

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Zlatko D. Pravdić

PROGNOSTIČKI I PREDIKTIVNI ZNAČAJ
POLIMORFIZAMA I EKSPRESIJE GENA ZA PROTEINE
UKLJUČENE U TRANSPORT I METABOLIZAM
CITARABINA I ANTRACIKLINAI REGULACIJU
APOPTOZE U AKUTNOJ MIJELOIDNOJ LEUKEMIJI
ODRASLIH

Doktorska disertacija

Beograd, 2024

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF MEDICINE

Zlatko D. Pravdić

PROGNOSTIC AND PREDICTIVE INFLUENCE OF
POLYMORPHISMS AND GENE EXPRESSION OF
PROTEINS INVOLVED IN TRANSPORT AND
METABOLISM OF CITARABINE AND ANTHRACYCLINES
AND APOPTOSIS REGULATION IN ADULT ACUTE
MYELOID LEUKEMIA

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2024

MENTOR:

prof. dr Nada Suvajdžić-Vuković, redovni profesor
Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE:

1. **prof. dr Ana Vidović**, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
2. **prof. dr Marija Plješa Ercegovac**, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
3. **doc. dr Mirjana Mitrović**, docent Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
4. **n.sav dr Sonja Pavlović**, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo Univerziteta u Beogradu
5. **prof. dr Aleksandar Savić**, redovni profesor Medicinskog fakulteta u Univerziteta u Novom Sadu

DATUM ODBRANE:

U Beogradu, _____

Prognostički i prediktivni značaj polimorfizama i ekspresije gena za proteine uključene u transport i metabolizam citarabina i antraciklina i regulaciju apoptoze u akutnoj mijeloidnoj leukemiji odraslih

SAŽETAK

Uvod: Značajne razlike u odgovoru na standardnu indukcionu terapiju, zasnovanu na citarabinu i antraciklinu, u odraslih bolesnika sa akutnom mijeloidnom leukemijom (AML), delimično bi se mogle objasniti genetičkim varijabilitetom metaboličkih puteva citarabina i antraciklina, kao i poremećenoj regulaciji apoptoze. Cilj ovog istraživanja bilo je ispitivanje uticaja polimorfizama u farmakogenima *SLC29A1* (engl. *solute carrier family 29 member 1*), *DCK* (gen za deoksicitidin kinazu), *ABCB1* (engl. *ATP binding cassette subfamily B member 1*), *GSTM1* i *GSTT1* (geni za glutation-S transferaze M1 i T1) i ekspresije antiapoptotskog *BCL2* (engl. *B-cell leukaemia 2*) i proapoptotskog *BAX* (engl. *BCL2 associated X*) i gena rezistencije na lekove (*ABCB1*), sa jedne strane i demografskih, kliničkih, laboratorijskih i parametara vezanih za AML, sa druge strane, na ishode lečenja odraslih bolesnika sa AML.

Materijal i metode. Ukupno 100 bolesnika sa AML uključeno je u studiju. Farmakogenetički polimorfizmi *SLC29A1* rs9394992, *DCK* rs12648166, *ABCB1* rs2032582 i delecije gena *GSTM1* i *GSTT1* određivane su metodologijom zasnovanom na PCR-u, analizom fragmenata i direktnim sekvenciranjem. U podgrupi pedesetjednog bolesnika sa AML i normalnim kariotipom (NK), analizirane su ekspresije gena *BCL2*, *BAX* i *ABCB1* PCR-om. Sve analize su sprovedene na uzorcima koštane srži uzete na dijagnozi. Korišćene su metode deskriptivne i analitičke statistike. Analiza preživljavanja je sprovedena prema Kaplan-Majerovom metodu upotrebom Log-Rank testa.

Rezultati. Ovo je prva farmakogenetička i farmakotranskriptomička studija odraslih bolesnika sa AML u srpskoj populaciji. Polimorfizmi u genima *SLC29A1*, *DCK*, *ABCB1*, *GSTM1* i *GSTT1* nisu uticale na ishode lečenja u našoj kohorti obolelih od AML, samostalno ili u međusobnim kombinacijama. Međutim, postizanje kompletne remisije (KR) bolesti istaklo se kao nezavisni prediktor ishoda lečenja. Analiza u podgrupi NK AML bolesnika pokazala je da je povećana ekspresija *BCL2* (*BCL2*⁺) udružena sa pojavom rezistencije ($p=0,024$), snižena ekspresija *BAX*-a sa relapsom ($p=0,047$), dok je u analizi združenog uticaja *BAX*-a i *BCL2*, 87% bolesnika sa *BAX/BCL2*^{nizak} statusom bilo primarno refraktarno ($p=0,044$). Povišena ekspresija *ABCB1* bila je udružena sa *BCL2*⁺ statusom ($p<0,001$) i odsustvom mutacije *FLT3-ITD* (engl. *fms related receptor tyrosine kinase 3 inter tandem duplication*) ($p=0,019$).

Zaključci. Polimorfizmi gena *SLC29A1*, *DCK*, *ABCB1*, *GSTM1* i *GSTT1* nisu uticali na ishode lečenja i preživljavanje, pojedinačno ili u međusobnim kombinacijama. U podgrupi NK AML bolesnika uočeni su: veća stopa rezistencije kod visoke ekspresije *BCL2*, veća stopa relapsa kod niske ekspresije *BAX*-a i češća primarna refraktarnost u onih sa *BAX/BCL2*^{nizak} statusom. Postizanje KR, u multivarijantnoj analizi, istaklo se kao nezavisni i jedini prediktor preživljavanja bez bolesti i ukupnog preživljavanja u našoj grupi odraslih novodijagnostikovanih bolesnika sa AML.

Ključne reči: akutna mijeloidna leukemija, citarabin, antraciklini, polimorfizmi gena, *SLC29A1*, *DCK*, *ABCB1*, *GST*, *BCL2*, *BAX*

Naučna oblast: Interna medicina

Uža naučna oblast: Biologija tumora i oksidativna oboljenja

UDK broj: _____

Prognostic and predictive influence of polymorphisms and gene expression of proteins involved in transport and metabolism of cytarabine and anthracyclines and apoptosis regulation in adult acute myeloid leukaemia

ABSTRACT

Background: Remarkable differences in therapy response among acute myeloid leukaemia (AML) patients, treated with standard cytarabine-anthracycline remission induction chemotherapy, could be partly explained by the patients' genetic variability related to metabolic paths of cytarabine and anthracyclines and dysregulation of apoptosis. The aim of this study is to evaluate the effect of polymorphisms in pharmacogenes *SLC29A1* (*solute carrier family 29 member 1*), *DCK* (*deoxycytidine kinase*), *ABCB1* (*ATP binding cassette subfamily B member 1*), *GSTM1* and *GSTT1* (*glutathione-S transferases M1 and T1*) and gene expression profiles of anti-apoptotic *BCL2* (*B-cell leukaemia 2*), pro-apoptotic *BAX* (*BCL2 associated X*) and multi-drug resistance (*ABCB1*), as well as laboratory and AML-related parameters on clinical outcomes and survival in adult AML patients.

Methods: A total of 100 AML patients were included in the study. Pharmacogenetic polymorphisms *SLC29A1* rs9394992, *DCK* rs12648166, *ABCB1* rs2032582, *GSTM1* and *GSTT1* gene deletions were detected by methodology based on PCR, fragment analysis and direct sequencing. In subgroup of 51 normal karyotype (NK) AML patients the expression of *BCL2*, *BAX* and *ABCB1* was analysed by PCR. All of the analyses were performed from bone marrow specimens obtained at diagnosis. Descriptive, analytic and survival (using Kaplan-Meier method / Log-Rank test) statistical analysis were performed.

Results: This is the first study of pharmacogenetics and pharmacotranscriptomics in adult Serbian AML population. Clinical outcomes in our cohort of AML patients were not impacted by analysed polymorphisms in *SLC29A1*, *DCK*, *ABCB1*, *GSTM1* and *GSTT1* genes, independently or in combinations. Achievement of complete remission (CR) was identified as an independent prognostic indicator of clinical outcome. Subgroup analysis of NK AML patients showed high expression of *BCL2* (*BCL2*⁺) was associated with chemoresistance (p=0.024), while patients with decreased *BAX* expression were susceptible to relapse (p=0.047). Joint effects of the *BCL2* and *BAX* expression revealed that 87% of patients with *BAX/BCL2*^{low} were chemo resistant (p=0.044). Increased *ABCB1* expression corelated with *BCL2*⁺ (p<0.001) and with absence *FLT3-ITD* (*fms related receptor tyrosine kinase 3 inter tandem duplication*) mutations (p=0.019).

Conclusions: polymorphisms of *SLC29A1*, *DCK*, *ABCB1*, *GSTT1* and *GSTM1* didn't influence clinical outcomes, either independently or in combinations. Subgroup analysis of NK AML patients revealed that high *BCL2* expression was related with chemoresistance while low expression of *BAX* with grater relapse rate. In addition, the patients with *BAX/BCL2*^{low} status experienced primary refractoriness more frequently. Moreover, achievement of CR, in multivariate analysis, was independent and unique predictor of disease free and overall survival in our cohort of adult newly diagnosed AML patients.

Keywords: acute myeloid leukaemia, cytarabine, anthracyclines, gene polymorphisms, *SLC29A1*, *DCK*, *ABCB1*, *GST*, *BCL2*, *BAX*

Scientific field: Internal medicine

Scientific subfield: Tumor biology and oxidative diseases

UDK number: _____

Zahvaljujem,

Svom mentoru i učitelju hematologije prof. dr Nadi Suvajdžić Vuković na bezrezervnoj podršci, strpljenju i vođenju tokom izrade moje doktorske disertacije

Prof. dr Ani Vidović takođe mom učitelju na stručnoj edukaciji u oblasti akutnih leukemija

Prof. dr Mariji Plješi Ercegovac na dobrim savetima u formulisanju teme za moj doktorski rad

Doc. dr Mirjani Mitrović istaknutoj u oblasti benigne hematologije na podršci u formulisanju teme, praćenju toka pisanja radova do finalne izrade doktorske disertacije

Naučnom sav. dr Sonji Pavlović rukovodiocu Projekta u okviru kojeg je disertacija urađena na pomoći u odabiru teme, finansijskoj i stručnoj podršci u sprovođenju analiza pri izradi disertacije

Naučnom sav. dr Nataši Tošić na nesebičnom zalaganju u sprovođenju analiza i naučnom doprinosu u izradi moje disertacije

Doc. dr Marijani Virijević, kolegici i članu tima za akutne leukemije na stalnoj pomoći dobrim savetima i sugestijama dok sam pisao disertaciju

Naučnom sar. dr Vladimiru Gašiću na predanosti tokom sprovođenja analiza

Članovima Laboratorije za molekularnu biomedicinu Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo i mojim kolegama sa Klinike za hematologiju Univerzitetskog kliničkog centra Srbije

Takođe, zahvaljujem i svojim roditeljima i dr Anici Divac na stalnoj brizi i podsticanju da rad uspešno privedem kraju

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1. Akutna mijeloidna leukemija (AML): definicija.....	1
1.2. Epidemiologija AML	1
1.3. Istorijat AML.....	1
1.4. Etiologija AML	3
1.5. Patogeneza AML.....	4
1.6. Dijagnoza AML.....	4
1.7. Citogenetičko-molekularna obeležja bolesti i prognoza	5
1.7.1. <i>FLT3</i> mutacija.....	7
1.7.2. Mutacija <i>NPM1</i>	7
1.7.3. Mutacije <i>CEBPA</i>	7
1.7.4. Stariji stratifikacioni sistemi grupa rizika.....	7
1.8. Klasifikacije AML	8
1.8.1 Citološko-morfološka klasifikacija.....	8
1.8.2. Klasifikacija prema Svetskoj zdravstvenoj organizaciji (SZO) iz 2022.....	9
1.9. Dva genoma obolelih od AML.....	10
1.10. Farmakogenetika, farmakotranskriptomika i personalizovana medicina.....	10
1.11. Lečenje AML	11
1.11.1. Citarabin	11
1.11.2. Antraciklini.....	13
1.12. Refraktarnost na lečenje AML	15
1.12.1. Transportna rezistencija u AML.....	15
1.12.2. Apoptoza i apoptotska rezistencija u AML	15
1.12.3. Farmakotranskripcioni markeri u AML.....	16
2. Ciljevi istraživanja	17
3. Materijal i metode	18
3.1. Dizajn studije.....	18
3.2. Studijska populacija, mesto i period istraživanja	18
3.3. Selekcija ispitanika.....	18
3.4. Kontrolna grupa.....	19
3.5. Etički aspekti istraživanja.....	19
3.6. Materijal	19
3.7. Kliničke karakteristike i osnovna hematološka ispitivanja	20
3.8. Analiza parametara krvne slike	20
3.9. Biohemijske analize	20

3.10. Citomorfološka analiza mijelograma	20
3.11. Imunofenotipizacija ćelija koštane srži metodom protočne citometrije.....	20
3.11.1. Monospecifična antitela.....	21
3.11.2. Direktna multikolorna imunofluorescencija.....	21
3.11.3. Obrada uzoraka multiparametarskom protočnom citometrijom.....	21
3.12. Klasična citogenetička analiza (kariotip)	22
3.13. Molekularno-genetička ispitivanja	22
3.13.1. Izolacija mononukleara koštane srži.....	23
3.13.2. Izolacija DNK iz mononukleara.....	23
3.13.3. Polimerazno lančano umnožavanje DNK – opis metode	23
3.13.4. Određivanje mutacije <i>FLT3-ITD</i>	24
3.13.5. Određivanje mutacija <i>NPM1</i>	24
3.13.6. Genotipizacija polimorfizama u genima <i>SLC29A1</i> i <i>DCK</i>	25
3.13.7. Genotipizacija polimorfizama <i>ABCB1</i>	25
3.13.8. Detekcija delecija gena <i>GSTM1</i> i <i>GSTT1</i>	27
3.13.9. Izolacija RNK.....	28
3.13.10. Analiza ekspresije gena putem „ <i>real time</i> ” PCR-a (RT-PCR).....	28
3.13.11. Određivanje ekspresija gena <i>ABCB1</i> , <i>BCL2</i> i <i>BAX</i> komparativnom metodom ddCt ...	30
3.14. Ispitivanje uzoraka cerebrospinalnog fluida metodom multiparametarske protočne citometrije.....	32
3.15. Lečenje i procena odgovora na lečenje	32
3.16. Metode procene odgovora na terapiju.....	33
3.17. Određivanje merljive rezidualne bolesti (MRB).....	33
3.18. Metode prikupljanja podataka	34
3.19. Metode statističke analize podataka	34
4. Rezultati	35
4.1. Ispunjenost inkluzionih kriterijuma i odabir uzoraka za analizu	35
4.2. Demografske karakteristike bolesnika	35
4.2.1. Distribucija bolesnika i zdravih kontrola prema starosti i polu.....	36
4.3. Kliničke karakteristike bolesnika	37
4.3.1. Distribucija bolesnika prema kliničkim karakteristikama	37
4.4. Standardne laboratorijske karakteristike bolesnika.....	38
4.5. Karakteristike bolesnika vezane za AML	38
4.5.1. Raspodela bolesnika prema FAB-u	38
4.5.2. Raspodela bolesnika prema imunofenotipskim markerima blasta	38
4.5.3. Infiltracija CNS-a.....	39
4.5.4. Citogenetičko-molekularne karakteristike bolesnika	39

4.5.5. Raspodela bolesnika prema klasifikaciji SZO	41
4.6. Primenjeno lečenje, ishodi lečenja i preživljavanje u našoj grupi bolesnika	41
4.6.1. Indukciono lečenje	41
4.6.2. Odgovor na terapiju – kompletna remisija, rana smrtnost i primarno refraktarna bolest	42
4.6.3. Konsolidaciono lečenje i TMČH	43
4.6.4. Merljiva rezidualna bolest (MRB)	43
4.6.5. Relaps	43
4.6.6. Preživljavanje bez bolesti, bez događaja i ukupno preživljavanje (DFS, EFS i OS)	44
4.6.7. Analiza uticaja demografskih, kliničkih, standarnih laboratorijskih i parametara AML na ishode lečenja i preživljavanje	44
4.7. Analiza uticaja genskih polimorfizama na ishode lečenja i preživljavanje	45
4.7.1. Analiza uticaja prisustva pojedinačnih genskih polimorfizama u ispitivanim genima na ishode lečenja i preživljavanje	46
4.7.2. Analiza združenih uticaja genetičkih polimorfizama u ispitivanim genima na ishode lečenja i preživljavanje	47
4.8. Rezultati ekspresije gena <i>ABCB1</i> , <i>BAX</i> i <i>BCL2</i> u podgrupi pacijenata sa normalnim kariotipom	48
4.8.1. Rezultati ekspresije gena <i>ABCB1</i>	48
4.8.2. Rezultati ekspresije gena <i>BCL2</i>	50
4.8.3. Rezultati ekspresije <i>BAX</i> gena	52
4.8.4. Rezultati odnosa ekspresija gena <i>BAX/BCL2</i>	52
4.8.5. Povezanost između ekspresija gena <i>ABCB1</i> , <i>BAX</i> i <i>BCL2</i>	52
5. Diskusija	54
6. Zaključci	58
7. Literatura	59

1. Uvod

1.1. Akutna mijeloidna leukemija (AML): definicija

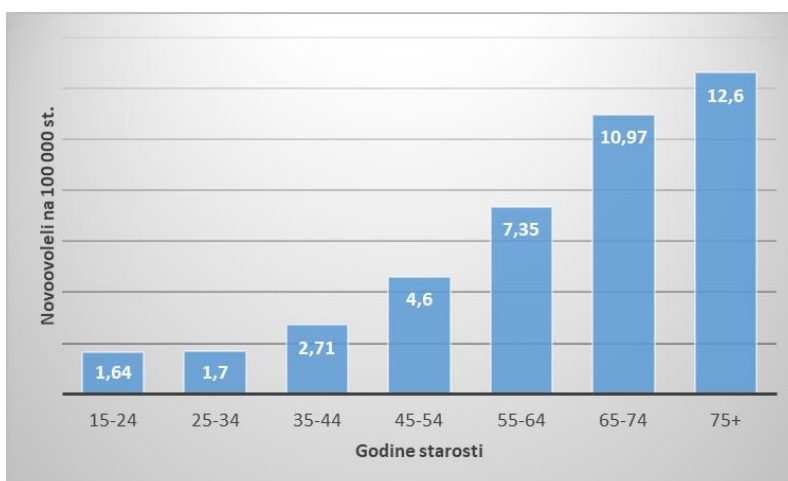
Akutna mijeloidna leukemija (AML) je klonalna bolest matične ćelije hematopoeze ili predodređene matične ćelije određene loze (granulocitne, eritrocitne ili megakariocitne) (1). AML predstavlja jednu od četiri vrste leukemije, prikazane u Tabeli 1.

Tabela 1. Osnovna klasifikacija leukemija

Ćelijska linija	Akutne	Hronične
Limfoidne	Akutna limfoblastna leukemija (ALL) – najčešća akutna leukemija dece	Hronična limfocitna leukemija (HLL) – najčešće kod starijih od 55 godina
Mijeloidne	Akutna mijeloidna leukemija (AML) – prisutna i kod mladih i starih	Hronična mijeloidna leukemija (HML) – najčešće kod odraslih

1.2. Epidemiologija AML

AML je najčešća akutna leukemija odraslih, sa incidencijom od 5-8/100.000 stanovnika u evropskoj populaciji (2). Pritom, 65% obolelih je starije od 60 godina (3), sa medijanom oboljevanja od 72 godine (1). Pokazana je nešto veća predominacija muškog pola među obolelima od AML i to u svim dobnim grupama, sem kod najmlađih (<24 godine) (2). Takođe, najveća stopa mortaliteta zabeležena je kod muškaraca u grupi 65-74 godine i u žena starijih od 75 godina (2). Kako je pokazano da incidencija i mortalitet u AML rastu sa starošću bolesnika (2), sve veći zdravstveni problem će predstavljati stariji bolesnici sa AML, pogotovo oni nepodobni za intenzivno lečenje.



Dijagram 1. Prosečne stope incidencije oboljevanja od AML, prilagođene uzrastu i razvrstane prema dobnim grupama, u populaciji grada Beograda u periodu 1999–2013. Dijagram napravljen prema podacima iz istraživanja Maksimovic N i sar 2018 (2).

1.3. Istorijat AML

Prvi opis bolesnika sa akutnom leukemijom (AL) jeste od strane Vlepea iz 1827 (4), koji opisuje: „cvečara i prodavca limunade, odanog alkoholu i ženama, koji pri tom ne oboleva od sifilisa”. Navedeni bolesnik žali se na umor, a prezentuje se distenzijom abdomena, febrilnošću i „posledicama uratnih kamenaca” (4-6). Fizikalni nalaz ukazuje na izraženu hepato/splenomegaliju, dok se krv bolesnika opisuje nalik „kaši” (4-6). Po hospitalizaciji bolesnik je ubrzo preminuo, stoga jasna dijagnoza AL nikada nije postavljena (4-6). Prvi opis AL dali su istovremeno 1845. dvojica

patologa, nemac Rudolf Virhof i englez Džon Benet (5,6). Virhof je predložio ime nem. *leukämie*, kovanicu od dveju grčkih reči: leukos (grč. Λευκός) – belo i haima (grč. αἷμα) – krv, dok je Benet dao ime *leukocypaenia*, implicirajući podtip pijemije. Dvadeset godina kasnije, potvrđena je Virhfova teza. Evolucija dijagnostike AL, prizazana je u Tabeli 2.

Tabela 2. Evolucija dijagnostike AML. Adaptirano prema *Paolo Piccaluga P. i sar.* (6)

Godina	Dostignuće
1600. god. PNE	Prvi pisani dokaz kancera u starom Egiptu
1670.	Analiza krvi pod složenim mikroskopom
1827.	Prvi klinički opis leukemije – Alfred Armand Luis Mari Valpeo
1847.	Pojam leukemija – Rudolf Virhof
1872.	Leukemija kao bolest k. srži – Franc Ern Kristijan Nojman
1877.	Histohemijsko bojenje – Pol Erlih
1913.	Distinkcija akutne i hronične, limfoidne i mijeloidne leukemije
1914.	Nastanak leukemije iz jedne ćelije usled hromozomskih promena – Teodor Boveri
1974.	FAB klasifikacija (citološka)
2008	SZO klasifikacija leukemija sa molekularnim podtipovima

Skraćenice: PNE – pre nove ere, FAB (Francusko-Američko-Britanska), SZO – Svetska zdravstvena organizacija

Od tada, pa do dana današnjeg neprestani su pokušaji u nalaženju adekvatnog tretmana ove bolesti. Prvi opis uspešnog tretmana AL datira iz 1930-ih godina 20. veka od strane dr. Glora iz Ciriha, koji je opisao „slučaj američkog biznismena”, kod koga je broj leukocita (Le) bio $100 \times 10^9/l$, praćen febrilnošću i anemijom (5-7) Primenjeno je lečenje iradijacijom, arsenikom i mezotorijumom (torijum-X), uz primenu transfuzija krvi, na koji je postignuta kompletna remisija bolesti (5,6). Nailazeći na nevericu od strane kolena u prikazane rezultate lečenja, Dr Glor po objavi svojih rezultata (7), biva premešten da radi u drugoj bolnici u udaljenom švajcarskom kantonu, a bolesnik Eugen Mecger, doživljava narednih pedesetak godina i umire u 102. godini života u Nju Jorku (5). Iako se u terapiji nekih leukemija (akutne promijelocitne) danas koristi arsenik, moguć uspeh lečenja ovog bolesnika može biti i primena transfuzije krvi, kao vida male transplantacije matičnih ćelija hematopoeze (TMČH). U Tabeli 3. prikazan je razvoj antileukemijskih terapija kroz vreme (6).

Tabela 3. Razvoj antileukemijskih terapija. Adaptirano prema *Paolo Piccaluga P. i sar* (6)

Godina	Dostignuće
1895	Primena radioterapije sa kratkotrajnim uspehom
1930	Izlečenje prvog bolesnika sa leukemijom uz pomoć arsen-trioksida, iradijacijom, mezotorijumom i transfuzijom krvi – Valter Glor
1969	FDA odobrava citarabin
1979	FDA odobrava daunorubicin
1983	FDA odobrava etopozid
1987	FDA odobrava mitoksantron

Skraćenice: FDA (engl. *Food and Drugs Administration*) – regulatorno telo Sjedinjenih Američkih Država, koje odobrava primenu leka

Sve do sedamdesetih godina 20. veka, prognoza obolelih od AML bila je nepovoljna, kada se u lečenje uvodi kombinacija citostatika citarabina i daunorubicina – shema „7+3” (8). Razvoj hemioterapije pratio je i razvioj TMČH. Tokom pedesetih godina 20. veka, subletalnom iradjacijom koštane srži miševa, a potom engraftmentom matičnih ćelija hematopoeze (MČH), postignut je nestatak leukemijskih ćelija (9). Potom je 1957. Donald Tomas sproveo prvu i.v. infuziju MČH iz

koštane srži u odraslih bolesnika (10). Kasniji razvoj TMČH pratili su različiti vidovi prikupljanja MČH – iz koštane srži, iz periferne krvi, iz krvi pupčanika, kako iz srodnika, tako i dobrovoljnih donora, što je vodilo prvom registru MČH u Ujedinjenom Kraljevstvu 1974 (6).

Zajedno sa razvojem antileukemijskih terapija, na preživljavanje značajno su uticali i poboljšanje simptomatsko-suportivne terapije, kako antimikrobne, tako i transfuzione. Na prvom mestu izdvaja se otkriće krvnih grupa 1901. od strane Landštajnera i sar, uspostavljanje prvih instituta za transfuziju krvi 1937. i primene transfuzije trombocita 1954 (6,11) (Tabela 4).

Tabela 4. Razvoj suportivno-simpomatskih mera i TMČH. Većinom adaptirano prema *Paolo Piccaluga P. i sar.* (6)

Godina	Dostignuće
1873	Prva transfuzija krvi u bolesnika sa leukemijom – Kalender
1901	Prvi opis krvnih grupa – Landštajner i sar.
1937	Prvi institut za transfuziju krvi pri bolnici
1954	Uvođenje transfuzija trombocita
1957	Prva singena TMČH
1968	Prva uspešna srodna TMČH (imunodeficijencija)
1972	Prva uspešna srodna TMČH (aplastična anemija)
1974	Prvi registar MČH (<i>Anthony Nolan Bone Marrow Registry</i>) UK
1977	Preživljavanje 18/110 bolesnika sa uznapredovalom leukemijom nakon nesrodne TMČH
1979	Uspeh > 50% za srodnu TMČH u bolesnika sa AML u KR1
1983	Prva uspešna haploidentična T-ćelijski depletirana TMČH
1986	Nacionalni program registra MČH u SAD
1989	Prva uspešna TMČH iz krvi pupčanika
1997	Prva uspešna TMČH kondicioniranjem sniženog intenziteta
2002	Prva generacija CAR-T ćelija
2005	Registar davalaca MČH Srbije

Skraćenice: TMČH – transplantacija MČH – matične ćelije hematopoeze, UK – Ujedinjeno Kraljevstvo, KR1 – prva kompletna remisija bolesti, SAD – Sjedinjene Američke Države, CAR-T (engl. *chimeric antigen receptor T cells*)

Razvoju precizne dijagnostike i pravilnom lečenju bolesnika sa AML značajno je doprinelo otkriće rekurentnih genetičkih aberacija sedamdesetih godina 20. veka, koje su prvi put dovele do stratifikacije bolesnika po grupama rizika za relaps bolesti (6,12,13). Kasnije dolaze tehnike bazirane na polimeraznoj lančanoj reakciji (engl. *polymerase chain reaction* – PCR), koje omogućavaju praćenje merljive rezidualne bolesti (MRB), stoga i pristup terapiji (intenzifikaciji, TMČH, ciljnoj terapiji). Konačno, tehnike bazirane na „sekvenciranju sledeće generacije” (engl. *next generation sequencing* – NGS) 2008. godine (14), doprinele su boljoj molekularnoj klasifikaciji AML (15), otkrivajući nove ciljne molekule i stvarajući preduslov za uspostavljanje personalizovane medicine (6).

1.4. Etiologija AML

AML nastaje usled brojnih genetičkih i epigenetičkih promena u nezrelim ćelijama hematopoeze (blastima), što rezultira blokom u sazrevanju, nekontrolisanoj proliferaciji i potiskivanju normalne hematopoeze (3). Iako somatske mutacije vode razvoju AML, prisustvo epigenetičkih promena na blastima, promene u mikrosredini koštane srži, kao i sveukupni funkcionalni kapacitet hematopoeznog sistema, značajno utiču na razvoj AML (16). Imajući u vidu da se današnje standardne metode dijagnostike baziraju primarno na dokazivanje promena u genomu somatskih ćelija leukemijskog klona, etiologija bolesti u većini slučajeva AML ostaje nepoznata.

Naime, nekoliko je faktora rizika za pojavu bolesti identifikovano, a to su ekspozicije jonizujućem zračenju, benzenu, benzenu i derivatima benzena, a koje mogu dovesti do oštećenja koštane srži i posledične leukemogeneze (1). Takođe, prethodna citotoksična terapija, primenjena u lečenju drugog maligniteta, može dovesti do razvoja tzv. *therapy-related* AML (16).

Određene bolesti, kao što su mijelodisplazni sindrom (MDS) i mijeloproliferativne neoplazne (MPN), a ređe aplastična anemija mogu se smatrati tzv. preleukemijskim stanjima (1).

Takođe, češća pojava AML je registrovana bolesnika sa određenim naslednim sindromima, kao što su Down-ov i Bloom-ov sindrom (1). Imajući u vidu sve veću spoznaju da AML ima i naslednu osnovu (engl. tzv. *germline predisposition*), poslednje preporuke Evropske radne grupe za leukemiju (engl. *European LeukemiaNet – ELN*) iz 2022. snažno preporučuju da se, pored standardne analize somatskih promena leukemijskog kлона, analiziraju i promene u germinativnim ćelijama (npr. fibroblasta kože). Neke od ovih promena u germinativnom genomu uključuju one koje su specifične za: kvalitativne i kvantitativne poremećaje trombocita, kao što su *ANKRD26* (engl. *Ankyrin repeat domain-containing protein 26*), *ETV6* (engl. *ETS Variant Transcription Factor 6*) i *RUNX1* (engl. *RUNX family transcription factor 1*), kao i one udružene sa bolestima drugih organa, kao što su *GATA2* (*GATA-binding factor 2*) (u imunodeficijenciji), Švahman-Dajmondov sindrom (sa insuficijencijom egzokrinog pankreasa i skeletnim displazijama), Fankonijeva anemija (dismorfija lica, sklonost ka skvamocelularnim karcinoma i tumorima jetre), kao i Diskeratosis congenita (sa fibrozom pluća, cirozom jetre i vaskularnim abnormalnostima). Neke od ovih mutacija viđaju se samo u AML, kao što je *CEBPA* (*CCAAT/enhancer-binding protein alpha*), dok se ostale viđaju i u drugim malignitetima (16). Značaj ovog testiranja jeste i u odabiru srodnih donora matične ćelije hematopoeze (MČH), gde oni sa promenama u *RUNX1* i *CEBPA*, ne bi smeli biti donori MČH (16).

1.5. Patogeneza AML

Smatra se da ulogu u patogenezi AML imaju brojne kaskadne molekularne i genetičke promene (engl. *multistep pathogenesis*). Ovaj model bolesti pretpostavlja da je AML posledica dve grupe promena u genima (1). Prvu grupu čine aktivirajuće mutacije signalnih puteva, kao što su: *BCR::ABL1* (engl. *Breakpoint cluster region::Abelson murine leukaemia viral oncogene homologue 1*), *TEL(ETV6)/PDGFRβ* (engl. *platelet derived growth factor receptor beta*), *N-RAS*, *K-RAS* (engl. *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*) ili aktivirani *FLT3* (engl. *fms related receptor tyrosine kinase 3*), što rezultuje pojačanom proliferacijom i imortalizacijom leukemijskih progenitora. Drugu grupu čine mutacije koje dovode do gubitka funkcije transkripcionih faktora ili komponenti transkripcionog koaktivacijskog kompleksa. U njih se ubrajaju: *t(8;21)*, *inv(16)/t(16;16)* i *t(15;17)* ili mutacije *CEBPA*, *MLL (KMT2A – lizin metiltransferaza 2A)* i *NPM1* (engl. *nucleophosmin 1*). Ove mutacije su se pokazale kao značajni prognozni pokazatelji, ali i kao ciljna mesta novih terapijskih modaliteta (1).

1.6. Dijagnoza AML

Dijagnostički kriterijum za AML je prisustvo $\geq 20\%$ blasta u razmazu aspirata koštane srži (mijelogramu) ili razmaza periferne krvi. Međutim, ukoliko su prisutne rekurentne citogenetičke aberacije, koje su prikazane u Tabeli 5, dijagnostički kriterijum za AML je prisustvo $\geq 10\%$ blasta u mijelogramu ili razmazu periferne krvi. Sa druge strane, kod AML sa *t(9;22)(q34.1;q11.2)/BCR::ABL1⁺*, dijagnostički kriterijum je $\geq 20\%$ blasta, u cilju razlikovanja faze akceleracije hronične mijeloidne leukemije od transformacije u AML (16).

