom u najmanjem procentu blasta. Akutna megakarioblastna leukemija je leukemija sa $\geq 20\%$ blasta od kojih je $\geq 50\%$ megakariocitne linije; megakarioblasti tipično ekspimiraju jedan ili više trombocitnih glikoproteina CD41 i/ili CD61, i ređe CD42. Akutne leukemije neutvrđenih ćelijskih linija su retke i obuhvataju one slučajeve koji ne pokazuju diferencijaciju ćelijskih linija (acute undifferentiated leukemia [AUL]) ili one sa blastima koji ekspimiraju markere više od jedne ćelijske linije (npr. MPAL). AUL često ekspimiraju HLA-DR, CD34, i/ili CD38, ali po definiciji imaju nedostatak markera povezanih sa ćelijskim linijama. MPAL može da sadrži ili različite populacije blasta različitih ćelijskih linija ili jedne populacije blasta sa markerima različitih ćelijskih linija na istoj ćeliji, ili kombinacijom oba. Neke AML sa rekurentnim genetskim poremećajima su povezane sa karakterističnim imunofenotipskim osobinama. Na primer: AML sa t(8;21) često eksprimira limfoidni markere CD19 ili u manjoj meri, CD7; a takođe može da eksprimira CD56 (81); AML sa inv(16) često eksprimira T

linijski marker CD2 (82); AML sa *NPM1* mutacijom tipično ima visok nivo CD33 ekspresije dok je CD34 nizak ili odsutan (83).

Tabela 4. Ekspresija membranskih i citoplazmatskih markera kod AML

Imunofenotipski markeri	
progenitori	CD34, CD117, CD33, CD13, HLA-DR
granulocitni	CD65, citoplazmatski MPO
monocitni	CD14, CD36, CD64
megakaricitni	CD41 (glikoprotein IIb/IIIa), CD61 (glikoprotein IIIa)
eritroidni	CD235a (glycophorin A), CD36

1.6.3. Citogenetska analiza

Konvencionalna citogenetska analiza je obavezni deo dijagnostičke procene bolesnika sa akutnom leukemijom. Hromozomski poremećaji detektovani su u oko 55% AML bolesnika (84,85). Osam rekurentnih balansiranih translokacija i inverzija i njihovih varijanti prepoznato je kao posebna kategorija u SZO "AML sa rekurentnim genetskim poremećajima." Osim toga, nekoliko citogenetskih poremećaja se smatra dovoljnim za dijagnozu "AML sa mijelodisplaznim karakteristikama" kada je prisutno $\geq 20\%$ blasta u koštanoj srži. Neophodno je da se analizira minimum 20 ćelija koštane srži u metafazi da bi se postavila dijagnoza AML sa normalnim kariotipom ili poremećenog kariotipa.

Fluorescencija *in situ* hibridizacija (FISH) je jedna od opcija za detekciju genskog rearanžmana, kao što su *RUNX1-RUNX1T1*, *CBFB-MYH11*, *KMT2A (MLL)* i (*MECOM*) *EVII* fuzije gena ili gubitak hromzoma 5q i 7q ili 17p (86, 87). FISH je često neophodan da identifikuje *MLL* fuziju gena na 11q23 translokaciji.

1.6.4. RT-PCR (reverse transcriptase–polymerase chain reaction)

Uzorak koštane srži (i krvi) treba uzeti rutinski radi molekularne dijagnostike. Najbolje bi bilo, ekstrahovati DNK i RNK i čuvati vijabilne ćelije; ako je broj ćelija

nedovoljan, ekstrakcija RNK bi trebalo da bude prioritet, zato što je RNK pogodan za molekularni skrining fuzionih gena i leukemijskih mutacija (78). Molekularna dijagnoza metodom RT-PCR za rekurentne fuzione gene, kao što su *RUNX1-RUNX1T1*, *CBFB-MYH11*, *MLLT3-MLL*, *DEK-NUP214*, može biti korisna u određenim okolnostima. RT-PCR metoda je opcija za detekciju ovih rearanžmana, ako je hromozomska morfologija lošeg kvaliteta ili ako je prisutna tipična morfologija koštane srži a suspektni citogenetski poremećaj ne postoji (88).

1.7. Klinička slika

Znaci i simptomi AML su nespecifični i povezani su sa smanjenim stvaranjem normalnih hematopoetskih ćelija, usled infiltracije leukemijskim ćelijama koštane srži i drugih organa. Kod bolesnika su prisutni znaci i simptomi anemije (umor, nedostatak energije, malaksalost), trombocitopenije (pojava krvarenja iz desni, modrice na koži, epistaksa, menoragija) i neutropenije (povišena temperatura, infekcije) (89). AML se može prezentovati ekstramedularnom infiltracijom gingiva, kože, limfnih žlezdi i drugih organa. Isto tako, mogu se javiti neurološki znaci i simptomi, kao što su: defekti kranijalnih nerava i drugih fokalni neurološki poremećaji, promene mentalnog statusa, uglavnom kod AML sa monocitnom / monoblastnom diferencijacijom (92).

Metabolički i elektrolitni poremećaji su česti kod AML bolesnika bilo zbog infiltracije organa leukemijskim ćelijama ili efekta hemioterapije. Pre lečenja, uočava se povećan serumski nivo mokraćne kiseline i laktatdehidrogenaze (LDH) kod svih AML bolesnika. Naglo razaranje leukemijskih ćelija može da dovede do stvaranja brojnih metaboličkih poremećaja. Sindrom tumorske lize se karakteriše brzim razvojem hiperurikemije, hiperkalemijom, hiperfosfatemijom i hipokalcemijom (90, 91), što može dovesti do akutne renalne insuficijencije. Sindrom tumorske lize je najčešći kod bolesnika sa povećanim brojem leukocita pri dijagnozi i povišenim nivom kreatinina, mokraćne kiseline i LDH u serumu. Hiperleukocitoza (definisana kao povećan broj leukocita $\geq 50 \times 10^9/l$) povećava rizik od fatalne plućne i CNS leukostaze i smatra se životno ugrožavajućim stanjem

(92). Diseminovana intravaskularna koagulacija (DIK) je čest uzrok hemoragijskog sindroma kod bolesnika sa APL, mijelomonocitnoj leukemiji i kod AML sa povećanim brojem leukocita (92).

1.8. Lečenje

Opšta terapijska strategija kod AML bolesnika se nije bitno promenila više od 30 godina (78). Lečenje AML podrazumeva primenu indukciono i postremisiono terapije. Cilj indukciono terapije je da se postigne kompletna remisija koja bi trebalo da se postremisiono terapijom održi putem eliminacije rezidualne bolesti.

1.8.1. Indukciono lečenje

Standardna indukciono terapija zasnovana je na kombinaciji citostatika citarabina i antraciklina. Poznata je kao "3+7" protokol i podrazumeva primenu citarabina u dozi od 100-200 mg/m² u kontinuiranoj iv infuziji dnevno u toku 7 dana i daunorubicina u dozi 45 - 60 mg/m² iv dnevno, D1-3. Stopa remisije se kreće 60% - 80% kod bolesnika < 60 godina i 40% - 60% kod bolesnika ≥ 60 godina (Tabela 5.) (78, 2, 94). Mnoge modifikacije protokola "3+7" su pokušale da poboljšaju ishod lečenja: primena citarabina 10 umesto 7 dana (3+10), povećanje doze citarabina od 100 mg/m²/dnevno do 200 mg/m²/dnevno ili dodavanje trećeg citostatika (mitoksantron, etopozid, tioguanin, topotekan, fludarabin). Međutim, nijedna od ovih modifikacija nije pokazala bolje rezultate (92).

Primena većih doza daunorubicin u odnosu na doze koja se trenutno koriste se još ispituje. Nekoliko studija je pokazalo da veća doza antraciklina (90 vs 45 mg/m²) i kod mlađih i starijih bolesnika rezultira većom stopom KR i produžava trajanje OS (94, 95). Zabrinutost zbog toksičnosti visokih doza daunorubicina i široke upotrebe doze od 60mg/m² kao "standard" terapije uslovalo je sprovođenje nekoliko studija. Tako je United Kingdom National Cancer Research Institute (NCRI) sprovelo prospektivnu randomiziranu studiju sa ciljem da uporedi daunorubicin 60 vs 90 mg/m² u indukciji 1206 AML bolesnika (96). U ovoj studiji nije bilo koristi pri upotrebi veće doze (90 mg/m²) u odnosu na 60 mg/m² u svim podgrupama (96). U nekoliko randomiziranih studija sprovedeno je ispitivanje efikasnosti

visokih doza citozara kao sastavnog dela indukcione hemioterapije (97, 98). Potvrđeno je da je povećana toksičnost bez poboljšanja u efikasnosti lečenja sa visokim dozama citozara. Većina dokaza ukazuje na to da citarabin u dozama $>1000 \text{ mg/m}^2$, ne bi trebalo da bude uključen u indukcionu hemioterapiju (99). Osim toga, ni ova studija, niti bilo koja druga nisu pokazale da pojedine citogenetske podgrupe imaju koristi od visokih doza citarabina. Do sada sprovedeno istraživanje na grupi od 717 AML bolesnika sa *FLT3* mutacijom je pokazalo da jedino primena inhibitora *FLT3*, kao što je midostaurin, zajedno sa standardnom indukcijom terapijom ima efikasnost u porastu stope KR i OS (100).

1.8.2. Postremisiono lečenje

Standardne postremisione strategije uključuju konvencionalnu hemioterapiju, praćenu transplantacijom matičnih ćelija hematopoeze (TMČH), u svojim različitim oblicima (autologna, alogena, haploidentična, iz pupčane vrpce, smanjenog intenziteta).

1.8.2.1. Konsolidacija sa intenzivnom hemioterapijom

Konsolidacioni protokoli obuhvataju primenu jednog citostatika, citarabina u visokim dozama i hemioterapije sa više citostatskih agenasa koji imaju slične rezultate. Postoji još rasprava o postremisionoj terapiji u pogledu doze i broja ciklusa. Najčešće se primenjuje konsolidaciona hemioterapija sa 4 ciklusa visokih doza citarabina ($2000\text{-}3000 \text{ mg/m}^2$, uobičajeno 6 doza po ciklusu). Međutim, nedavna ispitivanja dovode u pitanje potrebu za tako visokim dozama. Tako su, Burnett i sar. osporili ovakvu šemu doza za odrasle < 60 godina i pokazali da je veća doza (3 gr/m^2) u poređenju sa manjom dozom (1.5 g/m^2) citarabina sa tri kure dovela do identičnog ishoda (97). Isto tako, studija sa 781 bolesnika (15-64 godina nije pokazala korist od primene tri ciklusa citarabina u dozi od 2000 mg/m^2 (na 12 sati 5 dana) u poređenju sa 4 ciklusa hemioterapije sa više citostatskih agenasa u čiji sastav ulazi citarabin u dozi od 200 mg/m^2 u 24-časovnoj kontinuiranoj infuziji u toku 5 dana (101). Nijedna od ovih studija nije pokazala benefit od primene visokih doza citarabina kod AML sa povoljnim rizikom. Otvoreno pitanje ostaje i u vezi optimalnog broja ciklusa

konsolidacione terapije. U većini studija, 2 do 4 ciklusa su primenjivana nakon postizanja KR. U jednoj randomiziranoj studiji, 2 ciklusa postremisione terapije primenjena nakon dva indukciona ciklusa nisu bila manje efektivna u odnosu na 3 postremisiona ciklusa (101). U tabeli 5. prikazani su aktuelni principi lečenja bolesnika sa AML (76).

Tabela 5. Aktuelno konvencionalno lečenje bolesnika sa AML

Bolesnici koji su podobni za lečenje intenzivnom HT	
Indukciona terapija	
“3+7” indukcija	antraciklin, D1-3 iv (daunorubicin najmanje 60 mg/m ² ; idarubicin 10–12 mg/m ² ; mitoksantrone 10–12 mg/m ²) i citarabin, D1-7 kontinuirane-infuzije (100–200 mg/m ²)
Konsolidaciona terapija	
Mladi bolesnici (18-60/65 g)	
• Povoljan rizik	IDAC, 2-4 ciklusa (1000-1500mg/m ² iv 3h na 12h, D1-3; ili 1000-1500mg/m ² iv 3h na 12h, D1-5 ili 6)
• Intermedijaran rizik	- alogena TMČH (srodni/nesrodni davaoc) - 2-4 ciklusa IDAC (1000-1500mg/m ² iv 3h na 12h, D1-3; ili 1000-1500mg/m ² iv 3h na 12h, D1-5 ili 6) ili - visoko-dozna HT i autologa TMČH
• Nepovoljan rizik	alogena TMČH (srodni/nesrodni davalac)
Stariji bolesnici (>60/65 g)	
• Povoljan rizik	IDAC, 2-4 ciklusa (500-1000mg/m ² iv 3h na 12h, D1-3; ili 500-1000mg/m ² iv 3h na 12h, D1-5 ili 6)
• Intermedijaran/nepovoljan	neutvrđen nivo intenziteta konsolidacije; alogena TMČH kod bolesnika sa niskim HCT-CI ili studijska Th
Bolesnici koji su nepodobni za lečenje intenzivnom HT	
Azacitidin	75 mg/m ² , sc D1-7, na 4 nedelje, do progresije
Decitabin	20 mg/m ² , iv D1-5, na 4 nedelje, do progresije
Niske doze Citarabina	niske doze citarabina (20 mg, sc na 12h, D1-10, na 4 nedelje, do progresije; ne preporučuje se kod bolesnika sa nepovoljnim citogenetskim rizikom
Suportivna terapija	hidroksiurea; za bolesnike koji ne mogu tolerisati nikakavu antileukemijsku terapiju, ili koji ne žele da se leče

Preuzeto iz: Dohner H i sar. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. Blood, 2017;129 (4): 424-47.

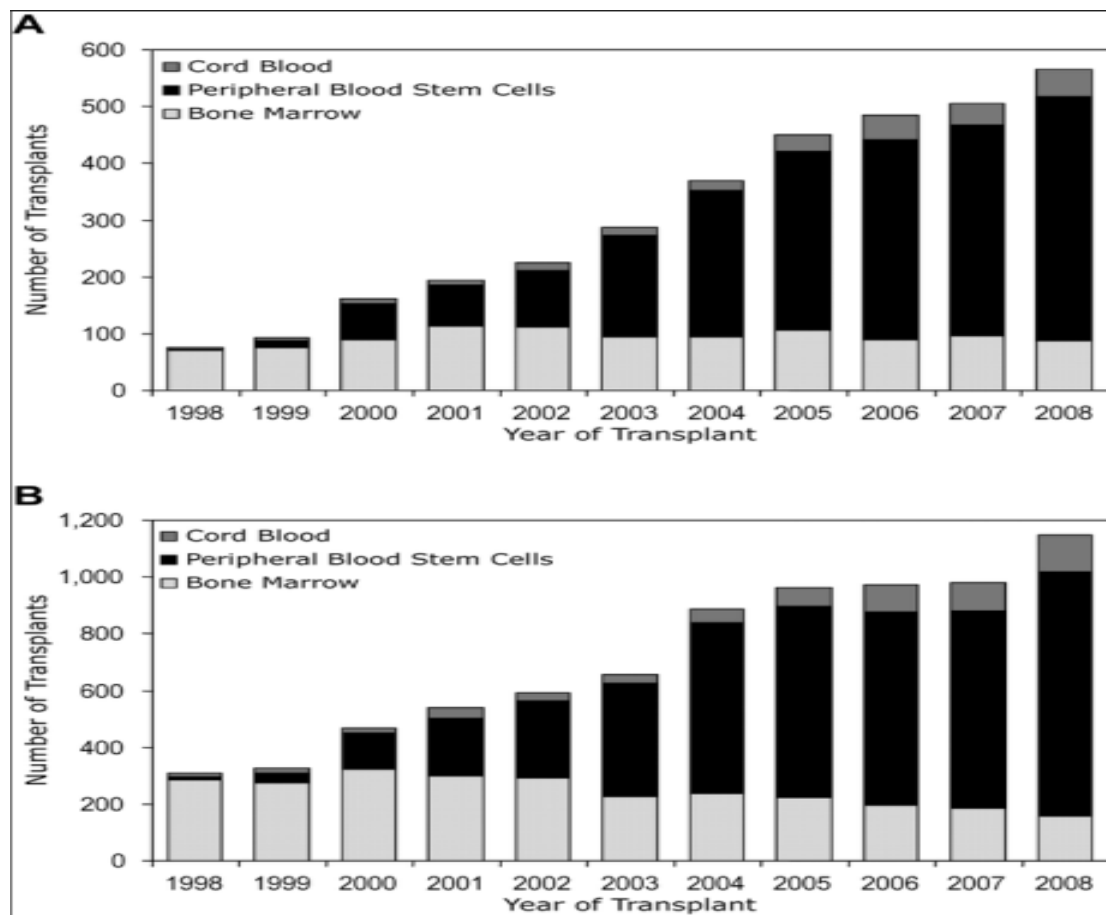
1.8.2.2. Alogena TMČH kod bolesnika sa AML

Alogena TMČH predstavlja najjači vid antimalignog lečenja za bolesnike sa AML. Efektu izlečenja alogena TMČH kod bolesnika sa AML doprinosi i hemioterapija i / ili zračenje u predtransplantacionom režimu i najvažnije imunološki efekat graft-versus leukemija (102). Lečenje alogenom TMČH je rezervisano sa bolesnike koji ne mogu da imaju dugotrajnu KR konvecionalnim načinom lečenja (103,104).

Podaci Centra za internacionalno istraživanje transplatancaije koštane srži (engl. Center for International Blood and Marrow Transplant Research (CIBMTR)) ukazuju na neprekidan porast broja alogenih transplantacija u poslednjoj deceniji (Slika 5.). Iako je broj transplantiranih bolesnika od srodnih davaoca ostao nepromenljiv poslednju deceniju, broj transplantiranih bolesnika od nesrodnih davaoca raste, naročito u prvoj remisiji (KR1) (Slika 5.).

Napredak u oblasti transplantacije, kao što su bolja suportivna nega, poboljšanje tehnologije transplantacije, povećanje dostupnosti alternativnih davaoca (haploidentični graft i krv pupčane vrpce), i primena kondicionih režima redukovano intenziteta, poboljšali su bezbednost, kao i pristup alogenoj TMČH za veći broj bolesnika. Jedno istraživanje u kome je analizirano 3638 bolesnika sa AML u KR1 pokazalo je značajno preživljavanje transplantiranih bolesnika u odnosu na netransplantirane kod AML bolesnika sa intermedijarnim i nepovoljnim citogenetskim rizikom, mada ne i za one sa povoljnim rizikom (105). Poslednji napredak u razumevanju biologije leukemija je dodatno poboljšao dalju finiju stratifikaciju rizika unutar intermedijarne grupe bolesnika, AML-NK i doprineo identifikaciji podgrupa na one sa genetikom povoljnog rizika i sa rizikom od recidiva. Tako je u jednoj studiji analizirana uloga *NPM1*, *FLT3*, *CEBPA* mutacija, uporedo sa *MLL* i *NRAS* u sprovođenju postremisione terapije kod AML-NK u KR1 (106). Pokazano je da su bolesnici sa AML-NK sa drugim genotipom, osim *NPM1⁺/FLT3-ITD⁻*, imali značajno bolje preživljavanje bez bolesti (DFS) ukoliko su imali donora u odnosu na one koji su primali HIDAC ili je sprovedena autologa TMČH. Nije bilo statistički značajne razlike među bolesnicima povoljnog rizika (*NPM1⁺/FLT3-ITD⁻*) u DFS, bilo da je sprovedena alogena

TMČH ili ne. Sličan ishod je uočen i kod bolesnika sa *CEBPA* mutacijom (106). Iz tih razloga alogena TMČH treba biti odložena kod AML bolesnika sa povoljnim genotipom u KR1.



Slika 5. Trendovi u sprovođenju alogene TMČH kod odraslih AML bolesnika (≥ 18 godina) od nesrodnih davaoca u odnosu na status bolesti u TMHČ: slučajevi registrovani od strane CIBMTR od 1998. do 2008. (A) AML bolesnici (≥ 18 g) u KR1, KR2, KR3 i bez KR kod kojih je sprovedena alogena TMČH od nesrodnog davaoca, (B) AML bolesnici (≥ 18 godina) u KR1 podrvgnuti alogenoj TMČH od nesrodnog davaoca.

Preuzeto iz: Gupta V. i sar. Allogeneic hematopoietic cell transplantation for adults with acute myeloid leukemia: myths, controversies and unknowns. *Blood*. 2011;117:2307-18.

U većini radova je pokazano da su *IDH1* i *IDH2* mutacije povezane sa lošom prognozom kod bolesnika sa AML (107, 108). Kako nijedan od *NPM1*⁺ i *CEBPA*⁺ bolesnika nije imao *IDH2*⁺, mnogi autori smatraju da se pod povoljnim genotipom bolesnika sa AML-NK podrazumeva prisutvo “*NPM1*⁺ ili bialelne *CEBPA*⁺ bez *FLT3-ITD* i *IDH1*.” Stoga se kod AML bolesnika, sa nepovoljnim i intermedijarnim citogenetskim rizikom (sa *FLT3-ITD*⁺ ili *NPM1*⁻/*CEBPA*⁻/*FLT3-ITD*⁻), koji su postigli KR1 sprovođenje alogene TMČH od srodnog davaoca može smatrati standarnom opcijom lečenja. Nažalost, samo oko 25%-30% AML bolesnika ima HLA-podudarnog srodnog davaoca. Prema istraživanju CIBMTR u kome je analizirano 476 bolesnika kod kojih je sprovedena alogena TMČH od nesrodnog davaoca, 3-godišnje OS i DFS u KR1 je bilo 44% i 43% (109). Zanimljivo je, da Tallman i sar. nisu pronašli razliku u preživljavanju prema citogenetskoj grupi rizika kod AML bolesnika kod koji je sprovedena alogena TMČH od nesrodnog davaoca (110). Međutim, objavljeno da je 5-godišnji DFS od 30% kod AML nepovoljnog rizika, što predstavlja bolji ishod u odnosu na netransplantirane bolesnike (78). Pokazano je da alogena TMČH od nesrodnog davaoca u KR1 može biti povezana sa visokom stopom mortaliteta uzrokovanim terapijom (engl. treatment-related mortality TRM) kao što je objavljeno u registru studije koja je prijavila trendove rezultata u poslednje dve decenije, naglašavajući potrebu da se pažljivo odaberu bolesnici za alogenu TMČH od nesrodnog davaoca. Međutim, kod bolesnika sa nepovoljnim citogenetskim rizikom i AML-NK sa *FLT3-ITD*⁺, koji nemaju srodnog davaoca, svakako je neophodno da se razmotri alogena TMČH od nesrodnog davaoca kao dalji vid lečenja.

Rezultati lečenja AML bolesnika u prvom recidivu su nezadovoljavajući i preživljavanje je obično loše. Jedna studija je procenjivala ishod 667 AML bolesnika u prvom recidivu među 1540 de novo dijagnostikovanim AML, svrstanih prema stepenu rizika u tri grupe (povoljan, intermedijarni, nepovoljan) (111). Za bolesnike koji su postigli KR2, pokazano je da su oni kod kojih je sprovedena alogena TMČH imali bolje 5-godišnje preživljavanje u poređenju sa onim koji su lečeni hemioterapijom (povoljan: 88% vs 33%; intermedijarni: 48% vs 31%; nepovoljan: 26% vs 6%). Za bolesnike sa refraktarnom AML (neragovanje na indukcionu HT, odnosno, bez KR posle 2 ciklusa HT), u recidivu posle KR1 u trajanju od 2-6 meseci, uspeh u postizanju KR sa bilo kojom daljom salvage terapijom je

veoma nizak do 10% -15%. Dalja primena hemioterapija povećava rizik od oportunističkih infekcija i toksičnosti organa, koje mogu povećati TRM buduće TMČH. Sekvencijalni pristup primene “salvage” hemioterapije a zatim primena kondicioniranja smanjenog intenziteta (engl. reduced-intensity conditioning (RIC)) opisan je od strane nemačke grupe. Ovaj pristup doveo je do ohrabrujućeg 3-godišnjeg peživljavanja od 30% i 32% kod bolesnika sa refraktarnom AML, i odnosi se na značajno selektovane bolesnike (112).

Preporuke vezene za indikaciju za sprovođenje alogene TMČH kod AML bolesnika prikazane su u tabeli 6 (2). U okviru ovih preporuka, kod svakog bolesnika treba pažljivo proceniti rizik same bolesti u odnosu na rizik od transplatacionog postupka, uzimajući u obziri faktore kao što su starost, ECOG performans status, komorbiditete, i podudarnost davaoca i primaoca.

Tabela 6. Indikacije za lečenje bolesnika sa AML alogenom TMČH

<ul style="list-style-type: none">• Bolesnici 16 do 60–65 g KR1 (isključujući AML povoljnog rizika, ELN klasifikacija); Druge visoko rizične kliničke karakteristike (t-AML; sekundarne AML koje predhode MDS ili mijeloproliferativnim neoplazmama); Perzistirajuća MRB detektovana kvantitativnom real-time PCR tehnikom ili MPFC; Primarni indukcionni neuspeh: alternativnim ili eksperimentalnim protokolima treba postići KR pre sprovođenja transplantacije; KR2; prvi recidiv; zadovoljavajući ishod bolesti sa odlaganjem TMČH zahteva promptno postizanje KR2 bez većih infekcija ili drugih stanja koja bi ugrozila kasnije hematopoezu ćelija.• Bolesnici $\geq 60-65$ g Kod bolesnika ≤ 75 godina može se sprovesti alogena TMČH, pod uslovom da su fizički sposobni da se podvrgnu transplantaciji, razmatrajući prisutne kliničke i biološke pokazatelje slične onima za mlađe bolesnike
--

Preuzeto iz: Dohner H. i sar. Acute Myeloid Leukemia. N Engl J Med. 2015;373;12:1136-52.

1.8.2.3. Autologa TMČH kod bolesnika sa AML

Autologa TMČH se smatra alternativnom opcijom postremisione terapije kod bolesnika sa povoljnim i intermedijarnim rizikom, ali se ne može preporučiti kod bolesnika sa visoko rizičnom citogenetikom (78). Ishod posle autologe TMČH je skoro jednako dobar kao posle primene postremisione hemioterapije, ipak nije bilo dokaza o poboljšanju ishoda (78). Autologa TMČH koja je ograničena samo na bolesnike koji su MRB⁺, može poboljšati rezultate lečenja (76).

1.8.3. Terapija održavanja kod bolesnika sa AML

U ovom trenutku, terapija održavanja nije deo standardnog lečenja AML, s obzirom na nedostatak ubedljivih dokaza njene koristi (76).

1.8.4. Lečenje bolesnika nepodobnih za intenzivnu terapiju

Lečenje starijih (≥ 60 g) ili nepodobnih AML bolesnika podrazumeva suportivnu negu i primenu hidroksiureje, niskih doza citarabina, hipometilirajućih agenasa decitabina i azacitidina (Tabela 5.). Stariji bolesnici imaju lošu prognozu iz različitih razloga, kao što su: komorbiditeti, loš ECOG performans status, nepovoljna citogenetika, sekundarna AML, smanjena tolerancija na intenzivnu hemioterapiju i njene mijelosupresivne i imunosupresivne posledice. Nekoliko modela sistema rizika se koriste da se na osnovu faktora rizika bolesnika ili faktora bolesti napravi izbor intenzivnog ili alternativnog lečenja (113-115).

Mogućnosti lečenja za nepodobne bolesnike su stoga kao što je predhodno navedeno ograničene na suportivnu negu, terapiju niskog intenziteta, ili primenu lekova u fazi studijskih ispitivanja. Terapije niskog intenziteta su: niske doze citarabina (engl. Low Dose Ara-C (LDAC)) i terapija hipometilirajućim agenasima (HMA) (Tabela 5). LDAC je generalno dobro podnosi i dovodi do KR od 15% do 25%. Međutim, OS (srednja vrednost, 5-6 meseci) je nezadovoljavajuće (116). Terapija primeneom HMA (Decitabin i Azacitid) je procenjivana u randomizovanim studijama. Uočeno je produženo OS kod primene decitabina

u odnosu na LDAC (7.7 vs 5.0 m) (26). Poređenjem Azacitidina sa tri konvencionalna protokola (LDAC, intenzivna HT, suportivna nega) pokazano je da Azacitidin značajno utiče na OS (10.4 vs 6.5 m) (117).

1.8.5. Lečenje recidiva i primarno refraktarne AML

Recidiv bolesti kod većine bolesnika se javi unutar 3 godine posle dijagnoze. Glavni pokazatelji ishoda nakon recidiva bolesti su: kratka remisija bolesti (< 6 meseci), nepovoljan kariotip, predhodna alogena TMČH, starije doba i loš ECOG performans status. Samo mali broj ovih bolesnika postigne uspešnu KR2. Primenom "salvage" hemioterapije kod bolesnika starosti 16-49 godina, KR2 može biti postignuta kod 55% bolesnika u odsustvu predhodne alogene TMČH (118). Dve trećine bolesnika je u stanju da nastavi lečenje alogenom TMČH, što dovodi do 40% 5-godišnjeg OS (119). Benefit od alogene TMČH mogu da imaju bolesnici sa aktivnom bolešću, sa stopom KR2 od 42% i preživljavanjem od 9-22% (120). Drugi pristup lečenja kod bolesnika sa refraktarnom bolešću je primena kratkih ciklusa hemioterapije sa fludarabinom, citarabinom i amsakrinom neposredno pre sprovođenja RIC i alogene TMČH. Sa ovim pristupom, postiže se KR nakon alogene TMČH 70 do 90%, sa očekivanim 4-godišnjim OS 32% i 45% (121). Na taj način najmanje 20% bolesnika sa primarnom refraktarnom AML još uvek može biti izlečeno alogenom TMČH (122). Na tabeli 7. prikazani su najčešće primenjivani salvage protokoli kod bolesnika sa AML (76).

Table 7. Konvecionalni “salvage” protokoli

Protokol	Doze
IDAC	IDAC (1000-1500 mg/m ² iv 3 h na 12 h, D1-3 (500-1000 mg/m ² kod bolesnika >60 g); ili 1000-1500 mg/m ² iv 3 h D1-6 (500-1000 mg/m ² kod bolesnika >60 g)); sa ili bez DA 45-60 mg/m ² , iv, D1-3; idarubicin 8-10 mg/m ² , iv, D3-5, ili mitoksantron 8 mg/m ² , D 1-3
MEC	mitoksantron 8 mg/m ² , D1-5; etopozid 100 mg/m ² , D1-5; citarabin 1000 mg/m ² , D 1-5
FLAG-IDA	fludarabin 30 mg/m ² iv, D2-6; citarabin 1500-2000 mg/m ² iv 3 h, 4 h posle fludarabina, D2-6; idarubicin 10 mg/m ² iv, D2-4; G-CSF 5 mg/kg, sc, D1-5 >60 g: fludarabin 20 mg/m ² ; citarabin 500-1000 mg/m ² ; idarubicin 8 mg/m ²

Preuzeto iz: Dohner H i sar. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. Blood, 2017;129 (4): 424-47.

1.8.6. Nove terapijske strategije

U toku su brojne studije koje razmatraju efikasnost novih lekova u lečenju AML, kao što su: nove formulacije tradicionalnih hemioterapeutika, antitela i ciljni agensi koji deluju na mutirane enzime. Revolucija u razumevanju genetike AML potpomognuta sekvencioniranjem novije generacije dovela je do sintetisanja mnogih novih lekova protiv mutacija kao što su mutacije *IDH* i *FLT3*. Nove terapije u predkliničkom i kliničkom razvoju podrazumevaju: inhibitore protein kinaza, epigenetičke modulatore, nove citotoksične agense, mitohondrijane inhibitore uključujući apoptoznu terapiju, terapiju ciljnih onkogenih proteina, terapiju antitelima i imunoterapiju, te ciljnu terapiju AML mikrosredine (tabela 8.) (76).

Tabela 8. Nove terapije u kliničkom razvoju kod AML

Nove terapije u kliničkom razvoju	
Inhibitori protein kinaza	FLT3inhibitori (midostaurin,quizaritinib, gilteritinib, crenolanib) KIT inhibitori PI3K/AKT/mTORinhibitori Aurora i inhibitori polo-like kinaza, CDK4 / 6 inhibitori, CHK1, VEE1 i MPS1 inhibitori SRC i inhibitoriHCK
Epigenetski modulatori	Novi inhibitori DNK metiltransferaze (SGI-110) HDAC inhibitori inhibitori IDH1 i IDH2 DOT1L inhibitori inhibitori BET-bromodomen
Hemioterapeutski agensi	CPX-351 Vosaroksin Nukleozidni analozi
Mitohondrijalni inhibitori	BCL-2, bcl-KSL, MCL-1 inhibitori Inhibitori Caseinolytic proteaze
Terapija ciljnih onkogenih proteina	Ciljani fuzioni transkripti EV11 ciljna terapija NPM1 ciljna terapija Hedgehog inhibitori
Antitela i imunoterapija	Monoklonska antitela protiv CD33, CD44, CD47, CD123, CLEC12A Imunokonjugati (npr, GO, SGN33A) BiTEs i DARTs CAR T ćelije ili genetički TCR T ćelije Imuni Inhibitori na kontrolnom punktu (PD-1 / PD-L1 CTLA-4) anti KIR antitela Vakcine (npr, WT1)
Ciljna terapija AML mikrosredine	CXCR4 i CXCL12 antagonisti Antiangiogenic terapije

Preuzeto iz: Dohner H i sar. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. Blood, 2017;129 (4): 424-47.