Imunofenotipizacija ćelija koštane srži multiparametarskom protočnom citometrijom (MPC) preporučuje se radi precizne dijagnoze i određivanja podtipa AML.

Promene u kariotipu prisutne su kod 55% bolesnika sa AML (17). Konvencionalna citogenetička analiza, metodom G traka, nepohodna je pri dijagnozi AML, budući da se na osnovu citogenetičkih aberacija definišu pojedini entiteti AML, a takođe se vrši i stratifikacija bolesnika u grupe rizika (16).

Molekularna dijagnostika neophodna je u klasifikaciji AML na podtipove, stratifikaciji rizika i određivanju ciljnih molekula za ciljnu (engl. *target*) terapiju AML. Analiza molekularnih markera uključuje ispitivanje prisustva mutacija u genima, kao što su: *FLT3*, *IDH1* (izocitrat dehidrogenaza 1), *IDH2*, *NPM1*, *CEBPA*, *DDX41* (engl. *DEAD-box helicase 41*), *TP53* (tumorski protein p53), *ASXL1* (engl. *ASXL transcriptional regulator 1*), *BCOR* (engl. *BCL6 corepressor*), *EZH2* (engl. *enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit*), *RUNX1*, *SF3B1* (engl. *splicing factor 3b subunit 1*), *SRSF2* (engl. *serine and arginine rich splicing factor 2*), *STAG2* (engl. *STAG2 cohesin complex component*), *U2AF1* (engl. *U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1*) i *ZRSR2* (engl. *zinc finger CCCH-type, RNA binding motif and serine/arginine rich 2*), uz određivanje i prethodno navedenih rekurentnih citogenetičkih aberacija, kao što su: *PML::RARα* (engl. *promyelocytic leukemia gene::retinoic acid receptor alpha*), *CBFB::MYH11* (engl. *core-binding factor subunit beta::myosin heavy chain 11*), *RUNX1::RUNX1T1* (engl. *RUNX family transcription factor 1::RUNX1 Partner Transcriptional Co-Repressor 1*), *KMT2A* i *BCR::ABL1* (16).

Tabela 5. Rekurentne citogenetičkih aberacije u AML (prema ELN klasifikaciji iz 2022). Adaptirano prema Döhner H. i sar. (16).

APL sa t(15;17)(q24.1;q21.2)/ <i>PML::RARα</i>
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>
AML sa t(9;11)(p21.3;q23.3)/ <i>MLLT3::KMT2A</i>
AML sa t(6;9)(p22.3;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 sa drugim retkim rekurentnim translokacijama
AML sa mutiranim <i>NPM1</i>
AML sa <i>in-frame</i> mutacijom u bZIP domenu <i>CEBPA</i> (mono ili bialelska)
AML sa t(9;22)(q34.1;q11.2)/ <i>BCR::ABL1</i>

Skraćenice: ELN - *Eurpoean LeukemiaNet*, APL - akutna promijelocitna leukemija, *PML::RARα* - *promyelocytic leukemia gene::retinoic acid receptor alpha*, *RUNX1::RUNX1T1* - *RUNX family transcription factor 1::RUNX1 Partner Transcriptional Co-Repressor 1*, *CBFB::MYH11* - *core-binding factor subunit beta::myosin heavy chain 11*, *MLLT3::KMT2A* - *MLLT3 super elongation complex subunit::lysine methyltransferase 2C*, *DEK::NUP214* - *DEK proto-oncogene::nucleophorin214*, *GATA2, MECOM(EV11)* - *GATA binding protein 2, MDS1 and EV11 complex locus*, *NPM1* – nukleofozmin 1, *bZIP*- *basic leucine-zipper 8*, *CEBPA* - *CCAAT enhancer binding protein alpha*, *BCR::ABL1* - *Breakpoint cluster region::Abelson murine leukaemia viral oncogene homologue 1*.

1.7. Citogenetičko-molekularna obeležja bolesti i prognoza

Zasada najbolje predterapijske prediktore ishoda lečenja, u smislu postizanja kompletne remisije (KR), dužine remisije, preživljavanja bez bolesti (engl. *disease-free survival*, DFS), preživljavanja bez događaja (engl. *event-free survival*, EFS) i OS kod odraslih bolesnika sa AML, predstavljaju kako aberacije kariotipa tako i molekularni markeri poput mutacija u genima *FLT3* i *NPM1* (17). Naime, na osnovu citogenetičkih i molekularnih markera, bolesnici sa AML se prema preporukama ELN-a iz 2022. svrstavaju u tri grupe rizika (Tabela 6): 1) povoljnu, kod koje 65-70% bolesnika biva izlečeno samo hemioterapijom, 2) intermedijarnu - sa dugoročnim preživljavanjem kod 40-50% bolesnika i 3) nepovoljnu, kod koje samo 10-15% bolesnika preživi dugoročno bez primene alogene TMČH (16-18).

Tabela 6. Stratifikacija rizika u AML prema citogenetičkim i molekularnim aberacijama pri dijagnozi (prema ELN 2022). Adaptirano prema *Döhner H. i sar. (16)*.

Grupa rizika	Citogenetičke/molekularne aberacije
Povoljna	<ul style="list-style-type: none"> • t(8;21)(q22;q22.1)/<i>RUNX1::RUNX1T1</i>¹ • inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22)/<i>CBFB::MYH11</i>¹ • Mutacija <i>NPM1</i>² bez <i>FLT3-ITD</i> • <i>bZIP in-frame</i> mutacija <i>CEBPA</i>
Intermedijarna (srednji rizik)	<ul style="list-style-type: none"> • Mutirani <i>NPM1</i>²sa <i>FLT3-ITD</i> • nemutirani <i>NPM1</i>sa <i>FLT3-ITD</i> • t(9;11)(p21.3;q23.3)/<i>MLLT3::KMT2A</i>³ • Citogenetičke i/ili molekularne abnormalnosti koje nisu klasifikovane kao povoljne ili nepovoljne
Nepovoljna	<ul style="list-style-type: none"> • t(6;9)(p23;q34.1)/<i>DEK::NUP214</i> • t(v;11q23.3)/<i>KMT2A</i>-rearanžman⁴ • t(9;22)(q34.1;q11.2)/<i>BCR::ABL1</i> • t(8;16)(p11;p13)/<i>KAT6A::CREBBP</i> • inv(3)(q21.3q26.2) or t(3;3)(q21.3;q26.2)/<i>GATA2, MECOM(EV11)</i> • t(3q26.2;v)/rearanžman <i>MECOM(EV11)</i> • -5 ili del(5q); -7; -17/abn(17p) • Kompleksan kariotip⁵, monozomalni kariotip⁶ • Mutirani <i>ASXL1, BCOR, EZH2, RUNX1, SF3B1, SRSF2, STAG2, U2AF1</i> ili <i>ZRSR2</i>⁷ • Mutirani <i>TP53</i>⁸

Skraćenice: ELN - *Eurpoean LeukemiaNet*, *RUNX1::RUNX1T1* - *RUNX family transcription factor 1::RUNX1 Partner Transcriptional Co-Repressor 1*, *CBFB::MYH11* - *core-binding factor subunit beta::myosin heavy chain 11*, *NPM1* – nukleofozmin 1, *FLT3-ITD* - *fms related receptor tyrosine kinase 3-inter tandem duplication*, *bZIP*- *basic leucine-zipper 8*, *CEBPA* - *CCAAT enhancer binding protein alpha*, *MLLT3::KMT2A* - *MLLT3 super elongation complex subunit::lysine methyltransferase 2C*, *DEK::NUP214* - *DEK proto-oncogene::nucleophorin214*, *BCR::ABL1* - *Breakpoint cluster region::Abelson murine leukaemia viral oncogene homologue 1*, *KAT6A::CREBBP* - *lysine acetyltransferase 6A::CREB binding protein*, *GATA2, MECOM(EV11)* - *GATA binding protein 2, MDS1 and EV11 complex locus*, *ASXL1* – *ASXL transcriptional regulator 1*, *BCOR* - *BCL6 corepressor*, *EZH2* - *enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit*, *RUNX1* - *RUNX family transcription factor 1*, *SF3B1* - *splicing factor 3b subunit 1*, *SRSF2* - *serine and arginine rich splicing factor 2*, *STAG2* - *STAG2 cohesin complex component*, *U2AF1* - *U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1*, *ZRSR2* - *zinc finger CCCH-type, RNA binding motif and serine/arginine rich 2*, *TP53* – tumor supresor protein p53, *KIT* - *KIT proto-oncogene, receptor tyrosine kinase*, *CBF* – *core binding factor*.

Napomene:

¹Istovremena mutacija *KIT* i/ili *FLT3* gena ne utiče na promenu grupe rizika.

²AML sa *NPM1* udruženom sa nepovoljnim citogenetičkim aberacijama se svrstavaju u grupu nepovoljnog rizika.

³Prisustvo t(9;11)(p21.3;q23.3) određuje grupu rizika čak iako je udružen sa retkim nepovoljnim mutacijama.

⁴Izuzev parcijalne tandem duplikacije (PTD) *KMT2A*.

⁵Kompleksan kariotip: ≥ 3 nepovezanih genetičkih aberacija u odsustvu aberacija koje definišu AML sa rekurentnim genetičkim aberacijama; isključuje se hiperdiploidan kariotip sa ≥ 3 trizomija (ili polizomija) bez strukturnih aberacija.

⁶Monozomalni kariotip: ≥ 2 različite monozomije (izuzev gubitka X ili Y hromozoma), ili bar jedna monozomija autozoma i bar jedna strukturna hromozomska aberacija (sem CBF-AML).

⁷Ukoliko se ovi markeri javljaju udruženi sa gen. aberacijama povoljnog rizika, ne svrstavaju se u nepovoljan rizik.

⁸Mutacija *TP53* prisutna u 10% frakcija alela (mono- ili bialelska). Česta sa kompleks. i monozomalnim kariotipom.

1.7.1. *FLT3* mutacija

FLT3 je receptor tirozin kinaza, čiji je gen lociran na hromozomu 13q12. Ima važnu ulogu u preživljavanju i proliferaciji hematopoeznih matičnih i progenitorskih ćelija. Reguliše ćelijsku proliferaciju i diferencijaciju zbog čega konstitutivno aktiviran *FLT3* protein promovira kontinuiranu fosforilaciju Stat5 (engl. *signal transducer and activator of transcription 5*) signalnog puta, koja dovodi do nekontrolisane proliferacije hematopoeznih ćelija. Brojne studije su pokazale prisustvo mutacije *FLT3-ITD* (interne tandemске duplikacije) u oko 30% obolelih od AML. Mutacija *FLT3-ITD* povezana je sa lošijom prognozom i hiperleukocitozom na prezentaciji, što ukazuje da je ova mutacija zaslužna za progresiju bolesti (1).

1.7.2. Mutacija *NPM1*

Mutacije nukleofosmin1 gena (*NPM1*) najčešće su stečene mutacije u AML (1). *Falini* i sar. su opisali najčešće mutacije u poslednjem egzonu *NPM1* gena u *de novo* AML sa normalnim kariotipom. Alteracija N terminalnog domena, dovodi do abnormalne citoplazmatske akumulacije *NPM1* fosfoproteina, što se dokazuje kvantitativnim PCR-om (q-PCR) (19). Mutacije *NPM1* gena sreću se u 25–35 % AML odraslih i to kod 45–64 % AML sa normalnim kariotipom (1,3). Nukleofosmin ima brojne uloge: 1. kodira fosfoprotein sa pleiotrofnim ulogama, 2. stabilizacija genoma i reparacija DNK, 3. endoribonukleazna aktivnost, 4. duplikacija centrozoma tokom ćelijske deobe, 5. regulacija ARF (CDKN2A, engl. *cyclin dependent kinase inhibitor 2*) - p53 tumor supresorskog puta, 6. šaperon histona i 7. sprečavanju apoptoze (1).

1.7.3. Mutacije *CEBPA*

CEBPA je ključni transkripcioni faktor granulocitne diferencijacije. Mutacija ovog gena dovodi do prekida diferencijacije granulocita. Mutirani *CEBPA* prisutan je u 15–20 % AML sa normalnim kariotipom. Pritom, su otkrivene dve glavne heterozigotne forme za mutirani *CEBPA*. Najčešća je kombinacija mutacija N terminalnog kraja i bZIP mutacija. Kada su obe mutacije prisutne, obično su locirane na različitim mutiranim alelima zbog čega *CEBPA wild-type* protein nije eksprimiran (1).

1.7.4. Stariji stratifikacioni sistemi grupa rizika

Pored najnovije stratifikacije rizika po ELN-u iz 2022. donedavno je korišćen i stratifikacioni sistem po ELN-u iz 2017 (3), prema kome su bolesnici sa *FLT3-ITD* mutacijom i odustvom *NPM1* mutacije kategorizovani u visok rizik (Tabela 7).

Tabela 7. Stratifikacija rizika prema ELN 2017 Klasifikaciji. Adaptirano prema *Döhner H. i sar (3)*

Povoljni	t(8;21)(q22;q22.1); <i>RUNX1-RUNX1T1</i> inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i> Mutirani <i>NPM1</i> bez <i>FLT3-ITD</i> ili sa <i>FLT3-ITD</i> ^{nizak} alelski odnos Bialelno mutirani <i>CEBPA</i>
Intermedijarni	Mutirani <i>NPM1</i> i <i>FLT3-ITD</i> ^{visok} alelni odnos Nemutirani <i>NPM1</i> bez <i>FLT3-ITD</i> ili sa <i>FLT3-ITD</i> ^{nizak} alelni odnos (bez nepovoljnih aberacija) t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>MLLT3-KMT2A</i> Citogenetičke aberacije koje nisu klasifikovane kao povoljne ili nepovoljne
Nepovoljni	t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i> t(v;11q23.3); <i>KMT2A</i> rearanžman t(9;22)(q34.1;q11.2); <i>BCR-ABL1</i> inv(3)(q21.3q26.2) or t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2,MECOM(EV11)</i> 25 ili del(5q); 27; 217/abn(17p) Kompleksan ili monozomalni kariotip Nemutirani <i>NPM1</i> sa <i>FLT3-ITD</i> ^{visok} alelni odnos Mutirani <i>RUNX1</i> Mutirani <i>ASXL1</i> Mutirani <i>TP53</i>

Napomena: alelski odnos – nizak <0,5, visok >0,5; odnos površina pod krivom *FLT3-ITD* i nemutiranog *FLT3*. Skraćenice: ELN - *Eurpoean LeukemiaNet*, *RUNX1::RUNX1T1 - RUNX family transcription factor 1::RUNX1 Partner Transcriptional Co-Repressor 1*, *CBFB::MYH11 - core-binding factor subunit beta::myosin heavy chain 11*, *NPM1 – nukleofozmin 1*, *FLT3-ITD - fms related receptor tyrosine kinase 3-inter tandem duplication*, *CEBPA - CCAAT enhancer binding protein alpha*, *MLLT3::KMT2A - MLLT3 super elongation complex subunit::lysine methyltransferase 2C*, *DEK::NUP214 - DEK proto-oncogene::nucleophorin214*, *BCR::ABL1 - Breakpoint cluster region::Abelson murine leukaemia viral oncogene homologue 1*, *GATA2, MECOM(EV11) - GATA binding protein 2, MDS1 and EV11 complex locus*, *RUNX1 - RUNX family transcription factor 1*, *ASXL1 – ASXL transcriptional regulator 1*, *TP53 – tumor supresor protein p53*

Takođe, još starija britanska stratifikacija rizika - *MRC-C (engl. UK Medical Research Council - Classification) (20)*.

1.8. Klasifikacije AML

Brojne klasifikacije AML su u upotrebi, navešćemo najznačajnije.

1.8.1 Citološko-morfološka klasifikacija

Na osnovu citoloških karakteristika blasta, bolesnici se svrstavaju u jednu od 7 kategorija po FAB (Francusko-Američko-Britanskoj) klasifikaciji (21) (Dijagram 2).

Tabela 8. Francusko-Američko-Britanska (FAB) klasifikacija akutne mijeloidne leukemije (AML). Adaptirano prema *Bennet-u i sar. (21)*.

FAB klasifikacija	
M1	AML sa minimalnom diferencijacijom
M2	AML bez sazrevanja
M3	AML sa sazrevanjem
M4	Ak. promijelocitna leukemija
M5	Ak. mijelomonocitna leukemija
M6	Ak. eritroleukemija
M7	Ak. megakarioblastna leukemija

1.8.2. Klasifikacija prema Svetskoj zdravstvenoj organizaciji (SZO) iz 2022

Prethodna morfološka klasifikacija FAB grupe, zamenjena je klasifikacijama SZO 2008, potom 2016. i 2022. godine, kada je poslednji put revidirana. Brojne revizije klasifikacija AML su posledica sve boljeg razumevanja biologije AML, otkrivanja novih prognoznih markera i novih terapijskih modaliteta u AML (22).

U odnosu na prethodnu klasifikaciju SZO iz 2016. (23), u poslednjoj klasifikaciji iz 2022. (22) promenjene su granične vrednosti procenata blasta neophodnih za dijagnozu u odnosu na prisustvo ili odsustvo rekurentnih citogenetičkih aberacija. Takođe, uvedeni su novi genetičko-molekularni entiteti AML, kao što su AML sa rearanžmanima *KMT2A* (lizin metiltransferaza 2C), *MECOM (EVII)* (engl. *MDS1 and EVII complex locus*) i sa *NUP98* (engl. *nucleoporin 98 and 96 precursor*) rearanžmanom (Khoyuri). S obzirom na veći značaj aberacija kariotipa i molekularnih markera u AML u odnosu na anamnestičke podatke (*therapy related* AML, sekundarne AML nastale na terenu prethodnog MDS-a ili MPN-a; nasledna osnova AML) na ispoljavanje bolesti i ishode lečenja, genetičko-molekularnim aberacijama dat je primat u klasifikaciji podtipova AML. Sa druge strane, predispozicioni faktori (*therapy-related*, raniji MDS, MPN, sa naslednom osnovom), postali su dijagnostički kvalifikatori (obeležja) AML, ali ne i posebni podtipovi AML (22). Kod bolesnika bez specifične citogenetičko-molekularne aberacije klasifikacija je sprovedena prema diferencijaciji leukemijskih blasta, ranija NOS (engl. *non otherwise specified*) grupa (22). U Tabeli 9. prikazana je najnovija SZO Klasifikacija AML.

Tabela 9. SZO klasifikacija AML iz 2022. Adaprirano prema *Khoury JD.* i sar (22)

AML definisana prema citogenetičkim aberacijama	AML definisana prema stepenu diferencijacije blasta
APL (<i>PML::RARα</i> fuzija)	Minimalno diferencijovana
AML sa <i>RUNX1::RUNX1T1</i>	Bez sazrevanja
AML sa <i>CBFB::MYH11</i>	Sa sazrevanjem
AML sa <i>DEK::NUP214</i>	Akutna bazofilna leukemija
AML sa <i>RBM15::MRTFA</i>	Akutna mijelomonocitna leukemija
AML sa <i>BCR::ABL1</i>	Akutna monoblastna/monocitna leukemija
AML sa <i>KMT2A</i> rearanžmanom	Akutna eritroleukemija
AML sa <i>MECOM</i> rearanžmanom	Akutna megakarioblastna leukemija
AML sa <i>NUP98</i> rearanžmanom	
AML sa mutiranim <i>NPM1</i>	
AML sa mutiranim <i>CEBPA</i>	
AML nastala progresijom ranijeg MDS-a	
AML sa drugim definisanim aberacijama kariotipa	

Skraćenice: AML – akutna mijeloidna leukemija, APL – akutna promijelocitna leukemija, *PML::RARα* - *promyelocytic leukemia gene::retinoic acid receptor alpha*, *RUNX1::RUNX1T1* - *RUNX family transcription factor 1::RUNX1 Partner Transcriptional Co-Repressor 1*, *CBFB::MYH11* - *core-binding factor subunit beta::myosin heavy chain 11*, *DEK::NUP214* - *DEK proto-oncogene::nucleophorin214*, *RBM15::MRTFA* - *RNA binding motif protein 15::myocardin related transcription factor*, *BCR::ABL1* - *Breakpoint cluster region::Abelson murine leukaemia viral oncogene homologue 1*, *KMT2A* – lizin metiltransferaza 2C, *MECOM(EVII)* - *MDS1 and EVII complex locus*, *NUP98* - *nucleoporin 98 and 96 precursor*, *NPM1* – nukleofozmin 1, *CEBPA* - *CCAAT enhancer binding protein alpha*, MDS – mijelodisplazni sindrom

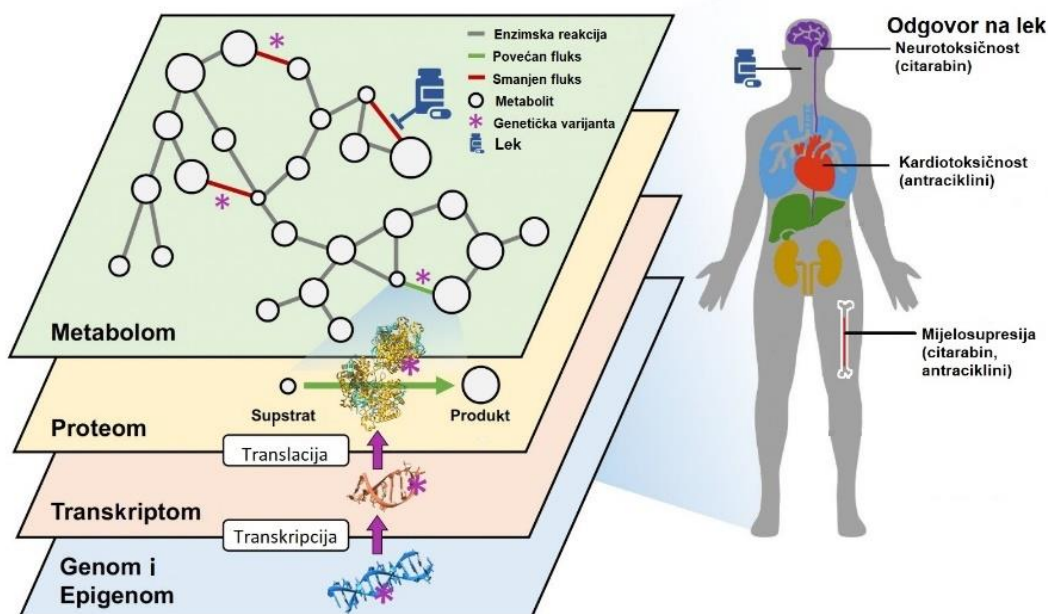
1.9. Dva genoma obolelih od AML

Bolesnika sa AML karakteriše dvostruki genom: konstitucionalni, prisutan u svim ćelijama sem leukemijskim i genom leukemijskih ćelija, koji sadrži stečene, somatske mutacije i koji evoluiru u toku bolesti (24). Postepeno sticanje somatskih mutacija u matičnim i progenitorskim ćelijama hematopoeze, koje imaju mogućnost samoobnavljanja, smatra se ključnim korakom u leukemogenezi (16). Pritom, varijante (polimorfizmi) konstitucionalnog genoma, imaju značajnu ulogu u modulaciji distribucije i metabolizma lekova, sa posledičnim uticajem na efikasnost i neželjene efekte hemioterapeutika, koji se koriste u lečenju AML. Sa druge strane, genom leukemijskog klonu smatra se odgovornim za rezistenciju tumora na terapiju (24).

1.10. Farmakogenetika, farmakotranskriptomika i personalizovana medicina

Oblast farmakogenetike ispituje uticaje genetičkih polimorfizama (varijanti) na odgovor bolesnika na određeni lek. Farmakotranskriptomika, sa druge strane, ispituje značaj varijacija u transkriptomu, ukupnoj ribonukleinskoj kiselini (RNK), tj. ekspresiji određenih gena, na odgovor bolesnika na određeni lek. Obe oblasti su komplementarne i obe se bave izučavanjem uticaja genetičkih varijanti, kako na farmakokinetiku – apsorpciju, distribuciju, metabolizam i eliminaciju leka, ali i na farmakodinamiku, u smislu efikasnosti leka, ali i neželjenih dejstava lekova u bolesnika, kod kojih je određena terapija primenjena. Obe naučne oblasti imaju za cilj razvoj efikasnijih i bezbednijih terapijskih protokola, ali i pronalaženja novih ciljnih molekula, krojenih po „genetičkoj meri“ pojedinca, time predstavljaju preduslov u razvoju personalizovane medicine (25,26).

Informacije dobijene istraživanjima objedinjuje Konzorcijum implementacije kliničke farmakogenetike (engl. *Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium* - CPIC) (27), u kome su u trenutku pisanja teze registrovane 518 interakcije između lekova i gena. Devedeset devet od navedenih interakcija, koje uključuju 23 gena i 82 leka, imaju najveći stepen dokaza i uključeni su u vodiče za propisivanje lekova. Ova 82 leka predstavlja mali udeo u ukupnom broju lekova odobrenih za primenu u humanoju populaciji, ali predstavljaju značajan udeo u propisanoj terapiji, Naime, 35-65% populacije je izloženo ovim lekovima sa farmakogenetičkom oznakom (26).



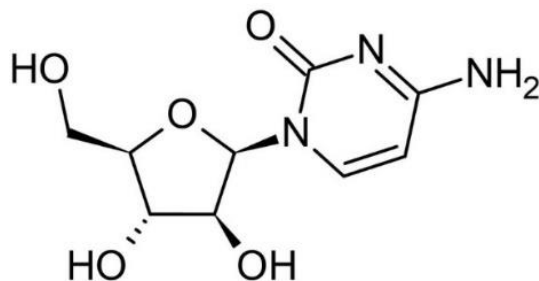
Dijagram 3. Shematski prizaz oblasti istraživanja raznih „omika“ i zbirnog uticaja na određenog bolesnika. Preuzeto i adaptirano prema Auwerx i sar (26).

1.11. Lečenje AML

Standard lečenja AML, osim akutne promijelocitne leukemije (APL), u poslednjih četrdeset godina, predstavlja kombinacija nukleozidnog analoga citarabina i antraciklina (daunorubicina ili idarubicina) u okviru indukcione kure hemioterapije „7+3”. Uprkos visokoj stopi postizanja remisije, koja se kreće od 60-80% kod bolesnika mlađih od 60 godina i od 40 do 60% kod starijih od 60 godina (3), petogodišnje ukupno preživljavanje (*overall survival - OS*) je < 50% kod mlađih i < 20% kod starijih od 60 godina (17, 28). Postremisiono lečenje se bazira na primeni tri ciklusa intermedijarnih ili visokih doza citarabina i na transplantaciji matične ćelije hematopoeze (TMČH) u odabranih bolesnika (16). Kod bolesnika čije leukemijske ćelije ekspirmiraju određene „target” molekule, uz standardnu terapiju, može biti primenjena i ciljana (engl. *target*) terapija, u vidu FLT3 inhibitora ili anti-CD33 monoklonskih antitela (16). Međutim, polovina bolesnika u kasnijem toku bolesti relapsira, prvenstveno zbog izostanka eliminacije MRB. Takođe, određeni broj bolesnika egzitira usled toksičnosti hemioterapije, primarno refraktarne bolesti ili relapsa. Nepovoljni ishodi lečenja kod bolesnika sa AML, delom, mogu biti objašnjeni varijabilitetom u genima koji enkodiraju proteine uključene u metaboličke puteve citarabina i antraciklina.

1.11.1. Citarabin

Citarabin (citozin arabinozid, ara-C), sintetisan 1959. godine, nezaobilazni je citostatik protokola za lečenje AML. Aktivna forma citarabin-trifosfat, svoj antileukemijski efekat ostvaruje sprečavanjem pretvaranja citidilata u 2’deoksicitidilat, neophodnog u sintezi dezoksiribonukleinske kiseline (DNK), njegovom inkorporacijom u molekule DNK i RNK, kao i na inhibiciji DNK zavisne polimeraze (17).



Dijagram 4. Hemijska struktura citarabina

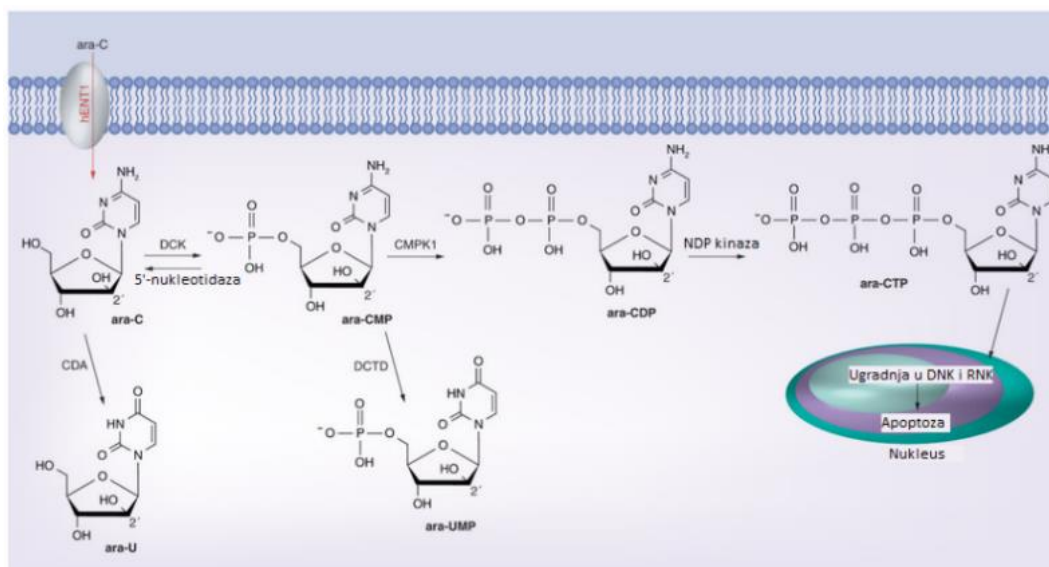
1.11.1.1. Transport citarabina u ćeliju

Citarabin u standardim dozama koje se primenjuju u indukciji, 100-200mg/m² i.v. tokom sedam dana u okviru protokola „7+3”, postiže koncentracije u plazmi <1 μM, zbog čega je glavni put ulaska (>80%) u leukemijske ćelije putem nukleozidnog transportera SLC29A1 (engl. *solute carrier family 29 member 1*), koji se naziva još i hENT (eng. *humanequilibrative nucleoside transporter*) (18, 28). Međutim, pri većim dozama citarabina od 1-2g/m² i.v./dan tokom tri dana, koje se primenjuju u kurama konsolidacije, postižu se koncentracije u plazmi >10 μM, što omogućava da citarabin slobodno difunduje u leukemijsku ćeliju, nezavisno od nukleozidnog transportera (18,28).

1.11.1.2. Metabolički put citarabina u ćeliji

Ulaskom u ćeliju, citarabin ulazi u metabolički put, kao i ostali nukleotidni analozi. Intracelularno, citarabin se aktivira u kaskadnom procesu što rezultira nastankom citarabin-trifosfata. Prvi u nizu i ograničavajući korak aktivacije posredovan je enzimom deoksicitidin-kinaza (DCK), koji konvertuje citarabin u citarabin-monofosfat. Potom, pomoću enzima deoksicitidilat kinaze (citidin monofosfat kinaze – CMPK) u citarabin-difosfat i konačno u nukleozidni analog citarabin-trifosfat, pomoću nukleozid difosfat kinaze (NDPK). Terapijski efekat citarabina direktno je

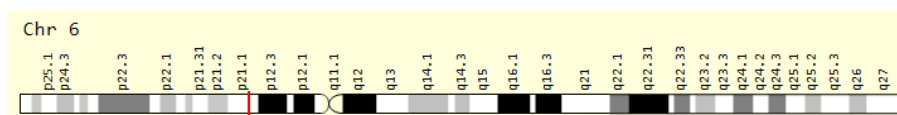
srazmeran intracelularnoj koncentraciji citarabin-trifosfata (5r3). Inaktivacija citarabina se odvija bilo putem uklanjanja aminogrupe deaminazama ili putem defosforilacije (u izvorni citarabin) 5' nukleotidazama (17).



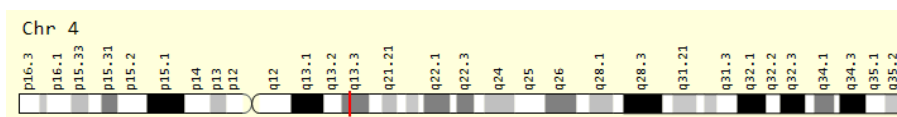
Dijaram 5. Metabolički put citarabina. Preuzeto i adaptirano prema *Emadi A. i sar.* (17). Skraćenice: ara-C – citarabin, hENT1 (engl. *human nucleoside transporter 1*), DCK – deoksicitidin kinaza, CMPK1 - citidin monofosfat kinaza 1, NDPK - nukleozid difosfat kinaza, ara-CMP – citarabin monofosfat, ara-CDP – citarabin difosfat, ara-CTP – citarabin trifosfat, CDA – citidin deaminaza, DCTD – deoksicitidin fosfat deaminaza, ara-C – uracil arabinozid, ara-UMP – uracil arabinozid monofosfat

1.11.1.3. Farmakogenetički markeri citarabina

Polimorfizmi ili varijante, engl. *single nucleotide variants / polymorphisms (SNV ili SNP)*, u genima *SLC29A1* rs9394992 i *DCK* rs12648166 pokazale su povezanost sa rizikom za razvoj, ali i kliničkim ishodima lečenja u drugim malignitetima (18). Naime, u dečjoj akutnoj limfoblastnoj leukemiji polimorfizam rs12648166 *DCK*, bio je udružen sa 2,6 puta većom šansom sa razvoj hematoloških toksičnosti tokom primene citarabina (29), dok je u pacijenta sa kancerom pankreasa, lečenih nukleotidnim analogom gemcitabinom, AA genotip rs12648166 *DCK*, je bio udružen sa dužim DFS i OS (30), dok je CT genotip *SLC29A1* rs9394992 bio udružen sa većim rizikom od neutropenije gradusa 3 i 4 (31). Imajući u vidu značaj ovih gena u mehanizmu dejstva nukleotidnog analoga citarabina, naveni polimorfizmi mogli bi biti potencijalni farmakogenetički markeri i u AML.



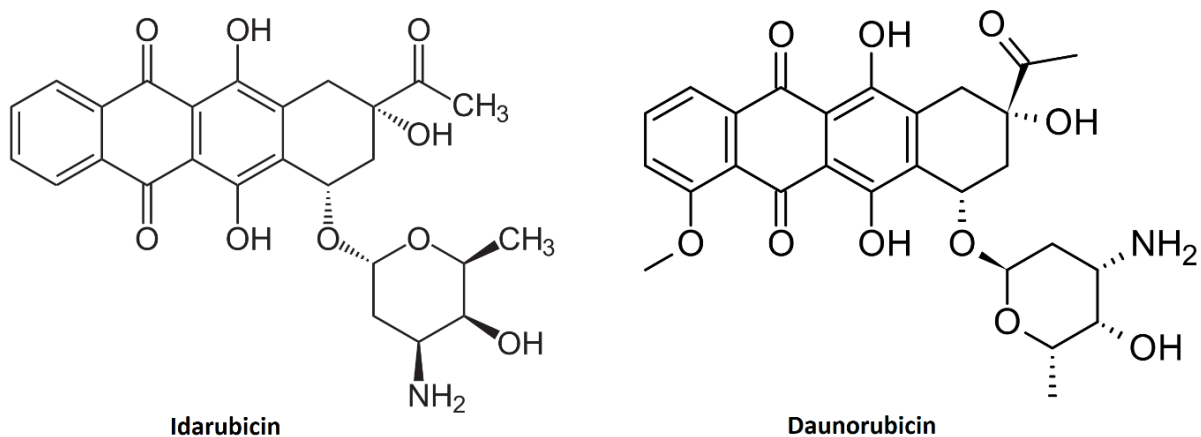
Dijagram 6. Pozicija *SCL29A1* gena na hromozomu 6 (obeležena crvenom crticom). Preuzeto putem *GeneLoc*-a (32).



Dijagram 7. Pozicija *DCK* gena na hromozomu 4 (obeležena crvenom crticom). Preuzeto putem *GeneLoc*-a (32).

1.11.2. Antraciklini

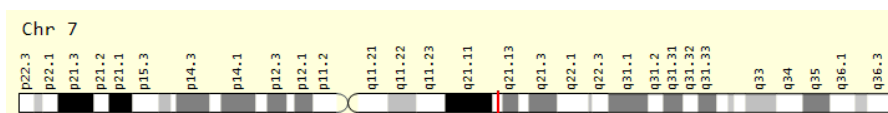
Antraciklini (daunorubicin i idarubicin) se, od šezdesetih godina XX veka, koriste u standardnoj terapiji AML. Svoje antileukemijsko dejstvo ostvaruju interkalacijom u heliks DNK, sprečavanjem replikacije DNK usled inhibicije enzima topoizomeraze II, kao i produkcijom reaktivnih kiseoničkih radikala (17).



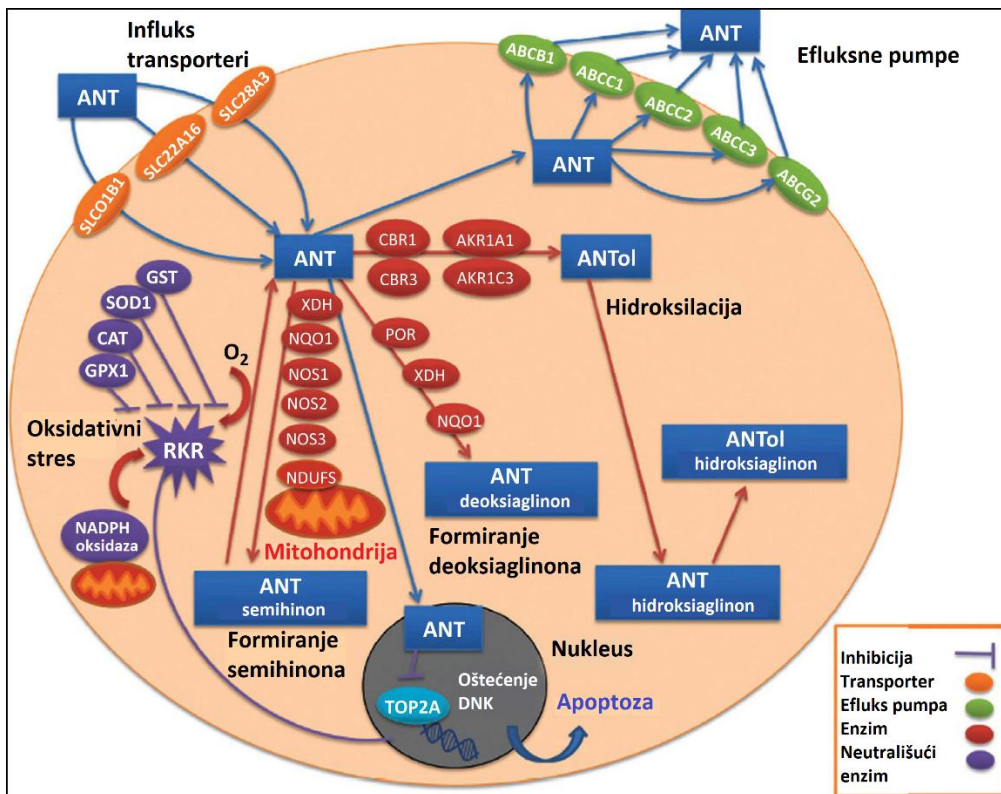
Dijagram 8. Hemijska struktura antraciklina

1.11.2.1. Efluks antraciklina i ABC transporteri

Superfamiliju transportnih proteina ABC (engl. *adenosine triphosphate-binding cassette*) čine nekoliko pumpi koje imaju ključnu ulogu u efluksu antraciklina iz leukemijskih ćelija. *ABCB1* gen lociran je na hromozomu 7q21.31 i enkodira P-gp, glikoprotein od 120 kb, koji se naziva i ABCB1, jedan od najviše izučavanih gena u AML. ABCB1 je efluksna pumpa, koja transportuje štetne supstance iz ćelije (33,34). Promenom intracelularne koncentracije lekova ABCB1 utiče i na toksičnost i na rezistenciju leukemijskih ćelija na antracikline. U ranijim istraživanjima pokazana je povezanost minornih alela SNV u ovom genu - *ABCB1* rs20132582, c.2677G > T/A, sa smanjenom funkcijom pumpe (35), posledično izraženijoj toksičnosti antraciklina, ali i većoj stopi KR u bolesnika sa AML (36).



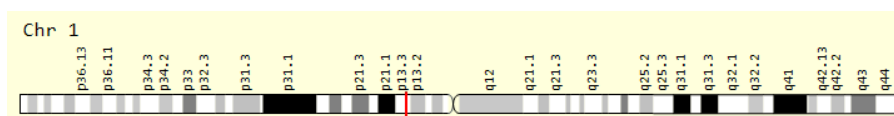
Dijagram 9. Pozicija *ABCB1* gena na hromozomu 7 (obeležena crvenom crticom). Preuzeto putem *GeneLoc*-a (32).



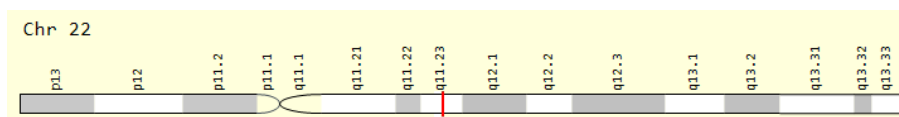
Dijagram 10. Mehanizam dejstva antraciklina. Adaptirano prema *Megias Vericat JE.* i sar. (35).
 Skraćenice: ANT – antraciklin, SLC01B1 - *solute carrier organic anion transporter family member 1B1*, SLC22A16 - *solute carrier family 22 member 16*, SLC28A3 - *solute carrier family 28 member 3*, ABCB1 – *ATP binding cassette subfamily B member 1* (p-glikoprotein), ABCC1 i ABCC2 - *ATP binding cassette subfamily C member 1 i 2*, ABCG2 - *ATP binding cassette subfamily G member 2*, GST – glutation-S transferaze, SOD1 – superoksid dizmutaza 1, CAT – katalaza, GPX1 – glutation preroksidaza 1, RKR – reaktivni kiseonični radikali, XDH – ksantin dehidrogenaza, NQO1 – NADPH hinon dehidrogenaza 1, NOS1,2 i 3 – azot oksid sintetaza 1,2 i 3, NDUFS - NADH dehidrogenaza [ubihinon] Fe-S, CBR1 i 3 – karbonil reduktaza 1 i 3, AKR1A1 i C3 – aldoketo reduktaza familija 1, član A1 i C3, ANTol – sekundarni alkohol (daunorubicinol/idarubicinol), POR – P450 oksidoreduktaza, TOP2A – topoizomeraza 2 A

1.11.2.2. Glutation S-transferaze (GST)

Citosolna familija glutation S-transferaza (GST) obuhvata sedam klasa, od kojih su najviše izucavane klase alfa, mi, pi i teta (A, M, P, T). GST, enzimi faze II, su glavni intracelularni detokisifikatori, koji svoje dejstvo ostvaruju bilo direktnom konjugacijom glutationa sa ksenobiotikom ili neutralizacijom reaktivnih kiseoničkih i drugih radikala, koje stvaraju citotoksični lekovi (35,37,38). Delecije (nulti genotipovi) gena *GSTM1* i *GSTT1* su odgovorne za odsustvo enzimske aktivnosti, što može biti uzrok povećane toksičnosti antraciklina u pacijenata sa AML, a povezane su i sa inferiornim odgovorom na terapiju i kraćim OS (35,37).



Dijagram 11. Pozicija *GSTM1* gena na hromozomu 1 (obeležena crvenom crticom). Preuzeto putem *GeneLoc*-a (32).



Dijagram 12. Pozicija *GSTT1* gena na hromozomu 22 (obeležena crvenom crticom). Preuzeto putem *GeneLoc*-a (32).

1.11.2.3. Farmakogenetički markeri antraciklina

Potencijalni kandidati za farmakogenetičke markere antraciklina mogli bi biti polimorfizmi u genima koji kodiraju efluksne pumpe (ABC), a koje utiču na intracelularnu koncentraciju antraciklina (*ABCB1* rs20132582, c.2677G > T/A) ili u genima koji kodiraju enzime zadužene za detoksifikaciju (GST) reaktivnih kiseoničkih radikala stvorenih dejstvom antraciklina (nulti i ne-nulti genotipovi *GSTM1* i *GSTT1*).

1.12. Refraktarnost na lečenje AML

Hemio rezistencija predstavlja glavni uzrok neuspeha lečenja AML, kao inicijalnog, tako i lečenja relapsa bolesti. Rezistencija na lekove koji se koriste u lečenju AML (*eng. Multi Drug Resistance*, MDR) je genetički determinisana (39,40). Dva osnovna mehanizma odgovornih za hemio rezistenciju u terapiji hematoloških maligniteta, jesu: 1) transportna, odnosno pumpna rezistencija, koja je određena povišenom ekspresijom proteina efluksnih pumpi i 2) apoptotska rezistencija, koja je određena povišenom aktivnošću antiapoptotskog sistema (41-43).

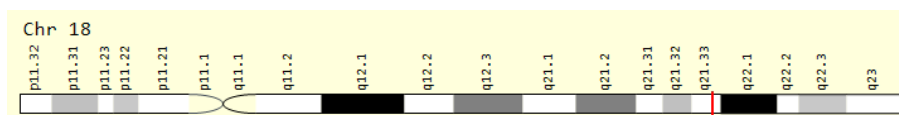
1.12.1. Transportna rezistencija u AML

Povećana ekspresija gena *ABCB1*, koji kodira efluks pumpu antraciklina (P-gp, *ABCB1*) smatra se nezavisnim prediktorom razvoja MDR-a u AML (44). Takođe, pokazana je uloga P-gp u inhibiciji apoptoze u AML, modulacijom puta sfingomijelin-ceramida (44).

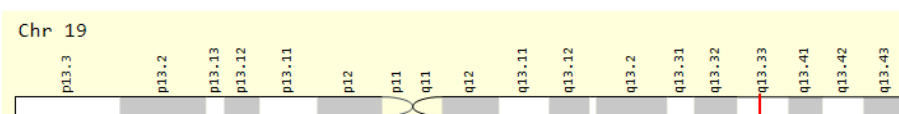
1.12.2. Apoptoza i apoptotska rezistencija u AML

Jedno od glavnih obeležja leukemijskih ćelija je smanjena ili odsutna apoptoza (45). Apoptoza predstavlja fiziološki proces samoodstranjivanja ćelija u cilju održavanja homeostaze tkiva i organizma u celini. Ovaj mehanizam programirane ćelijske smrti posebno je bitan u tkivima koja se fiziološki ubrzano dele, kao što je hematopoezno. U normalnim uslovima, određeni stresori (npr. oštećenje tkiva, ostarelost ćelije) mogu pokrenuti ovaj proces. Međutim, ove signale stresa mogu nadvladati antiapoptotski faktori, kao što je povećana ekspresija *BCL2* (*engl. B-cell lymphoma 2*) u leukemijskim ćelijama. Takođe, pored gore navedenih, mehanizmi hemioterapeutika koji se koriste u lečenju AML podrazumevaju i pokretanje apoptoze, kao bitnog antileukemijskog efekta (46). Imajući u vidu navedeno, analiza obrazaca ekspresije činilaca uključenih u proces apoptoze bi mogla objasniti pojavu hemio rezistencije u AML.

Proces apoptoze kontrolišu dva posebna puta, unutrašnji i spoljni, koji se međusobno nadovezuju. Unutrašnji put apoptoze je pod kontrolom familije proteina *BCL2*, koju čine: pro-apoptotski (*BAX* i *BAK*) i antiapoptotski proteini (*BCL2*, *BCL-XL*, *MCL1*) (47). Povećana ekspresija gena *BCL2* pokazana je u svim fazama razvoja AML – na dijagnozi, u relapsu i tokom nastanka rezistencije na hemioterapiju. Takođe, povećana ekspresija *BCL2* povezana je sa nepostizanjem KR i kraćim OS kod obolelih od AML (48,49). Navedene osobine *BCL2* dovele su i do razvoja *BCL2* inhibitora. Proapoptotski *BAX* (*engl. BCL2-associated X*) transkripciono je aktiviran od strane tumor supresorskog gena *p53*. Ekspresija *BAX*-a je ključna u završnim koracima apoptoze i dovodi do oslobađanja citohroma c iz mitohondrija i posledične smrti ćelije (50). Neke studije su pokazale da je povećana ekspresija *BAX*-a dobar prognostički marker u AML (51,52), dok druge to nisu potvrdile (53-55).



Dijagram 13. Pozicija *BCL2* gena na hromozomu 18 (obeležena crvenom crticom). Preuzeto putem *GeneLoc*-a (32).



Dijagram 14. Pozicija *BAX* gena na hromozomu 19 (obeležena crvenom crticom). Preuzeto putem *GeneLoc*-a (32).

Imajući u vidu literaturnu nekonzistentnost pojedinačnih uticaja ekspresije *BCL2* i *BAX*-a na prognozu AML, a budući da *BCL2* i *BAX* međusobnim povezivanjem formiraju heterodimere i koji u tom obliku regulišu proces apoptoze, istraživači su konstruisali *BAX/BCL2* odnos (43,52). Naime, studija Del Poete G. i sar. (52) pokazala je dobar prognozni potencijal ovog odnosa, dok je u studiji Kornblau SM i sar. (53) ovaj prognozni potencijal zavisio od citogenetičkog rizika bolesti.

1.12.3. Farmakotranskripcioni markeri u AML

Analiza ekspresije gena *BCL2* i *BAX*-a, njihovog odnosa *BAX/BCL2*, kao i ekspresije gena glavne efluks pumpe antraciklina *ABCB1* u leukemijskim ćelijama pacijenata obolelih od AML, može biti osnova za procenu njihovog značaja u razvoju apoptotske, odnosno pumpne rezistencije na hemioterapiju, kao i njihovog potencijala da postanu farmakotranskripcioni markeri u AML.

2. Ciljevi istraživanja

Bili su sledeći:

1. Utvrđivanje uticaja prisustva polimorfizama u genima *SLC29A1*, *DCK*, *ABCB1*, *GSTM1* i *GSTT1*, kao i ekspresije *ABCB1*, *BCL2* i *BAX* gena na:
 - Stopu i dužinu KR,
 - Stopu rane (indukcione) smrtnosti (engl. *early death*, ED),
 - Stopu primarne refraktarnosti
 - Stopu relapsa i dužinu perioda do pojave relapsa i
 - Preživljavanje: DFS, EFS i OS.

2. Utvrđivanje povezanosti polimorfizama u genima *SLC29A1*, *DCK*, *ABCB1*, *GSTM1* i *GSTT1*, kao i ekspresije *ABCB1*, *BCL2* i *BAX* gena, sa jedne strane i drugih prognostičkih markera:
 - Godina starosti
 - Pola
 - Kliničke prezentacije bolesti
 - Parametara krvne slike
 - Biohemijskih parametara
 - Citološkog
 - Imunofenotipskog i
 - Citogenetičko-molekularnog tipa bolesti, sa druge strane.

3. Materijal i metode

3.1. Dizajn studije

Kohortna studija

3.2. Studijska populacija, mesto i period istraživanja

U ovu kohortnu studiju uključen je 121 odrasli novodijagnostikovani bolesnik sa AML, osim akutne promijelocitne leukemije (APL), kod koga je dijagnoza postavljena u periodu od januara 2015. do januara 2018. u Klinici za hematologiju Univezitetskog kliničkog centra Srbije (UKCS), lečenih indukcijom kurom hemioterapije „7+3“ i konsolidacionom hemioterapijom u vidu tri ciklusa (visokih i intermedijarnih doza citarabina) i TMČH u odabranih bolesnika.

Sve molekularno-genetičke analize, uzete na dijagnozi bolesti, sprovedene su u Laboratoriji za molekularnu biomedicinu pri Institutu za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo (IMGGI), u sklopu Projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije pod brojem III41004, potprojekat 4, pod rukovodstvom dr sc. Sonja Pavlović, naučni savetnik. Odlukom Etičkog odbora Kliničkog centra Srbije (KCS) (br. 1435/10), od dana 08.09.2011. odobrena su istraživanja u okviru ovog projekta. Ostale analize sprovedene su u odgovarajućim laboratorijama UKCS, i to: laboratoriji za citologiju (krvna slika sa razmazom krvi i citomorfološkim pregledom mijelograma), laboratoriji za imunofenotipizaciju (imunofenotip ćelija koštane srži i likvora) i laboratoriji za citogenetiku i molekularnu genetiku Klinike za hematologiju (kariotip, *FL3-ITD* i *NPM1*), kao i u Centru za medicinsku biohemiju - služba za kliničku laboratorijsku dijagnostiku UKCS (biohemijske analize seruma). Napomena: u trenutku pisanja doktorske teze ime ustanove KCS je promenjeno u UKCS („Sl. glasnik RS", br. 5/2021 od 22.1.2021). Oba naziva se odnose na istu ustanovu i kliniku gde su istraživanja sprovedena i u tekstu Teze imaju ekvivalentno značenje.

Dijagnoza AML postavljena je na osnovu kliničke slike, analize razmaza periferne krvi, mijelograma, imunofenotipizacije ćelija koštane srži kao i citogenetičko-molekularne analize mononukleara iz koštane srži a u skladu sa preporukama SZO iz 2022 (22). Analiza likvora sprovedena je kod bolesnika sa faktorima rizika za infiltraciju centralnog nervnog sistema (CNS-a), prema preporukama NCCN (engl. *National Comprehensive Cancer Network*) (56,57), ELN (3, 58) i „Vodiča za dijagnostiku i lečenje akutnih leukemija, Klinike za hematologiju, KC Srbije iz 2015". Prisutni neurološki simptomi i znaci (u odsustvu *mass* lezija ili krvarenja na nuklearnoj magnetnoj rezonanciji/kompjuterizovanoj tomografiji endokranijuma)

- Bez neurosimptoma kod:
 - AML sa mijelomonocitnom i monocitnom diferencijacijom
 - FLT3-ITD/TKD+
 - $Le > 30 \times 10^9/l$ na dijagnozi
 - Organomegalija ili ekstramedularne AML
 - Kariotip: inv16/t(16;16), t(8;21)
 - AML/CD56+
 - $LDH \geq 1000 J/l$
 - Kod kandidata za TMČH
 - Refraktarna bolest

3.3. Selekcija ispitanika

U Klinici za hematologiju UKCS godišnje se dijagnostikuje oko 100 bolesnika sa AML svih starosnih grupa, od kojih su 50% kandidati za intenzivno lečenje. S obzirom da izračunati uzorak za α gresku od 5% i snagu studije od 80%, iznosi 249 bolesnika, a na osnovu godišnje frekvencije

bolesnika, u Klinici za hematologiju, nije moguće lako dostignuti ovaj uzorak, odlučili smo se za tzv. prigodni uzorak od oko 100 bolesnika.

Inkluzioni kriterijumi bili su:

- Starost 18-62 godine,
- Novodijagnostikovana AML, uključujući i one nastale iz mijelodisplaznog sindroma (MDS) ili mijeloproliferativne neoplazme (MPN) ili posle citotoksične terapije (engl. *therapy-related AML*)
- Procena opšteg funkcionalnog stanja „ECOG PS” (engl. *Eastern Cooperative Oncology Group, Performance Status*) skalom ≤ 2 (59)
- Indeks komorbiditeta - „HCT-CI skor” (engl. *Hematopoietic cell transplantation - specific comorbidity index*) < 3 (60)
 - Lečeni indukcijom kurom "3+7" i sa tri konsolidacione kure ara-C u intermedijarnim/visokim dozama, sa ili bez TMČH, Pritom, primena prethodne citoreduktivne terapije – hidroksiureom ili merkaptopurinom nije bila kriterijum za isključenje).

Ekskluzioni kriterijumi bili su:

- Mlađi od 18 i stariji od 62 godine
- Dijagnoza APL
- ECOG PS > 2
- HCT CI ≥ 3
- Relaps AML
- Bilo koja druga indukciona kura osim „3+7" ili bilo koji drugi konsolidacioni ciklus osim intermedijarnih/visokih doza ara-C.

Minimalna dužina praćenja u studiji bila je dve godine.

3.4. Kontrolna grupa

U analizama ekspresije gena, korišćeni su mononukleari koštane srži, dobijeni od 14 zdravih kontrola – donora matične ćelije hematopoeze.

3.5. Etički aspekti istraživanja

Svi bolesnici, uključeni u studiju, svojeručnim potpisom su potvrdili pristanak za izvođenje dijagnostičkih procedura. Istraživanje je sprovedeno u skladu sa etičkim principima sadržanim u Helsinškoj deklaraciji Svetske medicinske asocijacije (dopunjena verzija iz 2013) (61). Etički komitet KCS dao je odobrenje za istraživanja, pod brojem 110/11 od 23.5.2019.

3.6. Materijal

Sve molekularne i genetičke analize u okviru ove doktorske teze sprovedene su na biološkom materijalu (aspirat koštane srži i bris bukalne sluzokože), uzetom rutinski pri dijagnozi bolesti koji je čuvan u biobanci IMGGI.

3.7. Kliničke karakteristike i osnovna hematološka ispitivanja

Kod svih bolesnika na dijagnozi zabeležena su osnovne demografske i kliničke karakteristike kao i karakteristike AML:

- Pol
- Starost
- Prisustvo uvećanih limfonodusa (limfadenopatija)
- Prisustvo uvećane jetre ili slezine (hepato/splénomegalija)
- Prisustvo bilo kog tipa krvarenja (koža, sluzokože, organsko)
- Hiperplazija gingiva
- Prisustvo infiltracije CNS-a
- Broj leukocita
- Vrednost hemoglobina
- Broj trombocita
- Laktat dehidrogenaza (LDH) u serumu
- Procenat blasta u koštanoj srži
- Procenat blasta u perifernoj krvi
- FAB podtip

3.8. Analiza parametara krvne slike

Kompletna krvna slika (vrednost hemoglobina, broja leukocita i trombocita, kao i automatska leukocitarna formula) urađena je na *Coulter*-ovom brojaču (*Coulter S plus VI*, *Coulter Electronics*, *Krefeld*, *Nemačka*). Citomorfološka analiza razmaza periferne krvi (sa procentom blasta) rađena je ručnim brojanjem razmaza krvi bojenim po metodu *May-Grünwald Giemsa* (MGG).

3.9. Biohemijske analize

Na dijagnozi uzete su i kompletne biohemijske analize, a u istraživanju pratili smo vrednost LDH u serumu, koja je određena spektrofotometrijski.

3.10. Citomorfološka analiza mijelograma

Aspirat koštane srži dobijen je punkcionom aspiracijom sternuma ili kriste ilijačne kosti. Sproveden je citomorfološki pregled aspirata koštane srži (mijelograma), nakon bojenja po metodi MGG i dopunskim bojenjima na mijeloperoksidazu, sudan crnim B, *periodic acid-schiff* i na nespecifičnu esterazu, a nakon prebrojanih 500 ćelija sa jedrom. Na osnovu pregleda određivan je procenat blasta. Citohemijskim bojenjima definisani su morfologija, linijska pripadnost, stepen celularnosti i zrelosti ćelija koštane srži. Na osnovu morfoloških kriterijuma bolesnici su razvrstani prema FAB klasifikaciji (21).

3.11. Imunofenotipizacija ćelija koštane srži metodom protočne citometrije

Predterapijska analiza ćelija koštane srži kod 121 novootkrivenog ispitanika sa AML sprovedena je metodom imunofenotipizacije multiparametarskom protočnom citometrijom (MPC).

Obrada i analiza uzoraka sprovedena je prema zvaničnim smernicama (62,63). Postpunkcioni uzorci koštane srži skupljani su u epruvetama sa K_3 etilen diamin tetra sirćetnom kiselinom (EDTA) ili K_2 EDTA (*Becton Dickinson*). Hemocitometrom je određivana koncentracija ćelija. Koncentracija ćelija određivala je dalji postupak: 1) kod $1-10 \times 10^6$ ćel/ml – obeležavani su nerazblaženi uzorci u alikvotima od sto mikrolitara, a 2) $>10 \times 10^6$ ćel/ml – uzorci su razblaženi rastvorom dvopostotnog fetalnog govedeg seruma („FBS – *fetal bovine serum*”) / 0,01% natrijum azida (NaN_3) / fosfatom

pufferisanog natrijum hlorida („PBS – *phosphate buffered saline*”) pH 7,2, do postizanja razblaženja sa 10×10^6 ćelija/ml.

3.11.1. Monospecifična antitela

Nakon gore navedene pripreme uzorci su obeležavani standardnim monospecifičnim mišijim antitelima (MoAt) specifičnim za antigene humanih leukocita (Ag), prema zvaničnim smernicama (63,64) i preporukama proizvođača (Tabela 10). MoAt, korišćena u ovoj tezi, bila su konjugati antitela i određene fluorescentne boje („FITC” (fluorescein izocijanat), „PE” (fikoeritrin), „PerCP” (peridinhlorofil proteín) ili „APC” (alofikocijanin)). Proizvođači MoAt bili su: „Invitrogen”, Sjedinjene Američke Države - SAD (SAD) (anti-Lizozim) i „R&D Systems”, SAD (anti-CD163) i „BD Biosciences” SAD (sva ostala).

3.11.2. Direktna multikolorna imunofluorescencija

Analiza direktnom 4-kolornom imunofluorescencijom, sprovedena je iz uzoraka „pune” k. srži (62), dok su analize uzoraka periferne krvi sprovedene direktnim obeležavanjem konjugatima MoAt sa fluorohromom, prema panelu standardnih MoAt za AML (Tabela 10). Opis metode: inicijalno je dno epruvete ispunjeno MoAt u adekvatnoj količini, prema preporukama panela, a zatim je u epruvetu dodato sto mikrolitara uzorka (milion ćelija) i deset mikrolitara humanog seruma AB krvne grupe (Sigma, SAD), sa ciljem redukcije nespecifičnog vezivanja MoAt za ćelije. Nakon vorteksiranja, inkubacija alikvota srovedena je na 20°C tokom petnaest minuta na zamračenom mestiu, a potom je sprovedena liza eritrocita hipotoničnim rastvorom NH₄Cl (2ml, pH7.2) na 20°C tokom deset minuta. Nakon petominutnog centrifugiranja na 260g pri 20°C i eliminacije supernatanta, ispiranje taloga je sprovedeno dvopostotnim FBS/PBS, 0.01% natrijum azidom/PBS sa pH 7.2. Potom je uzorak tokom pet minuta centrifugiran na 260g i 20°C, a potom je srpovedena fiksacija uzorka standardnom solucijom sa formaldehidom („BD CelFIX”, SAD).

3.11.3. Obrada uzoraka multiparametarskom protočnom citometrijom

Na aparatu „FACSCalibur” (BD Biosciences, San Hoze, Kalifornija, SAD) metodom MPC određivane su sledeće karakteristike ćelija: 1) fizičke: relativna veličina i granulacija ćelija i 2) fluorescentne („FL1 – FITC, FL2 – PE, FL3 – PerCP”), koji reprezentuju obrasce ekspresije leukocitnih antigena na ispitivanim blastima (62). Određivanje blastnih signala fluorescencije sprovedeno je putem „BD CELLQuest” analitičkog softvera verzije 4.0.1. (BD, SAD). U cilju dalje analize blasti ispitivanog uzorka selektovani su prema gore navedenim fizičkim karakteristikama i ekspresiji molekukla CD45, a rezultat ispitivanja ekspresije određenog antigena prikazan je kao postotak ćelija u populaciji blasta sa ekspresjom datog antigena. Pozitivnim markerom smatrano je prisustvo ekspresije $\geq 20\%$ za membranski ili $\geq 10\%$ pozitivnih ćelija za određeni unutarćelijski antigen (63). Klasifikacija AML bolesnika sprovedena je prema Evropskoj grupi za imunološku klasifikaciju leukemija (EGIL) (63) i smernicama SZO (65). Imunotip AML kategorisan je prema ekspresiji antigena diferencijacije mijelomonocitne loze: CD11a, CD11b, CD11c, CD13, CD14, CD15, CD33, CD61 CD64, CD117, CD163 i GpA, dok je nediferentovana (mlada) AML, karakterisana ekspresijom diferencijacionih i linijski nespecifičnih antigena CD34, CD38 i HLA-DR.

Tabela 10. Panel standardnih MoAt za dijagnozu AML. Adaptirano prema dokumentu H43-A2 Instituta za klinički i laboratorijski standard („CLSI”) (62).

Epruvete	alofikocijanin	fikoeritrin	fluoresceinizotocijanat	peridinhlorofil	profein
I	CD19	CD56	CD2		CD45
II	CD34	CD13	CD7		CD45
III	CD33	CD117	HLA-DR		CD45
IV	CD4	CD14	CD64		CD45
V	CD11c	CD22	CD15		CD45
VI	CD11a	CD11b	CD24		CD45
VII	CD10	CD16	CD66b		CD45
VIII	CD38	CD36	CD41a		CD45
IX		CD235a	CD71		CD45
X	msIgG1	msIgG1	msIgG1		mCD45
XI	cCD3	cCD79a	cMPO		mCD45
XII		CD163	cLizozim		mCD45
XIII	cmsIgG1	cmsIgG1	cmsIgG1		mCD45

Skraćenice: msIg - imunoglobulin miša

3.12. Klasična citogenetička analiza (kariotip)

Klasična citogenetička analiza (kariotip) izvedena je metodom G (*giemsa*) traka na nestimulisanoj koštanoj srži, uzetoj na dijagnozi, direktnom preparacijom, a potom i kultivacijom tokom 24h. Kariotip bolesnika se opisivan je prema preporukama Internacionalnog sistema za humanu citogenetičku nomenklaturu („ISCN 2009”) (66).