Nekoliko FLT3 inhibitora je prozvedeno i pokazali su različite rezultate. Lekovi prve generacije uključuju inhibitore multi-kinaze (midostaurin, lestaurtinib, tandutinib sunitinib i sorafenib). Kada se koriste kao pojedinačni agensi, ovi inhibitori dovode samo do prolaznog smanjenja blasta. Rezultati nedavno objavljene randomizovane studije sa sorafenibom koja je obuhvatila 267 bolesnika bez obzira na *FLT3* mutacija status, ukazala je na povoljan efekat inhibitora kinaze na DFS, ali bez značajnog efekata na ukupno preživljavanje (123). Faza III studije za procenu efekta midostaurina kod mlađih odraslih bolesnika sa *FLT3* mutacijom dostigla je primarni cilj poboljšanje OS (101). Randomizirane studije koje procenjuju sledeću

generaciju *FLT3* inhibitora su u toku. Veliki napredak je takođe postignut u razvoju *epigenetske terapije*. Guadecitabine (SGI-110) je druga generacija hipermetiljarajućih agenasa i trenutno su u toku studije faze III primene leka (124). Jedan od novih ciljanih pristupa je i inhibicija mutiranih enzima *IDH1* i *IDH2*. *IDH1* inhibitor AG-120 i *IDH2* inhibitor AG-221 su pokazali obećavajući efekat kod AML u dve zasebne kliničke studije u fazi I kliničkih ispitivanja (125, 126). Preliminarni rezultati su nedavno predstavljani za obe studije. Objektivna stopa odgovora (ORR) sa AG-221 je 40% i 31% sa AG-120 kod recidiva/refraktarnih AML bolesnika, uz trajanje odgovora za AG-221 i AG-120 više od 15 i 11 meseci što i dalje traje. Generalno, ovi lekovi pokazuju visok trajan odgovor tj. 76% remisije je trajalo duže od šest meseci.

Takođe su razvijene i *nove formulacije klasičnih citotoksičnih agenasa* kao što je vosarokin-novi antikancerogeni derivat hinolona koji inhibira topoizomeraze II. Sprovedno je istraživanje koje je poredilo intermedijarne doze citarabina sa ili bez vosarokina u 711 bolesnika sa recidivom ili refraktarnim AML. Iako, primarni cilj nije postignut, pokazano je da je značajano preživljavanje bilo u korist bolesnika ≥ 60 godina, koji su dobili citarabin sa vosarokinom (7.1 meseci vs. 5.0 meseci (119)). CPX-351 je lipozomalna formulacija za citarabin i daunorubicin. Rezultati studije faze II ukazuju na kliničku korist, posebno kod bolesnika sa sekundarnom AML (127), dok je studija faze III u toku.

Nove terapije antitelima su revolucionarne u lečenju AML i trenutno su u razvoju. Mnoštvo terapeutskih antitela usmerenih protiv antigena (npr CD33, CD123, CLEC12A), himerni antigeni T ćelijskog receptora usmereni protiv CD33 i CD123 antigena su trenutno u ranoj fazi kliničkog ispitivanja.

1.9. Praćenje minimalne rezidualne bolesti kod AML

Pored genetskog profila i određivanja grupe rizika na inicijalnoj dijagnozi, minimalna rezidualna bolest (MRB), posle indukcije i tokom konsolidacione hemioterapije predstavlja jedan od najvažnih prognostičkih faktora. Trenutno, detekcija MRB kod AML bolesnika se zasniva na molekularnim (RQ-PCR) i multiparametarskim protočnocitometrijskim tehnikama (engl. multiparametric flowcytometry (MPFC)). Merenje MRB ima nekoliko

prednosti: (1) da poboljša procenu kvaliteta odgovora, (2) za dijagnozu ranog recidiva, (3) da odredi intenzitet postremisione terapije i (4) da spreči potpuni klinički recidiv dok je još na nivou molekularnog recidiva.

Generalno, PCR se smatra najosetljivijom tehnikom MRB sa pragom detekcije od 10^{-4} do 10^{-6} (128). Korišćenjem ove tehnike mogu se pratiti specifične ciljne karakteristike leukemije, poput himeričnih fuzionih gena, mutacija i prekomerne ekspresije gena. U situaciji prisustva citomorfološke KR, to omogućava identifikaciju rezidualnih fuzija gena u oko 30% bolesnika (129). Zajednički markeri za detekciju MRB na bazi PCR su npr. fuzioni transkripti MLL gen i CBF pozitivne AML (RUNKS1-RUNKS1T1, ranije AML1-ETO i CBFBIH11). Scholl i sar. su pokazali da bolesnici koji dostignu negativan MLL-AF9 imaju manju mogućnost od recidiva i 4-godišnje OS od 70%, dok svi oni koji su PCR pozitivni recidiviraju i umiru unutar tri godine (130). UK MRC studijska grupa je pokazala da kod CBF pozitivnih AML, MRB praćenje PCRom u različito vreme indentifikuje bolesnike sa većim rizikom od recidiva (131). Naredna multicentrična ispitivanja su potvrdila da je smanjenje MRB (nivo *RUNX1/RUNX1T1* transkripta) od < 3 -log u poređenju sa nivoima pri dijagnozi značajan prediktor recidiva posle dva ciklusa konsolidacije i ukazala da je druga konsolidacija najbolje vreme za ispitivanje MRD (132).

Ukoliko su fuzioni geni negativni kod AML bolesnika, mogući markeri za MRB, na osnovu PCRa su: mutacije *FLT3-ITD*, *NPM1* i *DNMT3A*. Oko 25% AML bolesnika je nosilac mutacije *FLT3-ITD* koji je prediktor lošeg ishoda. Međutim, mutacione promene između dijagnoze i recidiva, multiklonalnost na prezentaciji, novi klonovi u recidivu koji se razlikuju od onih na dijagnozi, čini upotrebu *FLT3* mutacije i dalje nepouzdanom za praćenje MRB (133). Postoji dokaz da se nedostatak longitudinalne stabilnosti mutacija gena odražava na nedovoljnu osetljivost metodologija koje se trenutno koriste. Imajući u vidu da su *NPM1* mutacije veoma stabilne u recidivu bolesti, one bi stoga mogle da imaju ulogu u proceni MRB (134). *NPM1* mutacija je prisutna kod 30% AML bolesnika i nekoliko studija je pokazalo njen povoljan uticaj kod AML-NK (135). Međutim, značajan procenat bolesnika sa *NPM1* mutacijom ima recidiv bolesti. U jednoj retrospektivnoj analizi 155 bolesnika, povećanje nivoa MRB, *NPM1* mutacije bilo je predikcija recidivu nakon hemoterapije ili alogene TMČH (136). Nedavno, Ivey i sar. Su potvrdili prognostičku ulogu rezidualane *NPM1*

mutacije. Nakon drugog ciklusa hemoterapije, postojanost NPM1 mutacije je uočena u perifernoj krvi u 15% prethodno nelečenih bolesnika i bila je povezana sa 3- godišnjim većim rizikom od recidiva (82% vs. 30%) i nižom stopom preživljavanja (24% vs 75%) u odnosu na nedetektabilnu mutaciju (137). Drugi mogući marker za praćenje MRD je *DNMT3A* mutacija, koja se može naći kod 15-25% od AML bolesnika. Međutim, na osnovu dosadašnjih istraživanja, pogodnost *DNMT3A* kao markera MRD se još uvek ispituje.

Neke studije su ispitivale *IDH* mutacije kao potencijalne markere MRB (138-142). Pokazano je da su *IDH1* i *IDH2* mutacije relativno stabilne i da pokazuju direktnu korelaciju sa statusom bolesti. Tako da *IDH* mutacije mogu biti korisni markeri za praćenje MRB, uključujući odgovor na lečenje i početak recidiva.

MRB se može pratiti i putem detekcije prekomerne ekspresije gena. Najpouzdaniji se pokazao Wilm's Tumor gen (*WT1*), tumor supresor gen koji je prekomerno ekspimiran u 85-90% AML slučajeva (143). RQ-PCR pozitivnost na *WT1*-MRD (definisano kao $> 0,5\%$ u perifernoj krvi) nakon indukcije je povezana sa povećanim rizikom od recidiva i kraćeg OS kod AML bolesnika sa *WT1* prekomernom ekspresijom (144).

MPFC omogućava brzi i relativno jeftin način za detekciju MRB, koji se primenjuje u velikoj većini bolesnika sa AML. U stvari, $\geq 85\%$ AML slučajeva imaju aberantan fenotip koji se naziva "leukemia-associated immunophenotype" (LAIP). LAIP je definisana kao kombinacija antigena i / ili fenotipskih abnormalnosti koje su odsutne ili veoma retke kod zdrave koštane srži (145). Fenotipske abnormalnosti u AML uključuju ekspresiju markera koji se ne ekspimiraju na mijeloidnim ćelijama (limfoidni antigeni kao što su: CD7, CD19 i CD56), ko-ekspresiju markera obično ekspimiranih u različitim fazama sazrevanja, kao i prekomernu ili smanjenu ekspresiju mijeloidnih markera (npr. CD33) (146).

Usavršavanjem opreme sa više multiplih lasera uvedeno je više kolornih testova ($> 6-10$ kombinacija monoklonskih antitela) i na taj način je favorizovan porast osetljivosti od 10^{-3} do 10^{-5} . Nemačka AML kooperativna grupa je pokazala da perzistiranje MRB na dan 16. i razlika između MRB pozitivnih ćelija na dan 1. i dan 16. je nezavisni prognostički faktor koji utiče na KR, OS, EFS (event-free survival) i RFS (relapse-free survival) (147). Nivo MRB posle indukciono terapije takođe je u korelaciji sa kvalitetom oporavka u perifernoj krvnoj slici u vreme morfološke remisije. MRB status može takođe da posluži kao

surogat za optimalno biološko doziranje hemoterapeutskih agensa. Tako, brz pad nivoa MRD posle terapije indukcije može da odražava visoko hemo-osetljivu bolest sa "per se" povoljnijom prognozom (148). Italijanska grupa je pokazala da su nivoi MRD $\geq 3 \times 10^{-4}$ mereni nakon konsolidacione terapije povezani sa velikom verovatnoćom recidiva i kratkim trajanjem OS i RFS (149).

Detekcija MRB može pomoći u finijoj proceni rizika AML bolesnika i stoga je treba prilagoditi procesu terapijskog odlučivanja. O tome govore rezultati studija sprovedenih kod bolesnika sa povoljnim i intermedijarnim rizikom gde je kod MRB negativnih 4-godišnje preživljavanje bilo 84% i 67% a onih koji su bili MRB pozitivni 38% i 23% (150, 151). Takođe, tako *FLT3* pozitivni bolesnici koji su imali MRB negativan status posle konsolidacije, značajno su bolje preživljavali u odnosu na one sa MRB pozitivnim statusom. Prema tome, bolesnici povoljnijeg stepena rizika mogu da pokažu veoma raličit ishod u zavnosti od MRB statusa posle konsolidacije. U tom pogledu, sveobuhvatna stratifikacija rizika, nastala integrisanjem pre-tretmanskih (citogenetika/genetika) i posle tretmanskih parametara (MRB), može pomoći u svrstavanju bolesnika u realnije kategorije rizika.

1.10. Tok i prognoza AML

1.10.1. Procena odgovora na primenjeno lečenje

Prema novim preporukama ELN grupe iz 2017. godine predloženo je nekoliko novih kategorija odgovora na hemioterapiju (tabela 9) (76). Jedna od predloženih kategorija je KR_{MRB} - zato što je utvrđeno da se recidiv više javlja kod bolesnika sa KR ili KR sa nekompletnim hematološkim oporavkom i detektovanom MRB (152, 153). Najbolje vreme za testiranje MRB kod bolesnika sa KR prema konvencionalnim kriterijuma nije određeno. Procena MRB posle jednog ili dva indukciono ciklusa omogućava ranu procenu bolesnika sa lošim odgovorom (152, 153).

Tabela 9. Kriterijumi za procenu odgovora na primenjenu hemioterapiju

Kategorija	Definicija
Odgovor na terapiju	
KR bez minimalne rezidualne bolesti (KR _{MRB-})	KR sa negativnim markerom MRB (PCR ili MFC)
Kompletna remisija (KR)	blasti k. srži <5%; odsustvo blasta per. krvi i blasta sa Auerovim štapićima; odsustvo ekstramedularni bolesti; ANC $\geq 1.0 \times 10^9/l$; trombocita $\geq 100 \times 10^9/l$
KR sa nekompletnim hematološkim oporavkom (KR _i)	svi KR prisutni osim rezidualne neutropenije (< $1 \times 10^9/l$) ili trombocitopenije (< $100 \times 10^9/l$)
Stanje bez citomorfološkog nalaza leukemije (engl. morphologic leukemia-free state (MLFS))	blasti k. srži <5%; odsustvo blasta sa Auerovim štapićima; odsustvo ekstramedularne bolesti; nije potreban hematološki oporavak
Parcijalna remisija (PR)	smanjenje procenata blasta k. srži 5% do 25%; i smanjenje procenta blasta k. srži pre terapije za najmanje 50%

Preuzeto iz: Dohner H i sar. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. Blood, 2017;129 (4): 424-47.

1.10.2. Recidiv i primarno refraktarna AML

Većina AML bolesnika koji postignu KR će recidivirati u toku tri godine nakon postizanja KR ($\geq 5\%$ blasta u koštanoj srži ili pojava blasta u periferiji; pojava ekstramedularne bolesti) (78). Između 10% i 40% bolesnika ne postigne KR nakon indukcione hemioterapije. Pod “primarno refraktarni” bolesnici sa AML podrazumevaju se oni koji nisu postigli KR posle najmanje 2 ciklusa intenzivne indukcione terapije, isključujući one bolesnike koji su umrli u aplaziji koštatne srži ili zbog neodređenih razloga. Prognoza bolesnika sa AML posle recidiva ili AML primarno refraktarnih na lečenje je loša tj. zasad raspoloživi terapijski modaliteti su nezadovoljavajući (78). Ipak, u slučaju recidiva i primarno rezistentne AML, alogena TMČH se smatra najboljom terapijskom strategijom, ali tek ukoliko se postigne KR2 hemioterapijom. Identifikovana su četiri klinička parametara (dužina KR1, inicijalni kariotip, uzrast u vreme recidiva i prethodno sprovedena alogene TMČH) koji utiču na preživljavanje bolesnika sa recidivom. Ovi parametri poslužili su za

izradu prognostičkog indeksa koji je potom široko prihvaćen - Evropski prognostički indeks (EPI skor) (Tabela 10.)(111).

Tabela 10. Prognostički indeks za bolesnike sa recidivom AML, uzrasta 15 – 60 g

Rizik	Indeksni skor u poenima	Verovatnoća preživljavanja %	
		1. god.	5. god.
Povoljan (9% bolesnika)	0-6	70	46
Inermedijarni (25% bolesnika)	7-9	49	18
Nepovoljan (66% bolesnika)	10-14	16	4

- dužina KR1: 18 meseci (0 poena); 7-18 meseci (3 poena); $i \leq 6$ meseci (5 poena)
- inicijalni kariotip: inv(16)/(16;16) (0 poena); t(8;21) (3 poena); ostalo (5 poena)
- predhodna transplantacija MČH: ne (0 poena); da (2 poena)
- uzrast u vreme recidiva: ≤ 35 godina (0 poena); 36-45 godina (1 poen); > 45 godina (2 poena)

1.10.3. Rana smrt

Rana smrt (smrt u aplaziji; TRM (engl. treatment-related mortality)) je definisana kao smrt koja se javlja unutar 28 dana od otpočinjanja indukcione hemioterapije (115). Bolesnici sa AML mogu doživeti fatalne komplikacije u prvih mesec dana od dijagnoze. Najčešći uzrok rane smrti su infekcija i krvarenje povezani sa citopenijom. Rizik od smrtnosti se značajno smanjuje četiri nedelje od otpočinja terapije (115). Iako je TRM je češći sa godinama, pokazano je da je ECOG performans status bliže povezan sa TRM nego godine starosti (115), a TRM veći od 30% je prijavljen kod starijih bolesnika sa lošim ECOG performans statusom koji su primili standardnu indukcionu terapiju "3 + 7" (115). Dve retrospektivne studije pokazale su da je smrtnost unutar prvih meseca dana značajno smanjena (stopa TRM između 1991 i 2009 smanjena je od 18 na 3% SWOG studija i sa 16% na 4% u MDA)(154).

1.11. Prognostički faktori kod AML bolesnika

Prognostički faktori se mogu podeliti na one koji su vezani za bolesnika i za samu bolest. Faktori koji zavise od bolesnika (npr. godine starosti, ECOG performas status, prisustvo komorbiditeta) predstavljaju prediktore indukcione rane smrti.

Faktori koji zavise od bolesti (npr. broj leukocita na dijagnozi, prethodni mijelodisplazni sindrom (MDS), inicijalni kariotip, molekularni markeri, prethodna citotoksična terapija) su prediktori rezistentnosti na aktuelnu standardnu terapiju (2).

Kariotip leukemijskih ćelija je najznačajni prognostički faktor za odgovor na terapiju indukcije i za preživljavanje (155, 156). Shodno tome, bolesnici sa AML se prema citogenetskim karakteristikama svrstavaju u grupu sa povoljnim, intermedijarnim ili nepovoljnim prognostičkim rizikom. ELN klasifikacija iz 2010. godine se zasnivala na rezultatima ispitivanja konvencionalne citogenetike i mutacija *NPM1*, *FLT3* i *CEBPA* mutacija. Tako su, hromozomski rearažmani t(8;21), t(15;17) ili inv (16) svrstani u povoljnu grupu rizika. Suprotno tome, citogenetske promene kao što su kompleksan kariotip (≥ 3 hromozomska poremećaja u odsustvu bilo kojeg rekurentnog genetskog poremećaja), monozomija 5 ili 7, t (6;9), inv(3) ili 11q promene osim t (9;11) su povezane sa nepovoljnim ishodom tj pripadaju nepovoljnoj grupi rizika. Intermedijarnu grupu rizika uglavnom čine AML-NK bolesnici (78).

Genske mutacije su doprinele daljoj finijoj stratifikaciji rizika. Tako je npr. utvrđeno da kod bolesnika sa t (8; 21) prisustvo *c-KIT* mutacije značajno povećava rizik od recidiva i smanjuje OS do nivoa koji odgovara bolesnicima sa intermedijerom rizika AML (157). Molekularna otkrića su imala posebno važnu ulogu u finijoj prognozi bolesnika sa AML-NK. Tako su AML-NK sa *CEBPA* ili *NPM1* mutacijom u odsustvu *FLT3-ITD* identifikovane kao AML koji imaju povoljan rizik (78). Povoljan prognostički uticaj *CEBPA* mutacije se u daljoj stratifikaciji rizika odnosi samo na bialelni oblik, prema reviziji ELN klasifikacije iz 2015. godine (2). S druge strane, mnoge studije, uključujući i meta-analizu RFS i OS kod bolesnika sa AML-NK < 60 godina pokazale su da je prisustvo *FLT3-ITD* povezano sa lošom prognozom (158, 159). Ovo je dovelo do toga da se sada AML-NK sa *FLT3-ITD* mutacijom svrstaju u grupu sa nepovoljnim rizikom (revizija ELN klasifikacije iz 2017. godine) (76).

Prema prehodnoj ELN klasifikaciji revidiranoj 2015. godine (2) intermedijarna grupa rizika se delila u dve podgrupe (intermedijarni rizik I i II). Intermedijarna podgrupa I (INT-I) se sastojala od bolesnika sa AML-NK sa drugim genotipskim kombinacijama *NPM1* i *FLT3* ITD (+/+, -/-, -/+) i intermedijarni rizik II (INT-II) koji je obuhavatao bolesnike sa t (9; 11) i citogenetskim promenama koje nisu klasifikovane ni kao povoljan niti nepovoljan rizik.

Prema poslednjim podacima, ustanovljeno je da je razlika između intermedijarnog I i II rizika zasnovana na genetskim karakteristikama, a ne i na prognostičkoj stratifikaciji. Iako su naredne studije pokazale duže OS u intermedijarnoj I grupi u odnosu na intermedijarnu II grupu, ove dve grupe su se prognostički razlikovale kod starijih bolesnika, koji inače čine većinu slučajeva AML. Imajući u vidu ove rezultate, odlučeno je da se pojednostavi ELN klasifikacija i da se sada (prema ELN iz 2017. godine) koriste samo tri grupe (povoljna, intermedijarna, nepovoljna) (Tabela 11.). Pored toga, novina su novi molekularni markeri uvršteni u klasifikaciju (*RUNX1*, *ASXL1*, *TP53*). *RUNX1* mutacije identifikuju bolesnike sa nepovoljnom prognozom (160, 161), *ASXL1* mutacije su češće kod starijih bolesnika i povezane su takođe sa nepovoljnom prognozom (160), dok su *TP53* mutacije povezane sa kompleksnim i monozomalnim kariotipom i specifičnim hromozomskim aneuploidijama (npr. -5/5q-, -7/7q) i prediktor su veoma lošeg ishoda (160,161). Sve ove mutacije su stoga svrstane u grupu nepovoljnog rizika.

Prognostički uticaj mnogih markera je zavistan od efekta i drugih abnormalnosti u zavisnosti od njihovog prisustva / odsustva (162). Nedavne studije su pokazale da kod AML sa *NPM1* ili bialelnom *CEBPA* mutacijom, prisustvo koegzistirajućeg hromozomskog poremećaja ne menja prognostički efekat mutacije (163), dok prognoza može biti više pod uticajem prisutnih združenih genskih mutacija (162). U skladu sa tim, kod CBF-AML, kategorizacija leukemija se zasniva na osnovu genetičkih podgrupa, bez obzira na kariotip. Veća stopa recidiva i lošije OS povezana sa *FLT3-ITD* u velikoj meri zavisi od ITD alelnog koeficijenta. Najnovije studije pokazuju da bolesnici sa *NPM1* mutacijom i *FLT3-ITD* sa niskim (< 0.5) alelnim koeficijentom (*FLT3-ITDnizak*) imaju slični (povoljniji) ishod kao bolesnici sa *NPM1* mutacijom bez *FLT3-ITD* mutacije (164, 165). Nasuprot tome, AML bez *NPM1* sa *FLT3-ITD* sa visokim (≥ 0.5) alelnim odnosom (*FLT3-ITDvisok*) imaju lošu prognozu i svrstane su sada prema poslednjoj klasifikaciji u grupu nepovoljnog rizika.

Tabela 11. ELN genetička stratifikacija rizika 2017

Kategorije rizika	Genetički poremećaji
Povoljan	t(8;21)(q22;q22.1); RUNX1-RUNX1T1 inv(16)(p13.1q22) ili t(16;16)(p13.1;q22); CBFB-MYH11 mNPM1 bez FLT3-ITD ili sa FLT3-ITD ^{nisko†} bialelna m CEBPA
Intermedijarni	mNPM1 i FLT3-ITD ^{visoko†} Wild-type NPM1 bez FLT3-ITD ili sa FLT3-ITD ^{nisko†} (bez nepovoljnih genetičkih lezija) t(9;11)(p21.3;q23.3); MLLT3-KMT2A‡ Citogenetski poremećaji koji nisu klasifikovani ni kao povoljni ni nepovoljni
Nepovoljan	t(6;9)(p23;q34.1); DEK-NUP214 t(v;11q23.3); KMT2A rearažman t(9;22)(q34.1;q11.2); BCR-ABL1 inv(3)(q21.3q26.2) ili t(3;3)(q21.3;q26.2); GATA2,MECOM(EV11) 25 ili del(5q); 27; 217/abn(17p) kompleksni kariotip,§ monozomalni kariotip Wild-type NPM1 i FLT3-ITD ^{visoko†} m RUNX1¶ m ASXL1¶ m TP53#

†nizak, nizak alelni nivo (<0.5); visok alelni nivo ratio (≥0.5);

‡prisustvo t(9;11)(p21.3;q23.3) ima prednost nad retkim, konkurentnim mutacijama lošeg rizika

§Tri ili više nepovezanih hromozomskih poremećaja u odsustvu 1 od SZO-određenih rekurentnih translokacija ili inverzija, kao što su, t(8;21), inv(16) ili t(16;16), t(9;11), t(v;11)(v;q23.3), t(6;9), inv(3) ili t(3;3); AML with BCR-ABL1.

||Definisan prisustvom 1 pojedinačne monozomije (izuzimajući gubitak X ili Y) povezanost sa najmanje 1 dodatnom monozomijom ili strukturnim hromozomskim poremećajem (izuzimajući CBF-AML)

¶Ove markere ne treba koristiti kao nepovoljne prognostičke markere ako se jave zajedno sa povoljnim subtipovima AML

#TP53 mutacije su značajno povezane sa AML sa kompleksnim i monozomalnim kariotipom

Preuzeto iz: Dohner H i sar. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. Blood, 2017;129 (4): 424-47.

Brojne studije su se bavile ispitivajem mutacija i u drugim genima, na primer, *DNMT3A*, *IDH1*, *IDH2*, ili genima u hromatinu / spajsozomskoj grupi drugačijoj od *ASXL1* i *RUNX1*. Međutim, još uvek nema dovoljno dokaza koji bi ukazali na njihov prognostički značaj u ELN klasifikaciji.

1.11.1. Prognostički značaj IDH mutacija

Analize velikog broja AML bolesnika su potvrdile prisustvo *IDH* mutacije u oko 15–20% AML bolesnika i 25–30% bolesnika sa normalnim kariotipom (166-171). Kliničke karakteristike koje se obično nalaze kod ovih bolesnika su starije životno doba, visoki broj trombocita i istovremeno prisustvo mutacije *NPM1* (65, 107, 166, 168, 169, 171). Relativno visoka učestalost *IDH* mutacija i njihova povezanost sa najčešće detektovanom *NPM1* mutacijom kod AML bolesnika ukazuje na mogući međusobni uticaj u patogenezi ove bolesti (172, 173).

Uprkos rezultatima brojnih studija koje su ispitivale uticaj efekta *IDH* mutacija na klinički ishod, prognostički značaj ovih mutacija ostaje kontroverzan (171). Neke studije su pokazale da prisustvo mutacije nema efekta na terapijski odgovor i preživljavanje (140, 174 – 175). Međutim, većina studija je pokazala da prisustvo *IDH1* i *IDH2* mutacija zajedno ima nepovoljan prognostički značaj tj. njihovo prisustvo je povezano sa visokim stepenom rizika od nastanka recidiva bolesti i kraćim preživljavanjem kod bolesnika sa AML-NK (140, 167-178). Takođe, većina studija se slaže sa činjenicom da *IDH* mutacije imaju nepovoljan prognostički uticaj na podgrupu nižeg rizika (*NPM1*⁺/*FLT3-ITD*⁻ AML-NK bolesnici) (168-170, 173, 178, 179). Od izuzetnog značaja je utvrđivanje prisustva *IDH* mutacija je, kao i njihove povezanosti sa drugim molekularnim markerima, jer može biti od pomoći u proceni stepena rizika bolesti, utvrđivanju prisustva minimalne rezidualne bolesti (MRB) i otkrivanju ranog recidiva tj. recidiva na molekularnom nivou.

2. CILJ RADA

1. Utvrđivanje učestalosti prisustva *IDH1* i *IDH2* mutacija kod bolesnika sa AML-NK
2. Utvrđivanje uticaja prisustva *IDH1* i *IDH2* mutacija na učestalost i dužinu remisije, ukupno preživljavanje i 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)
3. Utvrđivanje stabilnosti *IDH1* i *IDH2* mutacija u toku bolesti poređenjem uzoraka na početku bolesti sa uzorcima u toku KR, odnosno u recidivu bolesti

3. MATERIJAL I METODOLOGIJA ISTRAŽIVANJA

U ovu studiju preseka bilo je uključeno 110 odraslih novo dijagnostikovanih bolesnika sa AML-NK u periodu od septembra 2009. do maja 2013. godine u Klinici za hematologiju Kliničkog centra Srbije. Sve laboratorijske analize uključene u doktorsku disertaciju izvedene su na biološkom materijalu uzetom rutinski pri dijagnozi bolesti, prilikom kontrola toka bolesti odnosno, recidiva. Svi bolesnici su dali pismeni pristanak za izvođenje dijagnostičkih procedura.

Dijagnoza bolesti je postavljena na osnovu: kliničke slike, nalaza u perifernoj krvi i koštanoj srži, kriterijuma FAB klasifikacije (179) i na osnovu preporuka Svetske Zdravstvene Organizacije (SZO) (74).

3.1. Klinička i hematološka ispitivanja bolesnika

Kod bolesnika su pri dijagnozi evidentirane kliničke karakteristike: pol, starost, prisustvo oragnomegalije, limfadenopatije, hemoragijskog sindroma, hipertrofija gingiva i infiltracija centralnog nervnog sistema. Određivani su sledeći hematološki parametri: kompletna krvna slika (hemoglobin, broj leukocita, trombocita, leukocitarna formula), nivo serumske laktat dehidrogenaze (LDH), procenat blasta u perifernoj krvi i koštanoj srži. Performance status bolesnika procenjen je prema ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) skali (180). Procena komorbiditeta je vršena na osnovu komorbiditetnog indeksa (engl. hematopoietic cell transplantation- comorbidity index (HCT-CI)) koji se koristi za TMČH (101).

3.2. Morfološka i citohemijska analiza razmaza koštane srži

Koštana srž je dobijena aspiracijom iz grudne ili grebena ilijačne kosti. Citološka analiza obavljena je na razmazima koji su bojeni Mej Grinvald Gimza (May Grunawald Giemsa – MGG) metodom uz dopunska bojenja (MPO, SBB, PAS i NSE). Na razmazima koštane srži i periferne krvi određivan je broj blasta brojanjem blasta na 500 ćelija sa jedrom. Citohemijskim bojenjem određena je linijska pripadnost blasta, celularnost, prisutnost, brojnost i stepen zrelosti pojedinih ćelija hematopoeze, kao i njihove morfološke osobine (74).

3.3. Imunofenotipizacija protočnom citometrijom

Imunofenotipizacija metodom multiparametarske protočne citometrije (MPFC) sprovedena je na uzorcima koštane srži 110 novootkrivenih bolesnika sa akutnom mijeloidnom leukemijom sa normalnim kariotipom, pre primene hemioterapije.

Uzorci ispitanika su prikupljeni i obrađivani prema standardnim preporukama i protokolima (80). Analizirani su sveži nativni uzorci koštane srži bolesnika, dobijeni neposredno nakon aspiracione punkcije grudne ili ilijačne kosti. Koštana srž je prikupljana u standardnim epruvetama sa antikoagulansom K₃EDTA ili K₂EDTA (BD Vacutainer, K3EDTA ili K2EDTA). Koncentracija ćelija uzorka je određivana ručnom metodom, brojanjem ćelija u hemocitometru. U slučaju kada je koncentracija ćelija bila u opsegu od 1-10x10⁶/ml, obeležavani su alikvoti od 100µl nerazblaženih uzoraka, a u slučaju kada je koncentracija uzorka bila >10x10⁶/ml, pravljena su razblaženja osnovnog uzorka pomoću medijuma (2% FCS/ 0.01% NaN₃/ PBS, pH 7.2). Razblaženi uzorak je podešavan do koncentracije od 10x10⁶ ćelija/ml.

3.3.1. Monoklonska antitela

Alikvoti uzoraka su obeležavani primenom panela komercijalnih monoklonskih antitela (MoAt), poreklom od miša sa specifičnošću za humane leukocitne antigene (Ag) (181, 80) (Tabela 1.). Sva MoAt bila su direktno konjugovana molekulima jedne od četiri fluorescentne boje (FITC, PE, PerCP, APC). Većina MoAt su bila proizvod firme BD Biosciences (USA), osim u slučaju MoAt anti-Lizozim (Invitrogen, USA) i anti-CD163 (R&D Systems, USA). Za detekciju Ag mijelo-monocitne loze korišćena su sledeća MoAt: CD13-PE (klon L138), CD14-PE (klon M ϕ P9), CD15-FITC (klon MMA), CD16 (klon 3G8), CD24-FITC (klon ML5), CD33-PE (klon P67.6), CD36-PE (klon CB38), CD41a-FITC (klon HIP8), CD64-FITC (klon 10.1), CD66b (klon G10F5), CD117-PE (klon 104D2), CD163-PE (klon # 215927), CD235-PE (klon GAR-2), cMPO-FITC (klon 5B8), cLizozim (klon LZ-2). Za detekciju Ag T-limfoidne loze korišćena su sledeća MoAt: CD2-FITC (klon S5.2), cCD3-APC (klon UCHT1), CD4-FITC (klon SK3), CD7-FITC (klon 4H9), CD56-PE (klon MY31). Za detekciju Ag B-loze korišćena su sledeća MoAt: CD10-PE (klon HI10a), CD19-PE (klon SJ25C1), CD22 (klon S-HCL-1), cCD79a-PE (klon HM47). Za detekciju diferencijacionih linijski nespecifičnih Ag korišćena su sledeća MoAt: CD11a (klon HI111), CD11b-PE (klon Mac-1), CD11c (klon B-ly6), CD34-APC (klon 8G12), CD38-APC (klon HIT2), CD45-PerCP (klon 2D1), CD71-FITC (klon L01.1), HLA-DR-FITC (klon L243). Kao mera nespecifične reakcije MoAt i ćelija ispitivanog uzorka, korišćene su izotipske kontrole: msIgG1-FITC (klon X40), msIgG1-PE (klon X40) i msIgG1-APC (klon MOPC-21).

3.3.2. Metod direktne višekolorne imunofluorescencije

Primenjivan je metod direktne višekolorne imunofluorescencije na uzorcima pune koštane srži (*engl.* Whole Bone Marrow Lyse Wash, WBMLyW) (182, 183). Alikvoti uzoraka periferne krvi su obeležavani MoAt direktno konjugovanim sa fluorohromom, prema standardnom panelu za AML (Tabela 12.). Na dno epruveta su prvo sipana MoAt u optimalnoj količini i u kombinaciji koja je predviđena panelom, a zatim je sipan alikvot od

100µl uzorka (1×10^6 ćelija) i 10 µl pulovanog humanog AB seruma (Sigma, USA), u cilju smanjenja nespecifičnog vezivanja MoAt za ćelije. Nakon mešanja na vorteksu, alikvoti su inkubirani 15min/20°C u mraku, a zatim su eritrociti lizirani primenom 2ml hipotoničnog rastvora amonijum hlorida, pH 7.2 u trajanju od 10min/20°C u mraku. Posle centrifugiranja na 260g/5min/20°C i odbacivanja supernatanta, talog ćelija je ispiran medijumom (2% FCS/0.01% NaN₃/ PBS, pH 7.2), centrifugiran na 260g/5min/20°C i fiksiran primenom komercijalnog rastvora na bazi formaldehida (BD CelFIX, BD, USA). Obeleženi alikvoti uzoraka su čuvani na +4°C do analize, najduže 24h.

3.3.3. Merenje i analiza uzoraka metodom multiparametarske protočne citometrije

Metodom MPC (BD FACSCalibur, BD, USA) mereni su i analizirani fizički ćelijski parametri, relativna veličina (*engl.* Forward Light Scatter, FLS) i ćelijska granulacija (*engl.* Side Scatter, SSC), kao i fluorescentni signali (FL1 – FITC, FL2 – PE, FL3 – PerCP) koji odražavaju obrasce ekspresije leukocitnih Ag na populaciji leukemijskih ćelija (185). Merenje i analiza fluorescentnih signala reflektovanih ili emitovanih sa populacije leukemijskih ćelija vršena je primenom analitičkog softvera CELLQuest ver. 4.0.1. (Becton Dickinson, USA). Leukemijske ćelije ispitivanog uzorka su selekcionisane u cilju analize na osnovu kombinacije fizičkih svojstava (FSC/SCC) i obrasca ekspresije CD45 molekula i ćelijske granulacije (CD45/SSC).

Rezultati ispitivanja ekspresije svakog pojedinačnog Ag su izražavani kao procenat ćelija u populaciji blasta koje ekspimiraju dati Ag, a kriterijum prema kome je populacija blasta definisana kao pozitivna za neki Ag, bilo je prisustvo proporcije od $\geq 20\%$ obeleženih ćelija za dati plazmamembranski Ag ili proporcije od $\geq 10\%$ obeleženih ćelija za dati intracelularni Ag (80). Imunološka klasifikacija bolesnika sa AML vršena je na osnovu kriterijuma Evropske grupe za imunološku klasifikaciju leukemija (EGIL) (80) i preporuka Svetske Zdravstvene Organizacije (184). Imunološki tip AML definisan je na osnovu ekspresije kombinacije diferencijacionih Ag mijelomonocitne loze: CD117, CD13, CD33, CD64, CD14, CD163, CD11a, CD11b, CD11c, CD15, CD61 i GpA. Ekspresija

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

Tabela. 12. Standardni panel MoAt za imunofenotipizaciju

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

3.4. Klasična citogenetska analiza metodom HG traka

Kariotip bolesnika, u momentu postavljanja dijagnoze, utvrđivan je tehnikom HG traka i analiziran je prema Internacionalnom sistemu za humanu citogenetsku nomenklaturu (185).

Analiza je vršena iz uzorka koji sadrži 2 ml aspirata koštane srži i 8 ml medijuma RPMI 1640 sa 20% fetalnim telećim serumom. Uzorku se potom dodaje 0.2 ml (0,02 mg/ml) kolcemida da bi se zaustavilo deljenje ćelija u metafazi i inkubira se 1 h na 37°C. Prepreparacije, ćelije se ispiraju u medijumu RPMI 1640 centrifugiranjem (1600 rpm 10 min.). Odliva se supernatant, a ćelijskom talogu se dodaje hipotonični rastvor (9,8 ml 0,075 M KCl, 0,1 ml tripsina u koncentraciji 0.025%, 0,1 ml kolcemida u koncentraciji 0.001 mikrog/ml). Hipotonični tretman traje 20 minuta na 37°C, a posle se ćelije ponovo centrifugiraju (1600 rpm). Dobijeni talog se resuspenduje sa 10 ml Karneovog fiksativa (tri dela metil alkohola, jedan deo sirćetne kiseline). Posle resuspendovanja taloga u fiksativu, materijal se nanosi kap po kap na hladne mikroskopske pločice, koje se potom prevuku preko plamena špiritne lampe. Preparati se boje u trajanju od pet minuta sa 2% rastvorom gimze u fosfatnom puferu (0.9% KH₂PO₄, 1,2% Na₂HPO₄). Dobijeni preparati se analiziraju pod svetlosnim mikroskopom. Neke od pregledanih mitoza se fotografišu i potom se slaže kariogram.

Optimalan broj ćelija za direktnu preparaciju, a i za ćelijsku kulturu je 20x10⁶. Citogenetska analiza za svakog bolesnika rađena je na osnovu 20-30 pregledanih ćelija u metafazi, sa apsolutnim minimumom od 10 pregledanih ćelija u metafazi kod pacijenta sa normalnim kariotipom (185). Pod citogenetski patološkim klonom podrazumeva se prisustvo najmanje dve ćelije sa istom strukturnom aberacijom ili trizomijom istog hromozoma ili tri i više metafaza sa monozomijom istog hromozoma (185).

3.5. Molekularno – genetska istraživanja

Za sve vrste molekularno-genetskih istraživanja korišćeni su uzorci aspirata koštane srži, uzeti na 0.38% Na-citratu kao antikoagulansu. Ova istraživanja su sprovedena u Institutu za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo u Beogradu (projekat br. III 41004).

- Izolacija mononuklearnih ćelija iz aspirata koštane srži

Protokol:

1. na dno sterilne epruvete, zapremine 10 ml, sipati 3 ml Ficoll-Plaque PLUS (GE Healthcare), a zatim na ovaj gradijent naneti 4 ml razblaženog uzorka (1:1, uzorak : fiziološki rastvor)
2. centrifugirati na 1 500 g/25 min na sobnoj temperaturi, u kliničkoj centrifugi, bez kočenja
3. posle centrifugiranja, pipetom prebaciti „buffy coat“ interfazu koja je sastavljena od mononuklearnih ćelija u novu sterilnu epruvetu
4. isprati dva puta u PBS-u, posle svakog ispiranja sledi centrifugiranje na 1500 g/15 min
5. talog resuspendovati u 200 µl PBS-a

- Izolacija DNK iz mononuklearnih ćelija

Za izolaciju DNK iz mononuklearnih ćelija korišćen je QIAamp DNA Blood Mini Kit(Qiagen, Germany)

Protokol:

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

3.5.1. Reakcija lančanog umnožavanja DNK

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 odstrane 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 vitrosintezu* DNK: matrica (DNK koja se kopira), prajmere (oligonukleotidi komplementarni krajevima sekvence koja se kopira), nukleotide (gradivni elementi DNK), *Taq* polimerazu (termostabilna DNK polimeraza koja katalizuje ugradnju nukleotida po principu komplementarnosti sa matricom), jone magnezijuma i pufer (neophodni za optimalni rad *Taq*polimeraze).

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

3.5.2. Detekcija *FLT3/ITD* mutacije

Reakciona smeša zapremine 30 µl, sastojala se od sledećih elemenata; 100 – 300 ngDNK, 1x PCR pufer, 1x Q-solution, dNTP (2 mM finalno), MgCl₂ (2.75 mM finalno), prajmeri 14F i 15R (Tabela 13) (350 mM finalno) i 2U HotStarTaq®DNA Polimerase(Qiagen, Nemačka).

Tabela 13. Sekvence prajmera za detekciju i sekvenciranje *FLT3/ITD*, *FLT3/D835* i NPM1 mutacija

Prajmer	sekvenca (5'-3')
14F	GCA ATT TAG GTA TGA AAG CCA GC
15R	CTT TCA GCA TTT TGA CGG CAA CC
21F	CCG CCA GGA ACG TGC TTG
21R	GCA GCC TCA CAT TGC CCC
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

Temperaturni profil PCR reakcije

1. 15 min/95°C – 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. Kod *FLT3/ITD* pozitivnog nalaza, vršeno je isecanje dužeg PCR produkta sa agaroznog gela, a nakon prečišćavanja je izvršeno sekvenciranje upotrebom prajmera koji su korišćeni za PCR amplifikaciju.

3.5.3. Detekcija *FLT3/D835* mutacije

Reakciona smeša zapremine 30 µl, sastojala se od sledećih elemenata; 100 – 300 ngDNK, 1x PCR pufer, 1x Q-solution, dNTP (2 mM finalno), MgCl₂ (2.75 mM finalno), prajmeri 21F i 21R (Tabela 13.) (350 mM finalno) i 2U HotStarTaq® DNA Polimerase (Qiagen, Nemačka).

Temperaturni profil PCR reakcije

1. 15 min/95°C – 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). Prisustvom 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
- 20U *EcoRV* (Fermentas)

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

3.5.4. Detekcija mutacija u *NPM1* genu

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 13.) (500 mM finalno) i 2U HotStarTaq®DNA Polimerase (Qiagen, Nemačka).

Temperaturni profil PCR reakcije

1. 15 min/95°C – 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

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 13.)

3.5.5. Detekcija mutacija u *IDH1* genu

Reakciona smeša zapremine 25 µl, sastojala se od sledećih elemenata; 100 ng DNK, 1x PCR puffer, 1x Q-solution, dNTP (0.3 mM finalno), MgCl₂ (3 mM finalno), prajmeri *IDH1-F* i *IDH1-R* (200 mM finalno) i 2U HotStarTaq®DNA Polimerase (Qiagen, Nemačka).

Temperaturni profil PCR reakcije

4. 15 min/95°C – aktivacija HotStarTaq polimeraze
5. 35 ciklusa;
 - 30 sek/94°C – denaturacija
 - 1 min/55°C – aniling
 - 1 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 prajmera koji su korišćeni u PCR reakciji (Tabela 14.).

Tabela 14. Sekvence prajmera za detekciju mutacija u *IDH1* i *IDH2* genu

Prajmer	sekvenca (5'-3')
IDH1-F	AAA CAA ATG TGG AAA TCA CC
IDH1-R	TGC CAA CAT GAC TTA CTT GA
IDH2-F	CAA GCT GAA GAA GAT GTG GAA
IDH2-R	CAG AGA CAA GAG GAT GGC TA

3.5.6. Detekcija mutacija u *IDH2* genu

Reakciona smeša zapremine 25 μ l, sastojala se od sledećih elemenata; 100 ng DNK, 1x PCR pufer, 1x Q-solution, dNTP (0.3 mM finalno), MgCl₂ (3 mM finalno), prajmeri IDH2-F i IDH2-R (200 mM finalno) i 2U HotStarTaq®DNA Polimerase (Qiagen, Nemačka) (Tabela 14.).

Temperaturni profil PCR reakcije

7. 15 min/95°C – aktivacija HotStarTaq polimeraze
8. 35 ciklusa;
 - 30 sek/94°C – denaturacija
 - 1 min/61°C – aniling
 - 1 min/72°C – elongacija
9. 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 prajmera koji su korišćeni u PCR reakciji.

3.5.7. 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 (5 μ g/ml). Elektroforeza je tekla u 1XTAE puferu (40mM Tris, 20 mM Na-acetat, 1mM Na₂EDTA), pri voltaži od 4-7 V/cm. DNK je vizuelizovana osvetljavanjem gela UV svetlom talasne dužine 266 nm. Trajni zapis rezultata dobija se fotografisanjem gela CCD kamerom integrisanom u sistem za automatsku digitalnu akviziciju slike, BioDocAnalyze sistemom. Veličina fragmenata DNK određuje se pomoću adekvatnih komercijalnih markera (Fermentas).

3.5.8. Analiza DNK na poliakrilamidnom gelu

Fragmenti DNK su razdvajani na nenedenaturišućem 8% poliakrilamidnom gelu (Akrilamid: 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.

3.5.9. 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 bojeni u 0.1% rastvoru srebronitrata 10 minuta. Višak srebra je uklanjan ispiranjem najpre u bi-distilovanoj vodi, a zatim u razvijaju, koji je bio sledećeg sastava: 1.5% natrijumhidroksid, 0.01% natrijumborhidrid i 0,048% formaldehid. Gelovi su u razvijaju držani 20 minuta. Fiksiranje dobijenih traka vršeno je potapanjem gelova u 0.75% rastvor natrijumbikarbonata.

3.5.10. 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 (186). 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.

U ovoj studiji ispitivali smo uticaj *IDH* mutacija na ukupno preživljavanje kod AML-NK bolesnika u odnosu na tri različite grupe rizika koje su definisane u odnosu na *FLT3* i *NPM1* status (povoljan rizik- *NPM1*⁺/*FLT3-ITD*⁻; intermedijarni rizik- *NPM1*⁻/*FLT3-ITD*⁻; nepovoljan rizik- *FLT3-ITD*⁺), u skladu sa ELN preporukama (78).

3.6. Lečenje AML bolesnika

Lečenje bolesnika je sprovedeno hemioterapijom (indukcija i konsolidacija) prema ELN preporukama (78). Svi bolesnici ≤ 60 godina lečeni su standardnom "3+7" indukcionom hemoterapijom, u sastavu: Daunorubicin u dozi 60 mg/m^2 na dan 1, 2, 3 u kombinaciji sa Citarabinom u dozi 200 mg/m^2 dnevno kontinuirano intravenskom infuzijom 7 dana. Bolesnici > 60 godina lečeni su istim protokolom u redukovanim dozama. Bolesnici koji su postigli KR posle indukcione hemioterapije primali su tri ciklusa konsolidacione hemioterapije, u sastavu: Citarabin 3 g/m^2 na 12h dnevno 1, 3 i 5 ≤ 60 godina i Citarabin $0.5\text{--}1 \text{ g/m}^2$ na 12h dnevno 1, 3 i 5 > 60 godina. Bolesnici koji su imali recidiv bolesti ili bili refraktarni na primenjenu indukcionu hemioterapiju lečeni su jednim od "salvage" protokola: Mitoksantron (10 mg/m^2 D1-5) i Etopozid (100 mg/m^2 D1-5); FLAG-IDA: Fludarabin 30 mg/m^2 , na dan 1–5; Citarabin 1500 mg/m^2 , 4 sata posle fludarabinske infuzije, na dan 1–5; idarubicin 8 mg/m^2 na dan 3–5; faktor stimulacije granulocitnih kolonija (G-CSF) $5 \text{ } \mu\text{g/kg}$, subkutano od 6 dana do broja $\text{Le} > 1 \text{ g/l}$; Cytarabin (3 g/m^2 na 12h na dan 1, 3, 5 i 7) u kombinaciji sa Daunorubicin (50 mg/m^2) na dan 2, 4 i 6. Bolesnici koji su bili lošeg ECOG statusa i visokog HCT-CI ≥ 3 i nisu mogli da prime redukovanu hemioterapiju lečeni su palijativnom terapijom (malim dozama Citarabina, hidroksiurejom). Kod bolesnika ≤ 55 godina koji su pri dijagnozi imali nepovoljne prognostičke faktore za recidiv bolesti (leukocitoza, molekularni i imunofenotipski markeri) lečeni su alogenom ili autologom TMČH.

Procena efikasnosti lečenja sprovedena je na kraju indukcionog lečenja prema opšte prihvaćenim kliničkim kriterijumima Internacionalne Radne Grupe (187). Kompletna remisija (KR) podrazumevala je: 1) $\leq 5\%$ blasta u koštanoj srži, uz odsustvo Auerovih stapića u blastima; 2) odsustvo ekstramedularne bolesti; 3) broj neutrofila $\geq 1.5 \times 10^9/\text{L}$, trombocita $\geq 100 \times 10^9/\text{L}$; 4) transfuziona nezavisnost. Recidiv bolesti (RB) definisan je kao: 1) ponovna pojava blasta u koštanoj srži ($> 5\%$) ili u perifernoj krvi; 2) nastanak ekstramedularne bolesti. Pod refraktarnom bolešću podrazumeva se nepostizanje KR, nepotpune ili parcijalne KR kod bolesnika koji su preziveli ≥ 7 dana od završetka indukcije (dokaz perzistentne leukemije u krvi/koštanoj srži). Ukupno preživljavanje (engl. overall survival (OS)) je definisano kao

vreme od dijagnoze do smrti ili datuma poslednjeg praćenja. Preživljavanje bez znakova bolesti (engl. disease-free survival (DFS)) je definisano kao vreme od postizanja KR do recidiva ili smrti. Rana smrt (engl. early death (ED)) je definisana kao smrt u toku od 28 dana od otpočinja indukciono hemioterapije (115).

3.7. Statistička analiza

Dobijeni podaci su obrađeni i prikazani u tabelama i na slikama uz propratnu diskusiju.

Od opisnih statističkih pokazatelja korišćeni su; srednja vrednost i standardno odstupanje, raspon vrednosti promenljivih (minimum, maksimum) i medijana vrednosti.

Za istraživanje jačine veze između dve neprekidne promenljive upotrebljen je metod Pirsonove korelacije (R-Pirsonov koeficijent linearne korelacije).

Za ispitivanje veze između kategorijskih promenljivih korišćeni su neparametarski testovi i to: za poređenje između dve kategorijske promenljive (2x2 „crosstabs“) korišćen je Hi-kvadrat test nezavisnosti, a za ispitivanje veze između 3 i više kategorijskih promenljivih korišćen je Fišerov „tačan pokazatelj verovatnoće“ (Fisher's Exact Probability Test).

Od statističkih testova za poređenje grupa korišćeni su sledeći neparametarski testovi: Man-Vitnijev U-test za ispitivanje razlika između dve grupe neprekidno promenljivih i Kruskal-Volisov test za ispitivanje razlika između tri ili više grupa neprekidno promenljivih

Za analizu dužine preživljavanja korišćena je Kaplan-Majerova metoda, kao i Log Rank test za poređenje preživljavanja među ispitivanim grupama.

Za identifikaciju faktora rizika korišćen je univarijantni i multivarijantni Cox-ov proporcionalni regresioni model.

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 15.0.

4. REZULTATI

4.1. Demografske osobine bolesnika

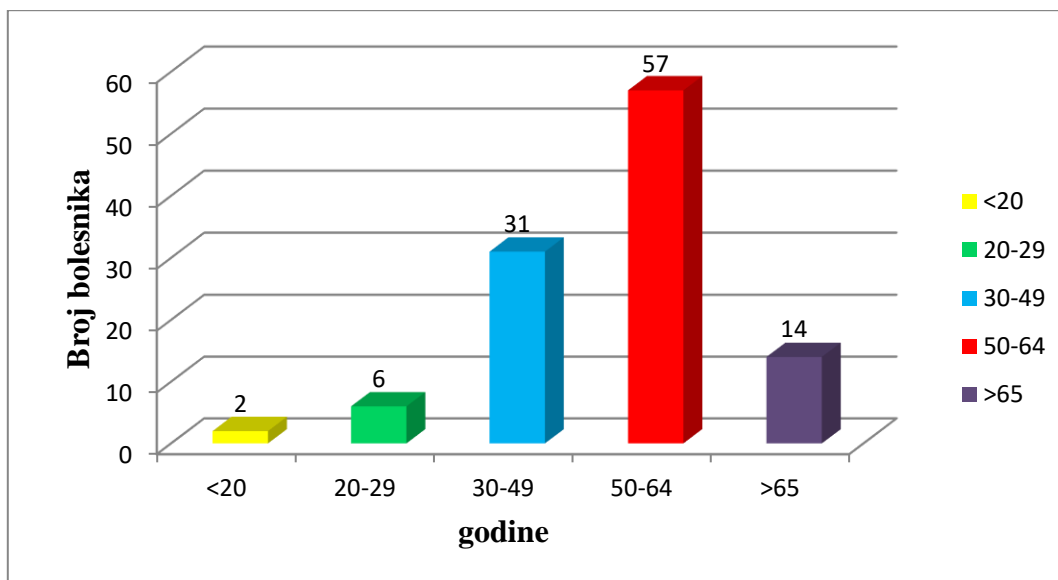
Ispitivanjem je obuhvaćeno 110 odraslih bolesnika sa akutnom mijeloidnom leukemijom i normalnim kariotipom koji su dijagnostikovani i lečeni u periodu od 2009. - 2014. godine u Klinici za hematologiju KCS.

4.1.1. Distribucija bolesnika prema polu

Studijsku grupu bolesnika činilo je 62 muškaraca (56.4%) i 48 (43.6%) žena.

4.1.2. Distribucija bolesnika prema životnoj dobi

Prosečna starost bolesnika je bila 54 godina (opseg: 19-78). Distribucija životnog doba bolesnika je prikazana na dijagramu 1. Najveći broj 57 (51.8%) bolesnika je bio starosti između 50 i 64 godina. Bolesnika preko 65 godina je bilo 14 (12.7%).

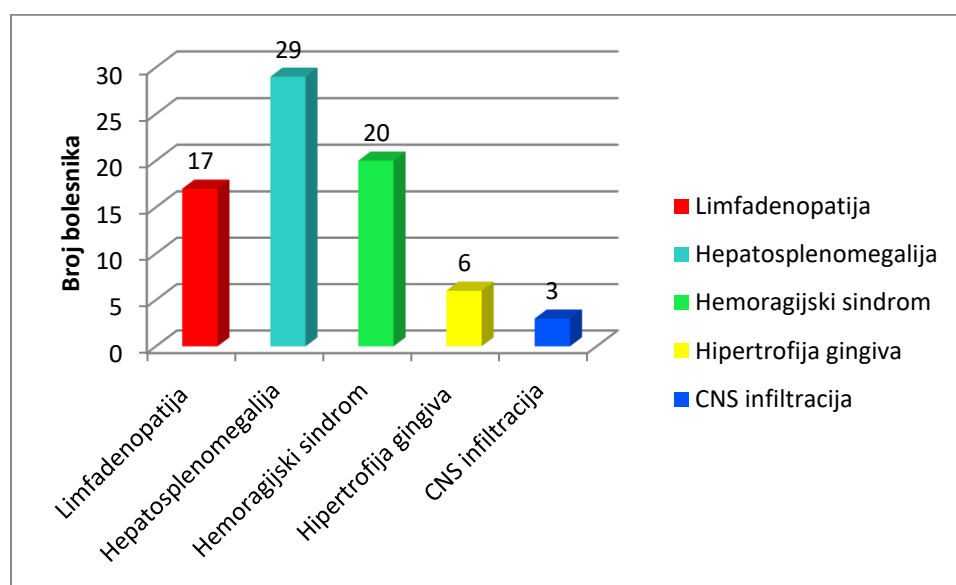


Dijagram 1. Distribucija frekvencija bolesnika sa AML-NK prema starosnim kategorijama

4.2. Kliničke osobine bolesnika

4.2.1. Prezentacija bolesnika sa AML-NK pri dijagnozi

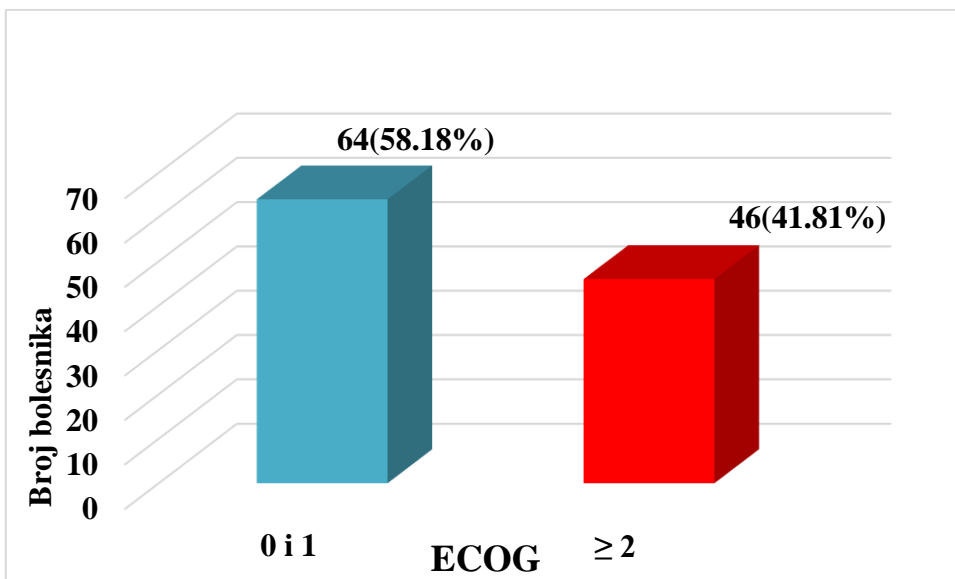
U fizikalnom nalazu bolesnika sa AML-NK bile su prisutne: hepatosplenomegalija u 29 (26.4%), hemoragijski sindrom u 20 (18.2%), limfadenopatija u 17 (15.5%), hipertrofija gingiva u 6 (5.5%) i CNS infiltracija u 3 (2.7%) bolesnika (Dijagram 2).



Dijagram 2. Distribucija bolesnika prema kliničkoj prezentaciji pri dijagnozi

4.2.2. Distribucija bolesnika prema opštem funkcionalnom stanju

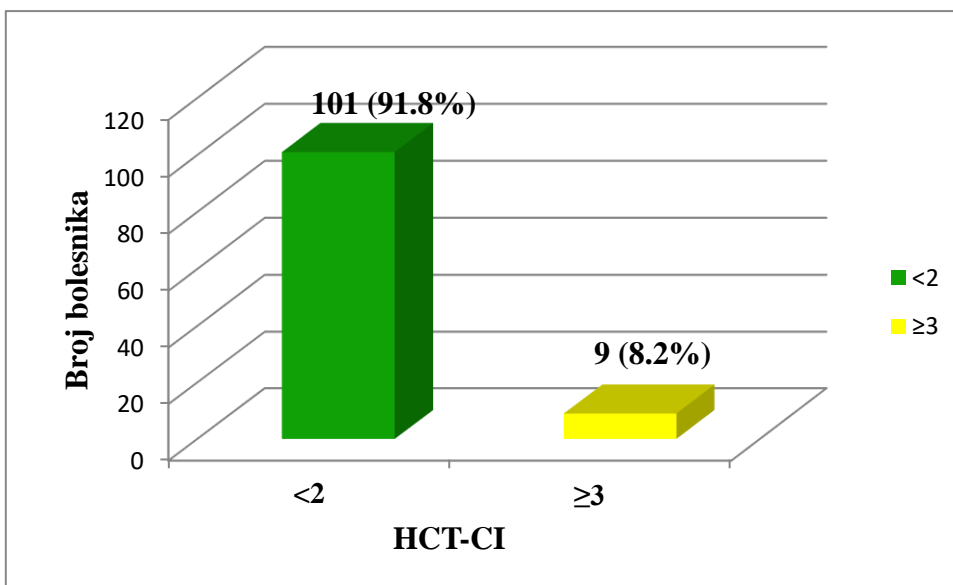
Pri dijagnozi veći broj bolesnika 64 (58.18%) je bio dobrog opšteg funkcionalnog stanja ECOG skor (0 i 1), dok je 46 (41.81%) bolesnika imalo ECOG skor (≥ 2) (Dijagram 3).



Dijagram 3. Distribucija AML-NK bolesnika prema vrednosti ECOG skora

4.2.3. Distribucija bolesnika prema komorbiditetnom indeksu (HCT-CI)

Visok HCT-CI skor ≥ 3 pri dijagnozi je imalo 9 (8.2%), dok je 101 (91.8%) bolesnika imalo HCT-CI skor < 2 (Dijagram 4).



Dijagram 4. Distribucija AML-NK bolesnika prema vrednosti HCT-CI skora

4.3. Laboratorijski nalazi

Srednja vrednost koncentracije hemoglobina u studijskoj grupi iznosila je 97.37 g/L (opseg: 57-141) (Tabela 15). Hemoglobin ispod 100g/L je imalo 66 (61.1%) bolesnika (Tabela 16). Broj leukocita se kretao od minimalnog broja 0.5 do maksimalnog broja 195 x 10⁹/L sa srednjom vrednosti od 37.86 x 10⁹/L (SD 49.08). Broj leukocita ≥ 30 x10⁹/L imalo je 40 (36.4%), dok je 16 (14.5%) bolesnika imalo ekstremnu leukocitozu ≥100 x10⁹/L. Srednja vrednost broja trombocita na prijemu je iznosila 79.67 x 10⁹/L (opseg: 1-420 x10⁹/L). Broj trombocita između 100 - 150 x 10⁹/L je imalo 26 (29.3), 45 (41.3%) bolesnika imalo broj trombocita < 50 x10⁹/L, dok je broj trombocita <20 imalo 11 (10.1) bolesnika. Blasti u perifernoj krvi kod nekih bolesnika nisu bili prisutni (0%), maksimalni procenat blasta je bio 98%, prosečna vrednost je bila 36.75% (SD 32.00). Prosečna vrednost blasta u koštanoj srži je bila 67.20%, minimalno 23% i maksimalno 97% (Tabela 15). Srednja vrednost laktat dehidrogenaze je bila 1129.45 U/L (SD 1202.9) i povišena vrednost LDH ≥ 450 U/L uočena je kod 85 (77.3%) bolesnika (Tabela 15 i 16).

Tabela 15. Srednje vrednosti hematoloških nalaza u AML-NK pri dijagnozi

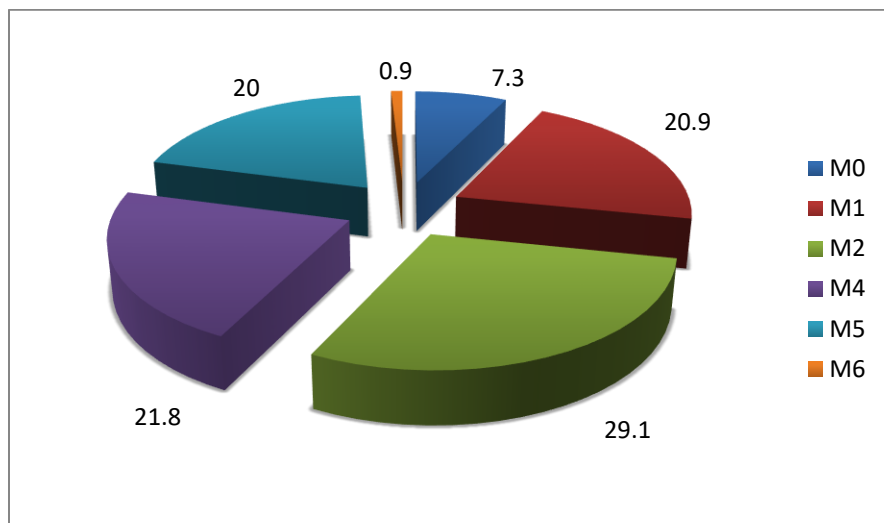
Karakteristike	jedinica	Normalna vrednost	Srednja vrednost	Medijana	Min	Max	SD
Hemoglobin	g/l	>120	97.37	97	57	141	17.48
Leukociti	x10 ⁹ /l	4-10	37.86	16.55	0.5	195	49.08
Trombociti	x10 ⁹ /l	150-450	79.67	68	1	420	62.83
Blasti u PK	%	0	36.75	26	0	98	32.00
Blasti u KS	%	0-5	67.20	72	23	97	19.65
LDH	U/L	220-450	1129.45	737	235	7180	1202.9

Tabela 16. Laboratorijske karakteristike bolesnika sa AML-NK pri dijagnozi

Karakteristike	Broj bolesnika	Procenat (%)
Hemoglobin (g/l)		
<100	66	61.1
≥100	42	38.9
Leukociti (x10 ⁹ /l)		
<10	48	43.6
10-29	22	20,0
30-99	24	21.8
≥100	16	14.5
Trombociti (x10 ⁹ /l)		
<20	11	10.1
20-49	34	31.2
50-99	27	24.8
100-150	26	23.9
>150	11	10.1
LDH (U/l)		
< 450	25	22.7
≥ 450	85	77.3

4.4. FAB podtipovi AML-NK bolesnika

Distribucija bolesnika sa AML-NK prema FAB klasifikaciji je prikazana u dijagramu 5. Najveći broj je pripadao M2 podtipu-32 (29.1%), potom M4 podtipu-24 (21.8%), M1-23 (20.9%) i M5-22 (20%) bolesnika. Najmanji broj bolesnika pripadao je M0-8 (7.3%) i M6-1 (0.9%) podtipu.