Dvomililitarski uzorci koštane srži preneti su u osmomililitarski „1640 RPMI medijum” (engl. *Roswell Park Memorial Institute*) sa 20% FBS U cilju zaustavljanja ćelijske deobe u metafazi, uzorku je dodat je kolcemid 0,2 ml (0,02 mg/ml). Ovako pripremljeni uzorci su inkubirni na 37°C tokom jednog sata. Prepreparacije: ispiranje ćelija vrši se centrifugiranjem u „1640 RPMI medijumu” na 1600 obrtaja u minuti tokom deset minuta. Po eliminaciji supernatanta talog sa ćelijama dopunjavamo hipotonom solucijom (9,8 ml 0,075 molarnog kalijum hlorida, 0,1 ml 0.025% tripsina i 0,1 ml 0.001µg/ml kolcemida). Hipotoni postupak na 37°C traje dvadeset minuta sa naknadnim centrifugiranjem na 1600 obrtaja u minuti. Resuspenzija dobijenog taloga vrši se sa „Karnerovim fiksativom” (10 ml - 3/4 metil alkohola, 1/4 acetatne kiseline). Dobijeni materijal se aplicira metodom „kap po kap” na ohlađene pločice sa naknadnim prevlačenjem preko plamena. Bojenje preparata vrši se dvopostotnim rastvorom *Giemsa-e* tokom pet minuta u puferu koji se sastoji do 0,9% monokalijum fosfata, 1,2% dinatrijum fosfata, a potom se pod svetlosnim mikroskopom preparati analiziraju.

Citogenetička analiza sprovodi se pregledom dvadeset do trideset metafaznih ćelija (najmanje deset u onih sa normalnim kariotipom) (67). Citogenetički patološki klon definisan je prisustvom minimalno dve ćelije istih strukturnih aberacija / trizomije ili ≥ 3 metafaza sa monozomijom istog hromozoma (67).

3.13. Molekularno-genetička ispitivanja

Testovi molekularne genetike *FLT3-ITD* i *NPM1* sprovedeni su u IMGGI i Laboratoriji za citogenetiku i molekularnu genetiku Klinike za hematologiju UKCS. Rezultati analiza klasične i molekularne genetike omogućili su preciznu dijagnozu bolesnika prema klasifikaciji SZO (22) ali i preciznu stratifikaciju bolesnika u citogenetičke grupe rizika, prema ELN klasifikaciji 2022 (16).

Bolesnici su stratifikovani i analizirani i prema dve starije klasifikacije: Evropskoj - ELN iz 2017. (3) i Britanskoj MRC-C (engl. *UK Medical Research Council - Classification*) (20).

Aspirati koštane srži antikoagulirani 0,38% natrijum citratom su korišćeni za sve molekularno-genetička ispitivanja.

3.13.1. Izolacija mononukleara koštane srži

Sprovedena je izolacija mononukleara iz koštane srži bolesnika i četrnaest zdravih kontrola, prema standardnom protokolu izolacijom putem gradijenta gustine:

- Tromililitarski rastvor „*Ficoll-Plaque™ PLUS*” (General Electric (GE) Healthcare, Bakingemšir, Ujedinjeno Kraljevstvo) sipa se na dno desetomililitarske sterilne epruvete. Potom se na navedeni gradijent aplicira četvoromililitarski razblaženi uzorak u jednakom odnosu sa 0,9% NaCl.
- Sprovodi se centrifugiranje kliničom centrifugom (bez kočnja) na 1500g tokom dvadesetpet minuta.
- Naknadno se ispipetira „*buffy coat*” međufaza sa mononuklearima u drugu sterilnu epruvetu
- Sprovodi se dvostruko propiranje PBS-om, a potom centrifugiranje na 1500g tokom petnaest minuta.
- Konačno, resuspenzija taloga vrši se u dvestotine mikrolitara PBS-a

Mononukleari su čuvani u PBS rastvoru na -20°C do izolacije DNK.

3.13.2. Izolacija DNK iz mononukleara

Izolacija DNK mononukleara vršena je pomoću „QIAamp DNA Blood Mini Kit” (Qiagen, Dizeldorf, Nemačka), prema uputstvima proizvođača:

- Inicijalno se sprovodi vorteksovanje tube koja sadži dvadesetmikrolitarsku proteinazu K (20 mg/ml) sa dvestotine mikrolitara rastvora mononukleara u PBS-u i isto toliko AL pufera
- Potom inkubacija u vodenom kupatilu tokom deset minuta na 56°C
- Nakon adicije dve stotine 96-100% etil-alkohola vrši se novo vorteksovanje
- Spreman uzorak se aplikuje na kolonu „QIAamp Mini spin”, koji se potom centrifugira na 8000 obrtaja u min tokom minuta
- Naknadno vrši se ispranje kolone sa pet stotina mikrolitara AW1 pufera i centrifugiranje na 8000 obrtaja u min tokom minuta
- Potom ispiranje kolone sa isto toliko AW2 pufera i centrifugiranje na 13000 obrtaja u minuti tokom tri minuta
- Na posletku kolona se premešta u čistu tubu sa dodatkom dve stotine mikrolitara AE pufera i centrifugiranja se na 8000 obrtaja u min tokom minuta

3.13.3. Polimerazno lančano umnožavanje DNK – opis metode

PCR, imitiranjem prirodnog provesa replikacije, predstavlja *in vitro* umnožavanje određene DNK sekvencije od značaja. Ovičavanje sekvencije od značaja vrši se pomoću dva međusobno suprotno orijentisana oligonukleotida (prajmera), dužine petnaest do dvadeset nukleotida, a koji su komplementarni krajevima sekvencije od značaja. Umnožavanje DNK je katalizovano termostabilnom DNK polimerazom, a uključuje: denaturaciju DNK, hibridizacije prajmera („*aniling*”) i ekstenziju hibridizovanih prajmera, u ciklusima koji se ponavljaju. Kao rezultat dobija se umnoženi fragment DNK, koji ovičavaju 5' krajevi prajmera. Za uspešnu PCR reakciju neophodni su osnovni sastojci za *in vitro* sintezu DNK: matrica (DNK koja se umnožava), prajmeri, nukleotidi,

„*Taq* polimeraza” (termostabilna DNK polimeraza zaslužna za ugradnju nukleotida po principu komplementarnosti sa matricom), Mg⁺⁺ i pufer (bitan za postizanje sredine u kojoj *Taq* polimeraza najadekvatnije radi).

3.13.4. Određivanje mutacije *FLT3-ITD*

Sastav 30 µl reakcione smeše: 100 – 300ng DNK, jednostruki PCR pufer, jednostruki Q-rastvor, dvomilimolarni deoksinukleotidtrifosfat, magnezijum hlorid (2,75 mM), ushodni 14 i nishodni 15 prajmer (Tabela 11) (350 mM) i 2J „*HotStarTaq*[®]*DNA Polimerase*” (Qiagen, Nemačka).

Tabela 11. Sekvencije prajmera za određivanje mutacija *FLT3-ITD* i *NPM1* mutacija (19, 68,69)

Naziv prajmera	Sekvencija
14_ushodni	5’GCAATTTAGGTATGAAAGCCAGC3’
15_nishodni	5’CTT TCAGCATTTTGACGGCAACC3’
<i>NPM1</i> _ushodni	5’TTAACTCTCTGG TGGTAGAATGAA3’
<i>NPM1</i> _nishodni	5’CAAGACTATTTG CCATTCCTAAC3’
<i>NPM1</i> _1112_nishodni	5’CCTGGACAACATTTATCAAACACGGTA3’

Skraćenice: *FLT3-ITD* - *fms related receptor tyrosine kinase 3 inter tandem duplication*, *NPM1* – nukleofozmin 1

Termociklusi su sprovedeni sledećim redom:

- Petnaest minuta na 95°C – polimerazna aktivacija
- Tridesetpet ciklusa
 - Minut na 95°C – denaturacija
 - Minut na 60°C – „aniling”
 - Dva minuta na 72°C – elongacija
- Deset minuta na 72°C – konačna ekstenzija

Određivanje PCR produkata sprovedena je elektroforezom (EF) na 4% agaroza gelu. Predviđena veličina wt (engl. *wild type*) proizvoda PCR-a je 325bp. Dokaz mutacije *FLT3-ITD* registrovano je dokazom dužeg PCR produkta. Kod pozitivnog nalaza mutacije *FLT3-ITD*, sprovedeno je iskrajanje dužeg PCR produkta sa agaroza gela, a po prečišćavanju produkt je sekvenciran amplifikacionim prajmerima.

3.13.5. Određivanje mutacija *NPM1*

Sastav 50 µl reakcione smeše: 100 – 300 ngDNK, jednostruki PCR pufer, jednostruki Q-rastvor, deoksinukleotidtrifosfat (0,3 mM), magnezijum hlorid (2,25 mM), ushodni *NPM1* i nishodni *NPM1* prajmer (Tabela 11) (500 mM) i 2J „*HotStarTaq*[®]*DNApolimerase*” (Qiagen, Nemačka).

Termociklusi su sprovedeni sledećim redom:

- Petnaest minuta na 95°C – polimerazna aktivacija
- Tridesetpet ciklusa
 - Minut na 95°C – denaturacija
 - Minut na 60°C – „aniling”
 - Dva minuta na 72°C – elongacija
- Deset minuta na 72°C – konačna ekstenzija

Po umnožavanju primenjeno je prečišćavanje na koloni („*QIAquick PCR Purification kit*”, Qiagen, Nemačka) po protokolu proizvođača. Potom je sprovedeno sekvenciranje *NPM1*_1112_nishodnim prajmerom (Tabela 11)

3.13.6. Genotipizacija polimorfizama u genima *SLC29A1* i *DCK*

Polimorfizmi u genuma *SLC29A1* (rs9394992) i *DCK* (rs12648166) određene su metodama multiple PCR, alelske diskriminacije i direktnog sekvenciranja (30,70).

Tabela 12. Sekvencije prajmera za određivanje polimorfizama gena rs9394992 (*SLC29A1*) i rs12648166 (*DCK*). Adaptirano prema (30,70).

Naziv prajmera	Sekvencija
rs9394992_ushodni	5'CTACTTCCCAGGAAGTGGA3'
rs9394992_nishodni	5'GAGAAGCTAAAGGCTTGTT3'
rs12648166_ushodni	5'TCTAGG ACCATAGGCCAC3'
rs12648166_nishodni	5'TCCTACAGAACTTTTGCATGTA3'

Skraćenice: *SLC29A1* - solute carrier family 29 member 1, *DCK* – gen za deoksicitidin kinazu

Segmenti gena koji okružuju varijantni region prvo se umnožavaju putem PCR amplifikacije sa prajmerima, navedenim u Tabeli 12. Sastav završne reakcije smeše volumena od 20 µl: jednostruki pufer 25 nmol magnezijum hlorida, 10 nmol deoksinukleotidtrifosfata, 10 pmol ushodnih i nishodnih prajmera, 1J *Taq* polimeraze („*FastGene Taq Polymerase*”, Nippon Genetics Europe, Diren, Nemačka) i 100ng DNK.

Termociklusi su sprovedeni sledećim redom:

- Pet minuta na 95°C – inicijalna denaturacija
- Trideset ciklusa
 - Pola minuta na 95°C - denaturacija
 - Minut na 57°C - „aniling”
 - Minut na 72°C - elongacija
- Deset minuta na 72°C – konačna ekstenzija

Po umnožavanju PCR-a vrši se prečišćavanje na koloni („QIAquick PCR Purification kit”, Qiagen, Nemačka) po protokolu proizvođača. Potom je sprovedeno sekvenciranje PCR produkata na „Genetic Analyzer 3130” (Applied Biosystems, Foster siti, Kalifornija, SAD).

3.13.7. Genotipizacija polimorfizama *ABCB1*

Polimorfizam rs2032582 *ABCB1* gena je genotipizirana korišćenjem dva PCR sistema

Prvi sistem korišćen za tipiziranje je bio amplifikaciono-refraktorni mutacioni sistem polimerazne lančane reakcije (ARMS-PCR). Prilagođeno protokolu Kurzavskog i sar. (71) za svaki alel posebno su kreirani prajmeri, u cilju preciznog određivanja genotipa. Pripremane su po tri smeše za PCR po uzorku, sa različitim prajmerima karakterističnim za određen alel uz istovetan ostatak reakcije smeše.

Tabela 13. Sekvence prajmera za alel-specifičnu genotipizaciju polimorfizma rs2032582 u genu *ABCB1* (71).

Naziv prajmera	Sekvencija
<i>ABCB1</i> _2677_A_ushodni	5'TGAAAGATAAGAAAGAACTAGAAAGGTA3'
<i>ABCB1</i> _2677_G_ushodni	5'TGAAAGATAAGAAAGAACTAGAAAGGTG3'
<i>ABCB1</i> _2677_T_ushodni	5'TGAAAGATAAGAAAGAACTAGAAAGGTT3'
<i>ABCB1</i> _2677_K_ushodni	5'AGCAAATCTTGGGACAGGAA3'
<i>ABCB1</i> _2677_nishodni	5'AGTCCAAGAACTGGCTTTGC3'

Skraćenice: *ABCB1* – *ATP* bnding casette subfamily B member 1

Finalnu reakcionu smešu od petnaest mikrolitara činili su: jednostruki pufer, tromilimolarni magnezijum hlorid, 0,67mM deoksinukleotidtrifosfat, 0,3M ushodni i nishodni prajmeri, 1J *Taq* polimeraze („*Hot Start polymerase*”, Qiagen, Hilden, Nemačka) i šezdeset nanograma DNK.

Termociklusi su sprovedeni sledećim redom:

- Petnaest minuta na 95°C – inicijalna denaturacija
- Deset ciklusa
 - Pola minuta na 95 °C
 - Pola minuta na 60°C
 - Četrdeset sekundi na 72 °C
- Trideset ciklusa
 - Pola minuta na 95°C
 - Pola minuta na 56°C
 - Četrdeset sekundi na 72°C
 - Pet minuta na 72 °C – konačna ekstenzija

U Tabeli 13. prikazani su prajmeri za polimorfizma rs2032582 za „ARMS PCR”. Umnožavanje kontrole sprovedeno je *ABCBI_2677_K* ushodnim i *ABCBI_2677_nishodnim* prajmerom, dok su produkti karakterističnih alela detektovani vezivanjem odgovarajućeg alel specifičnog ushodnog i nishodnog prajmera navedenih u Tabeli 13..

Drugi PCR sistem kojim je polimorfizam rs2032582 *ABCBI* gena genotipiziran, bio je „Kompetitivni Alel Specifični PCR genotipizirajući sistem (KASP)” (LGC, Tedington, Middlesex, UK), koji je primenjivan po protokolu proizvođača.

KASP vrši genotipiziranje po principu „fluorescentnog rezonantnog prenosa energije (FRPE)”. Sistem se sastoji od donorske hromofore (nosioca fluorescencije) i prijemne hromofore („kvenčera”), koja onemogućava emitovanje svetlosti izvan tačno određenih uslova.

KASP zahteva tri komponente:

1. Pet do deset nanograma DNK
2. „KASP Assay mix” (dva ushodna prajmera specifičnih za određene alele i jedan zajednički nishodni prajmer)
3. „KASP Master mix” (dva dvolančana oligonukleoida markirana raznim fluoroforama; KASP *Taq*, deoksinukleotidtrifosfati, soli, pufer)

Ushodni prajmeri u ovom sistemu, specifični za određene alele, poseduju alel koji je podudaran sa jednim od alela polimorfizma rs2032582 *ABCBI* na 3' kraju. Na 5' kraju ovi prajmeri poseduju određenu oligonukleotidnu sekvenciju, koja ne hibridizuje sa DNK (rep fluorofore), „FAM” (fluorescein) ili „HEX” (heksahlorfluorescein), već je vezana za jedan lanac oligonukleotida, dok je za komplementarni lanac istog oligonukleotida vezan „kvenčer”. Nishodni region fluorescentno obeleženog oligonukleotida je komplementaran repovima alel-specifičnih ushodnih prajmera.

KASP metoda inicijalno podrazumeva „*HotStart*” na 95°C , u cilju denaturacije i aktivacije enzima „KASP *Taq*”. Potom otpočinje denaturacija lanca DNK, a nakon toga „aniling” jednog od ushodnih prajmera. U zavisnosti od toga koji se u kompeticiji snažnije vezao, shodno komplementarnošću sa polimorfizmom (otuda i naziv metode) vrši se elongacija.

Druga etapa PCR-a podrazumeva denaturacija preostalog originalnog DNK i PCR proizvoda formiranog u inicijalnoj fazi. Vršiti se „aniling” i elongacija. Tokom ove faze, formira se

komplementaran niz sa elongiranim ushodnim prajmerom, kao i komplementarna sekvenca repa prajmera.

U poslednjoj fazi PCR-a, ponovo dolazi do denaturacije proizvoda PCR-a iz pređašnje faze. Štaviše, tokom „anilinga”, dolazi do spajanja lanca oligonukleotida sa fluoroforom komplementom repa odgovarajućeg prajmera, nakon čega se sprovodi elongacija. Tokom umnožavanja oligonukleotid sa fluoroforom se elongira i fluorofora biva separisana od „kvenčera”.

Na posletku sa redukcijom temperature <40°C, u cilju „kvenčovanja” preostalih fluorofora, određuje se signal koji emituju fluorescirajući umnoženi proizvodi. Zavisno koja fluorofora daje signal (jedna, druga ili obe), očitava se genotip bolesnika.

3.13.8. Detekcija delecija gena *GSTM1* i *GSTT1*

Određivanje delecije u homozigotnom obliku (nultog genotipa) *GSTM1* i *GSTT1* sprovedena je pomoću multiplog PCR-a prema protokolu *Chen CL* i sar. (72). Metoda se sastoji u dodatku tri para prajmera u svaku mešavinu za PCR – za segmente *GSTM1*, *GSTT1* i gena *beta-globina*, koji je korišten kao pozitivna kontrola. Sve amplifikacije su analizirane na gel EF (2% agarozni gel). Prajmeri za ovu metodu dati su u Tabeli 14.

Tabela 14. Sekvence prajmera za detekciju homozigotne delecije gena *GSTM1* i *GSTT1* (72).

Naziv prajmera	Sekvencija
<i>beta-globin_ushodni</i>	5'CAACTTCATCCACGTTCCACC3'
<i>beta-globin_nishodni</i>	5'GAAGAGCCAAGGACAGGTAC3'
<i>GSTM1_ushodni</i>	5'CTGGATTGTAGCAGATCATGC3'
<i>GSTM1_nishodni</i>	5'CTCCTGATTATGACAGAAGCC3'
<i>GSTT1_ushodni</i>	5'TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC3'
<i>GSTT1_nishodni</i>	5'TCACCCGGATCATGGCCAGCA3'

Skraćenice: *GSTM1* i *T1* – gen za glutation-S transferaze M1 i T1

Sastav reakcione smeša zapremine 50 µl: 60mM TrisHCL (pH 9,5), 15mM (NH)₄SO₄, 2mM MgCl₂, 0,1 µM ushodna i nishodna, *GSTM1* i/ili *GSTT1* prajmera (Tabela 14), 0,1 µM prajmera beta-globina, 1,5 J *Taq* DNK polimeraze („*HotStarTaq*[®]*DNA*polimerase” (Qiagen, Nemačka)), 0,2 mM dNPT i 500ng DNK. Za pojedinačno dokazivanje prisustva alela *GSTT1* i *GSTM1*, reakciona smeša je sadržala nishodni i ushodni prajmer jednog gena – *GSTT1* ili *GSTM1*. Za dokazivanje dvostrukih nultih genotipova *GSTT1* i *GSTM1*, reakciona smeša je sadržala ushodne i nishodne prajmere *GSTM1* i *GSTT1*.

Termociklusi su sprovedeni sledećim redom:

- Četiri minuta na 95°C – polimerazna aktivacija
- Tridesetpet ciklusa
 - Minut na 94°C – denaturisanje
 - Četrdesetpet sekundi na 58°C – „aniling”
 - Minut na 72°C – elongiranje
- Sedam minuta na 72°C – konačna ekstenzija

Produkti PCR-a (20 µL) analizirani su na EF na dvopostotonom agar gelu koji sadrže etidijum bromid (0,5 µg/ml) i fotografisani pod ultraljubičastim svetlom. DNK bolesnika sa prisutnim *GSTM1* alelom bio je veličine fragmenta od 215bp, dok je kod onih sa prisutnim *GSTT1* alelom umnoženi fragment bio 480bp. Pozitivna kotrola beta-globina bila je veličine umnoženog fragmenta od 268bp.

3.13.9. Izolacija RNK

Ukupna RNK izolovana je klasičnom metodom modifikovanom od strane *Chomczynski P. i Sacchi N. (73)*, koja uključuje homogenizaciju mononukleara u „*TRI reagensu*” (Ambion, Thermo Fisher Scientific, Voltam, Masačusets, SAD), potom separaciju dodatkom hloroforma i naknadnim centrifugiranjem. Precipitacija ukupne RNK iz vodene faze sprovedena je izopropil alkoholom, peletiranjem i ispiranjem sa 70-75% etil-alkoholom.

Protokol:

- U mililitru *TRI* reagensa rastvoreno je najviše deset miliona ćelija, koje su lizane prolaskom kroz 0,7 milimetarsku iglu
- Takav uzorak potom odstoji na temperaturi sobe tokom pet do deset minuta
- Po dodatku dvesta mikrolitara hloroforma uzorak se jako promućka i potom odstoji tokom pet do petnaest minuta na temperaturi sobe
- Po centrifugiranju na 12000 obrtaja u minuti tokom petnaest minuta na +4°C dolazi do jasnog izdvajanja faza: vršna (tečna) faza, koja sadrži RNK, međufaza i najniža, organska (crevena) faza koja sadrži proteine i DNK
- Vršna, tečna, faza prenosi se u drugu tubicu uz dodatak pola mililitra izopropil alkohola. Okteranjem tubice, uzorak se promeša, a potom se ostavi da odstoji tokom deset do petnaest minuta na temperaturi sobe, čime se vrši taloženje RNK
- Centrifugiranje se sprovodi na 12000 obrtaja u minuti tokom petnaest minuta na +4°C, nakon čega se supernatant odstranjuje presipanjem, a talog se propira sa mililitrom ohlađenog 70-75% etil-alkohola
- Potom se centrifugira na 12000 obrtaja u minuti tokom deset minuta na +4°C, odstranjuje se lagano etil-alkohol, a talog se suši na temperaturi sobe
- Finalno istaloženu RNK rastvaramo u vodi bez RNK-aze. Potom se putem spektrofotometra „A260/A280” određuje prečišćenost i sama koncentracija RNK.

Jedan mikrogram ukupne RNK korišten je za sintezu komplemetarne DNK (cDNK) pomoću „*RevertAid* reverzne transkriptaze” (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Voltam, Masačusets, SAD).

Protokol:

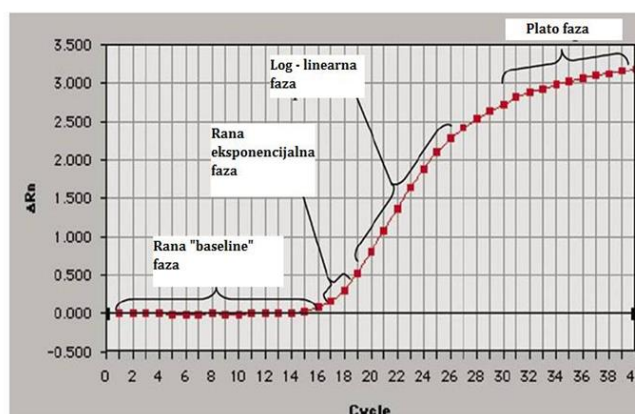
- Smešu finalnog volumena od jedanaest i po mikrolitara, koja sadrži dva mikrograma RNK i sto pikomola prajmera „*random-hexamer*“ inkubira se tokom pet minuta na 70°C, a potom se hladi na ledu
- Potom se dodaje smeša konačne zapremine od osam i po mikrolitara, u kojoj su prisutni četiri mikrolitra petostrukog „*RT-pufera*”, dvadeset jedinica inhibitora RNK-aze, dva mikrolitra deoksinukleotidtrifosfata (10 mM) i četrdeset jedinica *Fermentasove* reverzne transkriptaze „*M-MuLV*”
- Tokom deset minuta na 25°C, a potom tokom sat vremena na 42°C sprovodi se inukbacija
- Terminacija reakcije se sprovodi inkubiranjem tokom deset minuta na 70°C

3.13.10. Analiza ekspresije gena putem „*real time*” PCR-a (RT-PCR)

Analiza RT-PCR-om sprovedena je na sistemu „7900HT Fast Real-Time PCR” (Applied Biosystems, Foster siti, Kalifornija, SAD).

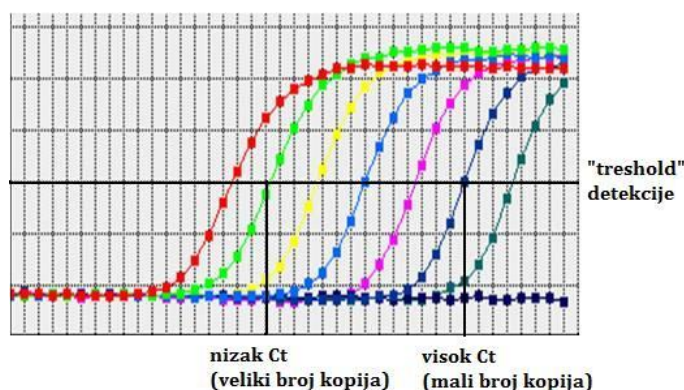
RT-PCR, odnosno „kvantitativni” PCR (*q*-PCR) predstavlja tehniku precizne kvantifikacije količine produkta PCR-a u toku svakog ciklusa u tzv. realnom trenutku. RT-PCR meri signal fluorescencije koji se ispušta tokom reakcije PCR-a, a izravno je srazmeran količini proizvoda PCR-a u određenom trenutku ciklusa. Ono šta ovaj PCR, razlikuje od „klasičnog”, jeste da se, počev od

eksponencijale faze duž celog daljeg ciklusa prati količina stvorenog produkta, za razliku od „klasičnog”, gde se količina zna tek na kraju reakcije (Dijagram 15).



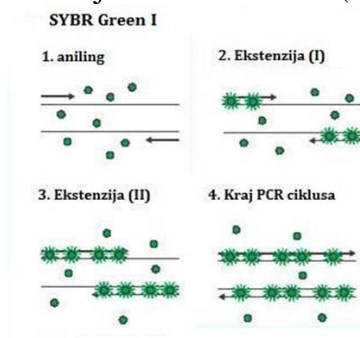
Dijagram 15. Etape umnožavanja PCR-a. Skraćenice: Rn - vrednost fluorescencije boje reportera, ΔRn - razlika vrednosti Rn uzorka i kontrole („no template control“). (Slika dobijena ljubaznošću dr sc. Nataše Tošić)

Tokom ranih ciklusa fluorescentni nivo se održava u granicama osnovnih (engl. *baseline*) vrednosti. Onaj ciklus, tokom koga nivo fluorescencije pređe bazalni, nazivamo „*threshold cycle* (Ct)”. Ct vrednost direktno korelira količinama ciljne sekvencije uzorka – sa većim inicijalnim brojem umnožaka ciljne sekvencije dobijamo nižu vrednost Ct-a i obratno (Dijagram 16).



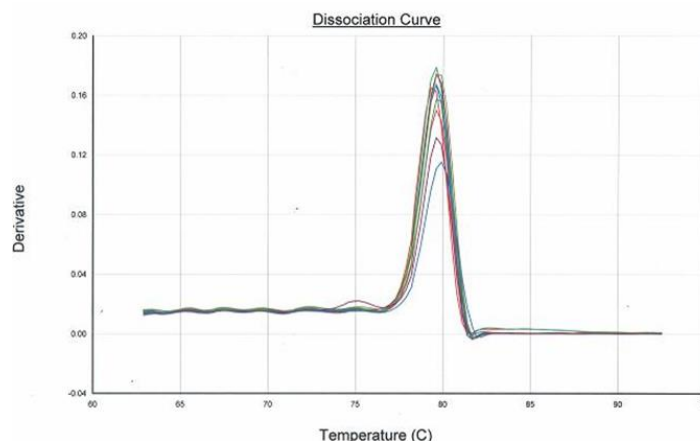
Dijagram 16. Plotovi amplifikacije sa različitim inicijalnim količinama ciljnih molekula. Niska vrednost Ct predstavlja veći broj molekula inicijalno. (Slika dobijena ljubaznošću dr sc. Nataše Tošić)

U našem radu koristili smo *SYBR Green I* tehniku RT-PCR-a, koja se zasniva na upotrebi boje „*SYBR Green I*” koja se ugrađuje u manji žleb dvolančanog molekula DNK. Kako tokom sukcesivnih ciklusa PCR-a dolazi od umnožavanja DNK, proporcijalno se očitava i uvećanje signala emitovanog od strane ove boje na talasnoj dužini od 520nm (Dijagram 17).



Dijagram 17. Prikaz SYBR Green tehnike. (Slika dobijena ljubaznošću dr sc. Nataše Tošić)

Kako je „SYBR Green” tehnika nespecifična i posledično može dokazivati i neodređeno umnožene produkte PCR-a, ali i međusobno povezane prajmere, u cilju ocene specifičnosti koristimo krivulju otapanja (engl. „melting curve analysis”). U toku ove analize sve vreme pratimo signal fluorescencije tokom postupnog povećanja reakcione temperature (40-95°C). Visok fluorescentni signal na nižim temperaturama karakterističan je za dvolančanu DNK. Pri tački topljenja proizvoda PCR-a dolazi do značajnog smanjenja fluorescencije. Različiti proizvodi PCR-a, u odnosu na svoju dužinu, imaju i drugačije tačke topljenja, samim tim i drugačije vršne vrednosti fluorescencije. Ono što izdvaja ciljni proizvod PCR-a jeste postojanje jedinstvenog vrha fluorescencije (Dijagram 18).



Dijagram 18. Kriva topljenja specifičnog produkta PCR-a (Slika dobijena ljubaznošću dr sc. Nataše Tošić)

Ocena podataka qPCR-a:

1. Apsolutna: rezultat predstavlja broj umnožaka ciljne sekvencije, a meri se u odnosu na standardnu krivulju uzoraka znane koncentracije.
2. Relativna: rezultat predstavlja odnos normale (kalibratora) i izmerenog uzorka.

Prilikom oba merenja neophodna je normalizacija dobijenih vrednosti, u cilju eliminacije greške merenja. Budući da je finalna koncentracija proizvoda PCR-a srazmerna inicijalnoj količini DNK matrice, zajedno sa amplifikacijom ciljne, sprovodimo i amplifikaciju sekvencije „unutrašnje kontrole”. Za „unutrašnju kontrolu” najčešće biramo tzv. „housekeeping gen” sa stabilnom ekspresijom u svim ispitivanim uzorcima.

U našem istraživanju obrada rezultata izvršena je relativnom kvantifikacijom, primenom komparativnog „ddCt metoda”. Zdrave kontrole su korišćene kao kalibratori (74,75). U ovoj analizi sprovedena je normalizacija količine ciljnog gena u odnosu na „unutrašnju kontrolu” i relativno u odnosu na kalibrator:

$$Q = 2^{-ddCt}, \text{ gde je}$$

$$ddCt = dCt_{uzorka} - dCt_{kalibratora} = (Ct_{ciljnog\ gena} - Ct_{endogene\ kontrole}) - (Ct_{ciljnog\ gena, kalibratora} - Ct_{endogene\ kontrole, kalibratora})$$

3.13.11. Određivanje ekspresija gena *ABCBI*, *BCL2* i *BAX* komparativnom metodom ddCt

Ekspresiju gena *ABCBI*, *BCL2* i *BAX* pratili smo qPCR metodom na aparatu „7500 Real-time PCR” (Applied Biosystems, Foster siti, Kalifornija, SAD), metodom „SYBR Green”. Unutrašnje kontrole bili su: *Abli* (engl. *Abelson proto-oncogene 1*) i *GADPH* (gen gliceraldehid fosfat dehidrogenaze) geni. Sve reakcije su rađene u duplikatu, a prajmeri sa sekvencijama gena navedeni su na Tabeli 15.

Tabela 15. Prajmeri korišćeni u određivanju ekspresije gena *ABCB1*, *BAX* i *BCL2*, kao i endogenih kontrola (42,43)

Naziv prajmera	Sekvencija
<i>ABCB1_ushodni</i>	5'GTCTACAGTTCGTAATGCTGACGT3'
<i>ABCB1_nishodni</i>	5'TGTGATCCACGGACACTCCTAC3'
<i>BCL2_ushodni</i>	5'TCGCCCTGTGGATGACTG A3'
<i>BCL2_nishodni</i>	5'CAGAGACAGCCAGGAGAAATC3'
<i>BAX_ushodni</i>	5'TGGCAGCTGACATGTTTTCTGAC3'
<i>BAX_nishodni</i>	5'TCACCCAACCACCCTGGTCTT3'
<i>GAPDH_ushodni</i>	5'ATGGGGAAGGTGAAGGTCG3'
<i>GAPDH_nishodni</i>	5'GGGTCATTGATGGCAACAATATC3'
<i>Abl_ushodni</i>	5'TGGAGATAA CACTCTAAGCATAACTAAAGG T3'
<i>Abl_nishodni</i>	5'GARGTAGTTGCTTGGGACCCA3'

Skraćenice: *ABCB1* - *ATP binding cassette subfamily B member 1*, *BCL2* - *B-cell lymphoma 2*, *BAX* – *BCL2-associated X*, *GADPH* – gen glicerinaldehid fosfat kinaze, *Abl* – *Abelson proto-oncogene 1*

Reakcija PCR-a (10 µl) sadrži: 1µl cDNK (50 ng RNK ekvivalenta), „SYBR™ Green PCR Master Mix” (Applied Biosystems, Foster siti, Kalifornija, SAD) i ushodnog i nishodnog prajmera u različitoj finalnoj koncentraciji, zavisno od ispitivanog gena (Tabela 15).