Dijagram 5. Distribucija prema FAB klasifikaciji u bolesnika sa AML-NK

4.5. Imunofenotipske karakteristike AML-NK bolesnika

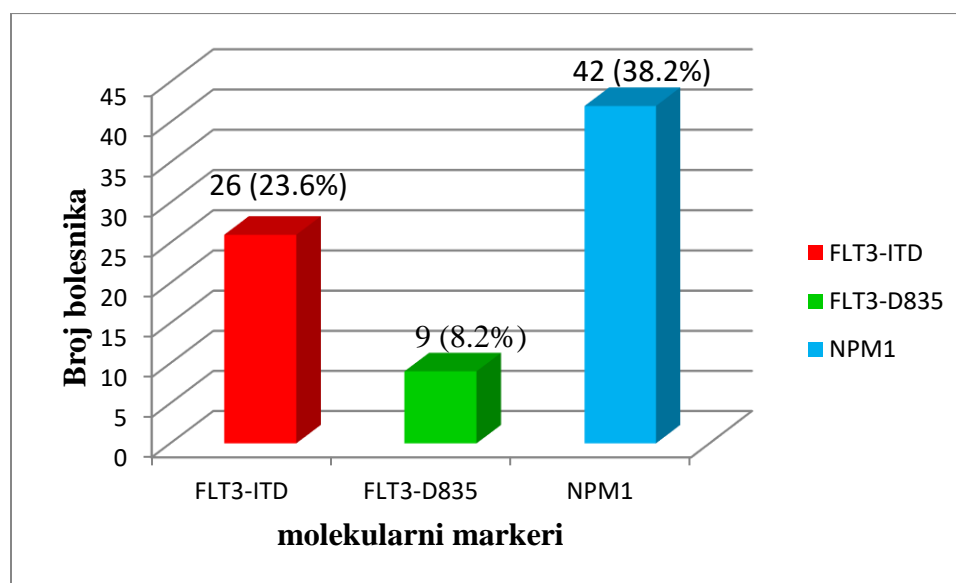
Distribucija bolesnika prema ekspresiji antigena na leukemijskim ćelijama prikazana je u tabeli 17. Najveću zastupljenost pokazali su sledeći imunofenotipski antigeni: CD13-106 (96.4), CD33-110 (94.5), HLA-DR-95 (90.5), CD117- 89 (80.9%), MPO-86 (78.2%) i CD34-67 (60.9%) bolesnika.

Tabela 17. Imunofenotipske osobine blasta kod bolesnika sa AML-NK

Antigeni	Ukupan broj bolesnika	Broj pozitivnih bolesnika (%)	Broj negativnih bolesnika (%)
CD13	110	106 (96.4)	4 (3.6)
CD34	110	67 (60.9)	43 (39.1)
CD33	110	110 (94.5)	6 (5.5)
MPO	110	86 (78.2)	24 (21.8)
HLA-DR	105	95 (90.5)	10 (9.5)
CD117	110	89 (80.9)	21 (19.1)
CD14	105	12 (11.4)	93 (88.6)
CD15	110	41 (37.3)	69 (62.7)
CD2	103	6 (5.8)	97 (94.2)
CD4	105	33 (31.4)	72 (68.6)
CD7	110	25 (22.7)	85 (77.3)
CD56	110	20 (18.2)	90 (81.8)
CD68	103	22 (21.4)	81 (78.6)
CD19	110	7 (6.4)	103 (93.6)

4.6. Molekularne karakteristike AML-NK bolesnika

U dijagramu 6 prikazana je učestalost molekularnih markera. *FLT3-ITD* mutacija je bila prisutna kod 26 (23.6%), a *FLT3-D835* kod 9 (8.2%) AML-NK bolesnika. *NPM1* mutacija je bila prisutna kod 42 (38.2%) bolesnika.



Dijagram 6. Distribucija molekularnih markera kod AML-NK bolesnika

4.7. Molekularne podgrupe rizika AML-NK bolesnika

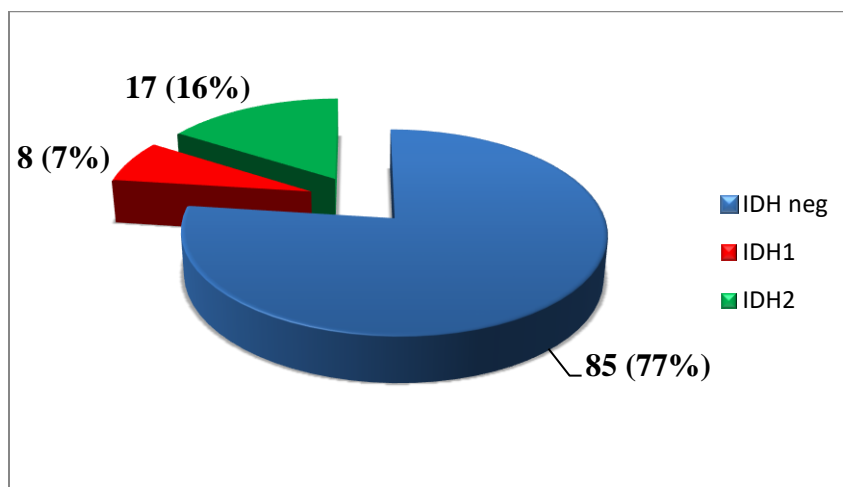
Najviše bolesnika 61/110 (55.5%) pripadalo intermedijarnoj podgrupi rizika (*NPM1*⁻/*FLT3-ITD*⁻), dok su bolesnici povoljne (*NPM1*⁺/*FLT3-ITD*⁻) i nepovoljne podgrupe rizika bili skoro jednako zastupljeni (23 (20.9%); 26 (23.6%)) (Tabela 18).

Tabela 18. Distribucija AML-NK bolesnika prema molekularnim podgrupama rizika

Grupe rizika	Ukupan broj bolesnika	Broj pozitivnih bolesnika (%)	Broj negativnih bolesnika (%)
<i>Povoljan rizik (NPM1⁺/FLT3-ITD⁻)</i>	110	23 (20.9)	87 (79.1)
<i>Intermedijarni rizik (NPM1⁻/FLT3-ITD⁻)</i>	110	61 (55.5)	49 (44.5)
<i>Nepovoljan rizik (FLT3-ITD⁺)</i>	110	26 (23.6)	84 (86.8)

4.8. Učestalost *IDH1* i *IDH2* mutacija kod AML-NK bolesnika

IDH mutacije su detektovane kod 25/110 (23%) bolesnika (Dijagram 7). Osmam (7%) bolesnika je imalo *IDH1* mutaciju i svi su imali *IDH^{R132}* mutaciju. Sedamnaest (16%) bolesnika je imalo *IDH2* mutaciju: petnaest *IDH^{R140}* i dva *IDH^{R172}* (Tabela 19.).



Dijagram 7. Distribucija *IDH* mutacija kod AML-NK bolesnika

Tabela 19. Tipovi *IDH1* i *IDH2* mutacija identifikovanih kod 110 AML-NK bolesnika

mutacije	Izmena nukleotida	Izmena amino kiselina	Broj bolesnika
<i>IDH1</i>			
	c.394C>T	R132C	4
	c.395G>A	R132H	2
	c.394C>G	R132G	1
	c.394C>A	R132S	1
<i>IDH2</i>			
	c.419G>A	R140Q	12
	c.418C>T	R140W	1
	c.419G>T	R140L	1
	c.418C>G	R140G	1
	c.515G>A	R172K	2

4.9. Kliničke karakteristike AML-NK bolesnika sa *IDH* mutacijom

Prosečna starost AML-NK bolesnika sa *IDH* mutacijom je bila 50 godina (opseg: 23-73). Bolesnici sa *IDH* mutacijom su skoro jednako bili zastupljeni i kod muškog i ženskog pola. *IDH*⁺ bolesnici su imali veći broj trombocita ($p=0.024$), kao i veći procenat blasta u perifernoj krvi ($p=0.031$) u odnosu na *IDH* bolesnike. Nije bilo razlike između *IDH*⁺ i *IDH* bolesnika u odnosu na starost, pol, broj leukocita, procenat blasta u BK, hemoglobin i nivo LDH. Distribucija *IDH*⁺ bolesnika prema FAB grupama je bila neravnomerna, najčešće su pripadali M2 grupi-9 (29%) bolesnika, zatim je 6 (27.3%) pripadalo M1 i 5 (21%) M4 grupi (Tabela 20.).

Tabela 20. Poređenje kliničkih i laboratorijskih karakteristike AML-NK bolesnika sa i bez *IDH* mutacije

Karakteristike	Ukupno (n=110)	<i>IDH</i> ⁺ (n=25)	<i>IDH</i> ⁻ (n=85)	<i>p</i>
Pol				0.617
muški (N, %)	62 (56.4)	13 (21)	49 (79)	
ženski (N, %)	48 (43.6)	12 (25)	36 (75)	
starost (godine, medijana, opseg)	53.5 (19-78)	50 (23-73)	54 (19-78)	0.783
ECOG ≥2				0.081
Da (N, %)	45 (40.9)	14(31.1)	31 (68.9)	
Ne (N, %)	65 (59.1)	11(16.9)	54 (83.1)	
HCT-CI ≥3				0.300
Da (N, %)	8 (7.3)	3 (37.5)	5 (62.5)	
Ne (N, %)	102 (92.7)	22 (21.6)	80 (78.4)	
Leukociti (x10 ⁹ /L, medijana, opseg)	16.8 (0.5-195)	6.9 (0.5-160)	16.8 (0.8-195)	0.374
Leukociti (≥30x10 ⁹ /L, N)	40 (36.4)	9 (22.5)	31 (77.5)	0.966
Hemoglobin (medijana, opseg)		100 (57-141)	95 (60-140)	
Trombociti (x10 ⁹ /L, medijana, opseg)	68 (1-420)	109 (16-193)	56 (1-420)	0.024
LDH (U/L, medijana, opseg)	917 (273-7180)	733 (315-5105)	739 (273-7180)	0.605
LDH, ≥450 U/L (N, %)	85 (77.3)	17 (20)	68 (80)	0.208
Blasti u perifernoj krvi (% , opseg)	26 (0-96)	61 (0-96)	21 (0-96)	0.031
Blasti u koštanoj srži (% , opseg)	71 (23-97)	71 (33-97)	72 (23-97)	0.920
FAB (N, %)				0.139
M0	8 (7.3)	4 (40)	6 (60)	
M1	23 (20.9)	6 (27.3)	16(72.7)	
M2	32 (29.1)	9 (29)	22 (71)	
M4	24 (21.8)	5 (21)	19 (79)	
M5	22 (20.9)	1 (0.05)	21 (95.5)	
M6	1 (0.9)	0 (0.0)	1 (100.0)	

4.9.1 Kliničke karakteristike AML-NK bolesnika sa *IDH1* i *IDH2* mutacijom

U tabeli 21. prikazane su kliničke i laboratorijske karakteristike AML-NK bolesnika sa i bez *IDH1* i *IDH2* mutacije. Nije bilo statistički značajne razlike među bolesnicima sa i bez *IDH1* i *IDH2* u odnosu na dole navedene karakteristike, izuzev u broju trombocita koji je u bolesnika sa *IDH1* mutacijom bio veći pri dijagnozi u odnosu na *IDH1*⁻ bolesnike (p=0.045).

Tabela 21. Poređenje kliničkih i laboratorijskih karakteristika AML-NK bolesnika sa i bez *IDH1* i *IDH2* mutacije.

Karakteristike	<i>IDH1</i> ⁺ (n=8)	<i>IDH1</i> ⁻ (n=102)	<i>P</i>	<i>IDH2</i> ⁺ (n=17)	<i>IDH2</i> ⁻ (n=93)	<i>P</i>
Pol			0.063			0.451
muški (N, %)	2 (3.2)	60 (96.6)		11 (17.7)	51 (82.3)	
ženski (N, %)	6 (12.5)	42 (87.5)		6 (12.5)	42 (87.5)	
starost (godine, medijana, opseg)	61.5 (33-73)	53 (19-78)	0.148	47 (23-73)	54 (19-78)	0.175
ECOG ≥2			0.715			0.707
Da (N, %)	5 (6.9)	96 (95.1)		9(8.9)	92(91.1)	
Ne (N, %)	3 (11.1)	8(88.8)		8(66.6)	1(11.1)	
HCT-CI ≥3			0.644			0.558
Da (N, %)	1 (11.1)	8 (88.9)		2 (22.2)	7 (77.8)	
Ne (N, %)	7 (6.9)	94 (93.1)		15 (14.9)	86 (85.1)	
Leukociti (x10 ⁹ /L, medijana, opseg)	4.4 (0.5-51.8)	17 (0.7-195)	0.119	17.2 (0.7-160)	16.3 (0.5-195)	0.928
Leukociti (≥30x10 ⁹ /L, N)	2 (5)	38 (95)	0.488	7 (17.5)	33 (82.5)	0.654
Hemoglobin (medijana, opseg)	98 (78-138)	97 (57-141)			96 (60-140)	
Trombociti (x10 ⁹ /L, medijana, opseg)	116 (31-181)	62 (1-420)	0.045	97 (16-193)	60 (1-420)	0.241
LDH (U/L, medijana, opseg)	410.5 (241-4734)	753 (235-7180)	0.226	797 (241-5105)	735 (235-7180)	0.788
LDH ≥450 U/L (N,%)	4 (4.7)	81 (95.3)	0.056	13 (15.3)	72 (84.7)	0.932
Blasti u perifernoj krvi (% , opseg)	63 (0-89)	25 (0-98)	0.294	59 (4-96)	25 (0-98)	0.079
Blasti u koštanoj srži (% , opseg)	73 (65-95)	71 (23-97)	0.270	60 (33-97)	73 (23-97)	0.527
FAB (N, %)			0.791			0.233
M0	1 (12.5)	7 (87.5)		3 (37.5)	5 (62.5)	
M1	3 (13)	20 (87)		3 (13)	20 (87)	
M2	2 (6.3)	30 (93.8)		7 (21.9)	25 (78.1)	
M4	1 (4.2)	23 (95.8)		4 (16.7)	20 (83.3)	
M5	1 (4.5)	21 (95.5)		0 (0)	22 (100)	
M6	0 (0)	1 (100)		0 (0)	1 (100)	

4.9.2. Imunofenotipske karakteristike AML-NK bolesnika sa *IDH* mutacijom

Kod bolesnika sa *IDH* mutacijom najčešće su bili eksprimirani mijelodni markeri CD33, CD13 i MPO, potom blastni markeri HLA-DR i CD117 (c-kit receptor) ali nije

postojala statistički značajna razlika u poređenju dve grupe bolesnika (sa i bez *IDH* mutacije) (Tabela 22.). Međutim, bolesnici sa *IDH* mutacijom su jedino statistički značajno ređe ekspimirali CD56 i CD14 antigene (p=0.040; p=0.007).

Tabela 22. Poređenje imunofenotipskih karakteristika AML-NK bolesnika sa i bez *IDH* mutacijama

Antigeni		<i>IDH1</i>			<i>IDH2</i>			<i>IDH1/2</i>		
		poz(%)	neg (%)	p	poz (%)	neg (%)	p	poz (%)	neg (%)	p
CD13	poz	8 (7.5)	98 (92.5)	0.568	16 (15.1)	90 (84.9)	0.591	24(22.6)	82 (75)	0.912
	neg	0 (0)	4 (100)		1 (25)	3 (75)		1 (25%)	3 (75)	
CD34	poz	3 (4.5)	64 (95.5)	0.159	10 (14.9)	57 (85.1)	0.848	13(19.4)	54 (80.6)	0.299
	neg	5 (16.1)	38 (88.4)		7 (16.3)	36 (83.7)		12(27,9)	31 (72.1)	
CD33	poz	8 (7.7)	96 (92.3)	0.480	14 (13.5)	90 (86.5)	0.056	22 (21.2)	82 (78.8)	0.101
	neg	0 (0)	6 (100)		3 (50)	3 (50)		3 (50)	3 (50)	
MPO	poz	8 (9.3)	78 (90.7)	0.121	14 (16.3)	72 (83.7)	0.651	22 (25.6)	64 (74.4)	0.176
	neg	0 (0)	24 (100)		3 (12.5)	21 (87.5)		3 (12.5)	21 (87.5)	
HLA-DR	poz	6 (6.3)	8 (80)	0.121	15 (15.8)	80 (84.2)	0.731	21 (22.1)	74 (77.9)	0.206
	neg	2 (20)	89 (93.7)		2 (20)	8 (80)		4 (40)	6 (60)	
CD117	poz	8 (9)	81 (91)	0.154	14 (15.7)	75 (84.3)	0.869	22 (24.7)	67 (75.3)	0.305
	neg	0 (0)	21 (100)		3 (14.3)	18 (85.7)		3 (14.3)	18 (85.7)	
CD14	poz	0 (0)	12 (100)	0.290	0 (0)	12 (100)	0.106	0 (0)	12 (100)	0.040
	neg	8 (8.6)	85 (91.4)		17 (18.3)	76 (81.7)		25(26.9)	68(73.1)	
CD15	poz	2 (4.9)	39 (95.1)	0.456	5 (12.2)	36 (87.8)	0.466	7 (17.1)	34 (82.9)	0.275
	neg	6 (8.7)	63 (91.3)		12 (17.4)	57 (82.6)		18(26.1)	51(73.9)	
CD2	poz	0 (0)	6 (100)	0.464	0 (0)	6 (100)	0.262	0 (0)	6 (100)	0.153
	neg	8 (8.2)	89 (91.8)		17 (17.5)	80 (82.5)		25 (25.8)	72 (74.2)	
CD4	poz	2 (6.1)	31 (93.9)	0.684	5 (15.2)	28 (84.8)	0.845	7 (21.2)	26 (78.8)	0.672
	neg	6 (8.3)	66 (91.7)		12 (16.7)	60 (83.3)		18 (25)	54 (75)	
CD7	poz	1 (4)	24 (96)	0.473	3 (12)	22 (88)	0.587	4 (16)	21 (84)	0.361
	neg	7 (8.2)	78 (91.8)		14 (16.5)	71 (83.5)		21 (24.7)	64 (75.3)	
CD56	poz	0 (0)	20 (100)	0.166	0 (0)	20 (100)	0.035	0 (0)	20 (100)	0.007
	neg	8 (8.9)	82 (91.1)		17 (18.9)	73 (81.1)		25 (27.8)	65 (72.2)	
CD68	poz	2 (9.1)	20 (90.9)	0.794	3 (13.6)	19 (86.4)	0.683	5 (22.7)	17 (77.3)	0.849
	neg	6 (7.4)	75 (92.6)		14 (17.3)	67 (82.7)		20 (24.7)	61 (75.3)	
CD19	poz	0 (0)	(100)	0.444	1 (14.3)	6 (85.7)	0.930	1 (14.39)	6 (85.7)	0.582
	neg	8 (7.8)	95 (92.2)		16 (15.5)	87 (84.5)		24 (23.3)	79 (76.6)	

4.9.3. Povezanost *IDH* mutacija sa drugim molekularnim markerima

IDH mutacije su jednako bile zastupljene kod *NPM1*⁺ i *NPM1*⁻ bolesnika (26.2% vs 20.6%, p=0.496). Pored toga, *IDH* mutacije nisu bile statistički značajno različito zastupljene kod *FLT3-ITD*⁺ i *FLT3-ITD*⁻ bolesnika (19.2 % vs 23.8%, p=0.626). Takođe, nije uočena statistički značajna povezanost *IDH1* i *IDH2* sa *FLT3-ITD*, *FLT3-D835* i *NPM1* mutacijom (Tabela 23.).

Tabela 23. Povezanost *IDH1* i *IDH2* mutacija sa drugim molekularnim markerima

Molekularni markeri		<i>IDH1</i>			<i>IDH2</i>			<i>IDH1/2</i>		
		poz	neg	p	poz	neg	p	poz	neg	p
<i>FLT3-ITD</i> (N,%)	poz	2 (7.7)	24(92.3)	0.925	3 (11.5)	23(88.5)	0.527	5 (19.2)	21(80.8)	0.626
	neg	6 (7.1)	78(92.9)		14 (16.7)	70(83.3)		20 (23.8)	64(76.2)	
<i>FLT3-D835</i> (N,%)	poz	2 (22.2)	7 (77.8)	0.071	1 (11.1)	8 (88.9)	0.707	3 (33.3)	6 (66.7)	0.428
	neg	6 (5.9)	95(94.1)		16 (15.8)	85(84.2)		22 (21.8)	79(78.2)	
<i>NPM1</i> (N,%)	poz	5 (11.9)	37(88.1)	0.141	6 (14.3)	36(85.7)	0.790	11(26.2)	31 (73.8)	0.496
	neg	3 (4.4)	65(95.6)		11 (16.2)	57(83.8)		14(20.6)	54 (79.9)	

4.9.4. Molekularne podgrupe rizika AML-NK bolesnika sa *IDH1* i *IDH2* mutacijom

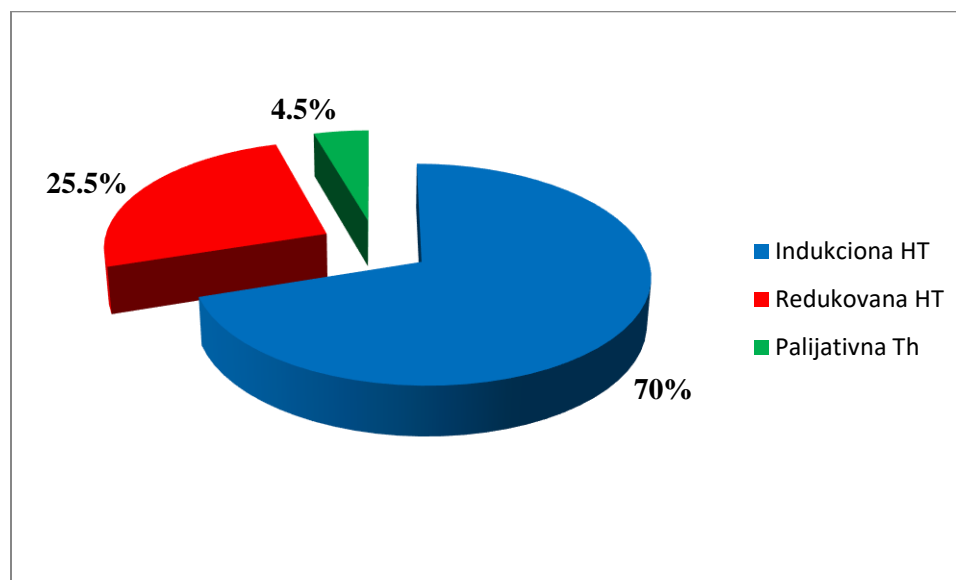
U tabeli 24 prikazana je zastupljenost *IDH* mutacija u odnosu na molekularne podgrupe rizika. Bolesnici sa *IDH1* i *IDH2*, posebno i sa obe ove mutacije zajedno, bili su najzastupljeniji u intermedijarnoj podgrupi rizika (*NPM1*⁻/*FLT3-ITD*⁻). Posmatrajući raspodelu ovih mutacija po molekularnim podgrupama rizika statistički značajno su bili zastupljeni bolesnici bez *IDH* mutacije u odnosu na one sa prisutnim mutacijama (Tabela 24.).

Tabela 24. Povezanost molekularnih podgrupa rizika AML-NK bolesnika sa i bez *IDH1* i *IDH2* mutacijom

Grupe rizika	<i>IDH1</i>			<i>IDH2</i>			<i>IDH1/IDH2</i>		
	poz	neg	p	poz	neg	p	poz	neg	p
Povoljan rizik (<i>NPM1</i> ⁺ / <i>FLT3-ITD</i> ⁻) (N,%)	3/8 (37.5)	16/102 (15.7)	< 0.001	4 /17 (23.5)	16/93 (17.2)	0,003	7/25 (28)	16/85 (18.8)	0,093
Intermedijarni rizik (<i>NPM1</i> ⁻ / <i>FLT3-ITD</i> ⁻) (N,%)	3/8 (37.5)	48/102 (47.1)	< 0.001	10 /17 (58.82)	48/93 (51.61)	< 0.001	13/ 25 (52)	48/85 (56.47)	< 0.001
Nepovoljan rizik (<i>FLT3-ITD</i> ⁺) (N,%)	2/8 (25)	21/102 (20.59)	< 0.001	3 /17 (17.65)	21/93 (22.58)	< 0.001	5/ 25 (20)	21/85 (24.71)	0,003

4.10. Analiza lečenja AML-NK bolesnika

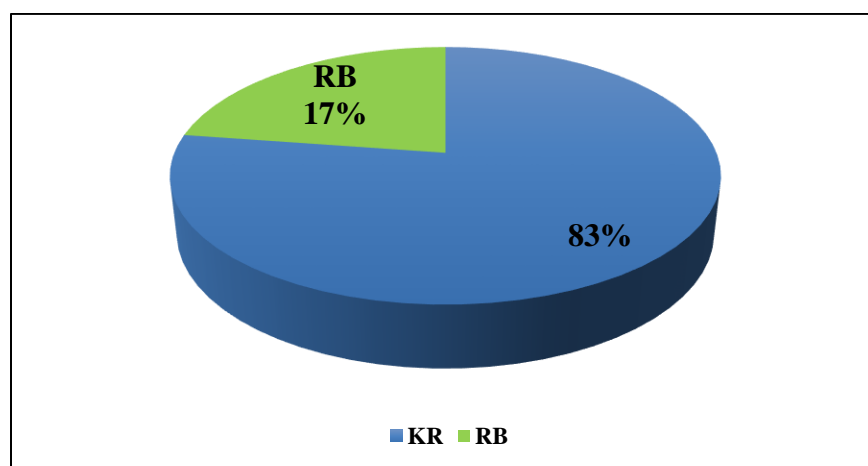
Bolesnici ≤ 60 godina, 77/110 (70%) lečeni su indukcijom hemioterapijom "3+7", dok je kod 28 (25.5%) bolesnika starijih od 60 godina primenjena redukovana terapija. Kod 5 (4.5%) bolesnika je primenjena palijativna terapija (Dijagram 8.).



Dijagram 8. Distribucija bolesnika prema primenjenom načinu lečenja

4.10.1. Rezultati indukcionog lečenja

Kompletnu remisiju je postiglo 62/75 (83%). Ukupno je u toku indukcionog lečenja umrlo 30 (28.57%) bolesnika. Refraktarnost na indukcionu terapiju je pokazalo 13 (17%) bolesnika (Dijagram 9).



Dijagram 9. Prikaz ishoda indukcionog terapije kod AML-NK bolesnika

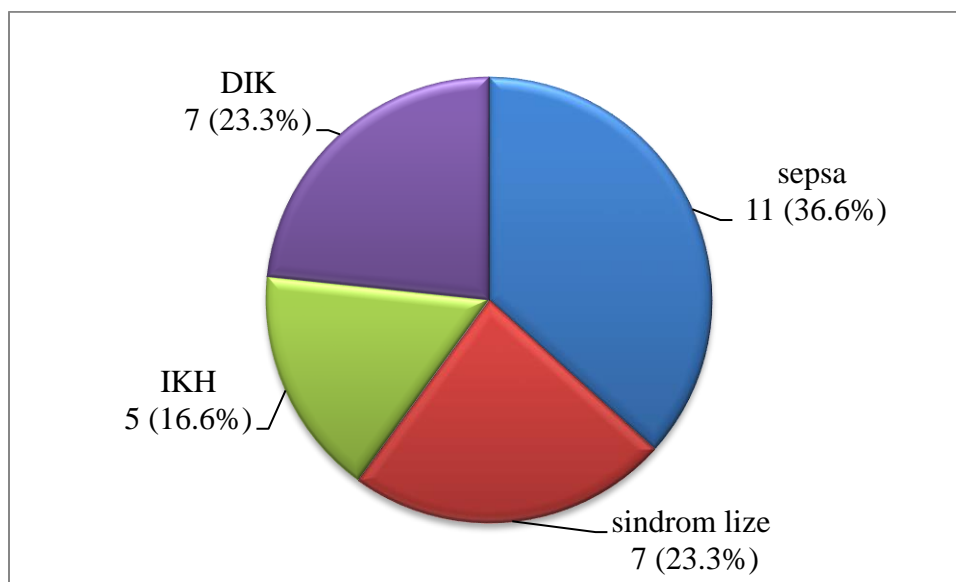
Univarijantna analiza je izvojila broj $Le \geq 30 \times 10^9/l$ ($p=0.016$) koji su uticali na stopu postizanja KR, koji su ujedno i najznačajni faktor za manju stopu postizanja KR ($p=0.015$) kod AML-NK bolesnika (Tabela 25).

Tabela 25. Prediktorni faktori za postizanje KR kod bolesnika sa AML-NK

<i>Faktori rizika</i>	<i>Univarijantna analiza</i>	<i>Multivarijantna analiza</i>		
	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>RR</i>	<i>95%CI</i>
Godine ≥ 55	0,217	/	/	/
Le $\geq 30 \times 10^9/l$	0.016	0.015	0.34	0.143-0.809
<i>Flt3-ITD</i> ⁺	0.087	/	/	/
<i>NPM1</i> ⁺	0.276	/	/	/
<i>IDH1</i> ⁺	0.703	/	/	/
<i>IDH2</i> ⁺	0.155	/	/	/
<i>IDH1/2</i> ⁺	0.703	/	/	/

4.10.2. Rana smrt

Rana smrt (RS) nastupila je kod 30/105 (28.57%) bolesnika. Najčešći uzrok rane indukcione smrti bila je sepsa kod 11 (36.6%) bolesnika, potom sindrom lize tumora kod 7 (23.35%), hemoragijski sindrom uzrokovan DIKom kod 7 (23.35%) i intrakranijalnim krvarenjem (IKH) kod 5 (16.6%) bolesnika (dijagram 10). RS je u proseku nastupila 11. dana od početka terapije (opseg 0-28).



Dijagram 10. Uzrok rane smrti kod AML-NK bolesnika

Poređenje rano umrlih i preživelih bolesnika prema karakteristikama, prikazano je u Tabeli 26. Analizirani su podaci za 18 bolesnika koji su bili živi na kraju studije, u KR1 posle hemioterapije i one kod kojih je sprovedena alogena i autologa TMČH u KR1 i KR2, njihova prosečna dužina života je bila 22.5 (13-48) meseci. Bolesnici koji su rano umrli imali su lošiji inicijalni ECOG status ($p = 0.047$), prosečno veći procenat blasta u perifernoj krvi ($p < 0.001$), veći procenat blasta u koštanoj srži ($p = 0.05$), prisutnu u većem procentu *IDH2* ($p = 0.019$), kao i obe mutacije *IDH1/IDH2* zajedno ($p = 0.007$). Bolesnici koji su bili *NPM1* pozitivni duže su živeli u odnosi na *NPM1* negativne bolesnike ($p = 0.001$).

Tabela 26. Poređenje preživelih i bolesnika sa ranom smrću prema demografskim karakteristikama, parametrima krvne slike, biohemijskim, imunofenotipskim i molekularnim karakteristikama

Karakteristike	Rano umrli (N-30)	Živi (N-18)	p
Starost (godine, medijana)	59	53	0.061
Godine ≥ 55 (N,%)	13 (24.1)	6 (33.3)	0.230
ECOG ≥ 2 (N,%)	32 (71.1)	7 (28.9)	0.047
HCT-CI ≥ 3 (N,%)	1 (12.5)	16 (87.5)	1.000
Leukociti ($\times 10^9/L$, medijana)	26 (1.2-160)	15.5 (0.5-195)	0.082
Le $\geq 30 \times 10^9/l$ (N,%)	10 (25)	14 (75)	0.313
Hemoglobin (medijana, opseg)	97 (64-178)	95 (6-140)	0.815
Trombociti ($\times 10^9/L$, mediana, opseg)	74 (11-237)	61.5 (1-420)	0.409
LDH (U/L, medijana, opseg)	1092 (485-5094)	895 (273-7186)	0.172
LDH, ≥ 450 U/L (N, %)	16 (22.5)	15 (83.3)	0.311
Blasti u perifernoj krvi (% , opseg)	73.5 (4-98)	20 (0-96)	< 0.001
Blasti u koštanoj srži (% , opseg)	76.5 (42-97)	72 (23-97)	0.055
CD56 ekspresija (N,%)	2 (10)	7 (38.8)	0.353
CD34 ekspresija (N,%)	10 (15.9)	5 (27.1)	0.449
<i>Ft3-ITD</i> (N,%)	7 (26.9)	8 (44.4)	0.262
<i>NPM1</i> (N,%)	15 (35.7)	11 (61.1)	0.001
<i>IDH1</i> (N,%)	3 (37.5)	12 (66.5)	0.177
<i>IDH2</i> (N,%)	10 (58.8)	7 (38.2)	0.019
<i>IDH1/2</i> (N,%)	15 (60)	10 (40.0)	0.007

4.10.3. Recidiv i refraktarnost bolesti

Kod 36/62 (58.06%) bolesnika koji su inicijalno postigli remisiju bolesti nakon indukcijske terapije, nastupio je recidiv bolesti u periodu od 2 do 47 meseci nakon postavljanja dijagnoze, prosečno 13.87 meseci. U tabeli 27 prikazane su karakteristike bolesnika sa recidivom i bolesnika sa KR. Ispitivanje je pokazalo da su bolesnici sa recidivom imali u većem procentu *IDH1*⁺ u odnosu na one sa KR, koji nisu imali ovu mutaciju. Faktori rizika za pojavu refraktarnosti su prikazani u tabeli 28. Univarijatnom analizom izvojeni su faktori rizika koji su uticali na pojavu refraktarnosti bolesti i to su bili: prisustvo *FLT3-ITD* mutacija (p=0.049) i broj $Le \geq 30 \times 10^9/l$ (p=0.041), za koji je multivarijatnom analizom pokazano da je najznačajni prediktorni faktor. U tabeli 29. je prikazano da su bolesnici sa refraktarnom AML imali statistički značajno niži prosečnu vrednost hemoglobina (p=0.02), povišen nivo LDH (p=0.42) i leukocitozu ($Le \geq 30 \times 10^9/l$)(p=0.033) u odnosu na bolesnike sa KR.

Tabela 27. Poređenje bolesnika sa recidivom i bolesnika sa KR prema demografskim karakteristikama, parametrima krvne slike, biohemijskim, imunofenotipskim i molekularnim karakteristikama

Karakteristike	Recidiv (N-36)	KR (N-26)	p
Starost (godine, medijana)	52.11	45.93	0.071
Godine \geq 55 (N,%)	14 (38.8)	13 (50)	1.000
ECOG \geq 2 (N,%)	9 (25)	17 (65.4)	0.463
HCT-CI \geq 3 (N,%)	3 (8.3)	3 (11.53)	0.692
Leukociti ($\times 10^9/L$, medijana)	28.30	32.23	0.532
Le $\geq 30 \times 10^9/l$ (N,%)	9 (25)	12 (46.15)	1.000
Hemoglobin (medijana)	96.69	99.85	0.486
Trombociti ($\times 10^9/L$, medijana)	96.89	65.22	0.125
LDH (U/L, medijana)	925.14	978.81	0.363
LDH ≥ 450 U/L (N, %)	18 (50)	15 (57.7)	0.813
Blasti u perifernoj krvi (%)	24.64	31.20	0.156
Blasti u koštanoj srži	59.69	67.19	0.131
CD56 ekspresija (N,%)	7 (19.44)	9 (34.61)	1.000
CD34 ekspresija (N,%)	15 (41.6)	17 (65.1)	0.232
Flt3-ITD (N,%)	7 (19.4)	8 (30.78)	0.774
NPM1 (N,%)	12 (33.33)	13 (50)	0.624
IDH1 (N,%)	4 (11.11)	0	0.028
IDH2 (N,%)	4 (11.11)	4 (15.38)	0.714
IDH1/2 (N,%)	8 (22.22)	4 (15.38)	0.108

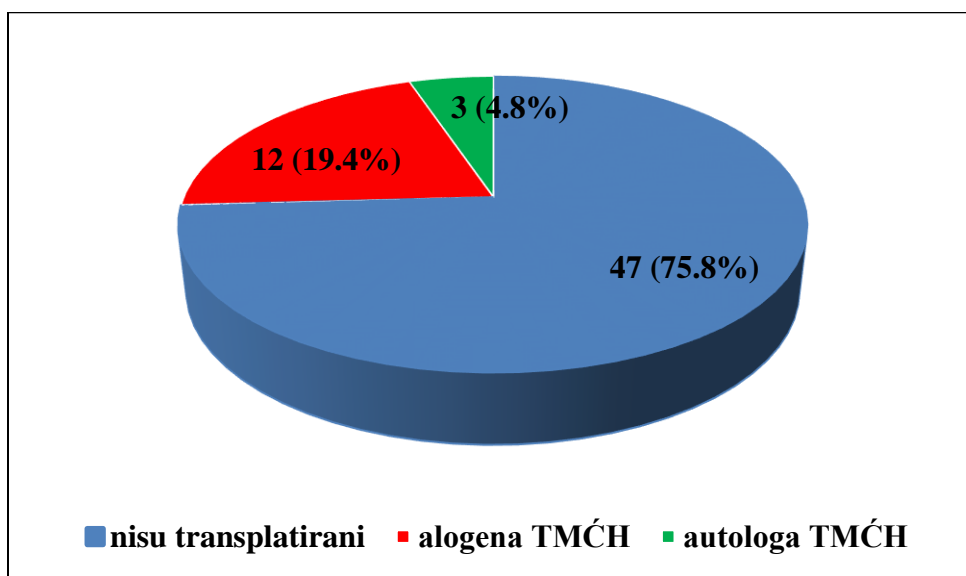
Tabela 28. Faktori rizika za pojavu refraktarnosti kod bolesnika sa AML-NK

<i>Faktori rizika</i>	<i>Univarijantna analiza</i>	<i>Multivarijantna analiza</i>		
	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>RR</i>	<i>95%CI</i>
Godine ≥ 55	0.179	/	/	/
Le $\geq 30 \times 10^9/l$	0.041	0.035	3.305	1.091-10.013
ECOG ≥ 2	1.000	/	/	/
HCT-CI ≥ 3	1.000	/	/	/
<i>Flt3-ITD</i>⁺	0.049	/	/	/
<i>NPM</i> ⁺	0.602	/	/	/
<i>IDH1</i> ⁺	0.602	/	/	/
<i>IDH2</i> ⁺	0.436	/	/	/
<i>IDH1/2</i> ⁺	0.312	/	/	/

Tabela 29. Poređenje bolesnika sa KR i refraktarnih bolesnika prema demografskim karakteristikama, parametrima krvne slike, biohemijskim, imunofenotipskim i molekularnim karakteristikama

Karakteristike	KR (N-62)	Refraktarni (N-13)	p
Starost (godine, medijana)	51	55	0.070
Godine \geq 55 (N,%)	25 (40.32)	5 (38.46)	0.176
ECOG \geq 2 (N,%)	20 (32.2)	4 (30.76)	0.476
HCT-CI \geq 3 (N,%)	5 (8.06)	2 (15.38)	1.000
Leukociti ($\times 10^9/L$, medijana, opseg)	10.35 (0.7-195)	25.5 (0.5-180)	0.292
Le $\geq 30 \times 10^9/l$ (N,%)	14 (22.58)	7 (53.3)	0.033
Hemoglobin (medijana, opseg)	101 (6-138)	88.5 (16-140)	0.020
Trombociti ($\times 10^9/L$, medijana, opseg)	69.5 (1-420)	48 (4-160)	0.531
LDH (U/L, medijana, opseg)	837 (273-4950)	1094 (447-7180)	0.042
LDH ≥ 450 U/L (N, %)	37 (67.3)	4 (32.7)	0.817
Blasti u perifernoj krvi (% , opseg)	17 (0-96)	30 (0-88)	0.125
Blasti u koštanoj srži (% , opseg)	65 (23-97)	78 (30-95)	0.056
CD56 ekspresija (N,%)	13 (20.9)	5 (38.46)	0.784
CD34 ekspresija (N,%)	34 (54.83)	5 (38.5)	0.482
FLT3-ITD (N,%)	10 (16.12)	7 (53.86)	0.103
NPM1 (N,%)	17 (27.41)	6 (46.15)	0.467
IDH1 (N,%)	3 (4.83)	2 (15.38)	0.648
IDH2 (N,%)	7 (11.29)	3 (23)	1.000
IDH1/2 (N,%)	10 (16.12)	5 (38.46)	1.000

Nakon primenjene "salvage" terapije 8/36 bolesnika sa recidivom (22.2%) je postiglo KR2. Svi bolesnici koji su pokazali refraktarnost na indukcionu hemioterapiju, njih 13 (17%) su primili "salvage" terapije i samo dvoje je postilo KR2. Kod ukupno 15/62 (24.19%) bolesnika sa KR sprovedeno je lečenje TMČH, s tim što su 4/15(26.6%) bolesnika su bila u KR2. Ostali bolesnici tj njih 11(73.3%) je bilo u KR1 a transplatirani su zbog drugih nepovoljnih prognostičkih faktora (leukocitoza, *FLT3-ITD*⁺ i imunofenotip CD56⁺). Dvanaest (80%) bolesnika je lečeno alogenom i 3 (20%) bolesnika autologom TMČH (Dijagram 11). Šest/15 (40%) bolesnika nakon sprovedene TMČH je živo 21.2 (13-25) meseci, ostali umrli su umrli tokom transplantacije 5 (33.3%) bolesnika i 4 (26.6%) u recidivu.



Dijagram 11. Distribucija AML-NK bolesnika sa KR koji su lečeni TMČH

4.11 Uticaj *IDH1* i *IDH2* mutacija na ishod bolesti

Prisustvo *IDH* mutacije nije uticalo na postizanje KR, 51 (60%) *IDH*⁻ bolesnika i 11/25 (44%) *IDH*⁺ bolesnika su postigli KR. Nije bilo statistički značajne razlike između ove dve grupe iako su *IDH*⁻ bolesnici imali veći procenat postizanja remisije (p=0.152) razlike nije bilo ni među bolesnicima sa *IDH1* i *IDH2* mutacijom. *IDH* mutacija nije bila povezana sa RS (*IDH*⁺-36% vs *IDH*⁻24.7%; p=0.310), takođe. *IDH* mutacija nije bila povezana sa nastankom recidiva bolesti (*IDH*⁺-24% vs *IDH*⁻35.3%; p=0.250), niti je uticala na pojavu refraktarnosti bolesti (*IDH*⁺-16% vs *IDH*⁻10.5%; p=0.474), među ispitivani grupama sa i bez *IDH* mutacije (tabela 30).

Tabela 30. Poređenje ishoda bolesti između *IDH1* i *IDH2* mutacije nakon indukciono terapije kod AML-NK bolesnika

Ishod bolesti	<i>IDH1</i>			<i>IDH2</i>			<i>IDH1/IDH2</i>		
	poz	neg	p	poz	neg	p	poz	neg	p
KR (N,%)	3 (37.5)	59 (57.8)	0.682	7 (41.17)	55 (59.13)	0.122	11 (44)	51 (60)	0.152
RS (N,%)	2 (25)	28 (27.4)	0.881	7 (41.17)	23 (24.73)	0.162	9 (36)	21 (24.7)	0.310
Refraktarnost (N,%)	2 (25)	11 (10.7)	0.438	3 (17.64)	10 (10.75)	0.786	4 (16)	9 (10.5)	0.474
Recidiv (N,%)	4 (50)	32 (31.37)	0.073	4 (23.52)	32 (34.4)	0.651	6 (24%)	30 (35.3)	0.250

Među ispitivanim molekularnim podgrupama rizika nije postojala statistički značajna u postizanju KR kod AML-NK bolesnika (Tabela 31). Takođe, nije postojala statistički značajna razlika između posmatranih podgrupa rizika ukoliko bi se uporedili bolesnici sa i bez *IDH* mutacije, ali uočavala se procentualna razlika u postizanju KR tj KR su u većem procentu postizali *IDH*⁻ bolesnici (Tabela 32).

Tabela 31 Distribucija postizanja KR unutar molekularnih podgrupa

<i>Grupe rizika</i>	KR		
	Da (N, %)	Ne (N, %)	p
Povoljan rizik (<i>NPM1</i> ⁺ / <i>FLT3-ITD</i> ⁻)	11 (47.82)	2(8.69)	0.225
Intermedijarni rizik (<i>NPM1</i> ⁻ / <i>FLT3-ITD</i> ⁻)	38(62.29)	6 (9.8)	0.575
Nepovoljan rizik (<i>FLT3-ITD</i> ⁺)	13 (50)	5 (19.23)	0.835

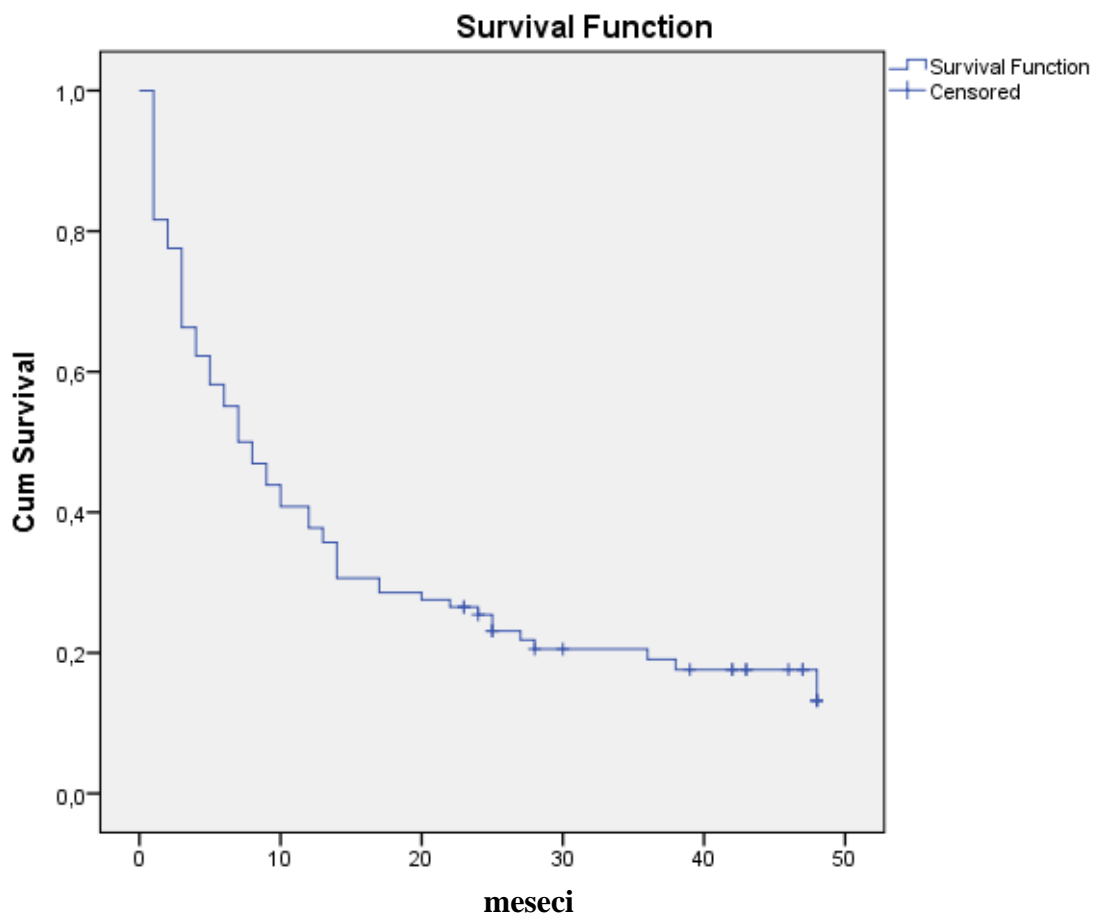
Tabela 32. Poređenje stope postizanja KR između *IDH1* i *IDH2* mutacije unutar molekularnih podgrupa rizika

<i>Grupe rizika</i>	<i>IDH1 (KR)</i>			<i>IDH2 (KR)</i>			<i>IDH1/IDH2 (KR)</i>		
	poz	neg	p	poz	neg	p	poz	neg	p
Povoljan rizik (<i>NPM1</i> ⁺ / <i>FLT3-ITD</i> ⁻) (N,%)	1 (50%)	10 (66.7)	0.643	1 (33.3)	10 (71.4)	0.557	2 (40)	9 (75)	0.413
Intermedijarni rizik (<i>NPM1</i> ⁻ / <i>FLT3-ITD</i> ⁻) (N,%)	2 (66.7)	39 (70.9)	0.875	6 (66.7)	35 (71.4)	0.773	7 (66.7)	33 (71.7)	0.731
Nepovoljan rizik (<i>FLT3-ITD</i> ⁺) (N,%)	1 (50)	9 (92.6)	0.739	0 (0)	10 (55)	0.075	1 (20)	10 (55.6)	0.159

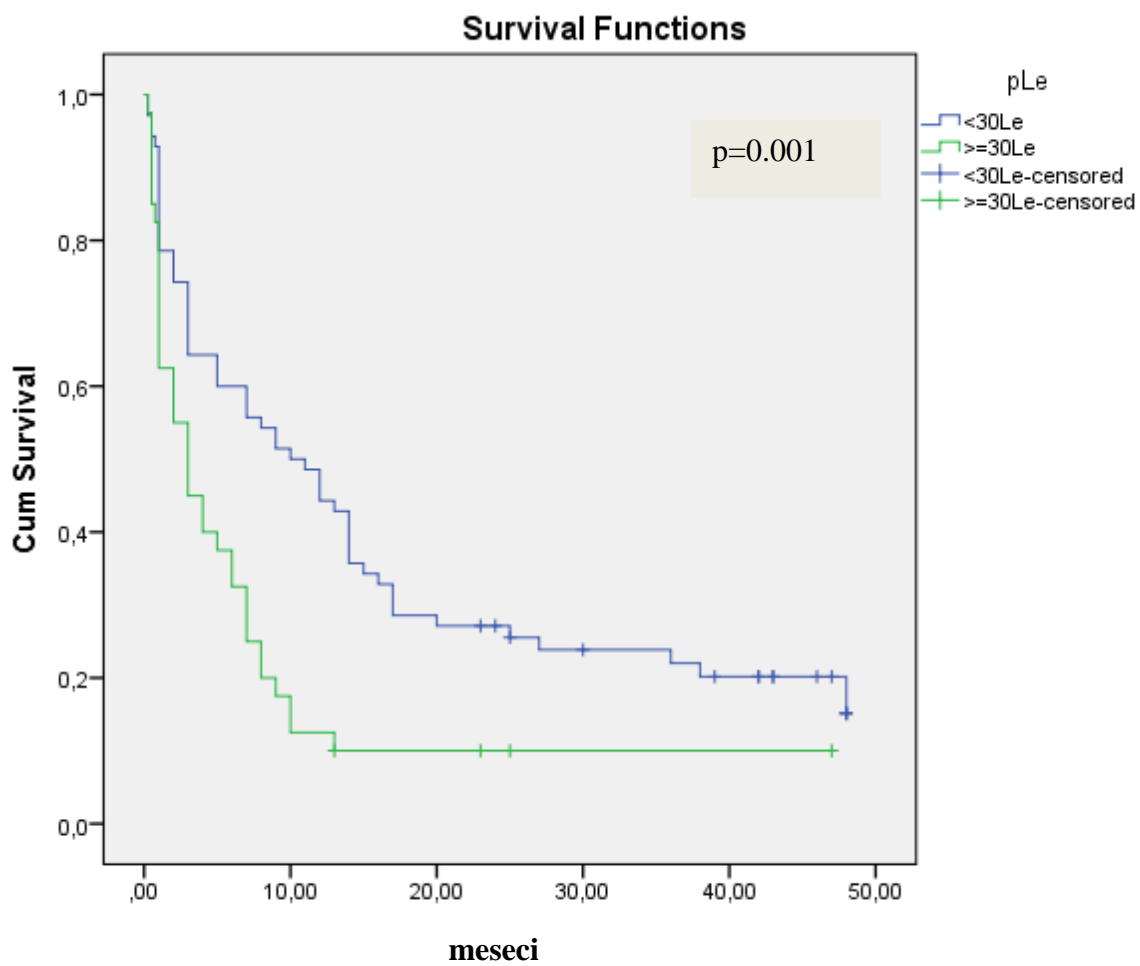
4.12. Analiza preživljavanja

Medijana preživljavanja AML-NK bolesnika je bila 7. 5 meseci (1 - 48 meseci), petogodišnji OS je bio 16.4% (Dijagram 12), dok je medijana preživljavanja bez znakova bolesti bila 12 meseci. Tokom studijskog perioda umrlo je ukupno 92 bolesnika (83.6%): 30 (32.6%) u toku indukcije, 15 (16.3%) tokom konsolidacije, 35 (38.05%) zbog recidiva bolesti i 12 (13.05 %) bolesnika od drugih bolesti. Na ukupno preživljavanje kod AML-NK bolesnika značajno je uticao povišen broj leukocita $\geq 30 \times 10^9/L$ (3m vs 10m; p=0.001)

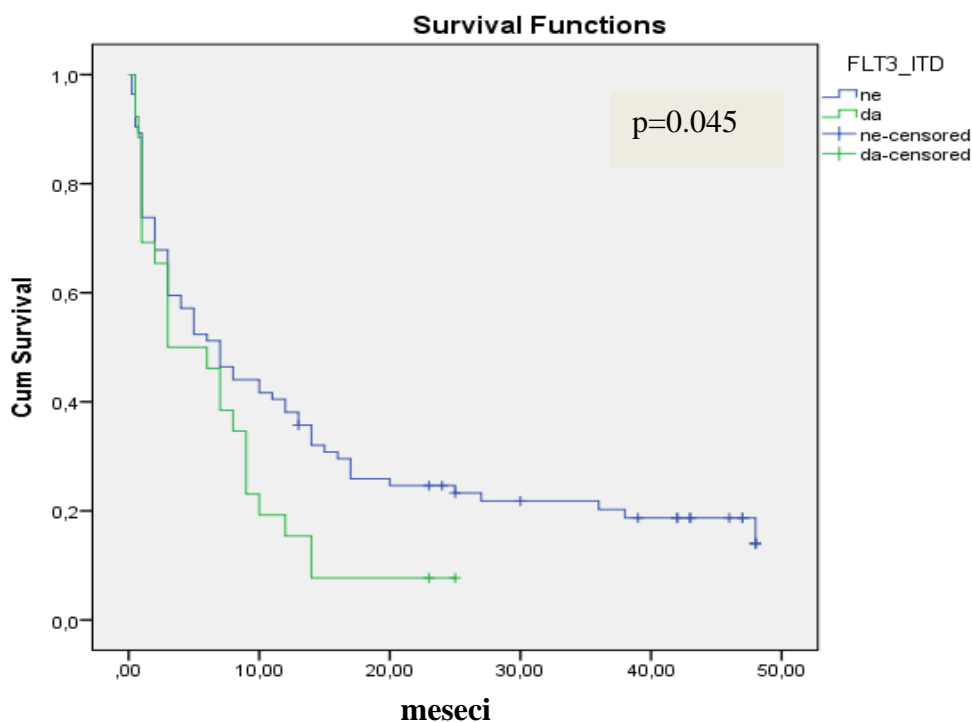
(Dijagram 13). Bolesnici koji su imali *FLT3-ITD* mutaciju značajno kraće su živeli u odnosu na bolesnika bez *FLT3-ITD* (3m vs 7m; $p=0.045$) (Dijagram 14). Ostali ispitivani klinički parametri nisu pokazali uticaj na OS kod AML-NK bolesnika.



Dijagram 12. Kriva 5-godišnjeg preživljavanja bolesnika sa AML-NK



Dijagram 13. Uticaj broja $Le \geq 30 \times 10^9/l$ na ukupno preživljavanje



Dijagram 14. Uticaj *Flt3-ITD* mutacije na ukupno preživljavanje

Univarijantna analiza je pokazala da su sledeće ispitivane karakteristike bile značajni prediktori za loše OS: godine ≥ 55 ($p=0.013$), broj $Le \geq 30 \times 10^9/l$ ($p=0.001$) i *IDH* pozitivnost ($p=0.033$), Multivarijantnom COX-ovom regresionom analizom izdvojen je broj $Le \geq 30 \times 10^9/l$ ($p=0.001$, RR=1.768, 95% CI 1.084–2.883) kao najznačajni prediktorni faktor za kraće OS (Tabela 33). Univarijantna analiza je pokazala da su značajni faktori za kraći DFS bili: *FLT3-ITD* pozitivnost ($p = 0.03$) i *NPM1* pozitivnost ($p = 0.032$). Najznačajni faktor rizika za DFS je bila *FLT3-ITD* pozitivnost ($p= 0.030$, RR= 2.465, 95% CI 1.089-5.579) (Tabela 34).

Tabela 33. Prediktorni faktori za loše ukupno preživljavanje kod bolesnika sa AML-NK

<i>Faktori rizika</i>	<i>Univarijantna analiza</i>	<i>Multivarijantna analiza</i>		
	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>RR</i>	<i>95%CI</i>
Godine ≥ 55	0.013	/	/	/
Le $\geq 30 \times 10^9/l$	0.001	0.001	1.768	1.084–2.883
<i>Ft3-ITD</i> ⁺	0.065	/	/	/
<i>NPM1</i> ⁺	0.123	/	/	/
<i>IDH1</i> ⁺	0.157	/	/	/
<i>IDH2</i> ⁺	0.138	/	/	/
<i>IDH1/2</i> ⁺	0.033	/	/	/

/=ns-nije statistički značajno

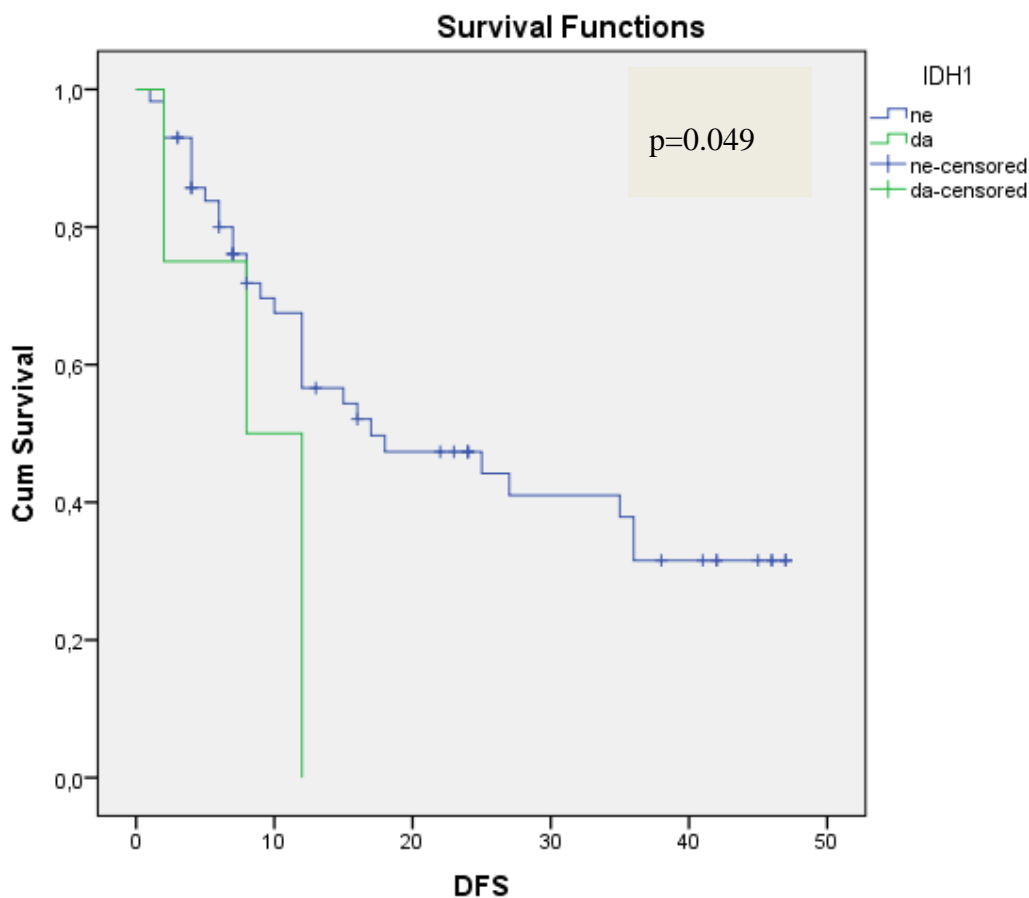
Tabela 34. Prediktorni faktori za kraće trajanje DFS kod bolesnika sa AML-NK

<i>Faktori rizika</i>	<i>Univarijantna analiza</i>	<i>Multivarijantna analiza</i>		
	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>RR</i>	<i>95%CI</i>
Godine ≥ 55	0.131	/	/	/
Le $\geq 30 \times 10^9/l$	0.281	/	/	/
<i>Ft3-ITD</i> ⁺	0.039	0.030	2.465	1.089-5.579
<i>NPM1</i> ⁺	0.032	/	/	/
<i>IDH1</i> ⁺	0.074	/	/	/
<i>IDH2</i> ⁺	0.847	/	/	/
<i>IDH1/2</i> ⁺	0.214	/	/	/

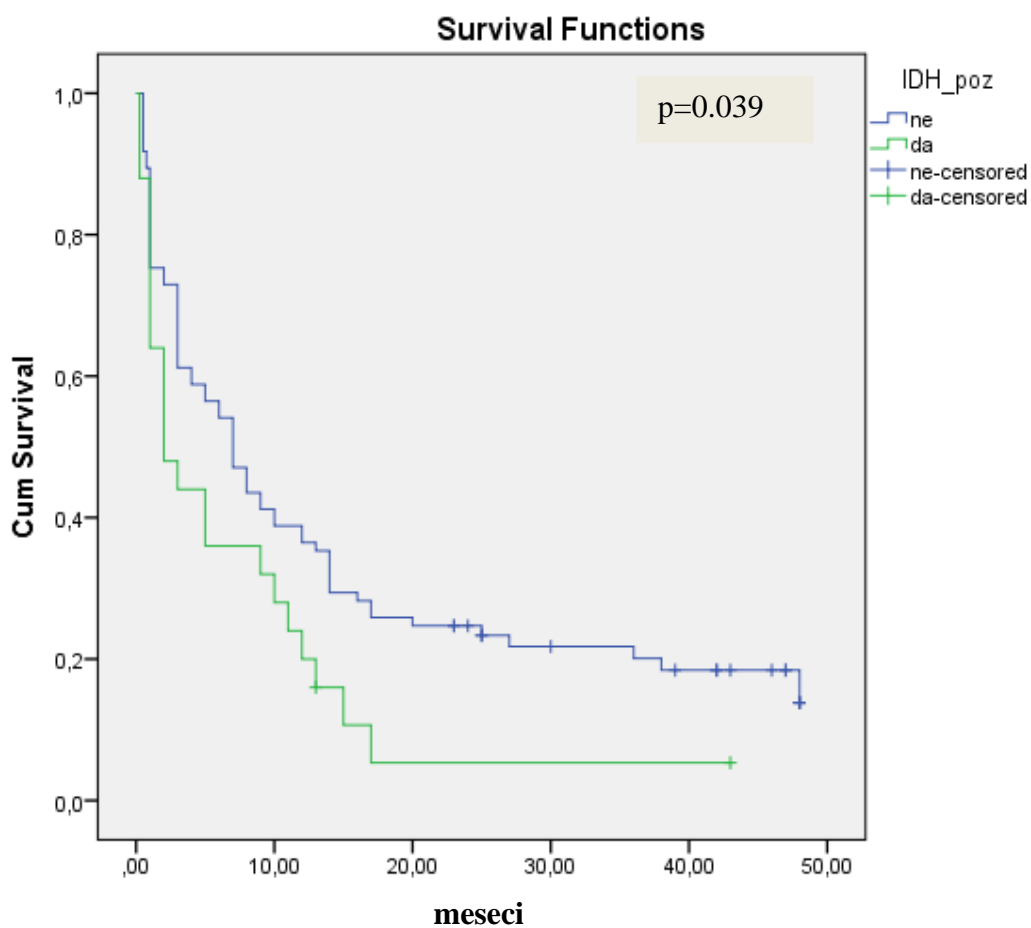
/=ns-nije statistički značajno

4.12.1. Analiza preživljavanja u odnosu na *IDH1* i *IDH2* mutacije

Bolesnici sa *IDH* mutacijom su imali prosečno preživljavanje 6.8 meseci. *IDH* mutacije nisu značajno uticale na dužinu trajanja remisije bez znakova bolesti (DFS) (*IDH*⁺- 12 meseci vs *IDH*⁻ 17 meseci; p=0.091). *IDH1*⁺ mutacija je pokazala značajan uticaj na DFS (*IDH*⁺- 8m vs *IDH*⁻ 17m; p=0.049) (Dijagram 15), što nije uočeno kod *IDH2*⁺ mutacija (p=0.943). Takođe, *IDH1*⁺ i *IDH2*⁺ nisu uticale na OS (p=0.157; p=0.138). Prisustvo *IDH* mutacija zajedno je značajno uticalo na ukupno preživljavanje (OS) (*IDH*⁺-2 meseci vs *IDH*⁻7 meseci; p=0.039) (Dijagram 16).