Konačna zapremina od deset mikrolitara PCR-a sadrži (Tabela 16):

Tabela 16. Sastav reakcione smeše PCR-a u određivanju ekspresije *ABCB1*, *BCL2*, *BAX*-a i endogenih kontrola (42,43)

<i>ABCB1</i>	<i>BCL2, BAX, GAPDH</i>	<i>ABL1</i>
Pedeset nanograma komplemetarne DNK		
„SYBR™Green PCR Master Mix”		
Prajmer konačne konc. 400 nM	Prajmer konačne konc. 50 nM	Prajmer konačne konc. 200 nM

Skraćenice: *ABCB1* - *ATP binding cassette subfamily B member 1*, *BCL2* - *B-cell lymphoma 2*, *BAX* – *BCL2-associated X*, *GADPH* – gen glicerinaldehid fosfat kinaze, *ABL1* – *Abelson proto-oncogene 1*

Termociklusi su sprovedeni sledećim redom:

- Dva minuta na 50°C
- Deset minuta na 95°C
- Četrdeset ciklusa
 - Petnaest sekundi na 95°C
 - Minut na 60°C

Komparativnim „ddCt metodom” sprovedena je obrada podataka, a za kalibrator je uzeta medijana „dCt” vrednosti merena u zdravih kontrola:

$$Q = 2^{-ddCt}$$

$$ddCt = dCt_{uzorka} - dCt_{kalibratora} = dCt_{uzorka} - dCt_{medijane\ zdravih\ kontrola}$$

Imajući u vidu potvrđen prognozni značaj citogenetičko-molekularnih aberacija na ishode lečenja i preživljavanje bolesnika sa AML u analizi prognozno značaja nivoa ekspresije gena *ABCB1*, *BCL* i *BAX* na ishode lečenja i preživljavanje, odlučili smo se da navedene analize ispitamo samo u podgrupi bolesnika sa AML i normalnim kariotipom (NK), koji po ELN 2022 klasifikaciji

pripadaju intermedijarnom stepenu rizika, u cilju bolje stratifikacije ove, inače veoma heterogene, citogenetičko-molekularne grupe rizika.

3.14. Ispitivanje uzoraka cerebrospinalnog fluida metodom multiparametarske protočne citometrije

Bolesnici su odabrani za ispitivanje na osnovu prisustva neuroloških simptoma i/ili na osnovu specifičnih hematoloških parametara i/ili imunofenotipskih karakteristika AML, prema preporukama NCCN-a (56,57), ELN-a (3, 58) i „Vodiča za dijagnostiku i lečenje akutnih leukemija, Klinike za hematologiju, KC Srbije iz 2015”. Analiza uzoraka cerebrospinalnog fluida (CSF) je izvođena na dijagnozi AML, primenom multiparametarske protočne citometrije (BD FACSCalibur, BD Biosciences, San Hoze, Kalifornija, SAD; BD Diva Software ver. 4.0.1. BD Biosciences, San Hoze, Kalifornija, SAD), prema metodologiji *Kraan i sar.* iz 2008. (76). Sveži uzorci CSF (~2ml) su bili stabilizovani tokom kolekcije i transporta, korišćenjem podloge od rashlađenog fosfatnog pufera (+4°C) sa 5% fetalnim goveđim serumom (5% FBS/PBS, pH 7.2), kako bi se izbegla brza degradacija ćelija. Uzorci CSF su obrađivani neposredno posle lumbalne punkcije (unutar 1h). Ćelije uzorka CSF su sedimentirane (2000 obrtaja u min tokom 10 min) i resuspendovane u 300µl 5% FBS/PBS/+4°C. Panel za ispitivanje ćelija CSF je dizajniran prema imunofenotipskom profilu leukemijskih ćelija utvrđenom pri dijagnozi, primenom 4-kolornih kombinacija, uz strategiju selektovanja zasnovanu na ekspresiji pojedinih antigena-(CD34/CD117/CD64/CD14/CD45/SSC). Skrining panel je primenjivan na alikvotu od 100µl (1. epruveta), a dalja analiza je podrazumevala obradu preostalog alikvota CSF od 200µl (2. epruveta), primenom istog ili sličnog panela MoAt. Tokom merenja uzoraka na protočnom citometru, iz svake epruvete su prikupljane sve prisutne ćelije. Rezultati za sve analizirane populacije ćelija CSF (limfociti, monocitni elementi i ćelije AML) su izražavani kao procenat nukleiranih ćelija (CD45+ ćelije) i kao apsolutan broj izmerenih ćelija svake populacije u reprezentativnoj epruveti (epruveta 2). Rezultati analize uzorka CSF su tumačeni na sledeći način: CSF-pozitivan (≥ 25 AML ćelija), CSF-sumnjiv (10-24 AML ćelija) i CSF-negativan (< 10 AML ćelija) (76).

3.15. Lečenje i procena odgovora na lečenje

Kod bolesnika lečenje je sprovedeno primenom hemioterapije koja se sastojala iz kura indukcije remisije i konsolidacija remisije bolesti, prema ELN preporukama (3,16,58).

Kod bolesnika starih ≤ 60 godina primenjena je standardna indikciona kura „7+3”, u sastavu: citarabin 200mg/m²/dan kontinuiranom i.v. infuzijom tokom sedam dana i daunorubicin 60 mg/m²/dan tokom prva tri dana jednočasovnom infuzijom. Bolesnici stariji od 60 godina primili su terapiju po istom protokolu, ali u sniženim dozama: citarabin 100mg/m²/dan kontinuiranom i.v. infuzijom tokom sedam dana i daunorubicin 45 mg/m²/dan tokom prva tri dana jednočasovnom infuzijom.

Kod bolesnika koji su postigli KR nakon indukcije lečenje je nastavljeno primenom jednog do tri konsolidaciona ciklusa srednjih/visokih doza citarabina, u sastavu: citarabin 1,5-3 g/m² na 12h dnevno tokom prva tri dana kod ≤ 60 godina ili na 12h prvog, trećeg i petog dana > 60 godina.

Kod bolesnika sa primarnom refraktarnosti ili kod kojih je potvrđen relaps bolesti lečenje je nastavljeno primenom ili još jedne indukcije „7+3” ili jednom od *salvage* kura hemioterapije: MitoxVP, u sastavu mitoksantron 10 mg/m²/dan i.v. i etopozid 100 mg/m²/dan i.v. tokom pet dana; FLAG-IDA, u sastavu: fludarabin 30mg/m²/dan i.v. i citarabin 1500 mg/m²/dan i.v. tokom pet dana, idarubicin 8 mg/m²/dan i.v. od trećeg do petog dana, granulocitni faktor rasta „G-CSF” 5 µg/kg s.c. dan pre primene hemioterapije i sedam dana nakon završetka poslednje doze hemioterapije do oporavka broja leukocita $> 1 \times 10^9/l$; HiIDAC-DA: citarabin 3 g/m² i.v. na 12h prvog, trećeg, petog i sedmog dana i daunorubicin 50mg/m²/dan i.v. drugog, četvrtog i šestog dana; MEC: mitoksantron 6 mg/m²/dan i.v, etopozid 100 mg/m²/dan i.v. i citarabin 1000mg/m²/dan i.v. tokom šest dana; kod bolesnika sa lošim opštim funkcionalnim stanjem ECOG PS > 2 ili kod kojih su nastale značajne komplikacije tokom lečenja (HCT-CI ≥ 3) dalje lečenje je nastavljeno simptomatsko-suportivnom terapijom: niske doze citarabina, hidroksiureja ili 6-merkaptopurin.

Bolesnici sa nepovoljnim inicijalnim markerima bolesti: leukocitoza $> 30 \times 10^9/l$, imunofenotipskim (CD56+) i citogenetičko-molekularnim markerima bolesti prema ELN-u i lečeni su alogenom TMČH u prvoj KR. U bolesnika sa intermedijarnim stepenom rizika po ELN-u, TMČH je primenjena u prvoj KR u slučaju pozitivne MRB ili u drugoj i sledećim KR.

3.16. Metode procene odgovora na terapiju

Procena odgovora na terapiju sprovedena je prema ELN kriterijumuma (3,16,58).

Procena remisije vršena je najranije dvadesetosmog dana svakog ciklusa hemioterapije, počev od indukcionog ciklusa.

KR je definisana nalazom normocelularne koštane srži, sa $<5\%$ blasta, odsustvom blasta u perifernoj krvi, odsustvom ekstramedularne bolesti, brojem neutrofila $\geq 1 \times 10^9/l$ i brojem trombocita $\geq 100 \times 10^9/l$ (3,16,58).

Primarno refraktarna bolest definisana je kao nepostizanje KR, nakon dva ciklusa hemioterapije (indukcije i jednog ciklusa konsolidacije) (3,16,58), sa dodatnim kriterijumom po *Chessonu* i sar. – u preživelih \geq nedelju dana po okončanju indukcije (zaostajanje blasta u mijelogrami ili razmazu periferne krvi) (77).

Relaps bolesti je definisan kao:

- Hematološki relaps:
 - $>5\%$ blasta u koštanoj srži ili registrovanje blasta u perifernoj krvi (u bar dva uzorka krvi, uzorkovanih u razmaku od najmanje 7 dana) ili
 - pojava ekstramedularne bolesti
- Molekularni relaps: registrovanje prisutne MRB, definisane MPC, kod prethodno MRB negativne KR (3,16,58).

ED se definiše se kao pojava smrti, usled bilo kog uzroka, u periodu do 30 dana, računato od prvog dana primene hemioterapije (3,16,58).

Preživljavanje bez „događaja” (EFS) definisano je kao vreme od postavljanja dijagnoze do datuma potvrde primarno refraktarne bolesti, relapsa nakon postignute KR ili smrti/datuma poslednjeg praćenja (3,16,58).

Preživljavanje bez bolesti (DFS), definisano je kao vremenski period protekao od potvrde KR do pojave relapsa bolesti ili smrti/ datuma poslednjeg praćenja (3,16,58).

Ukupno preživljavanje (OS) predstavlja kao vremenski period od postavljanja dijagnoze do smrti ili datuma poslednjeg praćenja (3,16,58).

3.17. Određivanje merljive rezidualne bolesti (MRB)

Imajući u vidu uspostavljanje merode praćenja MRB MPC u Klinici za hematologiju UKCS, u periodu ovog istraživanja, ispitivanje prisustva MRB sprovedeno je samo kod 35 bolesnika. Kod ispitanih bolesnika pri dijagnozi bolesti definisan je za leukemiju specifičan imunofenotip (LSIF) (78). Imunofenotipske aberacije u ekspresiji humanih leukocitnih molekula na blastima pri dijagnozi bolesti definisane su u više kategorija: a) maturaciona asinhronija (zajednička ekspresija molekula, koji se uobičajeno ne ekspimiraju u procesu normalne mijelopoeze); b) ektopična ekspresija (neuobičajeno ekspimiranje limfoidnih molekula na blastima mijeloidne loze); c) atipični obrasci ekspresije Ag (neuobičajena (veća/manja/odsutna) ekspresija Ag u odnosu na očekivanu za određeni razvojni stadijum). Kod bolesnika je na dijagnozi definisan bar jedna LSIF kombinacija.

Bolesnici koji su tokom lečenja postizali kompletnu citomorfološku remisiju bolesti ($<5\%$ blasta u koštanoj srži), ispitivani su posle nakon drugog ciklsa hemioterapije. Alikvoti nativnih uzoraka

kostne srži ($\sim 1,5 \times 10^6$ ćelija) su obeležavani 4-kolornim LSIF kombinacijama MoAt primenom standardne direktne imunofluorescentne metodologije (78). Analiza uzoraka koštane srži je izvođena primenom MPC (BD FACSCalibur, BD Biosciences, San Hoze, Kalifornija, SAD; BD Diva Software ver. 4.0.1. BD Biosciences, San Hoze, Kalifornija, SAD). Analiziran je dovoljan broj nukleisanih ćelija uzorka ($\sim 1 \times 10^6$ ćelija) u cilju postizanja senzitivnosti na nivou od 0,01% u detekciji leukemijskih ćelija (detekcija najmanje 50 - 100 ćelija sa LSIF karakteristikama od ukupnog broja CD45+ ćelija). MRB je definisana kao pozitivna, ukoliko je detektovana populacija leukemijskih ćelija na nivou od $\geq 0,1\%$ nukleisanih ćelija (16,79).

3.18. Metode prikupljanja podataka

Demografski, standardni laboratorijski i parametri vezani za AML prikupljeni su iz istorija bolesti i ambulantskih izveštaja. Navedeni podaci uključuju: godine starosti i pol bolesnika, kliničku prezentaciju (limfadenopatija, hepato/splenomegalija, krvarenje, hiperplazija gingiva, infiltracija CNS-a, parametre kompletne krvne slike (hemoglobin, broj leukocita i trombocita) sa diferencijalnom formulom, LDH u serumu, blastni % blasta u razmazu p. krvi i mijelogramu, citološke, imunofenotipske i citogenetičko-molekularne parametre, primenjen vid lečenja (indukcija, reindukcija, broj konsolidacionih ciklusa, TMČH), ED (sa danom i uzrokom smrti), stopu, broj dana i broj cikusa hemioterapije potrebnih za postizanje kompletne remijsije KR, trajanje KR, prisustvo MRB, stopu primarne rezistencije, stopu relapsa, vremena do pojave relapsa (engl. *time to relapse* - TTR) i eventualnu terapiju posle relapsa. Iz navedenih podataka računata su mere preživljavanja EFS, DFS i OS.

3.19. Metode statističke analize podataka

U ovom istraživanju koristili smo se brojnim statističkim postupcima:

1. Deskriptivnim
 - Merama centralne tendencije - aritmetičkom sredinom i medijanom
 - Merama varijabiliteta - intervalom varijacije, standardnom devijacijom i interkvartilnim opsegom i
 - Relativnim brojevima
2. Analitičkim
 - Određivanjem epirijskih distribucija
 - Ocenjivanjem signifikantnosti razlike primenom:
 - i. „Student”-ovog t testa za dva nezavisna uzorka i *Mann-Whitney U* testa (testa sume rangova) – za brojčane varijable
 - ii. χ -kvadrat i *Fisher*-ovog testa tačne verovatnoće – za nominalne/ordinalne varijable
 - Ocnom povezanosti, primenom korelacionih koeficijenata (shodno normalnosti raspodele variabli):
 - i. *Pearson*-ovog (linearne korelacije) za one sa normlanom i
 - ii. *Spearman*-ovog (korelacije ranga) za sve ostale raspodele
3. Ocene funkcije preživljavanja, primenom neparametarskog *Kaplan-Meier*-ovog metoda upotrebom Log-Rank testa, za komparaciju fukcija preživljavanja između ispitivanih grupa bolesnika.
4. Identifikacije prognostičkih faktora povezanih sa vremenom preživljavanja, upotrebom uni- i multivarijantnog *Cox*-ovog regresionog modela proporcionalnih hazarda.

Uticaje genetičkih polimorfizama na kliničke ishode ispitivan je u dominantnom, recesivnom i kodominantnom modelu. Združeni uticaji *SLC29A1* rs9394992, *DCK* rs12648166, *ABCB1* rs2032582 u dominantnom i *SLC29A1* rs9394992 i *DCK* rs12648166 u recesivnom modelu, takođe su testirani.

Statistička obrada podataka srovedena je pomoću softverskog paketa „SPSS v.21.0 (IBM)“ i u programskog okruženja „R v4.1.2“. Statistički značajna P vrednost definisana je na nivou $<0,05$.

4. Rezultati

4.1. Ispunjenost inkluzionih kriterijuma i odabir uzoraka za analizu

Inkluzione kriterijume ovog istraživanja ispunio je 121 bolesnik sa AML.

Imajući u vidu dostupnost i kvalitet uzoraka u biobanci IMGGI, finalnu grupu bolesnika na kojoj je sprovedena analiza prisustva polimorfizama u genima *SLC29A1*, *DCK*, *ABCB1*, *GSTM1* i *GSTT1*, činilo je 100 bolesnika sa AML.

Analiza ekspresije gena *ABCB1*, *BAX* i *BCL2* sprovedena je u podgrupi bolesnika sa AML koji su imali normalni kariotip (NK), koju je činilo ukupno 51 bolesnik (iz inicijalne grupe od 100 bolesnika).

4.2. Demografske karakteristike bolesnika

Demografske, kliničke, standardne laboratorijske i karakteristike AML u bolesnika na dijagnozi prikazane su u Tabeli 17.

Demografske, kliničke, standardne laboratorijske i karakteristike AML u podgrupi bolesnika sa NK AML na dijagnozi prikazane su u Tabeliama 28 i 29, zajedno sa analizama genskih ekspresija.

Tabela 17. Demografske, kliničke, standardne laboratorijske i karakteristike AML u bolesnika na dijagnozi

Varijabla	Broj (%) N = 100 (100%)	Medijana (opseg)
Starost		51 (18-62)
Starost>50 godina	53 (53%)	
Starost>55 godina	36 (36%)	
Pol, muški / ženski	52 / 48 (52 / 48%)	
Limfadenopatija, prisutna	19 (19%)	
Hepato/splenomegalija, prisutna	38 (38%)	
Krvarenje, prisutno	37 (37%)	
Hiperplazija gingiva, prisutno	8 (8%)	
Infiltracija CNS-a, prisutno / od ukupno testiranih	15 / 40 (37.5%)	
Broj leukocita (Le) x10 ⁹ /l		16,5 (1-349)
Broj Le>30 x10 ⁹ /l	31 (31%)	
Hemoglobin g/l		98 (65-166)
Broj trombocita x10 ⁹ /l		43,5 (1-422)
Laktat dehidrogenaza (LDH) J/l		253 (2-4169)
LDH>450 J/l	36 (36%)	
% blasta u koštanoj srži		61,5 (20-97)
% blasta u perifernoj krvi		16 (0-98)
FAB		
M0	7 (7%)	
M1	10 (10%)	
M2	30 (30%)	
M4	35 (35%)	
M5	18 (18%)	
Kariotip		
Normalan	51 (51%)	
Aberantan	49 (49%)	
Citogenetičko-molekularna grupa rizika (ELN 2022)		
Povoljna	16 (16%)	
Intermedijarna	60 (60%)	
Nepovoljna	24 (24%)	
<i>FLT3-ITD</i> , pozitivan	14 (14%)	
<i>NPM1</i> , mutiran	16 (16%)	
CD34, pozitivan	57 (57%)	
CD25, pozitivan	2 (2%)	

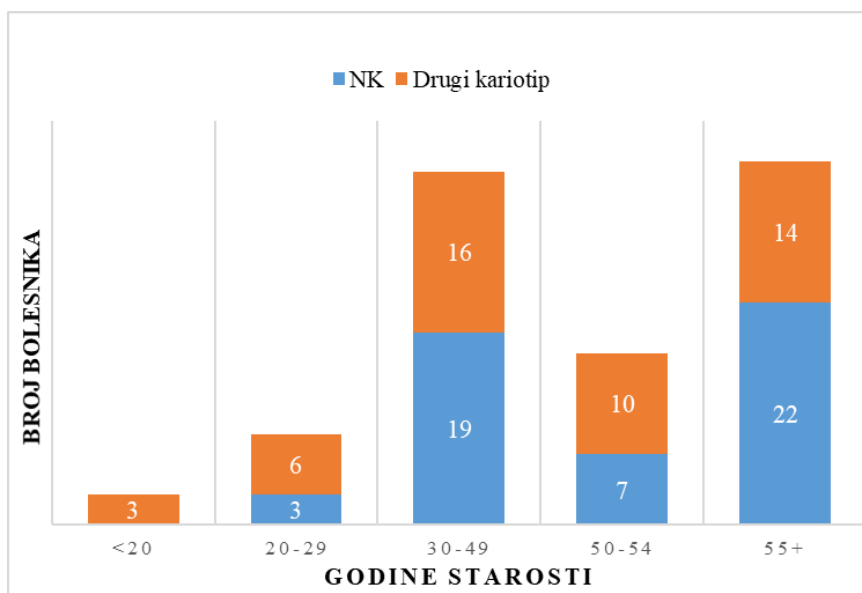
Skraćenice: CNS – centralni nervni sistem, FAB – Francusko-Američko-Britanska citomorfološka klasifikacija, ELN – *European LeukemiaNet*, *FLT3-ITD* - *fms related receptor tyrosine kinase 3-inter tandem duplication*, *NPM1* – nukleofozmin 1

4.2.1. Distribucija bolesnika i zdravih kontrola prema starosti i polu

Finalnu grupu, od 100 bolesnika, medijane starosti 51 godinu (opsega: 18-62), činilo je 52 (52%) muškaraca i 48 (48%) žena.

U grupi od 51 bolesnika sa NK AML, medijane starosti 51 godinu (opsega: 23-62), bilo je 25 muškaraca (49%) i 26 žena (51%).

Grupu 14 zdravih kontrola, medijane starosti 31 godinu, činilo je 8 muškaraca (57%) i 6 žena (43%).



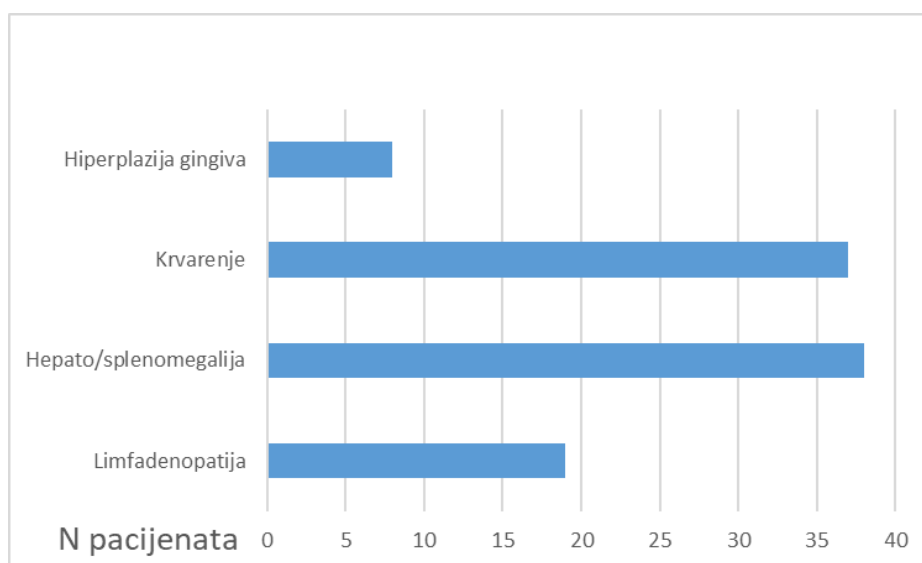
Dijagram 19. Distribucija bolesnika prema starosnim kategorijama i kariotipu. Skraćenica: NK – normalan kariotip

4.3. Kliničke karakteristike bolesnika

Kliničke karakteristike bolesnika na dijagnozi prikazani su u Tabeli 1.

4.3.1. Distribucija bolesnika prema kliničkim karakteristikama

Na dijagnozi u fizikalnom nalazu bili su prisutni: limfadenopatija kod 19 (19%), hepato/splenomegalija, prisutna kod 38 (38%), krvarenje kod 37 (37%) i hiperplazija gingiva kod 8 (8%) bolesnika.



Dijagram 20. Distribucija pacijenata prema kliničkim karakteristikama

4.4. Standardne laboratorijske karakteristike bolesnika

U našoj grupi bolesnika sa AML, medijane vrednosti su bile:

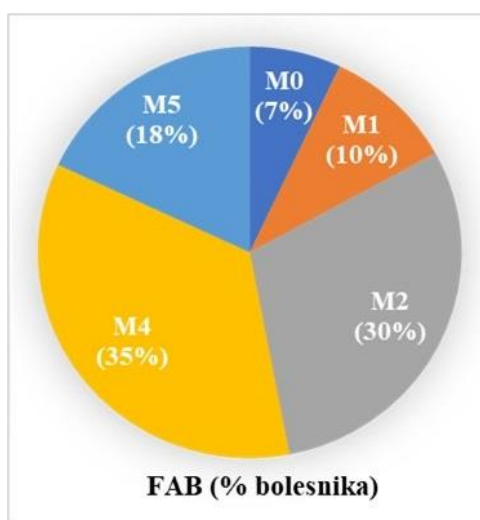
1. Hemoglobina: 98 g/l (opsega: 65-166)
2. Broja leukocita: $16,5 \times 10^9/l$ (opsega: 1-349), sa zabeleženom:
 - a. Leukocitozom $> 30 \times 10^9/l$ kod 31 bolesnika (31%)
 - b. Leukocitozom $> 100 \times 10^9/l$ kod 11 bolesnika (11%).
3. Broja trombocita: $43,5 \times 10^9/l$ (opsega: 1-422 $\times 10^9/l$)
4. Aktivnosti LDH: 253 J/l (opseg: 2-4169), sa izmerenim:
 - a. LDH > 450 J/l kod 36 bolesnika (36%)
5. Procenta blasta u perifernoj krvi od 16% (opseg: 0-98) i
6. Koštanjoj srži od 61,5% (opsega: 20-97)

U podgrupi bolesnika sa NK AML, medijane vrednosti standardnih laboratorijskih parametara bile su sledeće: hemoglobina: 99 g/l (opsega: 66-131) (onih sa hemoglobinom < 80 g/l bilo je 6 (12%)), broja leukocita: $22 \times 10^9/l$ (opsega: 1-349), broja trombocita: $55 \times 10^9/l$ (opsega: 8-422), LDH: 321 J/l (opsega: 1-2094), procenta blasta periferne krvi: 14% (opsega: 0-98) i procenta blasta u mijelogramu: 62% (opsega: 30-9).

4.5. Karakteristike bolesnika vezane za AML

4.5.1. Raspodela bolesnika prema FAB-u

U našoj grupi bolesnika sa AML, distribucija bolesnika po FAB kasifikaciji bila je sledeća: M0 7 bolesnika (7%), M1 10 bolesnika (10%), M2 30 bolesnika (30%), M4 35 bolesnika (35%) i M5 18 bolesnika (18%).



Dijagram 21. Udeo bolesnika po kategorijama FAB (Francusko-Američko-Britanske) klasifikacije. Ukupan broj bolesnika je 100 zbog čega procenat predstavlja i apsolutni broj bolesnika po grupi

4.5.2. Raspodela bolesnika prema imunofenotipskim markerima blasta

Prikazana je u Tabeli 18. Najveću učestalost imali su markeri: CD33 80 (91%), CD13 77 (89%), CD117 76 (85%), CD34 57 (63%) i MPO 68 (75%).

Tabela 18. Raspodela bolesnika sa prema imunofenotipskim markerima leukemijskih blasta

Antigen	∑ N bolesnika	N bolesnika sa markerom (%)	N bolesnika bez markera (%)
CD13	87	77 (89)	10 (11)
CD34	90	57 (63)	33 (37)
CD33	88	80 (91)	8 (9)
MPO	91	68 (75)	23 (25)
CD117	89	76 (85)	13 (15)
CD7	89	20 (22)	69 (78)
CD15	87	31 (36)	56 (64)
CD19	90	10 (11)	80 (89)
CD22	99	11 (11)	88 (89)
CD25	100	2 (2)	98 (98)
CD56	100	37 (37)	63 (63)

Skraćenice: ∑ - ukupan, N- broj, MPO – mijeloperoksidaza

4.5.3. Infiltracija CNS-a

Infiltracija CNS-a leukemijskim ćelijama bila je prisutna u 15 bolesnika od ukupno 40 testiranih (37.5%).

4.5.4. Citogenetičko-molekularne karakteristike bolesnika

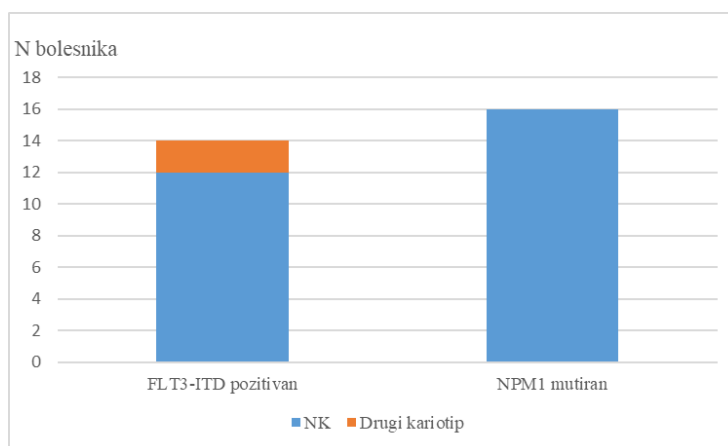
U našoj grupi pacijenata najveći broja pacijenata 51 (51%) imao je normalan kariotip. Nepovoljne citogenetičke karakteristike u vidu kompleksnog kariotipa imalo je 15 (15%), a monozomalnog 4 (4%) pacijenata. sa Fladelfija hromozomom imao je jedan bolesnik (1%). Povoljne citogenetičke aberacije u vidu t8;21 imalo je 5 (5%), a sa inv16 bilo je 2 bolesnika (2%). Tetraploidni kariotip imali su dva bolesnika (2%). Grupu od 21 (21%) bolesnika sa drugim aberacijama kariotipa, činili su: oni sa aditivnim kariotipom (10 bolesnika; 10%), sa sledećim aberacijama: +21, +der(6), +6, +mar, +C, +8, +10, der(C),+min; oni sa gubitkom hromozomskog materijala (7 bolesnika; 7%), sa sledećim aberacijama: nedostatak nepoznatog hromozoma, del(20), -C, del(9), del(11), del(5), del16; i oni sa translokacijama (2 bolesnika (2%)): t6;9 i t9;21.

Mutacija *FLT3-ITD* bila je prisutna kod 14 (14%), a *NPM1* kod 16 (16%) bolesnika. Raspodela prisustva mutacija u grupi sa NK, prikazana je na Dijagramu 22.

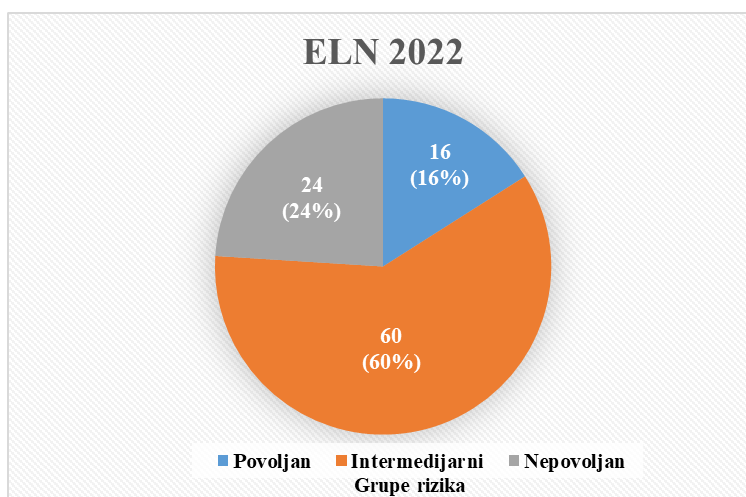
Prema ELN klasifikaciji iz 2022. 16, 60 i 24 bolesnika, redom su klasifikovani u povoljan, intermedijarni i nepovoljan citogenetičko-molekularni rizik (Dijagram 23). Uporedni prikaz raspodele bolesnika prema kategorijama ELN 2022 i starijim klasifikacijama: ELN 2017 i MRC-C, prikazani su u Tabeli 19. Poredeći klasifikacije ELN iz 2022 i 2017. godine, uočava se veći broj pacijenata u intermedijarnoj grupi pacijenata, redom 60 (60%) u odnosu na 48 (48%), uz isti broj u grupi povoljnog rizika 16 (16%), što ukazuje da su novom klasifikacijom iz 2022, 12 (12%) bolesnika iz grupe visokog, reklasifikovani u intermedijarni rizik.

Tabela 19. Raspodela bolesnika prema aberacija kariotipa

Kariotip	N pacijenata	%
Normalan	51	51%
inv(16)	2	2%
t8;21	5	5%
Kompleksan	15	15%
Monozomalni	4	4%
Tetraploidni	2	2%
Drugi	21	21%



Dijagram 22. Raspodela *FLT3-ITD* i *NPM1* mutacije u grupama sa normalnim (NK) i drugim kariotipom. Skraćenice: *FLT3-ITD* - *fms related receptor tyrosine kinase 3 – inter tandem duplication*, *NPM1* – nukleofosmin 1



Dijagram 23. Raspodela pacijenata prema citogenetičko-molekularnim grupama rizika, prema ELN 2022 klasifikaciji. Skraćenice: ELN – *European LeukemiaNet*

Tabela 20. Raspodela bolesnika prema kategorijama ELN 2022, ELN 2017 i MRC-C klasifikacije citogenetičko-molekularnog rizika

Grupe rizika	ELN 2022 N (%)	ELN 2017 N (%)	MRC-C N (%)
Povoljan	16 (16%)	16 (16%)	6 (6%)
Intermedijarni	60 (60%)	48 (48%)	75 (75%)
Nepovoljan	24 (24%)	36 (36%)	19 (19%)

Skraćenice: ELN - – European LeukemiaNet, MRC-C - UK Medical Research Council – Classification

4.5.5. Raspodela bolesnika prema klasifikaciji SZO

Na osnovu morfoloških i citogenetičko-molekularnih obeležja AML, bolesnici su razvrstani prema poslednjoj, 5. klasifikaciji SZO hematolinfoidnih tumora: mijeloidnih i histiocitnih/dendritičnih neoplazmi iz 2022 (Tabela 21).