Dijagram 15. Kriva DFS kod bolesnika sa i bez *IDH1* mutacije



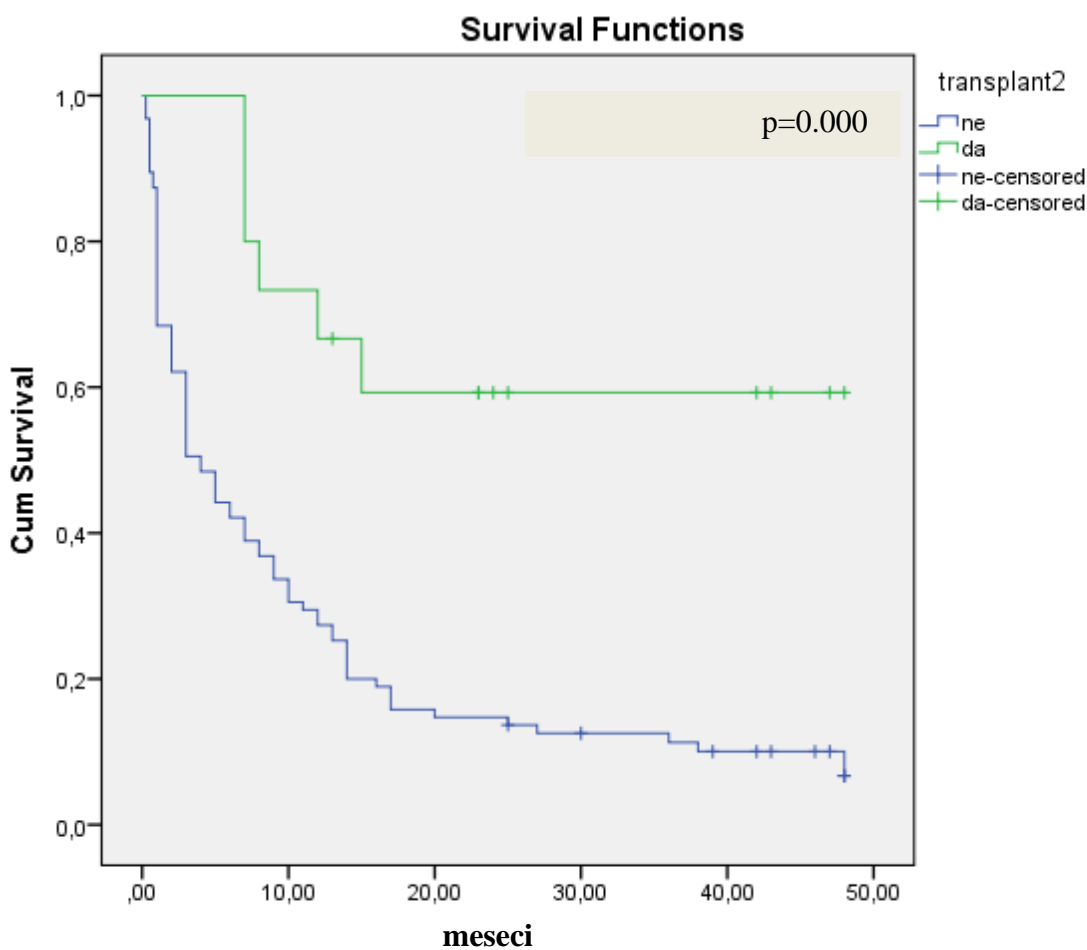
Dijagram 16. Kriva preživljanja kod bolesnika sa i bez *IDH* mutacije

4.12.2. Analiza preživljanja kod transplantiranih bolesnika sa *IDH* mutacijom

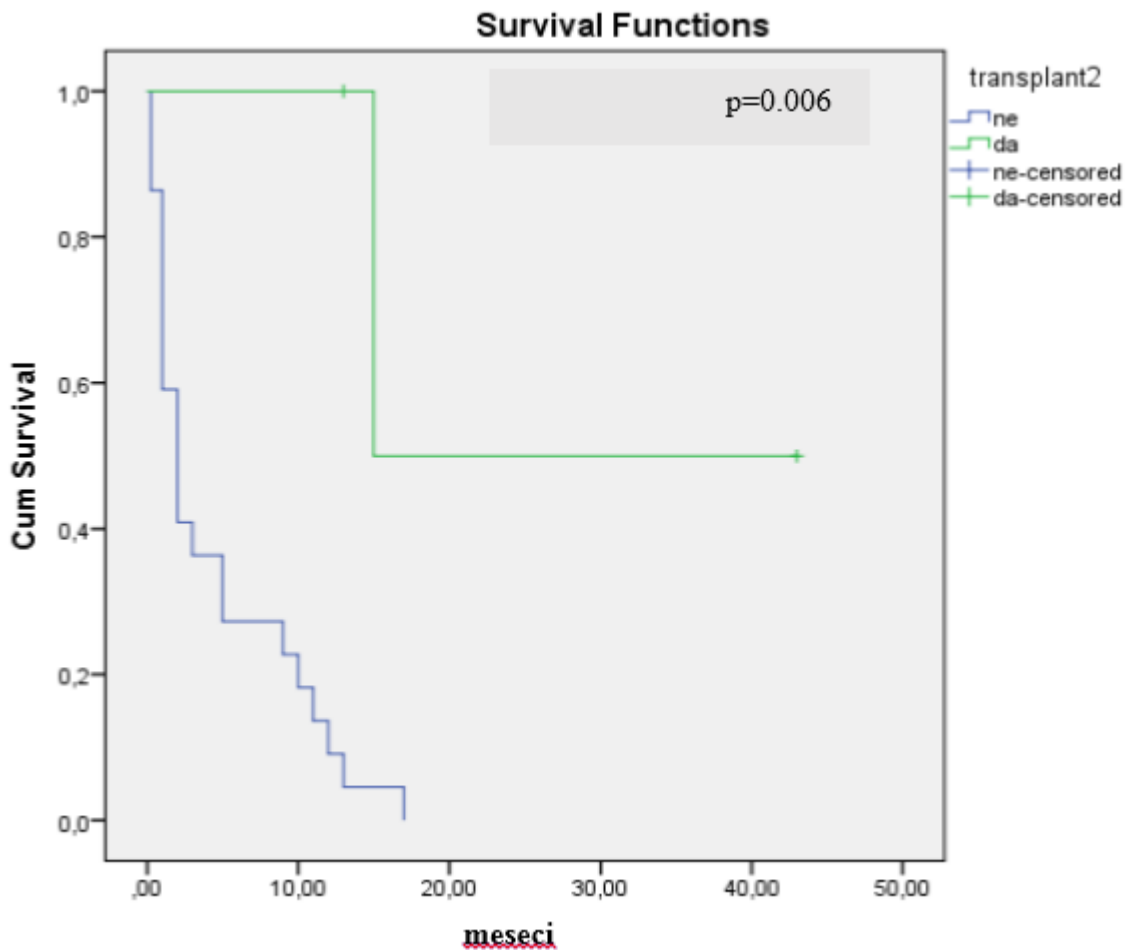
Od ukupnog broja bolesnika sa KR transplantirano je 15 (24.19%) bolesnika; kod 12 (80%) bolesnika je sprovedena alogena a kod 3 (20%) autologa transplantacija MČH. Postojala je statistički značajna razlika između transplantiranih i netransplantiranih bolesnika

u preživljavanju ($p=0.000$) (Dijagram 17). Duže od 36 meseci je živelo 13 bolesnika (4 (26.7%) transplantirana i 9 (9.5%) netransplantiranih); $p=0,05$).

Od ukupnog broja IDH^+ bolesnika transplantirano je troje bolesnika i postojala je statistički značajna razlika u ukupnom preživljavanju između transplantiranih i netransplantiranih bolesnika (15 vs 2 meseci; $p=0.006$) (Dijagram 18). Međutim, nije bilo statistički značajne razlike u ukupnom preživljavanju između IDH^+ i IDH^- bolesnika kod kojih je sprovedena TMČH.



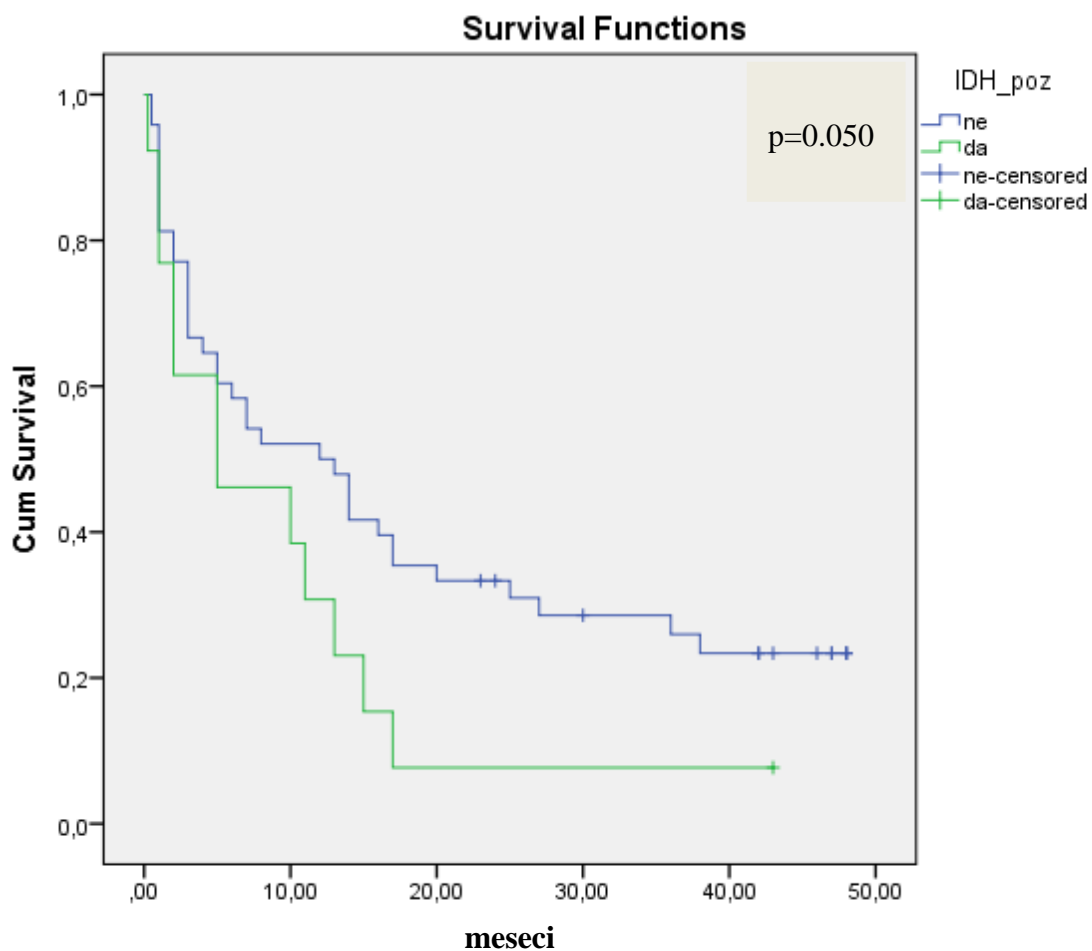
Dijagram 17. Kriva preživljavanja transplantiranih i netransplantiranih AML-NK bolesnika



Dijagram 18. Uticaj transplantacije na preživljavanje kod AML-NK sa *IDH* mutacijom

4.12.3. Analiza preživljavanja u odnosu na molekularne podgrupe rizika

Prisustvo *IDH* mutacija je pokazalo negativan uticaj na OS u *intermedijarnoj* podgrupi rizika (5 vs 12 meseci; $p=0.050$) (Dijagram 19). Međutim, *IDH* mutacije nisu imale uticija na OS u *povoljnoj* i *nepovoljnoj* podgrupi (1 vs 3 meseci, $p=0.668$; 1 vs 7 meseci, $p=0.114$).



Dijagram 19. Poređenje ukupnog preživljavanja u intermedijarnoj podgrupi rizika (*NPM1*⁻ / *Flt3-ITD*⁻) između *IDH*⁺ i *IDH*⁻ bolesnika

4.13. Praćenje AML-NK bolesnika sa *IDH* mutacijom

Rezultati praćenja bolesnika sa *IDH* mutacijom su prikazani u tabeli 35. Stanje *IDH* mutacije je serijski ispitivano na uzorcima 85 (77.27%) *IDH⁻* bolesnika koji su recidivirali i na uzorcima 25 (22.72%) *IDH⁺* bolesnika koji su praćeni i/ili su recidivirali. Nijedan od dostupnih uzoraka 28 (77.8%) *IDH⁻* bolesnika koji su recidivirali nije pokazao stečenu *IDH* mutaciju. Među 19 *IDH⁺* slučajeva koji su bili živi posle indukciono terapije, 11 (58%) je postiglo KR. Devet bolesnika je izgubilo *IDH* mutaciju posle indukciono terapije, dok ju je dvoje bolesnika zadržalo. Jedan bolesnik je postigao KR nakon prve indukciono terapije, izgubio pozitivnost *FLT3-D835* i *NPM1* mutacija, ali je ostao *IDH1⁺* pozitivan i umro je u recidivu bolesti (broj-469). Drugi je bolesnik (broj-349) postigao KR posle indukciono terapije, ali je zadržao *IDH2* mutaciju. Mutacija je izgubljena tokom sekvencijalnog praćenja uzoraka, ali je bolesnik umro u toku konsolidacione terapije sa cito-morfološkom remisijom bolesti u aplaziji koštane srži od septičnog šoka. Bolesnik sa refraktarnom bolešću (broj 487) je dva meseca nakon otpočinjanja terapije ostao *IDH2* pozitivan. Dva bolesnika, koji su izgubili *IDH* mutaciju u KR, stekli su je ponovo u recidivu bolesti. Dva od devet bolesnika koji su postigli molekularnu remisiju lečeni su alogenenom TMČH i još uvek su živi. Preostalih 7 bolesnika je umrlo za vreme terapije i posle recidiva bolesti. Ovi rezultati ukazuju na značajnu stabilnost *IDH* mutacija za vreme lečenja AML.

Table 35. Rezultati praćenja bolesnika sa *IDH1* i *IDH2* mutacijom

Bolesnici Broj	Starost/pol	<i>IDH/FLT3/NPM</i> status pri dijagnozi	Stanje bolesti posle ind. terapije	<i>IDH/FLT3/NPM</i> stanje posle ind. terapije	Stanje bolesti posle kons. terapije	<i>IDH/FLT3/NPM</i> status posle kons. terapije	Recidiv	<i>IDH/FLT3/NPM</i> status posle recidiva
245	53/F	<i>IDH2</i> ^{R140Q} /wt/wt	KR	/	KR	/	da	/
275	50/F	<i>IDH2</i> ^{R172K} /wt/wt	KR	/	KR	/	da	<i>IDH2</i> ^{R172K} / <i>FLT3-D835</i> /wt
280	61/F	<i>IDH1</i> ^{R132H} / <i>FLT3-ITD/Type A</i>	RB	/	RB	/		/
291	38/F	<i>IDH2</i> ^{R140Q} / <i>FLT3-ITD/Type A</i>	RB	/	RB	/		/
305	47/M	<i>IDH2</i> ^{R140Q} /wt/wt	KR	wt /wt/wt	KR	/	da	/
320	40/M	<i>IDH2</i> ^{R140W} /wt/wt	KR	/	KR	/		/
349	39/M	<i>IDH2</i> ^{R140L} /wt/wt	KR	<i>IDH2</i> ^{R140L} /wt/wt	KR	wt /wt/wt		/
378	66/M	<i>IDH1</i> ^{R132H} /wt/ <i>Type A</i>	RS	/		/		/
380	44/F	<i>IDH1</i> ^{R132C} /wt/wt	KR	wt /wt/wt	KR	/	da	<i>IDH1</i> ^{R132C} /wt/wt
393	54/M	<i>IDH2</i> ^{R132C} <i>FLT3-D835</i> /wt	KR	/	KR	/	da	/
399	23/F	<i>IDH2</i> ^{R140Q} /wt/ <i>Type A</i>	RS	/		/		/
401	69/M	<i>IDH2</i> ^{R140Q} / <i>FLT3-ITD</i> /wt	RB	/		/		/
403	73/F	<i>IDH1</i> ^{R132C} /wt/wt	RB	/		/		/
412	46/M	<i>IDH2</i> ^{R140Q} /wt/ <i>Type A</i>	RB	/		/		/
418	62/F	<i>IDH1</i> ^{R132G} / <i>FLT3-ITD/Type A</i>	KR	/	KR	/		/
423	43/M	<i>IDH2</i> ^{R140Q} /wt/wt	RS	/		/		/
426	56/M	<i>IDH2</i> ^{R172K} /wt/wt	RS	/		/		/
469	63/M	<i>IDH1</i> ^{R132C} <i>FLT3-D835/Type A</i>	KR	<i>IDH1</i> ^{R132C} wt /wt	KR	/		/
487	73/M	<i>IDH2</i> ^{R140Q} /wt/wt	RB	<i>IDH2</i> ^{R140Q} wt /wt	RB	/		/
556	50/M	<i>IDH2</i> ^{R140Q} /wt/ <i>Type A</i>	RS	/		/		/
612	30/M	<i>IDH2</i> ^{R140Q} /wt/wt	KR	wt /wt/wt	KR	/		/
615	40/F	<i>IDH2</i> ^{R140Q} /wt/ <i>Type A</i>	KR	wt /wt/wt	KR	wt /wt/wt		/
645	43/F	<i>IDH2</i> ^{R140G} / <i>FLT3-ITD/Type A</i>	RB	/		/		/
672	33/F	<i>IDH1</i> ^{R132S} wt/ <i>Type A</i>	RB	/		/		/
680	67/M	<i>IDH2</i> ^{R140Q} <i>FLT3-D835</i> /wt	RS	/		/		/

Legenda: /: n.r.-nije radeno; wt-wild type;RS-rana smt; KR-kompletna remisija; RB-refraktarna bolest;

5. DISKUSIJA

Bolesnici sa akutnom mijeloidnom leukemijom i normalnim kariotipom (AML-NK) čine 40-50% svih AML bolesnika. Odlikuje ih velika heterogenost u pogledu kliničkih, bioloških karakteristika i odgovora na terapiju. Ipak, svi AML-NK bolesnici su svrstani u grupu intermedijarnog stepena rizika. Potreba za preciznijom procenom rizika takvih slučajeva je dovela do otkrića brojnih novih molekularnih markera. Neke od njih, kao što su mutacije *FLT3*, *NPM*, *CEBPA* su uticale na prognozu AML-NK bolesnika. Ove mutacije su već uključeni u klasifikaciji ELN u kojoj AML-NK bolesnici sa mutacijom *NPM1* bez *FLT3-ITD* i bialelna *CEBPA* imaju povoljan genotip (2, 76). Mardis i kol, sekvencirali su ceo genom bolesnika sa AML-NK posle čega je identifikovano ukupno 64 somatskih mutacija, među njima i mutacije u genu za izocitrat dehidrogenazu 1 (*IDH1*) i izocitrat dehidrogenazu 2 (*IDH2*) (188).

Mutacije enzimski aktivnih mesta izocitrat dehidrogenaza izoformi 1 i 2 (*IDH1* i *IDH2*) dovode do nove enzimske aktivnosti koja katalizuje konverziju α -ketoglutarat u 2-hidrokgglutarat (2-HG). Povećan intracelularni nivo 2-HG dovodi do defekata histona demetilacijom što dovodi dalje do blokade ćelijske diferencijacije.

U hematološkim malignitetima, mutacije *IDH* nalaze se najčešće kod akutne mijeloidne leukemije (AML) i angioimunoblastnog T-ćelijskog limfoma, ali se mogu javiti i kod javlja mijelodisplastičkih sindroma i mijeloproliferativnih neoplazmi (194).

Analize velikog broja bolesnika sa AML lečenih sa više kliničkih protokola potvrdile su prisustvo *IDH1*^{R132} mutacije i identifikovane su *IDH2*^{R140} i *IDH2*^{R172} mutacije u oko 20% pacijenata sa AML-NK (166-171). Prognostički značaj *IDH* mutacija se i dalje ispituje. Većina studija je pokazala da prisustvo *IDH* mutacija ima nepovoljan prognostički značaj (139, 167-178). Naša studija je prvo ispitivanje prognostičkog značaja *IDH1* i *IDH2* mutacija u bolesnika sa AML-NK u Srbiji.

Naša grupa je obuhvatala 110 AML-NK bolesnika prosečne starosti 54 (opseg: 19-78). Najveći broj 71 (64.5%) bolesnika je bio starosti ≥ 50 godina, skoro podjednako kod oba pola. Najzastupljeniji su bili bolesnici 57 (51.8%) uzrasta 50-64 godina. Možemo uočiti da su naši bolesnici bili znatno mlađeg uzrasta u odnosu na literaturne podatke da je AML je bolest starijih ljudi i da je procentualno najviše zastupljena u 80% kod bolesnika uzrasta 65-70 godina (1, 3, 4, 6).

Imajući u vidu kliničke karakteristike naših bolesnika pri dijagnozi možemo zaključiti da AML-NK nije bila u većem procentu rasprostranjena u drugim organima. Nađena je hepatosplenomegalija u 29 (26.4%), limfadenopatija u 17 (15.5%), hipertrofija gingiva u 6 (5.5%) i CNS infiltracija u 3 (2.7%) bolesnika. Naši bolesnici su pri dijagnozi imali u većem procentu dobar ECOG performans status: ECOG skor 0 i 1 u 64 (58.18%), ECOG ≥ 2 u 46 (41.81%) bolesnika. Isto tako, 101 (91.8%) bolesnika je imalo komorbiditetni indeks HCT-CI skor < 2 , dok je svega 9 (8.2%) imalo visok HCT-CI skor ≥ 3 .

Laboratorijski podaci ukazuju da je povišen broj leukocita $> 30 \times 10^9/L$ imala trećina bolesnika, dok je ekstremnu leukocitozu $\geq 100 \times 10^9/L$ imalo svega 16 (14.5%) bolesnika, kao i tešku trombocitopeniju $< 20 \times 10^9/L$, koja je bila prisutna kod 11 (10.1%) bolesnika sa AML-NK.

Distribucija prema FAB klasifikaciji je pokazala da su najzastupljenije bile podgrupe M2- 32 (29.1%), potom M4-24 (21.8%), M1-23 (20.9%) i M5-22 (20%) bolesnika.

Imunofenotipske karakteristike naše grupe AML-NK su bile takve da su dominirali mijeloidni (CD13, CD33, HLA-DR, CD117 i MPO) antigeni, dok je ekspresija limfoidnih antigena bila zastupljena u manjem procentu. Ispitivana učestalost drugih molekularnih markera: *FLT3-ITD* u 26 (23.6%), *FLT3-D835* u 9 (8.2%) i *NPM1*⁺ u 42 (38.2%) bolesnika je odgovarala literaturnim podacima (17). Najzastupljenija je bila *NPM1* mutacija koja je bila prisutna kod 42 (38.2%) bolesnika, što takođe odgovara literaturnim podacima (39-41).

Prema molekularnim grupama rizika koje su definisane u odnosu na *FLT3* i *NPM1* status (povoljan rizik- *NPM1*⁺/*FLT3-ITD*⁻; intermedijarni rizik-*NPM1*⁻/*FLT3-ITD*⁻; nepovoljan rizik-*FLT3-ITD*⁺), u skladu sa ELN preporukama (76), najviše bolesnika-61/110 (55.5%) je pripadalo intermedijarnoj podgrupi rizika (*NPM1*⁻/*FLT3-ITD*⁻).

Imajući u vidu kliničke karakteristike pri dijagnozi koje se odnose na starost, ECOG performans status i HCT-CI skor, kod većine naših bolesnika je primenjena intenzivna hemioterapija 105 (95.5%), dok je svega 5 (4.5%) bolesnika lečeno palijativnom terapijom.

Među opisanim kliničko-laboratorijskim parametrima pri dijagnozi, kao i imunofenotipskim i molekularnim karakteristikama možemo uočiti da nisu bili značajno zastupljeni parametri koji se mogu uvrstiti u grupu loših prognoznih markera poput: povećanog broja leukocita > 30x10⁹/L, ekstramedularne bolesti, imunofenotipskih markera (CD2, CD4, CD7, CD56+) ili *FLT3-ITD* pozitivnosti (Tabela 16, 17; Dijagram 2, 6).

U našoj studiji *IDH* mutacije su detektovane kod 25/110 (23%) bolesnika (Dijagram 7.). U literaturi je takođe objavljena slična učestalost od 25–30% kod AML-NK bolesnika (166-171). Osam (7%) bolesnika je imalo *IDH1* mutaciju i svi su imali *IDH*^{R132} mutaciju. Sedamnaest (16%) bolesnika je imalo *IDH2* mutaciju: petnaest *IDH*^{R140} i dva *IDH*^{R172}, što takođe odgovara drugim objavljenim rezultatima (107, 165, 167, 175), te podacima da se *IDH2* češće javlja od *IDH1* mutacije (194).

IDH mutacije su jednako bile zastupljene kod oba pola, prosečne starosti 50 godina (Tabela 20). U više studija je pokazano da se *IDH* mutacija češće javljala kod starijih bolesnika (107, 108, 166, 167, 170). Takođe, opisana je povezanost *IDH1* mutacije sa ženskim polom (139, 175). Naša grupa je bila mlađa što delimično objašnjava ove razlike.

Naši bolesnici sa *IDH* mutacijom imali su veći broj trombocita i veći procenat blasta u perifernoj krvi u odnosu na bolesnike bez mutacije (Tabela 20.), što je u skladu sa prethodnim istraživanjima u literaturi (107, 165, 167, 170). Nije bilo razlike između *IDH*⁺ i *IDH*⁻ bolesnika u odnosu na starost, pol, broj leukocita, procenat blasta u koštanoj srži, hemoglobin i nivo LDH (Tabela 20.). Inače, neke objavljene studije su pokazale povezanost

IDH mutacija sa niskim brojem leukocita (108, 140, 166, 195). U našoj studiji nije bilo statistički značajne razlike među bolesnicima sa i bez *IDH1* i *IDH2* u odnosu na već navedene karakteristike, izuzev u broju trombocita koji je u bolesnika sa *IDH1* mutacijom bio veći pri dijagnozi u odnosu na *IDH1*⁻ bolesnike (p=0.045). Marcucci i sar. su u svojoj studiji opisali povezanost *IDH2* mutacije sa niskim brojem leukocita i procentom blasta u perifernoj krvi (167).

Bolesnici sa *IDH* mutacijom najčešće su pripadali M2 grupi-9 (29%) bolesnika, zatim M1 podgrupi- 6 (27.3%) i 5 (21%) M4 podgrupi po FAB klasifikaciji (Dijagram 5.), što je u saglasnosti sa drugim rezultatima (171, 174, 175,178). Isto tako, *IDH1* mutacija je bila zastupljenija u M1 pogrupi-3 (13%), dok je *IDH2* mutacija češće bila povezana sa M2 pogrupom-7 (21.9%) po FAB klasifikaciji, što odgovara literaturnim podacima (174).

Poređenjem *IDH* mutacije sa brojnim imunofenotipskim markerima (Tabela 22.) nije nađena statistički značajna povezanost, što odgovara literaturnim podacima (171). Pokazano je da su najzastupljeniji bili mijeloidni antigeni (CD33, CD13 i MPO), što se takođe podudara sa literaturnim podacima (174). U našoj grupi bolesnici sa *IDH* mutacijom su jedino statistički značajno ređe ekspimirali CD56 i CD14 antigene (p=0.040; p=0.007). Chou i sar. su pokazali da AML sa monocitnom diferencijacijom (FAB M4) i ekspresijom HLA-DR, CD13 i CD14 su neubičajeni za AML sa *IDH* mutacijom (174). U našoj grupi AML-M4 su ekspimirali HLA-DR i CD13.

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 (*NPM1*⁺- 26.2% vs *NPM1*⁻- 20.6%, p=0.496), što nije u saglasnosti sa literaturnim izveštajima, koji su opisali povezanost *IDH* mutacija sa *NPM1* mutacijom (65, 107, 167, 168, 170). *FLT3* mutacije su jednako bile zastupljene između *IDH*⁺ i *IDH*⁻ bolesnika, što je u skladu sa drugim studijama (65, 107, 166). U objavljenim studijama je pokazano da nema statistički značajne povezanosti između *IDH* mutacija i *FLT3-ITD* mutacije (107, 174, 139, 188). U našoj grupi bolesnika, takođe nije uočena statistički značajna povezanost *IDH1* i *IDH2* sa *FLT3-ITD*, *FLT3-D835* i *NPM1* mutacijom, dok je u

radovima opisana povezanost i sa *IDH1* i *IDH2* mutacijom posebno (139, 173, 174). Ispitivana je i povezanost *IDH* mutacija sa molekularnim grupama rizika i nije uočeno da su *IDH* mutacije statistički značajno bile zastupljene ni u jednoj od tri grupe rizika.

Intenzivno lečenje hemioterapijom “3+7” je sprovedeno kod 77/110 (70%) bolesnika ≤ 60 godina, dok je kod 28 (25.5%) bolesnika starijih od 60 godina primenjena redukovana indukciona hemioterapija. Kod 5 (4.5%) bolesnika je primenjena palijativna terapija. Kompletnu remisiju je postiglo 62/75 (83%) AML-NK bolesnika, što odgovara literaturim podacima da se stopa postizanja remisije za bolesnike < 60 godina kreće od 60% - 80% (2, 78, 94). U našoj studiji univarijatna analiza je izvojila broj $Le \geq 30 \times 10^9/l$ ($p=0.016$) koji su uticali na stopu postizanja KR, što je ujedno bio i najznačajni faktor za manju stopu postizanja KR ($p=0.015$) kod AML-NK bolesnika. Dobijeni rezultati odgovaraju literaturnim podacima (196).

Ukupno je u toku indukcionog lečenja umrlo 30 (28.57%) bolesnika, što se takođe uklapa u literaturne podatke (115). U našoj grupi bolesnika najčešći uzrok rane indukciono smrti bila je sepsa kod 11 (36.6%) bolesnika, potom sindrom lize tumora kod 7 (23.35%), hemoragijski sindrom uzrokovan DIKOM kod 7 (23.35%) i intrakranijalnim krvarenjem (IKH) kod 5 (16.6%) bolesnika (Dijagram 10.). Međutim, poslednje objavljene studije ukazuju da je smrtnost unutar prvih meseca dana značajno smanjena (stopa TRM u period između 1991. i 2009. smanjena je od 18 na 3% SWOG studija i sa 16% na 4% u MDA)(156). Naši rezultati (Tabela 26.) su pokazali da su bolesnici koji su rano umrli imali lošiji inicijalni ECOG status ($p = 0.047$), prosečno veći procenat blasta u perifernoj krvi ($p < 0.001$), veći procenat blasta u koštanoj srži (73.5% vs. 20%, $p = 0.05$), prisutnu u većem procentu *IDH2* (58.8% vs. 41.2%, $p = 0.019$), kao i obe mutacije *IDH1/IDH2* zajedno (60% vs. 40%, $P = 0.007$). Bolesnici koji su bili *NPM1* pozitivni duže su živeli u odnosi na *NPM1* negativne bolesnike (64.3% vs. 35,7%; $p=0.001$). Ovi rezultati su u skladu brojnim studijama (40-44).

Kod 36/62 (58.06%) bolesnika koji su inicijalno postigli remisiju bolesti nakon indukciono terapije, nastupio je recidiv bolesti u periodu od 2 do 47 meseci nakon

postavljanja dijagnoze, prosečno 13.87 meseci. Prema literaturnim podacima većina AML-NK bolesnika koji postignu KR će recidivirati u toku tri godine nakon postizanja KR ($\geq 5\%$ blasta u koštanoj srži ili pojava blasta u periferiji; pojava ekstramedularne bolesti) (78). Naše ispitivanje je pokazalo da su bolesnici sa recidivom imali u većem procentu *IDH*⁺ u odnosu na one sa KR, koji nisu imali ovu mutaciju.

Refraktarnost na indukcionu terapiju je pokazalo 13 (17%) bolesnika. Između 10% i 40% bolesnika ne postigne KR nakon indukciono hemioterapije što pakazuju literaturni podaci (78). Naše ispitivanje je pokazalo da su faktori rizika koji su uticali na pojavu refraktarnosti bolesti bili: prisustvo *FLT3-ITD* mutacije ($p=0.049$) i broj $Le \geq 30 \times 10^9/l$ ($p=0.041$), za koji je multivarijantnom analizom pokazano da je najznačajni prediktorni faktor. Analiza karakteristika naših bolesnika je pokazala da su imali: statistički značajno nižu prosečnu vrednost hemoglobina ($p=0.02$), povišen nivo LDH ($p=0.42$) i leukocitozu ($Le \geq 30 \times 10^9/l$) ($p=0.033$) u odnosu na bolesnike sa KR.