Tabela 21. Distribucija bolesnika prema kategorijama SZO klasifikacije iz 2022

Kategorije klasifikacije	N pacijenata = 100 (%)
AML definisana prema citogenetičkim aberacijama	72 (72%)
AML nastala progresijom ranijeg mijelodisplaznog sindroma	28 (28%)
AML sa drugim definisanim citogenetičkim aberacijama	21 (21%)
AML sa mutiranim <i>NPM1</i>	16 (16%)
AML sa <i>RUNX1::RUNX1T1</i>	5 (5%)
AML sa <i>CBFB::MYH11</i>	1 (%)
AML sa <i>DEK::NUP214</i>	1 (1%)
AML definisna prema stepenu diferencijacije blasta	28 (28%)
Minimalno diferentovana	3 (3%)
Bez sazrevanja	5 (5%)
Sa sazrevanjem	8 (8%)
Akutna mijelomonocitna leukemija	11 (11%)
Akutna monoblastna/monocitna leukemija	1 (1%)

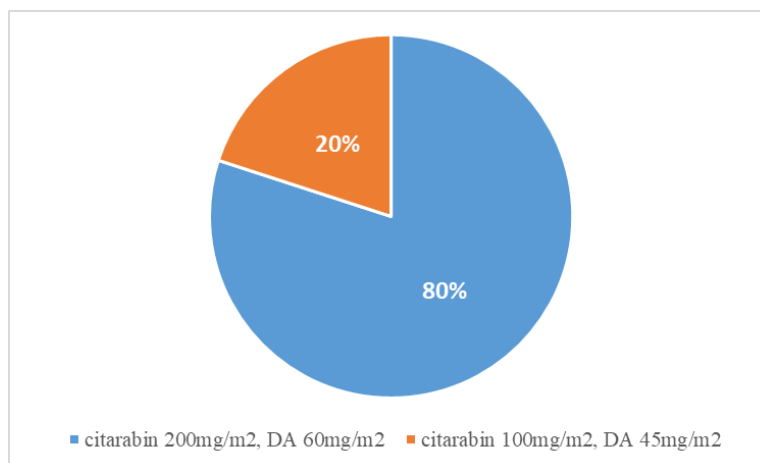
Skraćenice: SZO – Svetska zdravstvena organizacija, *NPM1* – nukleofozmin 1, *RUNX1::RUNX1T1* - *RUNX* family transcription factor 1::*RUNX1* Partner Transcriptional Co-Repressor 1, *CBFB::MYH11* - core-binding factor subunit beta::*myosin heavy chain 11*, *DEK::NUP214* - *DEK* proto-oncogene::*nucleophorin 214*

4.6. Primenjeno lečenje, ishodi lečenja i preživljavanje u našoj grupi bolesnika

4.6.1. Indukciono lečenje

Od ukupno 100 bolesnika, 80% bolesnika primilo je indukcionu kuru „7+3” u standardnoj dozi, citarabin 200mg/m² i.v. tokom sedam dana i daunorubicin 60mg/m² i.v. tokom prva tri dana, dok je 20% bolesnika primilo redukovanu dozu hemioterapeutika, citarabina 100mg/m² i.v. tokom sedam dana i daunorubicin 45mg/m² i.v. tokom prva tri dana.

Drugu indukciju „7+3” primilo je 37 bolesnika (37%). Raspodela bolesnika prema primenjenom indukcionm lečenju prikazana je na Dijagramu 24.



Dijagram 24. Raspodela bolesnika prema primenjom indukcionom lečenju. Napomena: ukupan broj bolesnika je 100, stoga su apsolutni brojevi ekvivalentni procentia. Skraćenice: DA – daunorubicin.

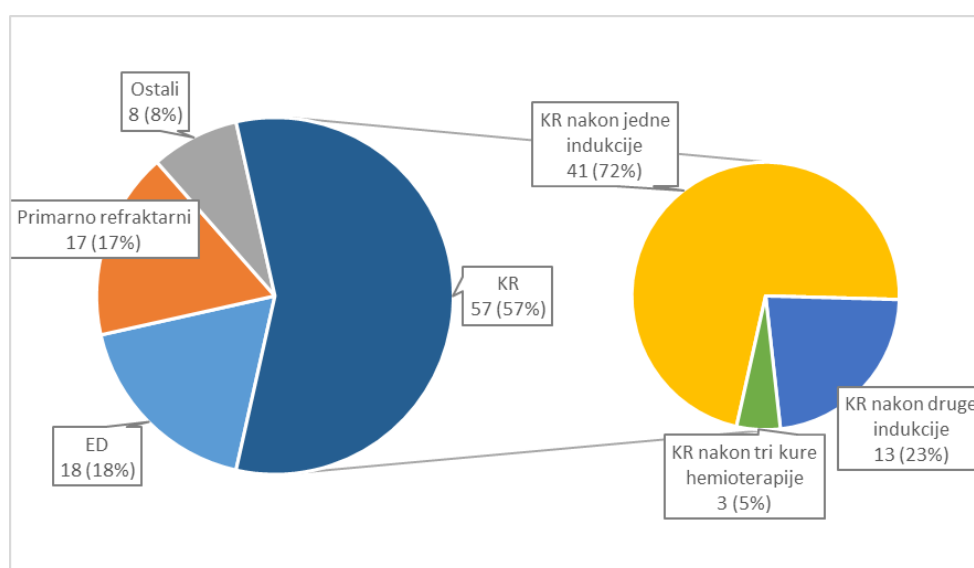
4.6.2. Odgovor na terapiju – kompletna remisija, rana smrtnost i primarno refraktarna bolest

Na primenjeno lečenje KR je postiglo 57/100 bolesnika (57%), sa medijanom do postizanja KR od 48 dana (opseg: 21-246). Broj terapija potrebnih za postizanje KR bio je redom, jedna, kod 41 bolesnika (72%), dve kod 13 bolesnika (23%), dok je kod tri bolesnika (5%) KR postignuta tek nakon treće terapije (Dijagram 25).

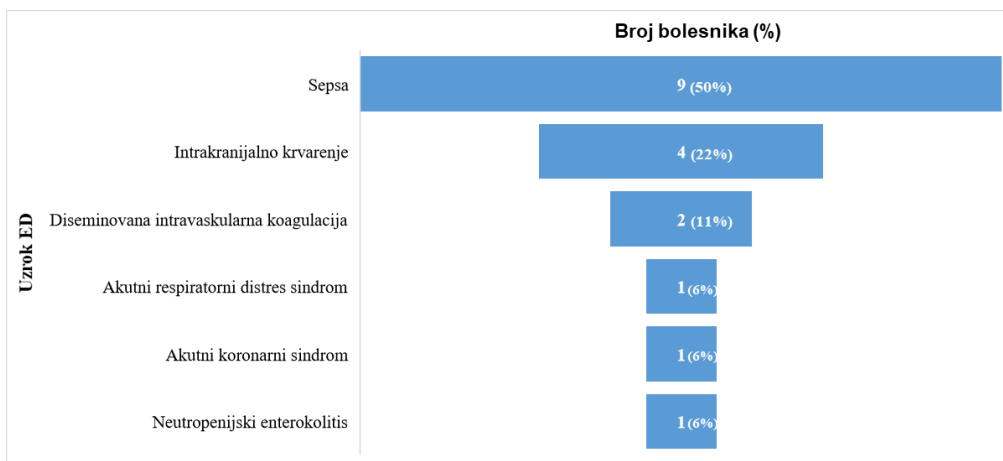
Osamnaest bolesnika (18%) preminulo je u toku indukcionog lečenja (Dijagram 25), sa medijanom 16,5 dana (opsega: 3-28) od početka lečenja. Uzroci ED navedeni su na Dijagramu 26.

Sedamnaest bolesnika (17%) bilo je primarno refraktarno nakon minimalno dva primenjena ciklusa hemioterapije.

Osam bolesnika (8%) nije ispunjavalo kriterijume za KR, ED ili primarno refraktarnu bolest. Kod svih, sem jednog bolesnika, primenom indukcionog lečenja (koje uključuje indukciju i eventualno drugu indukciju) nije postignuta KR, ali je smrtni ishod nastupio pre dokaza primarne refraktarnosti (dokaza refraktarnosti nakon dva ciklusa hemioterapije) (Dijagram 25). Medijana OS u ovoj grupi bila je 2,35 meseci (opsega 1,5-4).



Dijagram 25. Raspodela bolesnika prema stopi postizanja KR, ED i primarne refraktarnosti. Grupa KR dodatno je podeljena po broju ciklusa hemioterapije koji su bili potrebni za postizanje KR. Napomena – grupa ostalih sadrži bolesnike koji je isunjavaju kriterujume za jedan od tri ishoda lečenja. Skraćenice: KR – kompletna remisija; ED (*early death*) - rana smrtnost.

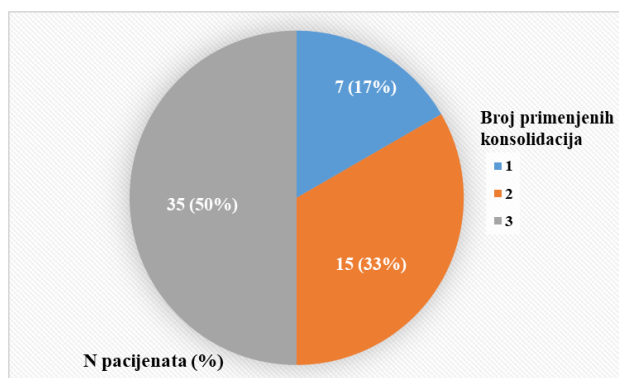


Dijagram 26. Raspodela bolesnika prema uzrocima rane smrtnosti (ED)

Rezultati mera ishoda lečenja i preživljavanja u podgrupi NK AML, prikazani su kasnije, zajedno sa analizom uticaja ekspresija gena.

4.6.3. Konsolidaciono lečenje i TMČH

Kod bolesnika, kod kojih je postignuta KR nakon induktionog lečenja (57 bolesnika; 57%), lečenje je nastavljeno primenom konsolidacionih kura srednjih do visokih doza citarabina, a 30 bolesnika (30%) je kasnije podvrgnuto TMČH. Raspodela bolesnika prema broju primenjenih konsolidacionih kura, prikazana je na Dijagramu 27.



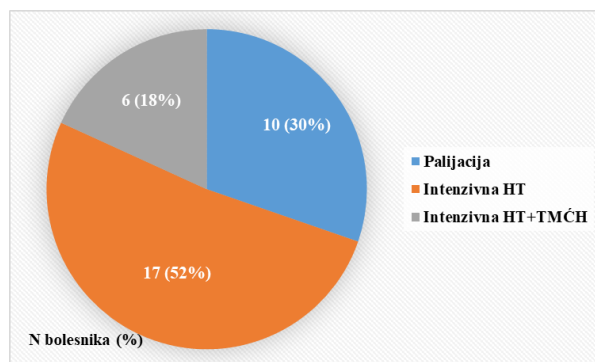
Dijagram 27. Raspodela bolesnika prema broju primenjenih konsolidacionih ciklusa

4.6.4. Merljiva rezidualna bolest (MRB)

MRB bila je pozitivna u 14 bolesnika, od 35 ukupno testiranih (40%).

4.6.5. Relaps

U naših bolesnika, sa inicijalno verifikovanom KR (57 bolesnika), relaps je zabeležen kod 33 bolesnika (stopa relapsa: 58%), sa medijanom vremena do pojave relapsa od 11 meseci (opseg: 2-324). Raspodela bolesnika prema primenjenom lečenju posle pojave relapsa, prikazana je na Dijagramu 28.



Dijagram 28. Primenjena terapija nakon dijagnoze relapsa AML

4.6.6. Preživljavanje bez bolesti, bez događaja i ukupno preživljavanje (DFS, EFS i OS)

U našoj grupi pacijenata sa AML, medijana DFS bila je 7,3 meseca (opsega: 0,3-88,2), medijana EFS bila je 4,85 meseca (opsega: 0,3-88,2), dok je medijana OS bila 9 meseci (opseg: 0,3-88,2).

U podgrupi sa NK AML, medijane parametra preživljavanja bile su sledeće: DFS 6,6 meseci (opseg: 0,3-86,5), EFS 4 meseca (opseg: 0,3-86), dok je za OS bila 8 meseci (opseg: 0,3-86,5).

4.6.7. Analiza uticaja demografskih, kliničkih, standardnih laboratorijskih i parametara AML na ishode lečenja i preživljavanje

Stopa postizanja KR, razvrstano prema ELN 2022 klasifikaciji, bila je 93,8% za povoljnu, 51,7% za intermedijarnu i 45,8% za nepovoljnu grupu rizika ($p=0,005$). Uzevši u obzir grupe rizika po ELN-u 2022, manju šansu za postizanje KR imali su bolesnici u intermedijarnoj (OR (engl. „*odds ratio*” - odnos šansi) 0,071, 95%CI (engl. „*confidence interval*” – interval poverenja) 0,009-0,574) i nepovoljnoj grupi (OR 0,056, 95%CI 0,006-0,498, $p=0,01$) u odnosu na povoljnu grupu rizika.

U našoj grupi bolesnika sa AML nijedan od drugih demografskih, kliničkih, standardnih laboratorijskih i parametara AML nije uticao na ishode lečenja.

Sprovedena je analiza prediktora preživljavanja, u koju su uključeni svi demografski, klinički, standardni laboratorijski i parametri vezani sa AML. Svi nezavisni prediktori ishoda, pri nivou značajnosti 0,05 u univarijantnoj analizi, uključeni su u multivarijantni regresioni COX-ov model proporcionalnih hazarda sa DFS (starost >55godina i postizanje KR) i OS (starost >55godina, kategorija rizika po ELN-u 2022 i postizanje KR), kao zavisnim varijablama. Zbog multikolinearnosti između varijable KR i primarne refraktarnosti, primene konsolidacije i TMČH, navedene varijable nisu uključene u finalni model. Takođe, budući da su samo dva pacijenta bila CD25 pozitivna i činjenice da nakon relapsa terapija nije bila primenjena kod svih pacijenata, parametri CD25 pozitivnost i relaps su isključena iz finalnog modela.

Nakon odabira prediktora iz univarijantne analize, multivarijantni model je izdvojio postizanje KR, kao nezavisnog prediktora za DFS (engl. *hazard ratio* – HR 0,284, 95%CI = 0,158-0,511, $p<0,01$) i OS (HR 0,114, 95%CI = 0,064-0,204, $P<0,01$) (Tabela 22).

Tabela 22. Analiza nezavishih prediktora ishoda lečenja COX-ovim regresionim modelom proporcionalnih hazarda

Varijable iz univarijantnog modela	Multivarijantna analiza za DFS			Multivarijantna analiza za OS		
	HR	95%CI	p	HR	95%CI	p
Starost>55godina	1.142	0.748-1.742	0.538	0.966	0.616-1.517	0.882
ELN 2022 povoljna g.r.				referentna		0.973
ELN 2022 intermedijarna g.r.				1.071	0.518-2.213	0.853
ELN 2022 nepovoljna g.r.				1.019	0.453-2.295	0.963
KR	0.030	0.012-0.075	0.003*	0.015	0.006-0.040	<0,001*

DFS (engl. *disease free survival*) – preživljavanje bez bolesti, OS (engl. *overall survival*) – ukupno preživljavanje, HR (engl. *hazard ratio*) – odnos hazarda (rizika) sa donjim i gornjim CI (engl. *confidence interval*) – intervalom poverenja, klasifikacija ELN-a (engl. *European LeukemiaNet*) – evropske mreže za leukemiju, citogenetičko-molekularne g.r. – grupe rizika, KR – kompletna remisija, * - značajnost razlike

4.7. Analiza uticaja genskih polimorfizama na ishode lečenja i preživljavanje

U ispitivanoj grupi bolesnika sa AML, raspodela genotipova *GSTM1*, *GSTT1*, *ABCB1*, *DCK* i *SLC29A1*, prikazana je u Tabeli 23.

Tabela 23. Raspodela genotipova u ispitivanoj grupi bolesnika sa AML

Gen Genotip	Broj (%) N = 100 (100%)
<i>GSTM1</i>	
Nulti	52 (52%)
Ne-nulti	48 (48%)
<i>GSTT1</i>	
Nulti	25 (25%)
Ne-nulti	75 (75%)
<i>GSTM1, GSTT1</i>	
Dvostruki nulti	10 (10%)
Ne-dvostruki nulti	90 (90%)
<i>ABCB1</i>	
GG	36 (36%)
GT	37 (37%)
GA	1 (1%)
TA	3 (3%)
TT	23 (23%)
<i>DCK</i>	
AA	15 (15%)
AG	40 (40%)
GG	45 (45%)
<i>SLC29A1</i>	
CC	54 (54%)
CT	39 (39%)
TT	7(7%)

Skraćenice: *GST T1 i M1* – gen za glutation-S transferaze T1 i M1, *ABCB1* – *ATP binding cassette subfamily B member 1*, *DCK* – gen za deoksicitidin kinazu, *SLC29A1* - *solute carrier family 29 member 1*.

4.7.1. Analiza uticaja prisustva pojedinačnih genskih polimorfizama u ispitivanim genima na ishode lečenja i preživljavanje

Nijedan od ispitivanih genskih polimorfizama pojedinačno, testirana u dominantnom, recesivnom i kodominantnom modelu, nije uticao na stopu postizanja KR, ED, primarne refraktarnosti i relapsa (Tabela 24), kao ni na DFS, EFS ili OS (Tabela 25).

Tabela 24. Pojedinačni uticaj genetičkih polimorfizama na ishode lečenja

Gen	Genotip	KR				ED				Refrakarna bolest				Relaps			
		Da, N(%)	Ne, N(%)	Σ, N(%)	p	Da, N(%)	Ne, N(%)	Σ, N(%)	p	Da, N(%)	Ne, N(%)	Σ, N(%)	p	Da, N(%)	Ne, N(%)	Σ, N(%)	p
GSTM1																	
Ko	Nulti	30 (53)	22 (51)	52 (52)	0.884	10 (53)	42 (52)	52 (52)	0.951	10 (59)	42 (51)	52 (52)	0.536	20 (61)	32 (48)	52 (52)	0.227
	Ne-nulti	27 (47)	21 (49)	48 (48)		9 (47)	39 (48)	48 (48)		7 (41)	41 (49)	48 (48)		13 (39)	35 (52)	48 (48)	
GSTT1																	
Ko	Nulti	11 (19)	14 (33)	25 (25)	0.130	6 (32)	19 (23)	25 (25)	0.557	7 (41)	18 (22)	25 (25)	0.123	8 (24)	17 (25)	25 (25)	0.902
	Ne-nulti	46 (81)	29 (67)	75 (75)		13 (68)	62 (77)	75 (75)		10 (59)	65 (78)	75 (75)		25 (76)	50 (75)	75 (75)	
GSTM1, GSTT1																	
Ko	Dvostruki nulti	6 (11)	4 (9)	10 (10)	1.000	0 (0)	10 (12)	10 (10)	0.201	4 (23)	6 (7)	10 (10)	0.064	5 (15)	5 (8)	10 (10)	0.291
	Ne-Dvostruki nulti	51 (89)	39 (91)	90 (90)		19 (100)	71 (88)	90 (90)		13 (77)	77 (93)	90 (90)		28 (85)	62 (92)	90 (90)	
ABCB1																	
Do	GG	23 (40)	13 (30)	36 (36)	0.297	4 (21)	32 (40)	36 (36)	0.132	6 (35)	30 (36)	36 (36)	0.947	12 (36)	24 (36)	36 (36)	0.958
	GT+GA+TA+TT	34 (60)	30 (70)	64 (64)		15 (79)	49 (60)	64 (64)		11 (65)	53 (64)	64 (64)		21 (64)	43 (64)	64 (64)	
DCK																	
Ko	AA	11 (20)	4 (9)	15 (15)	0.321	2 (10)	13 (16)	15 (15)	0.450	1 (6)	14 (17)	15 (15)	0.489	8 (24)	7 (10)	15 (15)	0.191
	AG	23 (40)	17 (40)	40 (40)		10 (53)	30 (37)	40 (40)		7 (41)	33 (40)	40 (40)		12 (36)	28 (42)	40 (40)	
	GG	23 (40)	22 (51)	45 (45)		7 (37)	38 (47)	45 (45)		9 (53)	36 (43)	45 (45)		13 (40)	32 (48)	45 (45)	
Do	AA	11 (19)	4 (9)	15 (15)	0.166	2 (11)	13 (16)	15 (15)	0.729	1 (6)	14 (17)	15 (15)	0.456	8 (24)	7 (10)	15 (15)	0.081
	AG+GG	46 (81)	39 (91)	85 (85)		17 (89)	68 (84)	85 (85)		16 (94)	69 (83)	85 (85)		25 (76)	60 (90)	85 (85)	
Re	GG	23 (40)	22 (51)	45 (45)	0.282	7 (37)	38 (47)	45 (45)	0.427	9 (53)	36 (43)	45 (45)	0.470	13 (39)	32 (48)	45 (45)	0.429
	AA+AG	34 (60)	21 (49)	55 (55)		12 (63)	43 (53)	55 (55)		8 (47)	47 (57)	55 (55)		20 (61)	35 (52)	55 (55)	
SLC29A1																	
Ko	CC	31 (54)	23 (53)	54 (54)	1.000	10 (53)	44 (54)	54 (54)	0.231	9 (53)	45 (54)	54 (54)	1.000	17 (52)	37 (55)	54 (54)	0.501
	CT	22 (39)	17 (40)	39 (39)		6 (31)	33 (41)	39 (39)		7 (41)	32 (39)	39 (39)		15 (45)	24 (36)	39 (39)	
	TT	4 (7)	3 (7)	7 (7)		3 (16)	4 (5)	7 (7)		1 (6)	6 (7)	7 (7)		1 (3)	6 (9)	7 (7)	
Do	CC	31 (54)	23 (53)	54 (54)	0.929	10 (53)	44 (54)	54 (54)	0.894	9 (53)	45 (54)	54 (54)	0.923	17 (52)	37 (55)	54 (54)	0.726
	CT+TT	26 (46)	20 (47)	46 (46)		9 (47)	37 (46)	46 (46)		8 (47)	38 (46)	46 (46)		16 (48)	30 (45)	46 (46)	
Re	TT	4 (7)	3 (7)	7 (7)	1.000	3 (16)	4 (5)	7 (7)	0.124	1 (6)	6 (7)	7 (7)	1.000	1 (3)	6 (10)	7 (7)	0.420
	CC+CT	53 (93)	40 (93)	93 (93)		16 (84)	77 (95)	93 (93)		16 (94)	77 (93)	93 (93)		32 (97)	61 (90)	93 (93)	

Skraćenice: Ko - kodominantan, Do - dominantan, Re - recesivan genski model; KR - kompletna remisija, ED (engl. *early death*) - rana smrtnost, Σ ukupno, *GST T1* i *M1* – gen za glutation-S transferaze T1 i M1, *ABCB1* – *ATP binding cassette subfamily B member 1*, *DCK* – gen za deoksicitidin kinazu, *SLC29A1* - *solute carrier family 29 member 1*.

Tabela 25. Pojedinačni uticaj genetičkih polimorfizama na preživljavanje

Gen	Genotip	EFS			DFS			OS		
		Vreme (meseći)	95% CI	p	Vreme (meseći)	95% CI	p	Vreme (meseći)	95% CI	p
GSTM1										
Ko	Nulti	5,0	3,4-6,6	0,424	12,6	6,8-18,4	0,608	8,7	0,4-16,9	0,925
	Ne-nulti	5,0	0,7-9,3		11,4	0-24,0		6,5	0,0-14,2	
GSTT1										
Ko	Nulti	3,0	1,3-4,7	0,099	23,6	7,1-40,1	0,836	6	0,3-11,7	0,293
	Ne-nulti	6,0	0,9-11,1		11,4	5,7-17,1		12,1	4,2-20	
GSTM1, GSTT1										
Ko	Dvostruki nulti	4,0	0,9-7,1	0,436	24,1	11,5-36,7	0,399	7,6	2,8-14,6	0,824
	Ne-Dvostruki nulti	5,0	2,5-7,5		10,7	4,9-16,5		8,7	0-19,2	
ABCB1										
Do	GG	4,0	3,1-4,8	0,863	9,9	4,5-15,3	0,982	7	0,9-13	0,998
	GT+GA+TA+TT	5,0	0,8-9,2		14,6	5,1-24,1		9,3	0,9-17,6	
DCK										
Ko	AA	4,5	12,2-29,8	0,336	22,5	18,9-26,1	0,551	21,6	12,0-31,2	0,615
	AG	4,0	2,6-5,3		20	5,3-34,6		6,0	0-19,8	
	GG	1,0	2,7-5,3		8,9	5-12,8		7,0	3,8-10,1	
Do	AA	21,0	12,2-29,8	0,195	22,5	18,9-26,1	0,526	21,6	12-31,2	0,379
	AG+GG	4,0	3,3-4,7		10,7	5,7-15,7		7	3,9-10,1	
Re	GG	4,0	2,7-5,3	0,241	8,9	5-12,8	0,286	7	3,8-10,1	0,447
	AA+AG	10,0	1,7-18,3		20,6	15,5-25,7		16,0	0-32,2	
SLC29A1										
Ko	CC	6,0	0,0-12,2	0,442	18,3	6,9-29,7	0,365	10,4	2,6-18,2	0,646
	CT	5,0	1,7-8,3		11,4	7,5-15,2		9,3	0,0-19,3	
	TT	2,0	0,7-3,3		2,5	0,7-4,3		2,5	0,7-4,3	
Do	CC	6,0	0,0-12,2	0,467	18,3	6,9-29,6	0,510	10,4	2,6-18,2	0,534
	CT+TT	4,0	2,8-5,2		10,7	4,1-17,3		8,8	2,9-13,1	
Re	TT	2,0	0,7-3,3	0,231	2,5	0,7-4,3	0,168	2,5	0,7-4,3	0,400
	CC+CT	6,0	3,5-8,5		14,6	5,3-23,9		9,7	3,5-16,1	

Skraćenice: Ko - kodominantan, Do - dominantan, Re - recesivan genski model, EFS (engl. *event-free survival*) – preživljavanje bez događaja, DFS (engl. *disease-free survival*) – preživljavanje bez bolesti, OS (engl. *overall survival*) – ukupno preživljavanje, *GST T1 i M1* – gen za glutation-S transferaze T1 i M1, *ABCB1* – *ATP binding cassette subfamily B member 1*, *DCK* – gen za deoksicitidin kinazu, *SLC29A1* - *solute carrier family 29 member 1*.

4.7.2. Analiza združenih uticaja genetičkih polimorfizama u ispitivanim genima na ishode lečenja i preživljavanje

Udruženi efekti genetičkih polimorfizama *SLC29A1* rs9394992, *DCK* rs12648166, *ABCB1* rs2032582 u dominantnom i *SLC29A1* rs9394992 i *DCK* rs12648166 u recesivnom modelu, nisu uticali ni na ishode lečenja (Tabela 26) ni na preživljavanje (Tabela 27) naših bolesnika sa AML. Testiranje *ABCB1* sprovedeno je samo po dominantnom modelu zbog male učestalosti A alela u nešoj grupi pacijenata (3 u TA i 1 u GA genotipu).

Tabela 26. Združeni efekti efekti genetičkih polimorfizama na ishode lečenja

Genetički model	Genotip (N)	KR				ED				Refraktarna bolest				Relaps			
		Da (%)	Ne (%)	Σ (%)	p	Da (%)	Ne (%)	Σ (%)	p	Da (%)	Ne (%)	Σ (%)	p	Da (%)	Ne (%)	Σ (%)	p
Dominanantan^a																	
	0	12 (21)	14 (33)	26 (26)	0.163	6 (32)	20 (25)	26 (26)	0.209	5 (29)	21 (25)	26 (26)	0.256	7 (21)	19 (28)	26 (26)	0.442
	1	26 (45)	19 (44)	45 (45)		10 (52)	35 (43)	45 (45)		8 (47)	37 (45)	45 (45)		15 (46)	30 (45)	45 (45)	
	2	18 (32)	9 (21)	27 (27)		3 (16)	24 (30)	27 (27)		4 (24)	23 (28)	27 (27)		11 (33)	16 (24)	27 (27)	
	3	1 (2)	1 (2)	2 (2)		0 (0)	2 (2.5)	2 (2)		0 (0)	2 (2)	2 (2)		0 (0)	2 (3)	2 (2)	
Recesivean^b																	
	0	25 (44)	18 (42)	43 (43)	0.836	8 (42)	35 (43)	43 (43)	0.962	8 (47)	35 (42)	43 (43)	0.988	15 (46)	28 (42)	43 (43)	0.803
	1	22 (39)	17 (39)	39 (39)		8 (42)	31 (38)	39 (39)		5 (29)	34 (41)	39 (39)		12 (36)	27 (40)	39 (39)	
	2	10 (17)	8 (19)	18 (18)		3 (16)	15 (19)	18 (18)		4 (24)	14 (17)	18 (18)		6 (18)	12 (18)	18 (18)	

^a*SLC29A1* CC, *DCK* AA, *ABCBI* GG genotip

^b*SLC29A1* TT, *DCK* GG genotip

Skraćenice: N broj genotipova, KR - kompletna remisija, ED (engl. *early death*) - rana smrtnost, Σ ukupno, *ABCBI* – *ATP binding cassette subfamily B member 1*, *DCK* – gen za deoksicitidin kinazu, *SLC29A1* - *solute carrier family 29 member 1*.

Tabela 27. Združeni efekti efekti genetičkih polimorfizama na preživljavanje

Genetički model	Genotip (Σ)	DFS			OS		
		HR	95% CI	p	HR	95% CI	p
Dominanantan^a							
	0	Referentna grupa			Referentna grupa		
	1	1.119	0.610-2.054	0.716	0.977	0.565-1.688	0.933
	2	0.807	0.403-1.614	0.544	0.812	0.436-1.511	0.510
	3	0.685	0.091-5.175	0.714	0.543	0.073-4.062	0.552
Recesivean^b							
	0	Referentna grupa			Referentna grupa		
	1	1.651	0.953-2.861	0.074	1.321	0.805-2.168	0.271
	2	1.271	0.619-2.610	0.514	1.103	0.586-2.074	0.762

^a*SLC29A1* CC, *DCK* AA, *ABCBI* GG genotip

^b*SLC29A1* TT, *DCK* GG genotip

Skraćenice: Σ zbir genotipova, EFS (engl. *event-free survival*) – preživljavanje bez događaja, DFS (engl. *disease-free survival*) – preživljavanje bez bolesti, OS (engl. *overall survival*) – ukupno preživljavanje, HR (engl. *hazard ratio*) – odnos rizika (hazarda), CI (engl. *confidence interval*) – interval poverenja, *ABCBI* – *ATP binding cassette subfamily B member 1*, *DCK* – gen za deoksicitidin kinazu, *SLC29A1* - *solute carrier family 29 member 1*.

4.8. Rezultati ekspresije gena *ABCBI*, *BAX* i *BCL2* u podgrupi pacijenata sa normalnim kariotipom

Analize ekspresije gena *ABCBI*, *BAX* i *BCL2* sprovedene su u podgrupi pacijenata sa NK AML, medijane starosti 51 godinu (opsega: 23-62), udela muškaraca / žena, redom 25 / 26.

4.8.1. Rezultati ekspresije gena *ABCBI*

Prikazani su u Tabeli 28.