U našoj studiji, stopa postizanja KR je bila 60% kod *IDH*⁻ bolesnika, dok je *IDH*⁺ bila nešto niža (44%), ali bez statistički značajne razlike ($p=0.152$). Slični rezultati su objavljeni od strane Nomdedeu i sar. (178), kod kojih je stopa KR kod *IDH*⁻ bolesnika bila 80% i 63% kod *IDH*⁺ ($p=0.086$). Niska stopa postizanja KR kod AML-NK bolesnika sa *IDH* mutacijom pokazana je u više radova (166, 167, 170).

Među ispitivanim molekularnim podgrupama rizika nije postojala statistički značajna u postizanju KR kod AML-NK bolesnika (Tabela 31). Takođe, nije postojala statistički značajna razlika između posmatranih podgrupa rizika ukoliko bi se uporedili bolesnici sa i bez *IDH* mutacije, ali uočavala se procetulna razlika u postizanju KR tj KR su u većem procentu postizali *IDH*⁻ bolesnici.

U našoj studiji je pokazano da prisustvo *IDH* mutacija nije bilo statistički značajno povezano za učestalostu recidiva (*IDH*⁺-24% vs *IDH*⁻35.3%; $p=0.250$), refraktarnosti AML-NK (*IDH*⁺-16% vs *IDH*⁻10.5%; $p=0.474$) i pojavom rane smrti (*IDH*⁺-36% vs *IDH*⁻24.7%; $p=0.310$), među ispitivani grupama sa i bez *IDH* mutacije. Povezanost *IDH* i stope pojave recidiva AML-NK pokazana je u studijama u literaturi (166,167).

Medijana preživljavanja AML-NK bolesnika je bila 7.5 meseci (1 - 48 meseci), petogodišnji OS je bio 16.4%, dok je medijana preživljavanja bez znakova bolesti bila 12 meseci (Dijagram 12.). Na ukupno preživljavanje kod AML-NK bolesnika značajno je uticao povišen broj leukocita $\geq 30 \times 10^9/L$ (3m vs 10m; $p=0.001$) (Dijagram 13.), o tome govori i literaturni podaci (196). Bolesnici koji su imali *FLT3-ITD* mutaciju značajno kraće su živeli u odnosu na bolesnika bez *FLT3-ITD* (3m vs 7m; $p=0.045$) (Dijagram 14.), što je opisano u literaturi (24-26). Ostali ispitivani klinički parametri nisu pokazali uticaj na OS kod AML-NK bolesnika u našoj studiji.

Univarijantna analiza je pokazala da su sledeće ispitivane karakteristike bile značajni prediktori za kraći OS: godine ≥ 55 ($p=0.013$), broj Le $\geq 30 \times 10^9/l$ ($p=0.001$) i *IDH* pozitivnost ($p=0.033$), Multivarijantnom COX-ovom regresionom analizom izdvojen je broj Le $\geq 30 \times 10^9/l$ ($p=0.001$, RR=1.768, 95% CI 1.084–2.883) kao najznačajni prediktorni faktor za kraći OS (Tabela 33.). Univarijantna analiza je pokazala da su značajni faktori za kraći DFS bili: *FLT3-ITD* pozitivnost ($p = 0.03$) i *NPM1* pozitivnost ($p = 0.032$). Najznačajni faktor rizika za DFS je bila *FLT3-ITD* pozitivnost ($p= 0.030$, RR= 2.465, 95% CI 1.089-5.579) (Tabela 34.).

Naše ispitivanje je pokazalo da *IDH* mutacije deluju kao loš prognostički marker ukupnog preživljavanja kod AML-NK bolesnika (Dijagram 15, 16). Što znači da su bolesnici sa *IDH* mutacijama imali značajno kraći OS, sa tendencijom kraće DFS. Prisustvo *IDH* mutacija zajedno značajno je uticalo na ukupno preživljavanje (OS) (*IDH*⁺-2 meseci vs *IDH*⁻-7 meseci; $p=0.039$). *IDH* mutacije nisu značajno uticale na dužinu trajanja remisije bez znakova bolesti (DFS) (*IDH*⁺- 12 meseci vs *IDH*⁻- 17 meseci; $p=0.090$). Sa druge strane, prisustvo *IDH*⁺ je uticalo 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 ranija istraživanja (165-167, 170, 176, 177).

Među, *IDH*⁺ bolesnicima, stopa OS kod onih kod kojih je sprovedena alogena TMČH je bila značajno viša u odnosu na one koji nisu lečeni transplantacijom ($p=0.000$). Ovo su takođe uočili i Yamaguchi i sad. (170) koji su utvrdili da alogena TMČH može

poboljšati OS kod mlađih pacijenata sa *IDH* mutacijom. Naša studija je pokazala da je postojala statistički značajna razlika u ukupnom preživljavanju između transplantiranih i netransplantiranih bolesnika *IDH*⁺ bolesnika (15 vs 2 meseci; p=0.006). Međutim, u okviru intermedijarne grupe rizika nije bilo statistički značajne razlike u preživljavanju bolesnika sa povoljnim genotipom (*NPM1*⁺/*FLT3-ITD*⁻), u odnosu na sprovedenu TMČH. Iz tih razloga alogena TMČH treba biti odložena kod AML-NK bolesnika sa povoljnim genotipom u KR1. Imajući u vidu rezultate većine radova u kojima je pokazano da su *IDH1* i *IDH2* mutacije povezane sa lošom prognozom kod bolesnika sa AML-NK (107, 108), kod ovih bolesnika u KR1 sprovođenje alogene TMČH se može smatrati standarnom opcijom lečenja (106, 170).

Kada smo primenili molekularnu klasifikaciju koja je bazirana na prisustvu/odsustvu *NPM1* i *FLT3* mutacije u našoj grupi bolesnika, uočili smo da je prisustvo *IDH* mutacija imalo loš uticaj na OS intermedijarne subgrupe rizika (*NPM1*⁻/*FLT3-ITD*⁻) (5 vs 12 meseci; p=0.050). Ovaj nalaz, je već objavljen od drugih autora (170, 139), i govori u korist testiranja za *IDH* mutacije u grupi AML-NK bolesnika.

Ovi rezultati ukazuju da pored *FLT3* i *NPM1* mutacija gena koje već imaju značaj kao prognostički faktori, detekcija *IDH* mutacija doprinosi boljoj klasifikaciji rizika kod AML-NK bolesnika. Ova grupa bolesnika AML-NK je inače označena kao grupa intermedijarnog rizika, ali zbog njene heterogenosti u pogledu kliničkog ishoda, neophodna je preciznija raspodela. Otuda potreba za definisanjem novih molekularnih markera kod AML-NK bolesnika koji bi doprineli boljoj i preciznijoj klasifikaciji bolesnika (2,76).

Česta povezanost *IDH* mutacija sa *NPM1* a manja povezanost sa *FLT3* mutacijama, ukazuje da te mutacije imaju ulogu u procesu leukemogeneze. *IDH1* i *IDH2* su epigenetski modifikovani geni uključeni u DNA metilaciju i modifikaciju histona i ne uklapaju se potpuno u aktuelnu definiciju klase I i II genskih mutacija, kao što je predloženo teorijom kancerogeneze 2-udarca (189,190).

Pored toga, navedeno je da su *IDH* mutacije rani događaj u različitim mijeloneoplazmama, kao što su mijelodisplastični sindrom i mijeloproliferativne neoplazme (MPN) (189,190). Kod bolesnika sa MPN, sticanje *IDH* mutacija predviđa povećan rizik od

progresije u sekundanu AML i potencijalno može da posluži kao marker ranog stadijuma transformacije (191,192). Takođe, činjenicu da su *IDH* mutacije veoma stabilne u toku bolesti podržava pretpostavka da je njihova pojava rani događaj u malignoj transformaciji.

Praćenje minimalne rezidualne bolesti je od izuzetnog značaja i može se sprovoditi molekularnim (RQ-PCR) i multiparametarskim protočnicometrijskim tehnikama. PCR se smatra najosetljivijom tehnikom MRB.

Prema dosadašnjim istraživanjima kao najstabilnija mutacija u recidivu bolesti se pokazala *NPM1* mutacija i kao takva ima veoma značajnu ulogu u proceni MRB (134). Neke studije su ispitivale *IDH* mutacije kao potencijalne markere MRB (138-142). Pokazano je da su *IDH1* i *IDH2* mutacije relativno stabilne i da pokazuju direktnu korelaciju sa statusom bolesti.

Postoji samo nekoliko izveštaja o njihovom značaju u praćenju MRB. Tako su, Gross i sar. (193) i Jeziskova i sar. (142) prikazali po četiri bolesnika sa *IDH1* i *IDH2* mutacijama, zatim slede ispitivanja Chou i sar. (174, 141). U sve tri studije, kao i u našoj devet *IDH*⁺ bolesnika koji su bili dostupni za sekvencionalnu analizu, mutacija koja je bila izgubljena za vreme KR pojavila se ponovo u relapsu bolesti kao isti tip mutacije. Šta više, nijedan od *IDH*⁺ bolesnika nije stekao novu *IDH* mutaciju u toku relapsa (172, 174, 193,141). U našoj studiji, uočili smo da su dva *IDH*⁺ bolesnika zadržala mutaciju u toku KR i za vreme perioda praćenja. Chou i sad. (141) objasnili su ovo otkriće hipotezom da su *IDH* mutacije važne u održavanju leukemijskog fenotipa preko povezanosti sa drugim onkogenim mutacijama, ali da same nisu dovoljne da učestvuju u leukemogenezi *in vivo*.

IDH1 i *IDH2* mutacije su potencijalno značajni MRB markeri, pod pretpostavkom da metod koji se primenjuje ispunjava uslove osetljivosti za detekciju MRB. Metoda koja se obično koristi za detekciju *IDH* mutacija je PCR-praćen direktnim sekvenciranjem, sa osetljivošću preko 20% (107, 161, 178, 174), koju smo i mi koristili u ovoj studiji.. Na osnovu ovoga i činjenice da su *IDH* mutacije heterozigotne, primena senzitivnih metoda, kao što je specifični real-time PCR za određene mutacije, treba uzeti u obzir za praćenje odgovora na terapiju i ranog recidiva.

Možemo da zaključimo da su stečene *IDH* mutacije uobičajene genske abnormalnosti kod AML-NK bolesnika. One imaju loš prognostički uticaj, posebno kod bolesnika koji nemaju *NPM1* mutaciju. Zajedno sa drugim molekularnim markerima, prisustvo *IDH* mutacije može poboljšati pristup stratifikaciji rizika kod AML-NK bolesnika. Štaviše, *IDH* mutacije su stabilne u toku praćenja toka bolesti i mogle bi da se potencijalno koriste kao molekularni markeri detekcije MRB. Ovo bi moglo biti posebno važno ukoliko bi se u svakodnevnoj praksi uveo poseban tretman sa inhibitorima *IDH*.

6. ZAKLJUČCI

1. *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.
2. *IDH* mutacije su jednako bile zastupljene i kod muškog i ženskog pola, prosečne starosti 50 godina.
3. AML-NK bolesnici sa *IDH* mutacijom su najčešće pripadali M2 (29%), M1(27.3%) i M4 (21%) podgrupi po FAB klasifikaciji.
4. *IDH*⁺ bolesnici su imali značajno veći broj trombocita, kao i veći procenat blasta u perifernoj krvi na početku bolesti, dok nije bilo značajne povezanosti sa starošću, brojem leukocita, procentom blasta u koštanoj srži, vrednostima hemoglobina i LDH u serumu.
5. *IDH1* mutacija je pokazala značajnu povezanost sa većim brojem trombocita, dok *IDH2* nije pokazala povezanost ni sa jednim kliničkim parametrom bolesnika pri dijagnozi.
6. *IDH* mutacije nisu pokazale značajnu povezanost sa ispitivanim imunofenotipskim i molekularnim markerima (*FLT3-ITD*, *FLT3-D835* i *NPM1* mutacijom) blasta.
7. Prisustvo *IDH* mutacija nije statistički značajno uticalo na postizanje KR, RS, niti na nastanak recidiva i pojavu refraktarnosti bolesti.
8. Multivarijatna analiza je izdvojila povećan broj $Le \geq 30 \times 10^9/l$ ($p=0.015$) kao najznačajni faktor za manju stopu postizanja KR kod AML-NK bolesnika.
9. Univarijatnom analizom izdvojeni su faktori rizika koji su uticali na pojavu refraktarnosti bolesti i to su bili: prisustvo *FLT3-ITD* mutacija i broj $Le \geq 30 \times 10^9/l$. Multivarijatna analiza je pokazala da je najznačajni faktor rizika za refraktarnost bolesti bio povećan broj $Le \geq 30 \times 10^9/l$.
10. 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.

11. Univarijantnom analizom su izdvojeni sledeći značajni prediktori za kraći OS AML-NK bolesnika: godine ≥ 55 , broj Le $\geq 30 \times 10^9/l$ i IDH^+ , pri čemu je broj Le $\geq 30 \times 10^9/l$ izdvojen kao najznačajni faktor za OS.
12. Na ukupno preživljavanje značajno je uticao povišen broj leukocita $\geq 30 \times 10^9/L$, dok su bolesnici koji su imali *FLT3-ITD* mutaciju značajno kraće živeli u odnosu na bolesnika bez *FLT3-ITD*.
13. Univarijatna analiza je pokazala da su najznačajniji faktori za kraći DFS bile prisutne mutacije *FLT3-ITD* i *NPM1*, dok je najznačajniji faktor rizika *FLT3-ITD* pozitivnost.
14. Prisustvo *IDH* mutacija zajedno je značajno uticalo na ukupno preživljavanje (OS) ($p=0.039$), a samo IDH^+ je uticala na DFS ($p=0.049$).
15. Nije bilo statistički značajne razlike u preživljavanju *IDH* i IDH^+ bolesnika koji su transplantirani, dok je statistički značajna razlika potvrđena između transplantiranih i netransplantiranih bolesnika u grupi IDH^+ , AML-NK bolesnika.
16. Prisustvo *IDH* mutacija je pokazalo negativan uticaj na OS u *intermedijarnoj* podgrupi rizika (*FLT3-ITD*-/*NPM1*-) AML-NK bolesnika.
17. *IDH* mutacije su pokazale stabilnost tokom lečenja AML (tokom KR, u recidivu, refraktarnoj bolesti).
18. Stečene *IDH* mutacije imaju loš prognostički značaj u AML-NK bolesnika. U kombinaciji sa drugim molekularnim markerima doprinose boljoj stratifikaciji rizika, a zbog dokazane stabilnosti tokom bolesti mogu se koristiti kao marker MRB.

7. LITERATURA

1. Miller KB, Pihan G. Clinical manifestations of acute myeloid leukemia. In Hoffman R, Benz E, Shattil S, Furie B, Silberstein L, Mc Glave P. Hematology: Basic Principles and Practice, 5th ed. 2008; 933-963.
2. Dohner H, Weisdorf D i Bloomfield C. Acute Myeloid Leukemia. N Engl J Med 2015;373;12:1136-52.
3. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015. CA Cancer J Clin 2015; 65: 5–29.
4. Xie M, Lu C, Wang J, McLellan MD, Johnson KJ, Wendl MC, et al: Age-related mutations associated with clonal hematopoietic expansion and malignancies. Nat Med 2014; 20:1472-78.
5. Kampen K, The discovery and early understanding of leukemia. Leukemia research 2012; 36:6-13.
6. Liesveld JL and Lichtman MA. Acute myeloid leukemia. In Kaushansky K, Prchal JT, Press OW, Lichtman MA, Levi M, Burns LJ. Williams Hematology 9th Edition 2015; 1373-1436.
7. Tsushima H, Iwanaga M, Miyazaki Y. Late effect of atomic bomb radiation on myeloid disorders: Leukemia and myelodysplastic syndromes. Int J Hematol 2012; 95:232.
8. Johnson GT, Harbison SC, McCluskey JD, Harbison RD: Characterization of cancer risk from airborne benzene exposure. Regul Toxicol Pharmacol 2009; 55:361.
9. Lichtman MA. Cigarette smoking, cytogenetic abnormalities, and acute myelogenous leukemia. Leukemia 2007; 21:1137.
10. Yeasmin S, Nakayama K, Ishibashi M, Oride A, Katagiri A, Purwana IN, et al: Therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia following paclitaxel- and carboplatin-based chemotherapy in an ovarian cancer patient: A case report and literature review. Int J Gynecol Cancer 2008; 18:1371.

11. Pedersen-Bjergaard J, Christiansen DH, Desta F, Andersen MK. Alternative genetic pathways and cooperating genetic abnormalities in the pathogenesis of therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2006; 20:1943.
12. Horwitz M. The genetics of familial leukemia. *Leukemia* 1997; 11:1347.
13. Luca DC, Almanaseer IY. Simultaneous presentation of multiple myeloma and acute monocytic leukemia. *Arch Pathol Lab Med* 2003; 127:1506.
14. Yohe SL, Chenault CB, Torlakovic EE, Asplund SL, McKenna RW. Langerhans cell histiocytosis in acute leukemias of ambiguous or myeloid lineage in adult patients: Support for a possible clonal relationship. *Mod Pathol* 2014; 27:651.
15. Kelly LM, Gilliland DG. Genetics of myeloid leukemias. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2002; 3:179–198.
16. Shih AH, Abdel-Wahab O, Patel JP, Levine RL. The role of mutations in epigenetic regulators in myeloid malignancies. *Nat Rev Cancer* 2012;12:599–612.
17. Cancer Genome Atlas Research Network. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2013; 368:2059–2074.
18. Chen, J. Odenike O, Rowley J. Leukaemogenesis: more than mutant genes. *Nat Rev Cancer* 2010;10: 23-36.
19. Eriksson A, Lennartsson B, and Lehmann S. Epigenetic aberrations in acute myeloid leukemia: early key events during leukemogenesis. *Experimental Hematology* 2015; 43:609-624.
20. Filip AA, Libura M, Giebel S, Haus O. Genetic mechanisms and molecular markers of neoplastic transformation in acute myeloid leukemia. In: Witt M, Dawidowska M, Szczepanski T. *Molecular aspects of hematologic malignancies*. Berlin, Germany: Springer Berlin Heidelberg 2012; 29–54.
21. Meshinchi S, Appelbaum FR. Structural and functional alterations of FLT3 in acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* 2009;15: 4263–9.
22. Volpe G, Clarke M, Garcia P, Walton DS, Vegiopoulos A, Del Pozzo W, et al. Regulation of the Flt3 gene in haematopoietic stem and early progenitor cells. *Plos One* 2015;10(9),e0138257.

23. Nakao M, Yokota S, Iwai T, Kaneko H, Horike S, Kashima K, et al. Internal tandem duplication of the *flt3* gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1996;10(12):1911–18.
24. Bienz M, Ludwig M, Mueller BU, Leibundgut EO, Ratschiller D, Solenthaler M, et al. Risk assessment in patients with acute myeloid leukemia and a normal karyotype. *Clin Cancer Res* 2005;11(4):1416–24.
25. Santos FP, Qiao W, Cortes JE, Jones D, Ravandi F, Verma D, et al. Prognostic value of FLT3 mutations among different cytogenetic subgroups in acute myeloid leukemia (AML). *J Clin Oncol* 2009;27(15S) abstr 7015.
26. Schlenk RF, Breitnick J, Benner A, Kreitmeier S, Tobis K, Do H, 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(13):4372–80.
27. Stirewalt DL, Kopecky KJ, Meshinchi S, Appelbaum FR, Slovak ML, Willman CL et al. FLT3, RAS and TP53 mutations in elderly patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2001;97:3589.
28. Mol CD, Lim KB, Sridhar V, Zou H, Chien EY, Sang BC, et al: Structure of a c-kit product complex reveals the basis for kinase transactivation. *J Biol Chem* 2003;278:31461.
29. Paschka P, Marcucci G, Ruppert AS, Mrózek K, Chen H, Kittles RA, et al: Adverse prognostic significance of KIT mutations in adult acute myeloid leukemia with *inv(16)* and *t(8;21)*: A Cancer and Leukemia Group B Study. *J Clin Oncol* 2006; 24:3904.
30. Hou HA, Chou WC and Tien HF. Genetic Alterations and Their Clinical Implications in Acute Myeloid Leukemia. In Koschmieder S. *Myeloid Leukemia - Basic Mechanisms of Leukemogenesis* 2011; 163-184.
31. 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; 109:431–448.

32. Koschmieder S, Halmos B, Levantini E, Tenen D.G. Dysregulation of the C/EBP α differentiation pathway in human cancer. *J. Clin. Oncol* 2009; 27: 619–628.
33. Fasan A, Haferlach, C, Alpermann T, Jeromin S, Grossmann V, Eder C. The role of different genetic subtypes of CEBPA mutated AML. *Leukemia* 2014; 28: 794–803.
34. Ernest P, Wang J, Korsmeyer SJ. The role of MLL in hematopoiesis and leukemia. *Curr. Opin. Hematol.* 2002; 9: 282–287.
35. Meyer C, Kowarz E, Hofmann J, Renneville A, Zuna J, Trka J, et al. New insights to the MLL recombinome of acute leukemias. *Leukemia* 2009;23 (8):1490–9.
36. Muntean AG, Hess JL. The pathogenesis of mixed lineage leukemia. *Annu Rev Pathol* 2012;7:283–301.
37. Mosna F, Gottardi M. Stem cell modeling of core binding factor acute myeloid leukemia. *Stem Cells Int* 2016; 7625827.
38. Duployez N, Willekens C, Marceau-renaut A, Boudry-labis E. Prognosis and monitoring of core-binding factor acute myeloid leukemia: current and emerging factors. *Expert Rev Hematol* 2015; 8(1):43–56.
39. Tošić N i Pavlović S. Molekularno-genetski marker u aktnim leukemijama. Marisavljević D, Mihaljević B, Elezović I i drugi. *Klinička hematologija*, 2011; 390-99.
40. Prada-Arismendy J, Arroyave JC, Röthlisberger S. Molecular biomarkers in acute myeloid leukemia. *Blood Rev* 2017; 31(1):63-76.
41. Marcucci, G, Haferlach, T, Dohner, H. Molecular genetic of adult acute myeloid leukemia:Prognostic and therapeutic implications. *J. Clin. Oncol* 2011; 29: 475–486.
42. Falini B, Bolli N, Shan J, Martelli M.P, Liso A, Pucciarini A, et al. Both carboxy-terminus NES motif and mutated tryptophan(s) are crucial for aberrant nuclear export of nucleophosmin leukemic mutants in NPMc+ AML. *Blood* 2006; 107: 4514–23.
43. Cheng K, Sportoletti P, Ito K, Clohessy JG, Teruya-Feldstein J, Kutok JL, et al. The cytoplasmic NPM1 mutant induces myeloproliferation in a transgenic mouse model, *Blood* 2010; 115:3341–45.

44. Dohner K, Schlenk RF, Habdank M, Scholl C, Rucker FG, Corbacioglu A, et al. Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: Interaction with other gene mutations. *Blood* 2005;106:3740–46.
45. Marcucci G, Metzeler K.H, Schwind S, Becker H, Maharry K, Mrozek K, et al. Age-related prognostic impact of different types of DNMT3A mutations in adults with primary cytogenetically normal acutemyeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2012; 30: 742–750.
46. Ellisen LW, Carlesso N, Cheng T, Scadden DT, and Haber DA. The Wilms tumor suppressor WT1 directs stage-specific quiescence and differentiation of human hematopoietic progenitor cells. *Embo J* 2001; 20: 1897-1909.
47. Gaidzik VI, Schlenk RF, Moschny S, Becker A, Bullinger L, Corbacioglu A, et al. Prognostic impact of WT1 mutations in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a study of the German-Austrian AML Study Group. *Blood* 2009; 113: 4505-11.
48. Paschka P, Marcucci G, Ruppert AS, Whitman SP, Mrózek K, Maharry K, et al. Wilms'tumor 1 gene mutations independently predict poor outcome in adults with cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a cancer and leukemia group B study. *J Clin Oncol* 2008; 26:4595-4602.
49. Renneville, A., Boissel N, Zurawski V, Llopis L, Biggio V, Nibourel O, et al. Wilms tumor 1 gene mutations are associated with a higher risk of recurrence in young adults with acute myeloid leukemia: a study from the Acute Leukemia French Association. *Cancer* 2009; 115:3719-3727.
50. Santamaria CM, Chillón MC, García-Sanz R, Pérez C, Caballero MD, Ramos F, et al. Molecular stratification model for prognosis in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Blood* 2009; 114:148-152.
51. Baylin, S.B. & Ohm, J.E. Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nat Rev Cancer* 2006; 6:107-116.
52. Chen J, Odenike O, and Row JD. Leukaemogenesis: more than mutant genes. *Nat Rev Cancer* 2010, 10:23-36.

53. Eriksson A, Lennartsson A, Lehmann S. Epigenetic aberrations in acute myeloid leukemia: early key events during leukemogenesis. *Exp Hematol* 2015;43(8):609–24.
54. Chan SM, Majeti R. Role of DNMT3A, TET2, and IDH1/2 mutations in pre-leukemic stem cells in acute myeloid leukemia. *Int J Hematol* 2013;98(6):648–57.
55. Ward PS, Patel J, Wise DR, Abdel-Wahab O, Bennett BD, Collier HA, et al. The common feature of leukemia-associated IDH1 and IDH2 mutations is a neomorphic enzyme activity converting α -ketoglutarate to 2-hydroxyglutarate. *Cancer Cell* 2010;17(3):225–34.
56. Im AP, Sehgal AR, Carroll MP, Smith BD, Tefferi A, Johnson DE, et al. *DNMT3A* and *IDH* mutations in acute myeloid leukemia and other myeloid malignancies: associations with prognosis and potential treatment strategies. *Leukemia* 2014; 28(9):1774–83
57. Richardson AD, Scott DA, Zagnitko O, Aza-Blanc P, Chang C-C, Russler-Germain DA. Registered report: *IDH* mutation impairs histone demethylation and results in a block to cell differentiation. *Elife* 2016;5:1–25.
58. Lu C, Ward PS, Kapoor GS, Rohle D, Turcan S, Abdel-Wahab O, et al. *IDH* mutation impairs histone demethylation and results in a block to cell differentiation. *Nature* 2012;483(7390):474–8.
59. Ye D, Ma S, Xion Y, and Kun-Liang Guan. *R*-2-hydroxyglutarate as the key effector of *IDH* mutations promoting oncogenesis, *Cancer Cell* 2013; 23(3): 274–276.
60. Ito S, D'Alessio AC, Taranova OV, Hong K, Sowers LC and Zhang Y. Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature* 2010; 466(7310):1129-1133.
61. Figueroa ME, Abdel-Wahab O, Lu C, Ward PS, Patel J, Shih A, et al. Leukemic *IDH1* and *IDH2* mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer Cell* 2010; 18(6):553-567.
62. Moran-crusio K, Reavie L, Shih A, Abdel-Wahab O, Ndiaye-lobry D, Lobry C, et al. Tet2 loss leads to increased hematopoietic stem cell self-renewal and myeloid transformation. *Cancer Cell* 2012;20(1):11–24.

63. Jan M, Snyder TM, Corces-Zimmerman MR, Vyas P, Weissman IL, Quake SR, et al. Clonal evolution of preleukemic hematopoietic stem cells precedes human acute myeloid leukemia. *Sci Transl Med* 2012; 4.
64. Scopim-Ribeiro R, Machado-Neto JA, Campos P de M, Silva CAM, Favaro P, Lorand-Metze I, et al. Ten-eleven-translocation 2 (TET2) is downregulated in myelodysplastic syndromes. *Eur J Haematol* 2015;94:413–8.
65. Patel JP, Gönen M, Figueroa ME, Fernandez H, Sun Z, Racevskis J, et al. Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2012;366(12):1079–89.
66. Pratcorona M, Abbas S, Sanders MA, Koenders JE, Kavelaars FG, Erpelinck-Verschueren CA, et al. “Acquired mutations in *ASXL1* in acute myeloid Leukemia: prevalence and prognostic value,” *Haematologica* 2012; 97:388–392.
67. Abdel-Wahab O, Adli M, LaFave LM, Gao J, Hricik T, Shih AH, et al. *ASXL1* mutations promote myeloid transformation through loss of PRC2-mediated gene repression. *Cancer Cell* 2012; 22:180–193.
68. Metzeler KH, Becker H, Maharry K Radmacher MD, Kohlschmidt J, Mrózek K et al. *ASXL1* mutations identify a high-risk subgroup of older patients with primary cytogenetically normal AML within the ELN Favorable genetic category,” *Blood* 2011; 118:6920–29.
69. Ley TJ, Ding L, Walter MJ, McLellan MD, Lamprecht T, Larson DE, Kandoth C, et al. *DNMT3A* mutations in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2010; 363,2424-33.
70. Shlush LI, Zandi S, Mitchell A, Chen WC, Brandwein JM, Gupta V, et al. Identification of pre-leukaemic haematopoietic stem cells in acute leukaemia. *Nature* 2014;506:328–33.
71. Ribeiro AF, Pratcorona M, Erpelinck-Verschueren C, Rockova V, Sanders M, Abbas S, et al. Mutant *DNMT3A*: a marker of poor prognosis in acute myeloid leukemia. *Blood* 2012;119:5824–5831.
72. Thol F, Damm F, Ludeking A, Winschel C, Wagner K, Morgan M, et al. Incidence and prognostic influence of *DNMT3A* mutations in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol.* 2011;29:2889–96.

73. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br. J. Haematol* 1976, 33, 451–458.
74. Arber DA, Brunning RD, Le Beau MM et al. WHO classification. IARC. Lyon, 2008; p. 110-146.
75. Peterson L, Bloomfield CD, Döhner H, Niemeyer C, Godley L. Myeloid neoplasms with germline predisposition. In: Swerdlow S, Campo E, Harris NL, et al, eds. *World Health Organization Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Update to 4th Edition*. Lyon, France: World Health Organization, 2017. In press.
76. Dohner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*, 2017;129 (4): 424-47.
77. Lichtman MA. Does a diagnosis of myelogenous leukemia require 20% marrow myeloblasts, and does <5% marrow myeloblasts represent a remission? The history and ambiguity of arbitrary diagnostic boundaries in the understanding of myelodysplasia. *Oncologist* 2013 18:973, 2013
78. Döhner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, Burnett AK, et al.. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* 2010;115:453-74.
79. Craig FE, Foon KA. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. *Blood* 2008;111(8):3941-3967.
80. Bene MC, Nebe T, Bettelheim P, Buldini B, Bumbea H, Kern W, et al. Immunophenotyping of acute leukemia and lymphoproliferative disorders: a consensus proposal of the European LeukemiaNet Work Package 10. *Leukemia* 2011;25(4):567-574.
81. Baer MR, Stewart CC, Lawrence D, Arthur DC, Byrd JC, Davey FR, et al. Expression of the neural cell adhesion molecule CD56 is associated with short remission duration

- and survival in acute myeloid leukemia with t(8;21)(q22; q22). *Blood* 1997; 90(4):1643-1648.
82. Adriaansen HJ, Boekhorst PAW, Hagemeyer AM, van der Schoot CE, Delwel HR, van Dongen JM. Acute myeloid leukemia M4 with bone marrow eosinophilia (M4Eo) and inv(16)(p13q22) exhibits a specific immunophenotype with CD2 expression. *Blood* 1993;81(11):3043-3051.
 83. Falini B, Mecucci C, Tiacci E et al. Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *N Engl J Med* 2005;352(3):254-266.
 84. Mroćzek K, Heerema NA, Bloomfield CD. Cytogenetics in acute leukemia. *Blood Rev* 2004;18 (2):115-136.
 85. Grimwade D. The clinical significance of cytogenetic abnormalities in acute myeloid leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2001;14(3):497-529.
 86. Frohling S, Skelin S, Liebisch P, Scholl C, Schlenk RF, Döhner H, et al. Comparison of cytogenetic and molecular cytogenetic detection of chromosome abnormalities in 240 consecutive adult patients with acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2002;20(10):2480-85.
 87. Lugthart S, van Drunen E, van Norden Y, van Hoven A, Erpelinck CA, Valk PJ, et al. High EVI1 levels predict adverse outcome in acute myeloid leukemia: prevalence of EVI1 overexpression and chromosome 3q26 abnormalities underestimated. *Blood* 2008;111(8):4329-37.
 88. Grimwade D. Screening for core binding factor gene rearrangements in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2002;16 (5):964-9.
 89. Tomin D. Akutne leukemije. Marisavljević D, Mihaljević B, Elezović I, i drugi. *Klinička hematologija*, 2011;390-99.
 90. Dombret H, Hunault M, Faucher C, Dombret MC, Degos L. Acute lysis pneumopathy after chemotherapy for acute myelomonocytic leukemia with abnormal marrow eosinophils. *Cancer* 1992; 69:1356.
 91. Porcu P, Farag S, Marcucci G, Cataland SR, Kennedy MS, Bissell M. Leukocytoreduction for acute leukemia. *Ther Apher* 2002; 6:15.