Tabela 28. Prikaz demografskih, kliničkih, standardnih laboratorijskih i karakteristika bolesti, razvrstanih prema ekspresiji gena *ABCB1* u podgrupi pacijenata sa NK AML

Varijabla	Ukupno (N=51)	<i>ABCB1</i>		P
		<i>ABCB1</i> ⁺ (N=25)	<i>ABCB1</i> ⁻ (N=26)	
Pol				0,051
Muški, N (%)	25 (49)	16 (64)	9 (35)	
Ženski, N (%)	26 (51)	9 (36)	17 (65)	
Starost (godine), medijana (opseg)	51 (23-62)	53 (23-62)	49 (23-62)	0,396
Broj Le (x10 ⁹ /l), medijana (opseg)	22 (1-349)	7 (1-184)	26 (0-349)	0,071
Hb (g/l), medijana (opseg)	99 (66-131)	106 (78-124)	96 (66-131)	0,191
> 80 (g/l)	45 (88)	24 (53)	21 (47)	
< 80 (g/l)	6 (12)	1 (17)	5 (83)	
Broj Tr (x10 ⁹ /L), medijana (opseg)	55 (8-422)	42 (8-422)	69.5 (16-169)	0,129
LDH (J/l), medijana (opseg)	321 (1-2904)	175 (1-2904)	553.5 (175-1992)	0.028*
Blasti u per. krvi , % (opseg)	14 (0-98)	14 (0-98)	13.5 (0-87)	0,900
Blasti u koš. srži , % (opseg)	62 (30-97)	57 (30-90)	65 (33-97)	0,565
CD34				0.025*
Pozitivan	24 (47)	16 (67)	8 (33)	
Negativan	27 (53)	9 (33)	18 (67)	
FAB				<0,001*
M0, N (%)	4 (8)	4 (100)	0	
M1, N (%)	5 (10)	5 (100)	0	
M2, N (%)	18 (35)	11 (61)	7 (39)	
M4, N (%)	17 (33)	3 (18)	14 (82)	
M5, N (%)	7 (14)	2 (29)	5 (71)	
KR (%)				0,781
Da, N (%)	28(55)	13 (46)	15 (54)	
Ne, N (%)	23(45)	12 (52)	11 (48)	
Primarno refraktarni				1,000
Da, N (%)	8 (16)	4 (50)	4 (50)	
Ne, N (%)	43 (84)	21 (49)	22 (51)	
Relaps				0,460
Da, N (%)	17 (61)	9 (53)	8 (47)	
Ne, N (%)	11 (39)	4 (36)	7 (64)	
FLT3-ITD				0.019*
Pozitivan, N (%)	12 (24)	2 (17)	10 (83)	
Negativan, N (%)	39 (76)	23 (59)	16 (41)	
NPM1 mutiran				0,075
Pozitivan, N (%)	17 (33)	5 (29)	12 (71)	
Negativan, N (%)	34 (67)	20 (59)	14 (41)	

Skraćenice: *ABCB1* – *ATP binding cassette subfamily B member 1*, Le – leukociti, Hb – hemoglobin, Tr – trombociti, LDH – laktat dehidrogenaza, FAB – Francusko-Američko-Britanska klasifikacija, KR – kompletna remisija, *FLT3-ITD* - *fms related receptor tyrosine kinase 3 – inter tandem duplication*, *NPM1* – nukleofosmin 1

U našoj podgrupi ispitanika sa NK AML registrovana je značajno niža ekspresija *ABCB1*, u poređenju sa kontrolnom grupom, sa medijanama ekspresija od 0,16 (opseg: 0,00-13,74) u NK AML grupi, u odnosu na 1,02 (opseg 0,29-5,27) u kontrolnoj grupi ($p=0,025$). Uzimajući kao deobnu vrednost medijanu ekspresija *ABCB1* gena u podgrupi NK AML pacijenata od 0,16, podelili smo bolesnike na one sa višom (*ABCB1*⁺) – 49% bolesnika i one sa nižom (*ABCB1*⁻) – 51% bolesnika, ekspresijom od medijane.

Pokazna je statistički značajna povezanost između *ABCB1*⁺ i nižih vrednosti LDH u serumu ($p=0,028$). U grupi *ABCB1*⁺, značajno češći su bili pacijenti sa AML M0/M1 po FAB-u ($p<0,001$), CD34 pozitivni ($p=0,025$) i oni bez mutacije *FLT3-ITD* ($p=0,019$).

Nivo ekspresije *ABCB1* nije statistički značajno uticao na stopu KR ($p=0,781$), primarnu refraktarnost ($p=1,000$), kao ni na dužinu preživljavanja – DFS (Log-Rank 0,037, $p=0,848$) i OS (Log-Rank 0,951, $p=0,329$).

Po sprovođenju podstratifikacije pacijenata sa NK AML, na osnovu prisustva mutacija *FLT3-ITD* i *NPM1* u tri grupe: *NPM1*⁺ (11 bolesnika), *FLT3-ITD*⁺ (12 bolesnika) i *NPM1*⁻/*FLT3-ITD*⁻ (28 bolesnika), nađena je statistički značajno prisustvo *ABCB1*⁺ u grupi *NPM1*⁻/*FLT3-ITD*⁻, sa udelom od 71% bolesnika sa visokom ekspresijom *ABCB1* u ovoj podgrupi bolesnika ($p=0,001$). U navedenoj podgrupi *NPM1*⁻/*FLT3-ITD*⁻ bolesnika, prognozni uticaj nivoa ekspresije *ABCB1* bio je blizu granice značajnosti za OS: *ABCB1*⁺ 5 meseci u odnosu na 10 meseci u *ABCB1*⁻ (Log-Rank 3,447, $p=0,063$).

4.8.2. Rezultati ekspresije gena *BCL2*

Prikazani su u Tabeli 29.

Tabela 29. Prikaz demografskih, kliničkih, standardnih laboratorijskih i karakteristika vezanih za bolest, razvrstanih prema ekspresijama gena *BCL2*, *BAX* i odnosa *BAX/BCL2*, nalazi se u Tabeli 29. u podgrupi pacijenata sa NK AML

Varijabla	Ukupno (N=51)	<i>BCL2</i>		P	<i>BAX</i>		P	<i>BAX/BCL2</i>		P
		<i>BCL2</i> ⁺ (N=25)	<i>BCL2</i> ⁻ (N=26)		<i>BAX</i> ⁺ (N=25)	<i>BAX</i> (N=26)		<i>BAX/BCL2</i> ^{visoka} (N=25)	<i>BAX/BCL2</i> ^{niska} (N=26)	
Pol										
Muški, N (%)	25 (49)	10 (38)	15 (60)	0,165	16 (62)	9 (36)	0,095	16 (62)	9 (36)	0,095
Ženski, N (%)	26 (51)	16 (62)	10 (40)		10 (38)	16 (64)		10 (38)	16 (64)	
Starost (godine), medijana (opseg)	51 (23-62)	53 (27-62)	49 (23-62)	0,137	49 (27-62)	52,5 (23-62)	0,597	48 (23-62)	54 (27-62)	0,111
Broj Le (x10 ⁹ /l), medijana (opseg)	22 (1-349)	7 (1-184)	22,5 (2-349)		22 (1-184)	22 (0,2-349)		29 (1-349)	6 (1-184)	0.041*
Hb (g/l), medijana (opseg)	99 (66-131)	103 (82-131)	98 (66-128)		97 (66-131)	105 (78-128)		98 (66-128)	103 (82-131)	
> 80 (g/l)	45 (88)	25 (56)	20 (44)	0.023*	22 (49)	23 (51)	1,000	19 (53)	26 (47)	0.010*
< 80 (g/l)	6 (12)	0	6 (100)		3 (50)	3 (50)		0	6 (100)	
Broj Tr (x10 ⁹ /L), medijana (opseg)	55 (8-422)	60 (8-422)	53,5 (8-169)	0,528	55 (17-169)	54,5 (8-422)	0,497	52 (8-169)	60 (8-422)	0,685
LDH (J/l), medijana (opseg)	321 (1-2904)	175 (153-1992)	590,5 (1-2904)	0.010*	386 (153-1992)	306,5 (1-2904)	0,815	605 (1-2904)	75 (153-1992)	0.002*
Blasti u per. krvi , % (opseg)	14 (0-98)	15 (0-98)	11 (0-97)	0,737	11 (0-92)	16 (0-98)	0,623	11 (0-97)	15 (0-98)	0,865
Blasti u koš. srži , % (opseg)	62 (30-97)	57 (30-90)	66,5 (32-90)	0,531	63 (30-97)	61 (31-90)	0,756	70 (30-90)	57 (31-97)	0,341
CD34				0,095			0,404			0.050*
Pozitivan	24 (47)	15 (63)	9 (38)		10 (42)	14 (58)		8 (33)	16 (67)	
Negativan	27 (53)	10 (37)	17 (363)		15 (56)	12 (44)		17 (63)	10 (37)	
FAB				0.006*			0,239			0.002*
M0, N (%)	4 (8)	4 (100)	0		1 (25)	3 (75)		0	4 (100)	
M1, N (%)	5 (10)	4 (80)	1 (20)		3 (60)	2 (40)		1 (20)	4 (80)	
M2, N (%)	18 (35)	10 (56)	8 (44)		7 (39)	11 (62)		6 (33)	12 (67)	
M4, N (%)	17 (33)	3 (18)	14 (82)		8 (47)	9 (53)		14 (82)	3 (18)	
M5, N (%)	7 (14)	4 (57)	3 (43)		6 (86)	1 (14)		4 (57)	3 (43)	
KR (%)				0,404			0,264			0,577
Da, N (%)	28(55)	12 (43)	16 (57)		16 (57)	12 (43)		15 (54)	13 (46)	
Ne, N (%)	23(45)	13 (57)	10 (43)		9 (39)	14 (61)		10 (43)	13 (57)	
Primarno refraktarni				0.024*			0,703			0.044*
Da, N (%)	8 (16)	7 (88)	1 (12)		3 (38)	5 (62)		1 (13)	7 (87)	
Ne, N (%)	43 (84)	18 (42)	25 (58)		22 (51)	21 (49)		24 (56)	19 (44)	
Relaps							0.047*			0,137
Da, N (%)	17 (61)	7 (41)	10 (59)	1,000	7 (41)	10 (59)		7 (41)	10 (59)	
Ne, N (%)	11 (39)	5 (45)	6 (55)		9 (82)	2 (18)		8 (73)	3 (27)	
FLT3-ITD				0,324			1,000			0,199
Pozitivan, N (%)	12 (24)	4 (33)	8 (67)		6 (50)	6(50)		8 (67)	4 (33)	
Negativan, N (%)	39 (76)	21 (54)	18 (46)		19 (49)	20 (51)		17 (44)	22 (56)	
NPM1 mutiran				0,237			0,144			0,144
Pozitivan, N (%)	17 (33)	6 (35)	11 (65)		11 (65)	6 (35)		11 (65)	6 (35)	
Negativan, N (%)	34 (67)	19 (56)	15 (44)		14 (41)	20 (59)		14 (41)	20 (59)	

Skraćenice: *BCL2* - *B-cell lymphoma 2*, *BAX* – *BCL2 associated X*, *Le* – leukociti, *Hb* – hemoglobin, *Tr* – trombociti, *LDH* – laktat dehidrogenaza, *FAB* – Francusko-Američko-Britanska klasifikacija, *KR* – kompletna remisija, *FLT3-ITD* - *fms related receptor tyrosine kinase 3 – inter tandem duplication*, *NPM1* – nukleofozmin 1

U našoj podgrupi ispitanika sa NK AML medijana ekspresije *BCL2* gena od 1,22 (opsega 0,13-8,87) nije značajno bila različita u poređenju sa grupom zdravih kontrola (medijana 1,00, opseg: 0,21-1,59) ($p=0,148$). Uzevši medijanu, kao deobnu vrednost (1,22), podelili smo našu grupu u one sa višom (*BCL2*⁺) (49% bolesnika) i one sa nižom ekspresijom od medijane (*BCL2*⁻).

U analizi povezanosti ekspresije *BCL2* sa kliničkim i molekularnim karakteristikama bolesnika, pokazana je singifikantna korelacija *BCL2*⁺ sa višim koncentracijama hemoglobina ($p=0,023$) i nižom aktivnosti LDH u serumu ($p=0,010$). Bolesnici sa *BCL2*⁺ pripadali su u niže diferentovane AML (M0 i M1 po FAB-u) ($p=0,006$). *BCL2*⁺ nije bila povezana sa prisustvom mutacija *FLT3-ITD* ili *NPM1*.

Analiza ekspresije *BCL2*, pokazala je statistički značajnu povezanost između *BCL2*⁺ i primarno refraktarne bolesti ($p=0,024$). Naime, u grupi primarno rezistetntnih bolesnika, njih 88% je imalo *BCL2*⁺. Stopa KR u našoj podgrupi NK AML bolesnika bila je 55%. Nešto niža stopa KR

(48%) u grupi $BCL2^+$ nije bila singifikantno drugačija u odnosu na $BCL2^-$ ($p=0,404$), kao ni trajanje KR (11 meseci u $BCL2^+$ u odnosu na 9,3 meseca u $BCL2^-$) (Log-Rank = 0,46, $p=0,831$). Dužina OS nije se značajno razlikovala među $BCL2^+$ i $BCL2^-$, redom 6, odnosno 8 meseci (Log-Rank 2,030, $p=0,154$).

4.8.3. Rezultati ekspresije BAX gena

U naših ispitanika sa NK AML medijana ekspresije BAX -a u od 0,92 (opsega: 0,27-2,64), nije singifikantno bila drukčija u poređenju sa zdravi kontrolama, čija je medijana bila 1,09 (opseg: 0,41-1,55) ($p=0,704$). Uzevši medijanu ekspresije BAX -a (0,92), isto kao i u prethodnoj analizi sa $BCL2$, podelili smo grupu na one sa višom (BAX^+) i one sa nižom (BAX^-) ekspresijom gena u odnosu na medijanu. Analizom BAX -a nije pokazana statistički značajna povezanost između nivoa ekspresije gena i kliničkih i molekularnih karakteristika bolesnika.

Na negativan uticaj niske ekspresije BAX -a, ukazala je statistički značajna pojava relapsa u grupi BAX^- ($p=0,047$). Nešto veći udeo onih koji nisu postigli KR (61%) u grupi BAX^- nije bio statistički značajan ($p=0,264$), kao ni niži DFS (BAX^- , 8 meseci u odnosu na 11 meseci u BAX^+ , Log-Rank 0,020, $p=0,889$) i niži OS (BAX^- , pet u odnosu na sedam meseci u BAX^+ , Log-Rank 0,020, $p=0,888$).

4.8.4. Rezultati odnosa ekspresija gena $BAX/BCL2$

Imajući u vidu nekonzistentne pojedinačne uticaje nivoa ekspresija $BCL2$ i BAX gena na ishode lečenja i preživljavanje bolesnika, analizirali smo i združeni uticaj ova dva gena u vidu $BAX/BCL2$ odnosa.

Medijana vrednosti $BAX/BCL2$ bila je 0,62 (opseg: 0,11-7,77) i nije se značajno razlikovala od medijane u zdravih kontrola, koja je isnosila 0,91 (opseg: 0,59-3,69) ($p=0,185$). Uzevši medijanu vrednosti odnosa ekspresija $BAX/BCL2$ (0,62), kao deobnu vrednost, podelili smo bolesnike u dve grupe: više od medijane ($BAX/BCL2^{\text{visoka}}$) i niže od medijane ($BAX/BCL2^{\text{niska}}$), sa 49% bolesnika u grupi $BAX/BCL2^{\text{visoka}}$.

Pokazana je statistički značajna povezanost između $BAX/BCL2^{\text{visoka}}$ i viših vrednosti Le ($p=0,041$) i LDH ($p=0,002$), a nižih vrednosti Hb ($p=0,010$). $BAX/BCL2^{\text{visoka}}$ grupu bolesnika češće su činili AML M4 po FAB-u ($p=0,002$) i CD34 negativne AML ($p=0,050$). Nije pokazana povezanost nivoa odnosa $BAX/BCL2$ sa prisustvom mutacija $FLT3-ITD$ i $NPM1$.

Prognozni značaj odnosa $BAX/BCL2$ pokazao se samo u odnosu na primarnu refraktarnost, gde je 87% pacijenata sa primarnom refraktarnošću, pripadalo grupi $BAX/BCL2^{\text{niska}}$ ($p=0,044$). Analiza preživljavanja nije pokazala uticaj vrednosti visokog ili niskog odnosa ekspresija $BAX/BCL2$ na dužinu DFS ili OS, redom Log-Rank 0,139 ($p=0,710$) i Log-Rank -0,004 ($p=0,951$).

4.8.5. Povezanost između ekspresija gena $ABCBI$, BAX i $BCL2$

Kako je kod bolesnika sa visokom ekspresijom $ABCBI$ ($ABCBI^+$) češće bila prisutna i visoka ekspresija $BCL2$ gena ($BCL2^+$) ($p<0,001$), tako su se ovi bolesnici sa $ABCBI^+$ češće nalazili u grupi sa niskim odnosom $BAX/BCL2$ ($BAX/BCL2^{\text{niska}}$) ($p<0,001$) (Tabela 30).

Tabela 30. Povezanost između ekspresije gena ABCB1, BCL2 i BAX u podgrupi bolesnika sa NK AML

Gen	Ukupno (N=51)	ABCB1		p
		ABCB1 ⁺ (N=25)	ABCB1 ⁻ (N=26)	
BCL2⁺	25 (49)	20 (80)	5 (20)	<0,001*
BCL2⁻	26 (51)	5 (24)	21 (76)	
BAX/BCL2^{visoka}	25(49)	5 (20)	20 (80)	
BAX/BCL2^{niska}	26 (51)	20 (77)	6 (23)	<0,001*

Skraćenice: ABCB1 – ATP binding cassette subfamily B member 1, BCL2 - B-cell lymphoma 2, BAX – BCL2 associated X

5. Diskusija

Uprkos visokoj stopi postizanja KR nakon indukcionog lečenja AML, značajan broj pacijenata razvija relaps bolesti. Jedno od mogućih objašnjenja visoke stope relapsa AML može biti nedovoljna efikasnost hemioterapije u eliminisanju MRB (35). Takođe, određeni broj bolesnika ima nepovoljan ishod lečenja usled toksičnosti same hemioterapije ili primarno refraktarne bolesti na primenjeno standardno lečenje (35). Imajući u vidu heterogenost AML u smislu kliničke prezentacije, citogenetičko-molekularnog profila i varijabilnih ishoda lečenja, predikcija finalnog ishoda lečenja na samoj dijagnozi bolesti, nije jednostavan zadatak. Zasad su najbolji prediktori ishoda lečenja citogenetičko-molekularne aberacije na dijagnozi (16). U našoj studiji analizirali smo uticaje više citogenetičko-molekularnih klasifikacija (MRC-C, ELN 2017 i najnoviju ELN 2022) na ishode lečenja i preživljavanje bolesnika. U našoj grupi bolesnika, ELN 2022 klasifikacija je dobro predvidela stope postizanja KR, shodno grupama rizika. Međutim, nije pokazala prediktivnu moć za druge ishode lečenja - ED, stope relapsa i primarne refraktarnosti, kao ni za preživljavanje. Takođe, nijedan od demografskih, kliničkih, standardnih laboratorijskih ili parametara same bolesti nije bio prediktivan za ishode lečenja ili preživljavanje. Multivarijantnom analizom identifikovali smo postizanje KR kao nezavisnog prediktora za DFS i OS. Starost >55 godina, klasifikacija grupa rizika prema ELN 2022, kao i polimorfizmi u ispitivanim genima, nisu pokazale uticaj na ishode lečenja ili preživljavanje u našoj grupi bolesnika sa AML.

Humani ekvilibrativni nukleozidni transporter 1 (hENT1), koga enkodira gen *SCL29A1*, predstavlja glavni transporter influksa citarabina u leukemijsku ćeliju. Oko 80% citarabina ulazi u ćeliju ovim putem, posebno u indukcionom lečenju, kada se primenjuju doze citarabina 100-200mg/m², kojima se dostiže plazmatska koncentracija citarabina od <1 µM (36). U ranijim studijama pokazana je povezanost nivoa ekspresije *SLC29A1* sa ishodima lečenja (80), gde je niska ekspresija informacione RNK (iRNK) bila povezana sa većim rizikom za rani relaps AML i kraće DFS i OS u odraslih bolesnika sa AML (81). U našoj studiji, polimorfizam rs9394992 *SLC29A1* gena nije pokazala povezanost sa ishodima lečenja i preživljavanjem, što je u saglasju sa rezultatima japanskih (82) i koreanskih (83) studija. U koreanskoj studiji (83), nađena je povezanost haplotipa ht3 (koji uključuje T alel rs9394992) sa višom stopom postizanja KR. Suprotno našim rezultatima, u kineskoj kohorti pokazana je niža stopa relapsa i duže DFS i OS u bolesnika sa CC genotipom u odnosu na CT/TT genotip (70).

Prvi i ograničavajući korak u aktivaciji citarabina u citarabin-trifosfat, aktivan-antileukemijski oblik citarabina, posredovan je enzimom DCK. Ranija istraživanja ukazala su na viši predterapijski nivo ekspresije iRNK *DCK* gena i duži EFS u bolesnika sa AML, lečenih citarabinom (84). Do sličnih opažanja došlo se i u istraživanjima kod bolesnika sa solidnim malignitetima, koji su lečeni gemcitabinom, lekom koji po hemijskom sastavu spada u nukleozidne analoge, kao i citarabin (85). Rezultati u našoj grupi bolesnika su u skladu sa rezultatima japanskih (82) i kineskih (70) studija, u kojima nije pokazan uticaj polimorfizma *DCK* rs12648166 na ishode lečenja i preživljavanje u grupi bolesnika sa AML.

Delecije gena (nulti genotipovi) familije *GST*, glavnih intracelularnih detoksifikatora reaktivnih kiseoničnih radikala koje proizvode antraciklini, povezane su sa ishodima lečenja obolelih od AML. Naime, metaanaliza jedanaest studija pokazala je povezanost delecionog (nultog) genotipa *GSTT1* i dvostruko nultih genotipova *GSTT1* i *GSTM1* sa nižom stopom postizanja KR, nižim preživljavanjem bez progresije bolesti i OS, naročito u azijskim populacijama (37). U našoj grupi bolesnika nismo potvrdili ove korelacije. Napominjemo da je u grupi bolesnika sa dvostrukim nultim genotipom *GSTT1* i *GSTM1*, p vrednost od 0,064 bila blizu statističkoj značajnosti za primarno refraktarnu bolest.

Smatra se da je pojava rezistencije na standardno lečenje AML, posebno rezistencije na brojne hemioterapeutike (engl. *Multi Drug Resistance* – MDR), genetički predodređena (39). Jedan od

glavnih mehanizama MDR-a je transportna (pumpna) rezistencija koja je predstavljena povišenom ekspresijom gena za membranske proteine – efluks pumpe – koje povećavaju efluks citostatika iz leukemijskih ćelija i time im smanjuju efikasnost (41,42). Do sada najviše istražen je transporter MDR1 (p-glikoprotein), koji ima ulogu efluks pumpe antraciklina, a enkodiran je genom *ABCB1*. Slabija funkcija pumpe i posledična veća intracelularna koncentracija antraciklina je u korelaciji sa većom stopom postizanja KR i dužim OS, ali i većom toksičnošću hemioterapije (36). Ovo zapažanje potvrđeno je u prethodnim studijama (86-89) i dve metaanalize (90,91), koje su ispitivale uticaj varijati *ABCB1* gena, uključujući i, u našem radu ispitivanu, polimorfizam rs2032582 (2677G>T/A). Za razliku od ovih studija, u našoj grupi bolesnika polimorfizam rs2032582 *ABCB1* gena nije uticala na ishode lečenja i preživljavanje. Naime, naši rezultati su u saglasju sa studijama u populacijama Nemaca (92), Turaka (93), Holanđana (94), stanovnika SAD (95), Šveđana (96), Španaca (97) i Južnokoreanaca (86,87).

U analizi obrazaca ekspresije gena *ABCB1*, u podgrupi bolesnika sa NK AML, našli smo značajno češće prisustvo povišene ekspresije *ABCB1* (*ABCB1*⁺ grupa) u bolesnika sa AML M0 ili M1, kao i u grupi bolesnika sa CD34⁺, što je u saglasju sa činjenicom da je ekspresija *ABCB1* gena u nezrelim ćelijama hematopoeze značajno povišena (98-100). Naši rezultati ukazuju na međusobnu isključivost mutacija *FLT3-ITD* ili *NPM1* i visoke ekspresije *ABCB1*. Slična opažanja uočena su u ranijim studijama, gde je pretpostavljeno da je u pacijenata sa *FLT3-ITD*⁺ gubitak ekspresije *ABCB1* posledica povećane proliferacije leukemijskih blasta usled prisustva *driver* mutacije *FLT3-ITD* (101-104), dok povećana ekspresija *ABCB1*, uočena u *NPM1* nemutiranih, može delimično da objasni lošiju prognozu ovih bolesnika, u odnosu na *NPM1* mutirane AML (101,102,105).

Ekspresija *ABCB1*, u našoj podgrupi AML bolesnika sa NK, nije bila povezana sa stopom postizanja KR, primarne refraktarnosti i relapsa, kao ni sa DFS ili OS. Odsustvo korelacije moglo bi se objasniti činjenicom da je ekspresija *ABCB1* zavisna od godina starosti obolelih. Naime, negativan uticaj ekspresije *ABCB1* je redukovan ili potpuno odsutan među mlađim obolelim od AML, a posebno u pedijatrijskoj AML (99, 106-108). Medijana starosti obolelih od AML kreće se između 65 i 70 godina (1-3), stoga naša podgrupa bolesnika sa NK AML, sa medijanom starosti od 51 godinu, mogla bi se posmatrati kao grupa nešto mlađih bolesnika. Osim toga, izostanak uticaja ekspresije gena *ABCB1* na ishode lečenja i preživljavanje možemo objasniti našom malom grupom ispitanika i činjenicom da smo ispitivali ekspresiju samo jednog, od brojnih gena, iz superfamilije ABC efluks pumpi. Osim toga, u našoj podgrupi bolesnika sa NK AML, mlađoj od uobičajene medijane starosti obolevanja, nepovoljan efekat *ABCB1*⁺ nije toliko evidentan, kao u starijih bolesnika sa AML. U ranijim studijama pokazan je uticaj različitih obrazaca koekspresije više članova ABC superfamilije transportera na pojavu rezistencije i prognozu obolelih od AML (105,109,110). Smatra se da postoji međusobno preklapanje u specifičnostima za određene supstrate među različitim ABC transporterima i da je njihova koekspresija odgovorna za pojavu refraktarnosti na hemioterapeutike (105, 111,112). Ovu pretpostavku potvrđuje istraživanje *Marzac C.* i sar. (105), u kome je pokazano da ispoljavanje refraktarnosti kod bolesnika sa AML raste sa 21% na 100%, u zavisnosti od broja (0-3) eksprimovanih gena iz *ABC* familije transportera (105).

Gubitak regulacije apoptoze, jedan je od najznačajnijih koraka, u leukemogenezi. Jedan od najznačajnijih regulatora ovog procesa su proteini iz familije *BCL2*, čiji poremećaj regulacije vodi ćelijskog imortalizaciji i hemiorezistenciji (47,113,114). U našem istraživanju ispitivali smo uticaj nivoa ekspresije gena dva člana ove familije i to *BCL2* i *BAX*, kao i združeni uticaj ekspresije ova dva gena oličenom u količniku *BAX/BCL2* na ishode lečenja i preživljavanje u podgrupi AML bolesnika sa NK.

U našoj podgrupi NK AML bolesnika, medijana ekspresije *BCL2*, nije se značajno razlikovala od medijane u zdravim kontrola. Takođe je uočen veliki opseg variranja vrednosti nivoa ekspresije *BCL2*, opisan i u ranijim istraživanjima (47,115). Nivo ekspresije *BCL2* nije pokazao prediktivni značaj u odnosu na stopu postizanja KR, dužine DFS, kao ni OS u našoj podgrupi NK AML bolesnika, što je u saglasnosti sa nekim od ranije publikovanih studija (43,48,116,117). Međutim, povišena

ekspresija *BCL2* (*BCL2*⁺), u našoj grupi bolesnika, značajno je bila povezana sa primarno refraktarnom bolesti. S tim u vezi grupa *Bilbao-Sieyro* i sar. (117) ukazala je na vezu između povećane ekspresije *BCL2*, u uzorcima srži uzetih pri potvrdi KR ili relapsa, i kraćih DFS i OS. Navedena saznanja mogu imati značaja za eventualnu primenu ciljane terapije *BCL2* inhibitorima.

Visoka ekspresija *BCL2* (*BCL2*⁺), u našoj podgrupi NK AML bolesnika, registrovana je u bolesnika sa M0 i M1 kategorijama AML, što je u saglasju sa podatkom da ekspresija *BCL2* zavisi od stadijuma diferencijacije, slično ekspresiji *ABCBI*. Naime, najveća ekspresija *BCL2*, pokazana je u nezrelim mijeloidnim progenitorima i postepeno se smanjuje kako odmiču kasniji stadijumima diferencijacije (115). Ovaj podatak, je od mogućeg značaja u primeni ciljane terapije *BCL2* inhibitorima, budući da su pokazani slabiji efekti ovih terapija u bolesnika sa zrelijim formama AML, kao što su M4 ili M5 (118,119).

U našoj podgrupi NK AML bolesnika pokazali smo da je snižena ekspresija *BAX*-a (*BAX*⁻) značajno udružena sa većom stopom relapsa. Ovaj nalaz je u skladu sa do sada objavljenim istraživanjima uticaja ekspresije *BAX*-a, ali sa napomenom da u ranijim studijama uticaj *BAX*-a analiziran je pretežno u kontekstu *BAX/BCL2* odnosa (43,52,53,55,120,121). U našem istraživanju, nizak odnos *BAX/BCL2* (*BAX/BCL2*^{nizak}) značajno je povezan sa primarno refraktarnom bolesti. U drugim studijama visok odnos *BAX/BCL2* (*BAX/BCL2*^{visok}) udružen je sa većom stopom postizanja KR, dok su pacijenti sa *BAX/BCL2*^{nizak} imali kraće OS. Vodeći se metodologijom *Del Poeta* i sar. (120), koja je pokazala je udruženost visokog *BAX/BCL2* odnosa sa mutiranim *NPM1* i odsutnom *FLT3-ITD* mutacijom (120), ispitali smo povezanost *BAX/BCL2*^{visok} statusa sa mutacionim statusom *FLT3-ITD* i *NPM1*. U našoj grupi bolesnika, nismo pokazali značajnu povezanost između ovih parametara, budući da prisustvo navedenih mutacija nije bilo povezano sa pojedinačnim nivoima ekspresije *BCL2* ili *BAX*-a.

Napominjemo da metodologija određivanja ekspresije *BCL2* i *BAX*-a, korištena u navedenim referentnim studijama, bila je veoma heterogena, a uključivala je analizu protočnom citometrijom, *western-blot*-om, RT-PCR-om i sekvenciranjem RNK, stoga navedena poređenja ne mogu se doslovno tumačiti u kontekstu naših rezultata. Takođe, analiza samo dva, u odnosu na brojne članove *BCL2* familije regulatora apoptoze, predstavlja pojednostavljenje, inače, veoma složene plejade pro- i anti-apoptotskih članova ove familije, čiji zbirni međusobni uticaji na koncu odlučuju o sudbini leukemijskog blasta.

U našoj studiji obolelih od AML ispitali smo i združene uticaje prisustva više polimorfizama gena na ishode lečenja i preživljavanje. Rezultati prethodnih studija koje su ispitivale povezanost združenih efekata polimorfizma rs2032582 *ABC* i drugih članova *SLC* familije, ali ne i *SLC29A1*, pokazali su povezanost ovih polimorfizama sa povećanom renalnom i hepatičnom toksičnošću primenjenog lečenja kod TT genotipa rs2032582 *ABC*, bez uticaja na stopu KR ili ED (36,97). S druge strane, združeni efekti polimorfizama rs9394992 (genotip CT/TT) i rs324148 (genotip CC) u genu *SLC29A1* (70), povezani su sa signifikantno redukovanim DFS i OS. Povrh toga, združeni efekti polimorfizma rs3734703 *SLC29A1* (genotip AA ili AC) sa rs2612100 *TYMS* (timidilat sintetaze) korelirani su sa signifikantno kraćim DFS u odnosu na *wild type* genotipove navedenih gena (122). Združeni efekti ispitivanih varijanti u genima *SLC29A1*, *DCK* i *ABCBI*, nisu pokazali prediktivni uticaj na ishode lečenja i samo preživljavanje, u našoj grupi bolesnika sa AML.

Većina studija, koja se bavila uticajem genetičkih polimorfizama na ishode lečenja i preživljavanje bolesnika sa AML, rađena je u azijskim populacijama (123). Rezultati ovih studija nisu potvrđeni u našoj studijskoj grupi. Jedan od mogućih razloga ovakvih rezultata mogle bi biti razlike u učestalostima genotipova između azijskih i srpske populacije, koji bi objasnio izostanak prediktivnog značaja ispitivanih polimorfizama u našoj populaciji obolelih od AML. Navedeno objašnjenje, možda najbolje odslikava prognozni uticaj polimorfizama u genima *SLC29A1*, *GSTT1* i *GSTM1*, koji je pokazan isključivo u studijama sa azijskim populacijama (37,70). Izostanak uticaja

polimorfizma u genu *ABCB1* na ishode lečenja i preživljavanje moglo bi se objasniti niskom učestalošću minornog alela A u našoj grupi obolelih od AML.

Osim toga, razlike među studijama, u smislu doziranja hemioterapeutika (citarabin 100-200 mg/m² i daunorubiin 45-90 mg/m²), upotrebe drugih antraciklina (npr. idarubicina), dodatka drugih klasa hemioterapeutika, kao što su etopozid, amsakrin ili fludarabin, mogli su da utiču na krajnje rezultate i ishode lečenja, samim tim i na prediktivnu moć genetičkih polimorfizama. Osim toga, varijacije u demografskim i obeležjima AML u različitim studijama, mogle su dodatno da utiču na ishode lečenja i preživljavanje u ispitivanjima grupama obolelih od AML.

Nekonzistentnost u studijama farmakogenetike može se delom objasniti i različitim farmakogenetičkim profilima, jedinstvenim za određene populacije (124). Naime, podaci o farmakogenetici AML u evropskim populacijama su veoma retki. U vezi sa ovim, prospektivne studije, koje bi uključile brojne različite evropske populacije obolelih od AML su potrebne kako bi se dobili pouzdani farmakogenetički podaci i time bolje definisali prognosni potencijal ovih markera u AML. Ova studija predstavlja prvu farmakogenetičku i farmakotranskriptomsku studiju u srpskoj populaciji obolelih od AML, čime doprinosi dopuni saznanja u ovoj oblasti. Takođe, u našem istraživanju prvi put je proučavan uticaj ekspresija gena *BCL2*, *BAX*-a i odnosa *BAX/BCL2* isključivo u grupi bolesnika sa NK AML, čime je uticaj citogenetičkih aberacija, bilo povoljan ili nepovoljan, isključen kao pridruženi faktor. Ova citogenetički homogena grupa bolesnika, pokazuje veoma varijabilne ishode lečenja i dužinu preživljavanja. Uzevši u obzir nemogućnost adekvatne procene prognoze u ovih bolesnika sprovedi smo ispitivanje obrazaca ekspresije jednih od glavnih gena rezistencije – apoptotskih i pumpnih i time delimično doprinesi boljoj stratifikaciji pacijenata sa NK AML.