92. Faderl S and Kantarjian HM. Clinical Manifestations and Treatment of Acute Myeloid Leukemia. In Hoffman R, Benz E, Silberstein LE, Furie B, Heslop, HE, Weitz J, Anastasi J. Hematology: Basic Principles and Practice, 6th ed. 2013; 863-881.
93. Dombret H, Gardin C. An update of current treatments for adult acute myeloid leukemia. *Blood* 2016;127 (1):53-61.
94. Lowenberg B, Ossenkoppele GJ, van Putten W, Schouten H.C, Graux C, Ferrant A, et al. High-dose daunorubicin in older patients with acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med* 2009; 361: 1235–48.
95. Fernandez HF, Sun Z, Yao X, Litzow MR, Luger SM, Paietta EM, et al. Anthracycline Dose Intensification in Acute Myeloid Leukemia. *N. Engl. J. Med* 2009, 361: 1249–59.
96. Burnett AK, Russell NH, Hills RK, Kell J, Cavenagh J, Kjeldsen, et al. A randomized comparison of daunorubicin 90 mg/m² vs 60mg/m² in AML induction: Results from the UK NCRI AML17 Trial in 1206 Patients. *Blood* 2015, 125: 3878–85.
97. Burnett AK, Russell NH, Hills RK, Hunter AE, Kjeldsen L, Yin J, et al. Optimization of chemotherapy for younger patients with acute myeloid leukemia: results of the medical research council AML 15 trial. *J Clin Oncol* 2013, 31(27):3360-68.
98. Lowenberg B, Pabst T, Vellenga E, van Putten W, Schouten HC, Graux C, et al. Dutch Belgian Cooperative Trial Group for Hemato Oncology (HOVON) and Swiss Group for Clinical CancerResearch (SAKK) Collaborative Group. Cytarabine dose for acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2011;364(11):1027-36.
99. Lowenberg B. Sense and nonsense of high-dose cytarabine for acute myeloid leukemia. *Blood* 2013;121(1):26-28.
100. Miyawaki S, Ohtake S, Fujisawa, Kiyoi H, Shinagawa K, Usui N, et al. A randomized comparison of 4 courses of standard-dose multiagent chemotherapy versus 3 courses of high-dose cytarabine alone in postremission therapy for acute myeloid leukemia in adults: the JALSG AML201 Study. *Blood* 2011; 117 (8): 2366 - 72.
101. Stone RM, Mandrekar S, Sanford BL, Geyer S, Bloomfield CD, Dohner K, et al. Midostaurin, a multi-targeted kinase inhibitor, improves overall survival when added to standard chemotherapy in adults age 18 - 60 with FLT3 mutant acute myeloid

- leukemia (AML): results from a randomized, prospective, placebo-controlled, double-blind trial, CALGB 10603 / ratify [abstract]. *Blood* 2015; 126 (23).
102. Gupta V, Tallman MS, Weisdorf DJ. Allogeneic hematopoietic cell transplantation for adults with acute myeloid leukemia: myths, controversies, and unknowns. *Blood* 2011;117:2307-18.
103. Sorror ML, Storb RF, Sandmaier BM, Maziarz RT, Pulsipher MA, Maris MB, et al. Comorbidity-age index: a clinical measure of biologic age before allogeneic hematopoietic cell transplantation. *J Clin Oncol* 2014; 32: 3249-56.
104. Armand P, Kim HT, Logan BR, Wang Z, Alyea EP, Kalaycio ME, et al. Validation and refinement of the Disease Risk Index for allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 2014; 123: 3664-71.
105. Koreth J, R Schlenk, Kopecky KJ, Honda S, Sierra J, Djulbegovic BJ et al. Allogeneic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia in first complete remission: systematic review and meta-analysis of prospective clinical trials. *PIT* 2009; 301 (22): 2349-61.
106. Schlenk RF, Dohner K, Crowther, Fröhling S, Corbacioglu A, Bullinger L, et al. Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2008; 358 (18): 1909 -18.
107. Abbas S, Lugthart S, Kavelaars FG, Schelen A, Koenders JE, Zeilemaker A, van Putten WJ, et al. Acquired mutations in the genes encoding *IDH1* and *IDH2* both are recurrent aberrations in acute myeloid leukemia: prevalence and prognostic value. *Blood* 2010; 116:2122-26.
108. Paschka P, Schlenk RF, Gaidzik VI, Habdank M, Krönke J, Bullinger L, et al. *IDH1* and *IDH2* mutations are frequent genetic alterations in acute myeloid leukemia and confer adverse prognosis in cytogenetically normal acute myeloid leukemia with *NPM1* mutation without *FLT3* internal tandem duplication. *J Clin Oncol* 2010; 28:3636-3643.
109. Lazarus HM, Pérez WS, Klein JP Kollman C, Bate-Boyle B, Bredeson CN, et al. Autotransplantation versus HLA-matched unrelated donor transplantation for acute myeloid leukaemia: a retrospective analysis from the Center

- for International Blood and Marrow Transplant Research. *Br J Haematol* 2006; 132: 755-769.
110. Tallman MS, Dewald GW, Gandhi S, Logan BR, Keating A, Lazarus HM, et al. Impact of cytogenetics on outcome of matched unrelated donor hematopoietic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia in first or second complete remission. *Blood* 2007; 110: 409-417
111. Breems DA, Van Putten WL, Huijgens PC, Ossenkoppele GJ, Verhoef GE, Verdonck LF, et al. Prognostic index for adult patients with acute myeloid leukemia in first relapse. *J Clin Oncol* 2005; 23 (9): 1969-78.
112. Schmid C, M Schleuning, Schwerdtfeger R, Hertenstein B, Mischak-Weissing E, Bunjes D, et al. Long-term survival in refractory acute myeloid leukemia after sequential treatment with chemotherapy and reduced-intensity conditioning for allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 2006; 108 (3): 1092-99.
113. Ossenkoppele G, Löwenberg B. How I treat the older patient with acute myeloid leukemia. *Blood* 2015;125 (5):767-774.
114. Klepin HD, Geiger AM, Tooze JA, Kritchevsky SB, Williamson JD, Pardee TS, et al. Geriatric assessment predicts survival for older adults receiving induction chemotherapy for acute myelogenous leukemia. *Blood* 2013;121(21): 4287-94.
115. Walter RB, Othus M, Borthakur G, Ravandi F, Cortes JE, Pierce SA, et al. Prediction of early death after induction therapy for newly diagnosed acute myeloid leukemia with pretreatment risk scores: a novel paradigm for treatment assignment. *J Clin Oncol*. 2011; 29(33):4417-23.
116. Burnett AK, D Milligan, Prentice AG, Goldstone AH, McMullin MF, Hills RK, et al. A comparison of low-dose cytarabine and hydroxyurea with or without all-trans retinoic acid for acute myeloid leukemia and high-risk myelodysplastic syndrome in patients not considered fit for intensive treatment. *Cancer* 2007; 109 (6): 1114 -24.
117. Kantarjian HM, Thomas XG, Dmoszynska A, Wierzbowska A, Mazur G, Mayer J, et al. Multicenter, randomized, open-label, phase III trial of decitabine versus patient choice, with physician advice, of either supportive care or low-dose cytarabine for the

- treatment of older patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2012; 30 (21): 2670 -77.
118. Burnett AK, A Goldstone, Hills RK, Milligan D, Prentice A, Yin J, et al. Curability of patients with acute myeloid leukemia who did not undergo transplantation in first remission. *J Clin Oncol* 2013; 31 (10): 1293-1301.
119. Ravandi F, Ritchie EK, Sayar H, Lancet JE, Craig MD, Vey N, et al. Vosaroxin plus cytarabine versus placebo plus cytarabine in patients with first relapsed or refractory acute myeloid leukemia (VALOR): a randomized, controlled, double-blind, multinational, phase 3 study. *Lancet Oncol.* 2015; 16 (9): 1025-36.
120. Jabbour E, Daver N, Champlin R, Mathisen M, Oran B, Ciurea S, et al. Allogeneic stem cell transplantation as initial salvage for patients with acute myeloid leukemia refractory to high-dose cytarabine-based induction chemotherapy. *Am J Hematol.* 2014; 89 (4): 395-398.
121. Holtick U, Shimabukuro-Vornhagen A, Chakupurakal G, Theurich S, Leitzke S, Burst A, et al. FLAMSA reduced intensity conditioning is equally effective in AML patients with primary induction failure as well as in first or second complete remission. *Eur J Haematol* 2016; 96(5):475-482.
122. Othus M, Appelbaum FR, Petersdorf SH, Kopecky KJ, Slovak M, Nevill T, et al. Fate of patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia who fail primary induction therapy. *Biol Blood Marrow Transplant* 2015; 21(3):559-564.
123. Röllig C, Müller-Tidow C, Hüttmann A, Noppeney R, Kunzmann V, Baldus CD, et al. Sorafenib versus placebo in addition to standard therapy in younger patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia: results from 267 patients treated in the randomized placebo-controlled SAL-Soramyl trial. *Blood* 2014;124:6.
124. Issa JP, Roboz G, Rizzieri D, Elias Jabbour, Wendy Stock, Casey O'Connell, et al. Safety and tolerability of guadecitabine (SGI-110) in patients with myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukaemia: a multicentre, randomised, dose-escalation phase 1 study. *Lancet Oncol* 2015;16(9):1099-1110.
125. Stein E.M, Altman J.K, Collins R, DeAngelo DJ, Fathi AT, Flinnet I, al. Selective, First-in-Class, Potent Inhibitor of the IDH2 Mutant Metabolic Enzyme, Induces

- Durable Remissions in a Phase I Study in Patients with IDH2 Mutation Positive Advanced Hematologic Malignancies. In Proceedings of 56th ASH Annual Meeting and Exposition, San Francisco, CA, USA, 2014; p.115.
- 126.Hansen E, Quivoron C, Straley, Lemieux RM, Popovici-Muller J, Sadrzadehet H, al. AG-120, an oral, selective, First-in-Class, Potent Inhibitor of Mutant IDH1, 2HG Reduces Intracellular and Cellular Differentiation and induces TF-1 R132H Cells and Primary Human Mutant IDH1 AML Patient Samples Treated Ex Vivo. In Proceedings of the 56th ASH Annual Meeting and Exposition, San Francisco, CA, USA, 2014; Volume 124, p. 3734.
- 127.Lancet JE, Cortes JE, Hogge DE, Tallman MS, Kovacsovics TJ, Damon LE, et al. Phase 2 trial of CPX-351, a fixed 5:1 molar ratio of cytarabine/daunorubicin, vs cytarabine/daunorubicin in older adults with untreated AML. *Blood* 2014; 123: 3239-46.
- 128.Grimwade D, Freeman SD. Defining minimal residual disease in acute myeloid leukemia: which platforms are ready for "prime time"? *Blood* 2014;124(23):3345-55.
- 129.Del Principe MI, Buccisano F, Maurillo L, Sconocchia G, Cefalo M, Consalvo MI, et al. Minimal Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia of Adults: Determination, Prognostic Impact and Clinical Applications, *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2016; 8(1):1-13.
- 130.Scholl C, Schlenk RF, Eiben K, Döhner H, Fröhling S, Döhner K; AML Study Group. The prognostic value of MLL-AF9 detection in patients with t(9;11)(p22;q23)-positive acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2005; 90(12): 1626-1634.
- 131.Yin JA, O'Brien MA, Hills RK, Daly SB, Wheatley K, Burnett AK. Minimal residual disease monitoring by quantitative RT-PCR in core binding factor AML allows risk stratification and predicts relapse: results of the United Kingdom MRC AML-15 trial. *Blood* 2012;120(14): 2826-35.

132. Zhu HH, Zhang XH, Qin YZ, Liu DH, Jiang H, Chen H, et al. MRD-directed risk stratification treatment may improve outcomes of t(8;21) AML in the first complete remission: results from the AML 05 multicenter trial. *Blood* 2013; 121 (20): 4056-62.
133. Paietta E. Minimal residual disease in acute myeloid leukemia: coming of age. *Hematol Educ Program* 2012; 35-42.
134. Gorello P, Cazzaniga G, Alberti F, et al. Quantitative assessment of minimal residual disease in acute myeloid leukemia carrying nucleophosmin (NPM1) gene mutations. *Leukemia* 2006; 20:1103-08.
135. Schlenk RF, Döhner K, Krauter J, Fröhling S, Corbacioglu A, Bullinger L, et al. German-Austrian Acute Myeloid Leukemia Study Group. Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2008;358(18):1909-18.
136. Kramer M, Bornhäuser M, Schaich M, Schetelig J, Platzbecker U, Röllig C, et al. Study Alliance Leukemia (SAL). The level of residual disease based on mutant NPM1 is an independent prognostic factor for relapse and survival in AML. *Blood* 2013; 122(1):83-92
137. Ivey A, Hills RK, Simpson MA, Jovanovic JV, Gilkes A, Grech A, et al. UK National Cancer Research Institute AML Working Group. Assessment of Minimal Residual Disease in Standard-Risk AML. *N Engl J Med* 2016; 374(5):422-433.
138. Thol F, Damm F, Wagner K, Göhring G, Schlegelberger B, Hoelzer D, et al. Prognostic impact of *IDH2* mutations in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Blood* 2010; 116: 614-6.
139. Schnittger S, Haferlach C, Ulke M, Alpermann T, Kern W, Haferlach T. *IDH1* mutations are detected in 6.6% of 1414 AML patients and are associated with intermediate risk karyotype and unfavorable prognosis in adults younger than 60 years and unmutated *NPM1* status. *Blood* 2010; 116: 5486-96.

140. Chou WC, Lei WC, Ko BS, Hou HA, Chen CY, Tang JL, et al. The prognostic impact and stability of Isocitrate dehydrogenase 2 mutation in adult patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2011; 25: 246-253.
141. Chou WC, Peng KY, Lei WC, Ko BS, Tsay W, Kuo CH, et al. Persistence of mutant isocitrate dehydrogenase in patients with acute myeloid leukemia in remission. *Leukemia* 2012; 26: 527-529.
142. Jeziskova I, Razga F, Bajerovala M, Racil Z, Mayer J, Dvorakova D. *IDH2* mutations in patients with acute myeloid leukemia: missense p.R140 mutations are linked to disease status. *Leuk Lymphoma* 2010; 51: 2285-87.
143. Cilloni D, Renneville A, Hermitte F, Hills RK, Daly S, Jovanovic JV, et al. Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction detection of minimal residual disease by standardized *WT1* assay to enhance risk stratification in acute myeloid leukemia: A European Leukemia Net Study. *J Clin Oncol.* 2009; 27(31): 5195-5201.
144. Lambert J, Nibourel O, Pautas C, Hayette S, Cayuela JM, Terré C, Rousselot P, et al. MRD assessed by *WT1* and *NPM1* transcript levels identifies distinct outcomes in AML patients and is influenced by gemtuzuma ozogamicin. *Oncotarget.* 2014;5(15):6280-88.
145. Ossenkuppele GJ, van de Loosdrecht AA, Schuurhuis GJ Review of the relevance of aberrant antigen expression by flow cytometry in myeloid neoplasms. *Br J Haematol* 2011;153(4):421-436.
146. Olaru D, L Campos, Flandrin P, N Nadal, Duval A, Chautard S, D. Guyotat Multiparametric analysis of normal and postchemotherapy bone marrow: Implication for the detection of leukemia-associated immunophenotypes. *Cytometry B ClinCytom* 2008; 74 (1): 17-24.
147. Kern W, Haferlach T, Schoch C, Loffler H, Gassmann W, Heinecke A, et al. Early blast clearance by remission induction therapy is a major independent prognostic factor for both achievement of complete remission and long-term outcome in acute myeloid leukemia: data from the German AML Cooperative Group (AMLCG)1992Trial. *Blood* 2003; 101: 64-70.

148. Walter RB. Should acute myeloid leukemia patients with actionable targets be offered investigational treatment after failing one cycle of standard induction therapy? *Curr Opin Hematol* 2016; 23 (2): 102-7.
149. Venditti A, Buccisano F, Del Poeta G, Maurillo L, Tamburini A, Cox C, et al. Level of minimal residual disease after consolidation therapy predicts outcome in acute myeloid leukemia. *Blood* 2000; 96, 3948-3952.
150. Buccisano F, Maurillo L, Del Principe MI, Del Poeta G, Sconocchia G, Lo-Coco F, et al. Prognostic and therapeutic implications of minimal residual disease detection in acute myeloid leukemia. *Blood* 2012; 119: 332-341.
151. Buccisano F, Maurillo L, Spagnoli A, Del Principe MI, Fraboni D, Panetta P, et al. Cytogenetic and molecular diagnostic characterization combined to post-consolidation minimal residual disease assessment by flow-cytometry improves risk stratification in adult acute myeloid leukemia. *Blood*; 2010;116:2295-2303.
152. Grimwade D, SD Freeman. Defining minimal residual disease in acute myeloid leukemia: which platforms are ready for "prime time"? *Blood* 2014; 124 (23): 3345-55.
153. Ossenkoppele GJ, Schuurhuis. MRD in AML: it is time to change the definition of remission. *Best Pract Res Clin Oncol*. 2014; 27 (3-4): 265-271.
154. Othus M, Kantarjian H, Petersdorf S, Ravandi F, Godwin J, Cortes J, et al. Declining rates of treatment-related mortality in patients with newly diagnosed AML given 'intense' induction regimens: a report from SWOG and MD Anderson. *Leukemia* 2014; 28 (2): 289-292.
155. Bullinger L, Dohner K, Döhner H. Genomics of acute myeloid leukemia diagnosis and pathways. *J Clin Oncol* 2017. In press.
156. Meyer SC, Levine RL. Translational implications of somatic genomics and acute myeloid leukemia. *Lancet Oncol*. 2014; 15 (9): 382 to 394. Kouchkovsky ID i Hay MA. Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update' *Blood Cancer Journal* 6, e441.
157. Port M, Bottcher M, Thol F, Ganser A, Schlenk R, Wasem J, et al. Prognostic significance of FLT3 internal tandem duplication, nucleophosmin 1, and CEBPA

- gene mutations for acute myeloid leukemia patients with normal karyotype and younger than 60 years: a systematic review and meta-analysis. *Ann Hematol* 2014; 93: 1279–86.
158. Patel JP, Gonen M, Figueroa ME, Fernandez H, Sun Z, Racevskis J, et al. Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2012; 366: 1079–89.
159. Tsai CH, Hou HA, Tang JL, Liu CY, Lin CC, Chou WC, et al. Genetical terations and their clinical implications in older patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2016; 30(7):1485-92.
160. Metzeler KH, Herold T-Thurley Rothenberg M, Amler S, Sauerland MC, Görlich D, et al; AMLCG Study Group. Spectrum and prognostic relevance of driver mutations in genes of acute myeloid leukemia. *Blood* 2016; 128 (5): 686-698.
161. Papaemmanuil E, M Gerstungen, Bullinger L, Gaidzik VI, Paschka P, Roberts ND, et al. Genomic classification and prognosis in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2016; 374 (23): 2209-21.
162. Micol JB, Boissel N, Renneville A, Castaigne S, Gardin C, Preudhomme C, et al. The role of cytogenetic abnormalities in acute myeloid leukemia with *NPM1* mutations and no *FLT3* internal tandem duplication. *Blood* 2009; 114 (20): 4601-02.
163. Linch DC, Hills RK, Burnett AK, A Khwaja, Gale RE. Impact of *FLT3 (ITD)* mutant allele level on relapse risk and intermediate-risk acute myeloid leukemia. *Blood* 2014; 124 (2): 273-276.
164. Schlenk RF, Kayser S, Bullinger L, Kobbe G, Casper J, Ringhoffer M, et al; German Austrian AML Study Group. Differentil impact of allelic ratio and insertionsitein *FLT3-ITD* positive AML with respectto allogeneic transplantation. *Blood* 2014; 124 (23): 3441-49.
165. Paschka P, Schlenk RF, Gaidzik VI, Habdank M, Krönke J, Bullinger L, et al. *IDH1* and *IDH2* mutations are frequent genetic alterations in acute myeloid leukemia and confer adverse prognosis in cytogenetically normal acute myeloid leukemia with *NPM1* mutation without *FLT3* internal tandem duplication. *J Clin Oncol* 2010; 28:3636-3643.

166. Boissel N, Nibourel O, Renneville A, Gardin C, Reman O, Contentin N, et al. Prognostic impact of isocitrate dehydrogenase enzyme isoforms 1 and 2 mutations in acute myeloid leukemia: a study by the Acute Leukemia French Association group. *J Clin Oncol* 2010; 28:3717-23.
167. Marcucci G, Maharry K, Wu YZ, Radmacher MD, Mrózek K, Margeson D, et al. *IDH1* and *IDH2* gene mutations identify novel molecular subsets within de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol* 2010; 28:2348-55.
168. Zhou KG, Jiang LJ, Shang Z, Wang J, Huang L, Zhou JF, et al. Potential application of *IDH1* and *IDH2* mutations as prognostic indicators in non-promyelocytic acute myeloid leukemia: a meta-analysis. *Leuk Lymphoma* 2012; 53:2423–29.
169. Im AP, Sehgal AR, Carroll MP, Smith BD, Tefferi A, Johnson DE, et al. *DNMT3A* and *IDH* mutations in acute myeloid leukemia and other myeloid malignancies: associations with prognosis and potential treatment strategies. *Leukemia* 2014; 28:1774-83.
170. Yamaguchi S, Iwanaga E, Tokunaga K, Nanri T, Shimomura T, Suzushima H, et al. *IDH1* and *IDH2* mutations confer an adverse effect in patients with acute myeloid leukemia lacking the *NPM1* mutation. *Eur J Haematol* 2014; 92:471-477.
171. Patel KP, Ravandi F, Ma D, Paladugu A, Barkoh BA, Medeiros LJ, et al. Acute myeloid leukemia with *IDH1* or *IDH2* mutation: frequency and clinicopathologic features. *Am J Clin Pathol* 2011, 135:35-45.
172. Chou WC, Lei WC, Ko BS, Hou HA, Chen CY, Tang JL, et al. The prognostic impact and stability of Isocitrate dehydrogenase 2 mutation in adult patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2011, 25:246-253.
173. Wagner K, Damm F, Göhring G, Görlich K, Heuser M, Schäfer I, et al. Impact of *IDH1* R132 mutations and an *IDH1* single nucleotide polymorphism in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: SNP rs11554137 Is an Adverse Prognostic Factor. *J Clin Oncol* 2010; 28:2356-64.

174. Chou WC, Hou HA, Chen CY, Tang JL, Yao M, Tsay W, et al. Distinct clinical and biologic characteristics in adult acute myeloid leukemia bearing the isocitrate dehydrogenase 1 mutation. *Blood* 2010; 115:2749-54.
175. Chotirat S, Thongnoppakhun W, Promsuwicha O, Boonthimat C, Auewarakul CU et al. Molecular alterations of isocitrate dehydrogenase 1 and 2 (*IDH1* and *IDH2*) metabolic genes and additional genetic mutations in newly diagnosed acute myeloid leukemia patients. *J Hematol Oncol* 2012; 5:5.
176. Nomdedéu J, Hoyos M, Carricondo M, Esteve J, Bussaglia E, Estivill C, et al. Adverse impact of *IDH1* and *IDH2* mutations in primary AML: experience of the Spanish CETLAM group. *Leuk Res* 2012; 36:990-997.
177. Ravandi F, Patel K, Luthra R, Faderl S, Konopleva M, Kadia T, et al. Prognostic significance of alterations in IDH enzyme isoforms in patients with AML treated with high-dose cytarabine and idarubicin. *Cancer* 2012; 118:2665-73.
178. Thol F, Damm F, Wagner K, Göhring G, Schlegelberger B, Hoelzer D, Lübbert M et al. Prognostic impact of *IDH2* mutations in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Blood* 2010; 116:614-616.
179. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med* 1985;103:620–625.
180. Oken MM, Creech RH, Tormey DC, Horton J, Davis TE, McFadden ET, et al. Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Am J Clin Oncol* 1982;5:649-55.
181. Zola H, Swart B, Boumsell L, Mason DY. CD molecules 2005: Human cell differentiation molecules. *Blood* 2005;106: 3123-26.
182. European Leukemia Net-WP-10, Consensual recommendations on preanalytical precautions for the immunophenotyping of leukemia and lymphoproliferative disorders. 2005a.
183. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) document H43-A2 – ClinicalFlow Cytometric Analysis of Neoplastic Hematolymphoid Cells; Approved Guideline[Second Edition 2007]

184. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, et al. *ITS Classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*. 4th ed. Lyon: IARC Press; 2008.
185. International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN). *Recommendations for the International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature*. Memphis, Tennessee, USA, Oct 9-15, 1994.
186. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977; 74(12):5463-7.
187. Cheson BD, Bennet JM, Kopecky KJ, Buchner T, Willman CL, Estey EH et al. International Working Group for diagnosis, standardization of response criteria, treatment outcomes, and reporting standards for therapeutic trials in acute myeloid leukemia. Revised recommendations of the international working group for diagnosis, standardization of response criteria, treatment outcome, and reporting standards for therapeutic trials in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2003;21:4642–9.
188. Mardis ER, Ding L, Dooling DJ, Larson DE, McLellan MD, Chen K, et al. Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. *N Engl J Med* 2009; 361:1058-66.
189. Kelly LM, Gilliland DG. Genetics of myeloid leukemias. *Annu. Rev Genomics Hum Genet* 2002; 3:179-198.
190. Fröhling S, Scholl C, Gilliland DG, Levine RL. Genetics of myeloid malignancies: pathogenetic and clinical implications. *J Clin Oncol* 2005; 23:6285-95.
191. Abdel-Wahab O, Manshouri T, Patel J, Harris K, Yao J, Hedvat C, et al. Genetic analysis of transforming events that convert chronic myeloproliferative neoplasms to leukemias. *Cancer Res* 2010; 70:447-452.
192. Tefferi A, Jimma T, Sulai NH, Lasho TL, Finke CM, Knudson RA, et al. IDH mutations in primary myelofibrosis predict leukemic transformation and shortened survival: clinical evidence for leukemogenic collaboration with *JAK2V617F*. *Leukemia* 2012; 26:475-480.
193. Gross S, Cairns RA, Minden MD, Driggers EM, Bittinger MA, Jang HG, et al. Cancer-associated metabolite 2-hydroxyglutarate accumulates in acute myelogenous leukemia with isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations *J Exp Med* 2010; 207:339-344.

194. Rakheja D, Konoplev S, Medeiros J, Chen W. *IDH* mutations in acute myeloid leukemia *Human Pathology* 2012; 1541-51.
195. Green CL, Evans CM, Zhao L, Hills RK, Burnett AK, Linch DC, et al. The prognostic significance of *IDH2* mutations in AML depends on the location of the mutation. *Blood* 2011;118:409-12.
196. Röllig C and Ehninger G. How I treat hyperleukocytosis in acute myeloid leukemia. *Blood* 2015; 125:3246-52.

SPISAK SKRAĆENICA

AML	akutna mijeloidna leukemija
AML-NK	AML sa normalnim kariotipom
<i>IDH 1</i>	izocitrat dehidrogenaza 1
<i>IDH2</i>	izocitrat dehidrogenaza 2
t-AML	therapy related-myeloid neoplasms
MDS	mijelodisplastični sindrom
FLT3	fms-like tyrosine kinase 3
FLT3-ITD	FLT3- internal tandem duplications
CBF	core binding factor
<i>CEBPA</i>	CCAAT Mixed Lineage Leukemia -/enhancer binding protein alpha
<i>MLL</i>	mixed lineage leukemia
<i>PML-RARα</i>	retinoic acid receptor- α
APL	akutna promijelocitna leukemija
<i>NPM1</i>	nucleophosmin
<i>WT1</i>	Wilms' Tumor
NADP	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
2-HG	2-hidroksiglutarat
<i>TET2</i>	ten eleven translocation
MČH	matična ćelija hematopoeze
<i>ASXL1</i>	additional sex comb-like 1
DNA	deoxyribonucleic acid
<i>DNMT3A</i>	DNA methyltransferase 3 genes
FAB	Francusko-američko-britanska grupa
SZO	svetska zdravstvena organizacija
MPO	mijeloperoksidaza
SBB	sudan black B
NSE	nespecifična esteraza

PAS	periodic acid- Schiff
MPAL	akutna leukemija mešovutih linija
MRB	minimalna rezidualna bolest
AUL	acute undifferentiated leukemia
FISH	fluorescencija <i>in situ</i> hibridizacija
RT-PCR	reverse transcriptase–polymerase chain reaction
LDH	laktatdehidrogenaza
DIK	diseminovana intravaskularna koagulacija
KR	kompletna remisija
NCRI	United Kingdom National Cancer Research Institute
TMČH	transplantacija matične ćelije hematopoeze
CIBMTR	Center for International Blood and Marrow Transplant Research
HT	hemioterapija
RIC	reduced-intensity conditioning
TRM	treatment-related mortality
LDAC	low dose Ara-C
HMA	hipometilirajući agensi
MPFC	multiparametric flowcytometry
EPI	Evropski prognostički indeks
RS	rana smrt
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
HCT-CI	Hematopoietic cell transplantation- comorbidity index
Ag	antigen

BIOGRAFIJA

Marijana Virijević rođena je 23.01.1975. godine u Beogradu. Medicinski fakultet u Beogradu upisala je školske 1994/95.godine, a diplomirala 26.04.2001. godine sa prosečnom ocenom 9,00 (devet). U periodu 2001.-2002. obavila je lekarski staž u Kliničkom Centru Srbije, Beograd. Radni odnos u Klinici za hematologiju zasnovala je 15.01.2007. godine. Specijalizaciju iz Interne medicine na Medicinskom fakultetu u Beogradu započela 01.10.2002. godine i završila 28.06.2007. godine.

Rad iz specijalističkih akademskih studija pod nazivom “Komparativna analiza MALT limfoma gastrointerstinalne i negastrointerstinalne lokalizacije: Značaj kliničko-laboratorijskih parametara i proliferativnog markera Ki67 za ishod bolesti” odbranila je 09.07.2010. (mentor Prof. Dr Biljana Mihaljević).

Rad iz uže specijalizacije pod nazivom: “Procena terapijskog odgovora nakon primene FLAG-IDA protokola u lečenju recidiva i refraktarnih akutnih leukemija” odbranila je 22.06.2012. pod mentorstvom Prof. dr Nada Suvajdžić-Vuković.

Doktorske studije smer molekularna medicina je upisala školske 2011/12. Izrada doktorske disertacije pod nazivom »Prognostički značaj mutacija u genu za izocitrat dehidrogenazu 1 (*IDH1*) i izocitrat dehidrogenazu 2 (*IDH2*) u akutnoj mijeloidnoj leukemiji sa normalnim kariotipom« odobrena je odlukom Veća naučnih oblasti medicinskih nauka na sednici održanoj 03.12.2014. godine, za mentora je određen prof. dr Dragica Tomin.

Novembra 2016. godine izabrana je za kliničkog asistenta za užu naučnu oblast Interna medicina (hematologija).

Marijana Virijević je autor u 14 radova publikovanih časopisima indeksiranim u Current Contentsu (CC) ili Science Citation Index-u (SCI), pri čemu je prvi autor u 3 radova. Takođe je autor u 2 radova objavljenih u časopisima indeksiranim u Science Citation Index-u (SCI) Expanded i jednog rada koji je objavljen časopisima koji nisu uključeni u gore pomenute baze podataka.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani-a Marijana Virijević

broj upisa MM-19/11

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

Prognostički značaj mutacija u genima za izocitrat dehidrogenazu 1 (IDH1) i izocitrat dehidrogenazu 2 (IDH2) u akutnoj mijeloidnoj leukemiji sa normalnim kariotipom

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 25.05.2017.

Marijana Virijević

Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora _____ Marijana Virijević _____

Broj upisa _____ MM-19/11 _____

Studijski program Doktorske studije, smer molekularna medicina

Naslov rada: Prognostički značaj mutacija u genima za izocitrat dehidrogenazu 1 (IDH1) i izocitrat dehidrogenazu 2 (IDH2) u akutnoj mijeloidnoj leukemiji sa normalnim kariotipom

Mentor Prof dr Dragica Tomin _____

Potpisani _____ Marijana Virijević _____

izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 25.05.2017.

Marijana Virijević

Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

„Prognoštički značaj mutacija u genima za izocitrat dehidrogenazu 1 (IDH1) i izocitrat dehidrogenazu 2 (IDH2) u akutnoj mijeloidnoj leukemiji sa normalnim kariotipom“

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim prilogima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

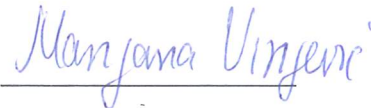
Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poleđini lista).

Potpis doktoranda

U Beogradu, 25.05.2017.



1. Autorstvo - Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.
2. Autorstvo – nekomercijalno. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
3. Autorstvo - nekomercijalno – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.
4. Autorstvo - nekomercijalno – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.
5. Autorstvo – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
6. Autorstvo - deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.