U budućim analizama obolelih od AML, biće neophodna primena tehnika analize visoke propusnosti (engl. *high-throughput analysis*), kao i primena integrativnih analiza više „omika” (engl. *multi-omics*), koje uključuju genomiku, proteomiku, transkriptomiku, epigenomiku i metabolomiku, u cilju pronalaženja klinički značajnih farmakogenetičkih/farmakotranskriptomičkih markera bolesti. Tek u tom trenutku možemo smatrati da je lečenje AML prersonalizovano.

6. Zaključci

- U našoj grupi bolesnika sa AML ispitivani polimorfizmi u genima *SLC29A1*, *DCK*, *GSTT1*, *GSTM1* i *ABCB1* nisu pokazali prognozni potencijal na ishode lečenja i preživljavanje, kako pojedinačno, tako i u analizi združenih efekata polimorfizama ovih gena.
- U podgrupi bolesnika sa normalnim kariotipom pokazana je veza između primarno refraktarne bolesti i povećane ekspresije antiapoptotskog gena *BCL2*. U istoj grupi bolesnika veća stopa relapsa registrovana je u grupi sa niskom ekspresijom proapoptotskog gena *BAX*. Analiza odnosa ekspresija *BAX/BCL2* u grupi sa normalnim kariotipom pokazala je veću stopu primarne refraktarnosti u onih bolesnika sa niskim odnosom *BAX/BCL2*.
- Ekspresija *ABCB1* nije pokazala prognozni potencijal u našoj podgrupi bolesnika sa normalnim kariotipom. Pokazano je odsustvo *FLT3-ITD* i *NPM1* u grupi bolesnika sa visokom ekspresijom *ABCB1*.
- Postizanje kompletne remisije bolesti istaknuto je kao nezavisni i jedini prediktor preživljavanja bez bolesti i ukupnog preživljavanja u multivarijantnoj analizi naše grupe obolelih od AML.
- Razmatranja specifičnih genetičkih profila određenih populacija neophodno je u farmakogenetičkim i farmakotranskriptomičkim istraživanjima. Imajući u vidu oskudan broj studija farmakogenetike i farmakotranskriptomike AML u evropskim populacijama, naši rezultati doprinose saznanjima u ovoj oblasti i snažno ukazuju na neophodnost integrativnog pristupa u cilju pronalaženja dobrih farmakogenetičkih i farmakotranskriptomičkih markera u srpskoj i evropskim populacijama obolelih od AML.

7. Literatura

1. Hatipoglu O.F, Bender O, Gunduz E, Gunduz M. Pharmacogenomics in Acute Myeloid Leukemia. In: Barh D, Dhawan D, Ganguly N (eds). *Omics for Personalized Medicine*. New Delhi: Springer; 2013. p.237-48.
2. Maksimovic N, Zaric M, Gazibara T. et al. Incidence and Mortality Patterns of Acute Myeloid Leukemia in Belgrade, Serbia (1999–2013). *Medicina (Kaunas)* 2018; 54(1):5.
3. Döhner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, Dombret H, Ebert BL, Fenaux P, Larson RA, Levine RL, Lo-Coco F, Naoe T, Niederwieser D, Ossenkoppele GJ, Sanz M, Sierra J, Tallman MS, Tien HF, Wei AH, Löwenberg B, Bloomfield CD. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood* 2017; 129(4):424-447. doi: 10.1182/blood-2016-08-733196.
4. Gunz FW. Leukemia in the past. In: Henderson ES, Lister TA (eds). *Leukemia*. Philadelphia: WB Saunders Company; 1990. p.3-11.
5. Beutler E. The treatment of acute leukemia: past, present, and future. *Leukemia* 2001; 15:658-661.
6. Paolo Piccaluga P. Introductory Chapter: A Brief History of Acute Leukemias Treatment [Internet]. *Acute Leukemias*. IntechOpen; 2021. Available from: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.96439>. Pristupljeno 17.2.2024.
7. Gloor W. Ein fall von geheilter Myeloblasten leukämie. *Munch Med Wochenschr* 1930; 77:1096-1098.
8. Yates JW, Wallace HR, Ellison RR, Holland JF. Cytosine arabinoside (NSC-63878) and daunorubicin (NSC-83142) therapy in acute nonlymphocytic leukemia. *Cancer Chemother Rep* 1973; 57:485.
9. Barnes DWH, Corp MJ, Loutit JF, Neal FE. Treatment of murine leukaemia with X-rays and homologous bone marrow. *BMJ* 1956; ii:626-627.
10. Thomas ED, Lochte HL, Jr Lu WC, Ferrebee JW. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *N Engl J Med* 1957; 257:491-496.
11. Gaynon PS, Zomorodian TJ and Pinkel D. History of leukemia: historical perspectives. In: *Childhood Leukemias: Third Edition*, by Ching-Hon Pui, Ed. Cambridge University Press 978-0-521-19661-1.
12. Bloomfield CD, Secker-Walker LM, Goldman AI, Van Den Berghe H, de la Chapelle A, Ruutu T, Alimena G, Garson OM, Golomb HM, Rowley JD, et al. Six-year follow-up of the clinical significance of karyotype in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet.* 1989; 40(2):171-85. doi: 10.1016/0165-4608(89)90023-x.
13. Visani G, Bernasconi P, Boni M, Castoldi GL, Ciolli S, Clavio M, Cox MC, Cuneo A, Del Poeta G, Dini D, Falzetti D, Fanin R, Gobbi M, Isidori A, Leoni F, Liso V, Malagola M, Martinelli G, Mecucci C, Piccaluga PP, Petti MC, Rondelli R, Russo D, Sessarego M, Specchia G, Testoni N, Torelli G, Mandelli F, Tura S. The prognostic value of cytogenetics is reinforced by the kind of induction/consolidation therapy in influencing the outcome of acute myeloid leukemia--analysis of 848 patients. *Leukemia.* 2001;15(6):903-9. doi: 10.1038/sj.leu.2402142.

14. Ley TJ, Mardis ER, Ding L, et al. DNA sequencing of a cytogenetically normal acute myeloid leukaemia genome. *Nature*. 2008;456(7218):66-72.
15. Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, et al. Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2016;374(23):2209-2221.
16. Döhner H, Wei AH, Appelbaum FR, Craddock C, DiNardo CD, Dombret H, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN. *Blood* 2022; 140(12): 1345-1377. doi: 10.1182/blood.2022016867.
17. Emadi A, Karp JE. The clinically relevant pharmacogenomic changes in acute myelogenous leukemia. *Pharmacogenomics* 2012;13(11):1257-69. doi: 10.2217/pgs.12.102.
18. Lamba JK. Genetic factors influencing cytarabine therapy. *Pharmacogenomics* 2009;10(10): 1657–74. doi: 10.2217/pgs.09.118.
19. Falini B, Mecucci C, Tiacci E, Alcalay M, Rosati R, Pasqualucci L, La Starza R, Diverio D, Colombo E, Santucci A, Bigerna B, Pacini R, Pucciarini A, Liso A, Vignetti M, Fazi P, Meani N, Pettrossi V, Saglio G, Mandelli F, Lo-Coco F, Pelicci PG, Martelli MF; GIMEMA Acute Leukemia Working Party. Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *N Engl J Med*. 2005 Jan 20;352(3):254-66. doi: 10.1056/NEJMoa041974.
20. Grimwade D, Hills RK, Moorman AV, Walker H, Chatters S, Goldstone AH, Wheatley K, Harrison CJ, Burnett AK. Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood*. 2010;116:354–365.
21. 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: 620-5. doi: 10.7326/0003-4819-103-4-620.
22. Khoury, J.D., Solary, E., Abla, O. et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. *Leukemia* 2022;36:1703–1719. <https://doi.org/10.1038/s41375-022-01613-1>
23. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, Bloomfield CD, Cazzola M, Vardiman JW. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127(20):2391-405. doi: 10.1182/blood-2016-03-643544.
24. Mlakar V, Huezo-Diaz Curtis P, Satyanarayana Uppugunduri CR. et al. Pharmacogenomics in Pediatric Oncology: Review of Gene-Drug Associations for Clinical Use. *Int J Mol Sci* 2016;17(9):1502.
25. Pavlovic S, Kotur N, Stankovic B, Zukic B, Gasic V, Dokmanovic L. Pharmacogenomic and Pharmacotranscriptomic Profiling of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: Paving the Way to Personalized Treatment. *Genes (Basel)*. 2019;10(3):191. doi: 10.3390/genes10030191.
26. Auwerx C, Sadler MC, Reymond A, Kutalik Z. From pharmacogenetics to pharmaco-omics: Milestones and future directions. *HGG Adv*. 2022;3(2):100100. doi: 10.1016/j.xhgg.2022.100100.
27. Relling M.V., Klein T.E., Gammal R.S., Whirl-Carrillo M., Hoffman J.M., Caudle K.E. The clinical pharmacogenetics implementation consortium: 10 years later. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2020;107:171–175.
28. Megías-Vericat JE, Montesinos P, Herrero MJ, Bosó V, Martínez-Cuadrón D, Poveda JL, et al. Pharmacogenomics and the treatment of acute myeloid leukemia. *Pharmacogenomics* 2016; 17(11): 1245-1272. doi: 10.2217/pgs-2016-0055.

29. Gabor KM, Schermann G, Lautner-Csorba O, Rarosi F, Erdelyi DJ, Endreffy E, Berek K, Bartyik K, Bereczki C, Szalai C, Semsei AF. Impact of single nucleotide polymorphisms of cytarabine metabolic genes on drug toxicity in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer*. 2015;62(4):622-8. doi: 10.1002/pbc.25379.
30. Xiong J, Altaf K, Ke N, Wang Y, Tang J, Tan C, Li A, Zhang H, He D, Liu X. dCK Expression and Gene Polymorphism With Gemcitabine Chemosensitivity in Patients With Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: A Strobe-Compliant Observational Study. *Medicine (Baltimore)*. 2016 Mar;95(10):e2936. doi: 10.1097/MD.0000000000002936.
31. Tanaka M, Javle M, Dong X, Eng C, Abbruzzese JL, Li D. Gemcitabine metabolic and transporter gene polymorphisms are associated with drug toxicity and efficacy in patients with locally advanced pancreatic cancer. *Cancer*. 2010 Nov 15;116(22):5325-35. doi: 10.1002/cncr.25282.
32. Rosen N, Chalifa-Caspi V, Shmueli O, Adato A, Lapidot M, Stampnitzky J, Safran M, Lancet D. GeneLoc: exon-based integration of human genome maps. *Bioinformatics*. 2003;19 Suppl 1:i222-4. doi: 10.1093/bioinformatics/btg1030.
33. Chen CJ, Clark D, Ueda K, Pastan I, Gottesman MM, Roninson IB. Genomic organization of the human multidrug resistance (MDR1) gene and origin of P-glycoproteins. *J Biol Chem* 1990; 265: 506-14.
34. Gerlach JH, Endicott JA, Juranka PF, Henderson G, Sarangi F, Deuchars KL, Ling V. Homology between P-glycoprotein and a bacterial haemolysin transport protein suggests a model for multidrug resistance. *Nature*. 1986;324(6096):485-9. doi: 10.1038/324485a0.
35. Megias-Vericat JE, Martinez-Cuadron D, Herrero MJ, Alino SF, Poveda JL, Sanz MA, Montesinos P. Pharmacogenetics of Metabolic Genes of Anthracyclines in Acute Myeloid Leukemia. *Curr Drug Metab* 2018; 19(1): 55-74. doi: 10.2174/1389200218666171101124931.
36. Megías-Vericat JE, Martínez-Cuadrón D, Solana-Altabella A, Poveda JL, Montesinos P. Systematic Review of Pharmacogenetics of ABC and SLC Transporter Genes in Acute Myeloid Leukemia. *Pharmaceutics* 2022;14(4): 878. doi: 10.3390/pharmaceutics14040878.
37. Xiao Q, Deng D, Li H, Ye F, Huang L, Zhang B, Ye B, Mo Z, Yang X, Liu Z. GSTT1 and GSTM1 polymorphisms predict treatment outcome for acute myeloid leukemia: a systematic review and meta-analysis. *Ann Hematol*. 2014;93(8):1381-90. doi: 10.1007/s00277-014-2050-z.
38. Sheehan D, Meade G, Foley VM, Dowd CA. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem J*. 2001 Nov 15;360(Pt 1):1-16. doi: 10.1042/0264-6021:3600001.
39. Shaffer BC, Gillet JP, Patel C, Baer MR, Bates SE, Gottesman MM. Drug resistance: still a daunting challenge to the successful treatment of AML. *Drug Resist Updat* 2012; 15(1-2): 62-9. doi: 10.1016/j.drug.2012.02.001.
40. Fleischmann M, Schnetzke U, Hochhaus A, Scholl S. Management of acutemyeloid leukemia: current treatment options and future perspectives. *Cancers*, 2021;13:5722. doi: 10.3390/cancers13225722
41. Wang X, Wang C, Qin YW, Yan SK, Gao YR. Simultaneous suppression of multidrug resistance and antiapoptotic cellular defense induces apoptosis in chemoresistant human acute myeloid leukemia cells. *Leuk Res* 2007; 31(7): 989-94. doi: 10.1016/j.leukres.2006.09.001.
42. Svirnovski AI, Shman TV, Serhiyenka TF, Savitski VP, Smolnikova VV, Fedasenka UU. ABCB1 and ABCG2 proteins, their functional activity and gene expression in concert with drug sensitivity of leukemia cells. *Hematology* 2009; 14(4): 204-12. doi: 10.1179/102453309X426218.

43. Kulsoom B, Shamsi TS, Afsar NA, Memon Z, Ahmed N, Hasnain SN. Bax, Bcl-2, and Bax/Bcl-2 as prognostic markers in acute myeloid leukemia: are we ready for Bcl-2-directed therapy? *Cancer Manag Res* 2018;10: 403-16. doi: 10.2147/CMAR.S154608
44. Pallis M, Turzanski J, Higashi Y, Russell N. P-glycoprotein in acute myeloid leukaemia: therapeutic implications of its association with both a multi drug resistant and an apoptosis-resistant phenotype. *Leuk Lymphoma* 2002;43:1221-8. doi: 10.1080/10428190290026277
45. Krawiec K, Strzałka P, Czemerska M, Wiśnik A, Zawlik I, Wierzbowska A, Pluta A. Targeting Apoptosis in AML: Where Do We Stand? *Cancers (Basel)*. 2022;14(20):4995. doi: 10.3390/cancers14204995.
46. Testa U, Riccioni R. Deregulation of apoptosis in acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2007;92(1):81-94; <https://doi.org/10.3324/haematol.10279>.
47. Handschuh L, Wojciechowski P, Kazmierczak M, Lewandowski K. Transcript level dysregulation of BCL2 family genes in acute myeloblastic leukemia. *Cancers* 2021; 13: 3175. doi: 10.3390/cancers13133175
48. Zhou JD, Zhang TJ, Xu ZJ, Gu Y, Ma JC, Li XX, Guo H, Wen XM, Zhang W, Yang L, Liu XH, Lin J, Qian J. BCL2 overexpression: clinical implication and biological insights in acute myeloid leukemia. *Diagn Pathol*. 2019;14(1):68. doi: 10.1186/s13000-019-0841-1.
49. Tiribelli M, Michelutti A, Cavallin M, Di Giusto S, Simeone E, Fanin R, Damiani D. BCL-2 Expression in AML Patients over 65 Years: Impact on Outcomes across Different Therapeutic Strategies. *J Clin Med*. 2021;10(21):5096. doi: 10.3390/jcm10215096.
50. Korsmeyer SJ. BCL-2 gene family and the regulation of programmed cell death. *Cancer Res* 1999, 59: 1693s-700s.
51. Ong YL, McMullin MF, Bailie KE, Lappin TR, Jones FG, Irvine AE. High bax expression is a good prognostic indicator in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2000;111: 182-9. doi: 10.1046/j.1365-2141.2000.02315.x
52. Del Poeta G, Venditti A, Del Principe MI, Maurillo L, Buccisano F, Tamburini A, Cox MC, Franchi A, Bruno A, Mazzone C, Panetta P, Suppo G, Masi M, Amadori S. Amount of spontaneous apoptosis detected by Bax/Bcl-2 ratio predicts outcome in acute myeloid leukemia (AML). *Blood*. 2003;101(6):2125-31. doi: 10.1182/blood-2002-06-1714.
53. Kornblau SM, Vu HT, Ruvolo P, Estrov Z, O'Brien S, Cortes J, Kantarjian H, Andreeff M, May WS. BAX and PKC α modulate the prognostic impact of BCL2 expression in acute myelogenous leukemia. *Clin Cancer Res*. 2000;6(4):1401-9.
54. Köhler T, Schill C, Deininger MW, Krahl R, Borchert S, Hasenclever D, Leiblein S, Wagner O, Niederwieser D. High Bad and Bax mRNA expression correlate with negative outcome in acute myeloid leukemia (AML). *Leukemia*. 2002;16(1):22-9. doi: 10.1038/sj.leu.2402340.
55. Vazanov A, Jurecekova J, Balharek T, Marcinek J, Stasko J, Dzian A, Plank L, Zubor P, Racay P, Hatok J. Differential mRNA expression of the main apoptotic proteins in normal and malignant cells and its relation to in vitro resistance. *Cancer Cell Int*. 2018;18:33. doi: 10.1186/s12935-018-0528-9.
56. O'Donnell MR, Abboud CN, Altman J, Appelbaum FR, Arber DA, Attar E, Borate U, Coutre SE, Damon LE, Goorha S, Lancet J, Maness LJ, Marcucci G, Millenson MM, Moore JO, Ravandi F, Shami PJ, Smith BD, Stone RM, Strickland SA, Tallman MS, Wang ES, Naganuma M, Gregory KM. NCCN Clinical Practice Guidelines Acute myeloid leukemia. *J Natl Compr Canc Netw*. 2012;10(8):984-1021. doi: 10.6004/jnccn.2012.0103.

57. O'Donnell MR, Tallman MS, Abboud CN, Altman JK, Appelbaum FR, Arber DA, Bhatt V, Bixby D, Blum W, Coutre SE, De Lima M, Fathi AT, Fiorella M, Foran JM, Gore SD, Hall AC, Kropf P, Lancet J, Maness LJ, Marcucci G, Martin MG, Moore JO, Olin R, Peker D, Pollyea DA, Pratz K, Ravandi F, Shami PJ, Stone RM, Strickland SA, Wang ES, Wieduwilt M, Gregory K, Ogba N. Acute Myeloid Leukemia, Version 3.2017, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw*. 2017;15(7):926-957. doi: 10.6004/jnccn.2017.0116.
58. Döhner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, Burnett AK, Dombret H, Fenaux P, Grimwade D, Larson RA, Lo-Coco F, Naoe T, Niederwieser D, Ossenkoppele GJ, Sanz MA, Sierra J, Tallman MS, Löwenberg B, Bloomfield CD; European LeukemiaNet. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*. 2010;115(3):453-74. doi: 10.1182/blood-2009-07-235358.
59. Oken MM, Creech RH, Tormey DC, Horton J, Davis TE, McFadden ET, Carbone PP. Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Am J Clin Oncol*. 1982;5(6):649-55.
60. Sorrow ML, Maris MB, Storb R, Baron F, Sandmaier BM, Maloney DG, Storer B. Hematopoietic cell transplantation (HCT)-specific comorbidity index: a new tool for risk assessment before allogeneic HCT. *Blood*. 2005 Oct 15;106(8):2912-9. doi: 10.1182/blood-2005-05-2004. Epub 2005 Jun 30. PMID: 15994282; PMCID: PMC1895304.
61. World Medical Association. "Declaration of Helsinki: Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects". *JAMA*. 2013;310 (20): 2191–2194. doi:10.1001/jama.2013.281053. hdl:10818/33790.
62. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) document H43-A2 – Clinical Flow Cytometric Analysis of Neoplastic Hematolymphoid Cells; Approved Guideline – [Second Edition 2007]
63. Béné MC, Nebe T, Bettelheim P, Buldini B, Bumbea H, Kern W, Lacombe F, Lemez P, Marinov I, Matutes E, Maynadié M, Oelschlagel U, Orfao A, Schabath R, Solenthaler M, Tschurtschenthaler G, Vladareanu AM, Zini G, Faure GC, and Porwit A. Immunophenotyping of acute leukemia and lymphoproliferative disorders: a consensus proposal of the European LeukemiaNet Work Package 10. *Leukemia* 2011; 25: 567-574.
64. van Dongen JJM, Lhermitte L, Böttcher S, Almeida J, van der Velden VHJ, Flores-Montero J, Rawstron A, Asnafi V, Lécresse Q, Lucio P, Mejstrikova E, Szczepański T, Kalina T, de Tute R, Brüggemann M, Sedek L, Cullen M, Langerak AW, Mendonça A, Macintyre E, Martin-Ayuso M, Hrusak O, Vidriales MB, Orfao A. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. on behalf of the EuroFlow Consortium. *Leukemia* 2012, 26: 1908–1975.
65. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Thiele J, Vardiman JW (Eds.): WHO Classification of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC: Lyon 2016
66. Shaffer LG, Slovak ML, Campbell LJ. ISCN 2009: an international system for human cytogenetics nomenclature. Basel: Karger; 2009.
67. International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN). Recommendations for the International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature. Memphis, Tennessee, USA, Oct 9-15, 1994
68. Kiyoi H, Naoe T, Yokota S, Nakao M, Minami S, Kuriyama K, Takeshita A, Saito K, Hasegawa S, Shimodaira S, Tamura J, Shimazaki C, Matsue K, Kobayashi H, Arima N, Suzuki R, Morishita H, Saito H, Ueda R, Ohno R. Internal tandem duplication of FLT3 associated with leukocytosis in acute

- promyelocytic leukemia. Leukemia Study Group of the Ministry of Health and Welfare (Kohseisho). *Leukemia*. 1997;11(9):1447-52. doi: 10.1038/sj.leu.2400756.
69. Yamamoto Y, Kiyoi H, Nakano Y, Suzuki R, Kodera Y, Miyawaki S, Asou N, Kuriyama K, Yagasaki F, Shimazaki C, Akiyama H, Saito K, Nishimura M, Motoji T, Shinagawa K, Takeshita A, Saito H, Ueda R, Ohno R, Naoe T. Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. *Blood*. 2001;97(8):2434-9. doi: 10.1182/blood.v97.8.2434.
70. Wan H, Zhu J, Chen F, Xiao F, Huang H, Han X, Zhong L, Zhong H, Xu L, Ni B, Zhong J. SLC29A1 single nucleotide polymorphisms as independent prognostic predictors for survival of patients with acute myeloid leukemia: an in vitro study. *J Exp Clin Cancer Res*. 2014;33(1):90. doi: 10.1186/s13046-014-0090-9.
71. Kurzawski M, Pawlik A, Górnik W, Drożdżik M. Frequency of common MDR1 gene variants in a Polish population. *Pharmacol Rep*. 2006 Jan-Feb;58(1):35-40.
72. Chen CL, Liu Q, Relling MV. Simultaneous characterization of glutathione s-transferase m1 and t1 polymorphisms by polymerase chain reaction in american whites and blacks. *Pharmacogenetics* 1996;6: 187-91.
73. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162(1):156-9.
74. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; 25: 402-8. doi: 10.1006/meth.2001.1262
75. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 2008; 3: 1101-8. doi: 10.1038/nprot.2008.73
76. Kraan J, Gratama JW, Haioun C, Orfao A, Plonquet A, Porwit A, Quijano S, Stetler-Stevenson M, Subira D, Wilson W. Flow cytometric immunophenotyping of cerebrospinal fluid. *Current Protocols in Cytometry* 6.25.1-6.25.16, Supplement 45, 2008 John Wiley & Sons, Inc.
77. Cheson BD, Bennett JM, Kopecky KJ, et al. 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 Outcomes, and Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol* 2003;21(24):4642-9.
78. Béné MC and Kaeda JS. How and why minimal residual disease studies are necessary in leukemia: a review from WP10 and WP12 of the European LeukaemiaNet. *Haematologica* 2009;94:1135-1150.
79. Heuser M, Freeman SD, Ossenkoppele GJ, Buccisano F, Hourigan CS, Ngai LL, Tettero JM, Bachas C, Baer C, Béné MC, Bücklein V, Czyz A, Denys B, Dillon R, Feuring-Buske M, Guzman ML, Haferlach T, Han L, Herzig JK, Jorgensen JL, Kern W, Konopleva MY, Lacombe F, Libura M, Majchrzak A, Maurillo L, Ofran Y, Philippe J, Plesa A, Preudhomme C, Ravandi F, Roumier C, Subklewe M, Thol F, van de Loosdrecht AA, van der Reijden BA, Venditti A, Wierzbowska A, Valk PJM, Wood BL, Walter RB, Thiede C, Döhner K, Roboz GJ, Cloos J. 2021 Update on MRD in acute myeloid leukemia: a consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party. *Blood*. 2021 Dec 30;138(26):2753-2767. doi: 10.1182/blood.2021013626.
80. Zhang J, Visser F, King K.M, Baldwin S.A, Young J.D, Cass C.E. The role of nucleoside transporters in cancer chemotherapy with nucleoside drugs. *Cancer Metastasis Rev* 2007; 26: 85–110. doi: 10.1007/s10555-007-9044-4.

81. Galmarini CM, Thomas X, Calvo F, Rousselot P, Rabilloud M, El Jaffari A, Cros E, Dumontet C. In vivo mechanisms of resistance to cytarabine in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol.* 2002;117(4):860-8. doi: 10.1046/j.1365-2141.2002.03538.x.
82. Amaki J, Onizuka M, Ohmachi K, Aoyama Y, Hara R, Ichiki A, Kawai H, Sato A, Miyamoto M, Toyosaki M, Machida S, Kojima M, Shirasugi Y, Kawada H, Ogawa Y, Ando K. Single nucleotide polymorphisms of cytarabine metabolic genes influence clinical outcome in acute myeloid leukemia patients receiving high-dose cytarabine therapy. *Int J Hematol.* 2015;101(6):543-53. doi: 10.1007/s12185-015-1766-4.
83. Kim JH, Lee C, Cheong HS, Koh Y, Ahn KS, Kim HL, Shin HD, Yoon SS. SLC29A1 (ENT1) polymorphisms and outcome of complete remission in acute myeloid leukemia. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2016;78(3):533-40. doi: 10.1007/s00280-016-3103-x.
84. Galmarini CM, Thomas X, Calvo F, Rousselot P, El Jafaari A, Cros E, Dumontet C. Potential mechanisms of resistance to cytarabine in AML patients. *Leuk Res* 2002; 26(7): 621-9. doi: 10.1016/s0145-2126(01)00184-9.
85. Kroep JR, Loves WJ, van der Wilt CL, Alvarez E, Talianidis I, Boven E, Braakhuis BJ, van Groeningen CJ, Pinedo HM, Peters GJ. Pretreatment deoxycytidine kinase levels predict in vivo gemcitabine sensitivity. *Mol Cancer Ther.* 2002;1(6):371-6.
86. Kim DH, Park JY, Sohn SK, Lee NY, Baek JH, Jeon SB, Kim JG, Suh JS, Do YR, Lee KB. Multidrug resistance-1 gene polymorphisms associated with treatment outcomes in de novo acute myeloid leukemia. *Int J Cancer.* 2006;118(9):2195-201. doi: 10.1002/ijc.21666.
87. Kim YK, Bae SY, Kim HN, Kim NY, Kim HJ, Bang SM, et al. Prognostic Impact of DNA Repair and MDR-1 Gene Polymorphisms In De Novo Acute Myeloid Leukemia with t(8;21) or Inv(16). *Blood* 2010; 116: 1714. doi.: 10.1182/blood.V116.21.1714.1714.
88. Gréen H, Falk IJ, Lotfi K, Paul E, Hermansson M, Rosenquist R, Paul C, Nahi H. Association of ABCB1 polymorphisms with survival and in vitro cytotoxicity in de novo acute myeloid leukemia with normal karyotype. *Pharmacogenomics J.* 2012;12(2):111-8. doi: 10.1038/tpj.2010.79.
89. He H, Yin J, Li X, Zhang Y, Xu X, Zhai M, Chen J, Qian C, Zhou H, Liu Z. Association of ABCB1 polymorphisms with prognostic outcomes of anthracycline and cytarabine in Chinese patients with acute myeloid leukemia. *Eur J Clin Pharmacol.* 2015;71(3):293-302. doi: 10.1007/s00228-014-1795-6.
90. Megías-Vericat JE, Rojas L, Herrero MJ, Bosó V, Montesinos P, Moscardó F, Poveda JL, Sanz MÁ, Aliño SF. Influence of ABCB1 polymorphisms upon the effectiveness of standard treatment for acute myeloid leukemia: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Pharmacogenomics J.* 2015;15(2):109-18. doi: 10.1038/tpj.2014.80.
91. Megías-Vericat JE, Rojas L, Herrero MJ, Bosó V, Montesinos P, Moscardó F, Poveda JL, Sanz MA, Aliño SF. Positive impact of ABCB1 polymorphisms in overall survival and complete remission in acute myeloid leukemia: a systematic review and meta-analysis. *Pharmacogenomics J.* 2016;16(1):1-2. doi: 10.1038/tpj.2015.79.
92. Illmer T, Schuler US, Thiede C, Schwarz UI, Kim RB, Gotthard S, Freund D, Schäkel U, Ehninger G, Schaich M. MDR1 gene polymorphisms affect therapy outcome in acute myeloid leukemia patients. *Cancer Res.* 2002;62(17):4955-62.
93. Kaya P, Gündüz U, Arpacı F, Ural AU, Guran S. Identification of polymorphisms on the MDR1 gene among Turkish population and their effects on multidrug resistance in acute leukemia patients. *Am J Hematol* 2005; 80(1): 26-34. doi: 10.1002/ajh.20427.

94. Van der Holt B, Van den Heuvel-Eibrink MM, Van Schaik RH, Van der Heiden IP, Wiemer EA, Vossebeld PJ, et al. ABCB1 gene polymorphisms are not associated with treatment outcome in elderly acute myeloid leukemia patients. *Clin Pharmacol Ther* 2006; 80(5): 427-39. doi: 10.1016/j.clpt.2006.07.005.
95. Hampras SS, Sucheston L, Weiss J, Baer MR, Zirpoli G, Singh PK, Wetzler M, Chennamaneni R, Blanco JG, Ford L, Moysich KB. Genetic polymorphisms of ATP-binding cassette (ABC) proteins, overall survival and drug toxicity in patients with Acute Myeloid Leukemia. *Int J Mol Epidemiol Genet*. 2010;1(3):201-7.
96. Jakobsen Falk I, Fyrberg A, Paul E, Nahi H, Hermanson M, Rosenquist R, Höglund M, Palmqvist L, Stockelberg D, Wei Y, Gréen H, Lotfi K. Impact of ABCB1 single nucleotide polymorphisms 1236C>T and 2677G>T on overall survival in FLT3 wild-type de novo AML patients with normal karyotype. *Br J Haematol*. 2014;167(5):671-80. doi: 10.1111/bjh.13097.
97. Megías-Vericat JE, Montesinos P, Herrero MJ, Moscardó F, Bosó V, Rojas L, Martínez-Cuadrón D, Hervás D, Boluda B, García-Robles A, Rodríguez-Veiga R, Martín-Cerezuela M, Cervera J, Sendra L, Sanz J, Miguel A, Lorenzo I, Poveda JL, Sanz MÁ, Aliño SF. Impact of ABC single nucleotide polymorphisms upon the efficacy and toxicity of induction chemotherapy in acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2017;58(5):1197-1206. doi: 10.1080/10428194.2016.1231405.
98. Schaich M, Soucek S, Thiede C, Ehninger G, Illmer T; SHG AML96 Study Group. MDR1 and MRP1 gene expression are independent predictors for treatment outcome in adult acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2005;128: 324-32. doi: 10.1111/j.1365-2141.2004.05319.x
99. van den Heuvel-Eibrink MM, van der Holt B, Burnett AK, Knauf WU, Fey MF, Verhoef GE, Vellenga E, Ossenkoppele GJ, Löwenberg B, Sonneveld P. CD34-related coexpression of MDR1 and BCRP indicates a clinically resistant phenotype in patients with acute myeloid leukemia (AML) of older age. *Ann Hematol*. 2007 May;86(5):329-37. doi: 10.1007/s00277-007-0269-7. Epub 2007 Mar 6.
100. Shman TV, Fedasenka UU, Savitski VP, Aleinikova OV. CD34+ leukemic subpopulation predominantly displays lower spontaneous apoptosis and has higher expression levels of Bcl-2 and MDR1 genes than CD34- cells in childhood AML. *Ann Hematol* 2008;87: 353-60. doi: 10.1007/s00277-008-0439-2
101. Varatharajan S, Abraham A, Karathedath S, Ganesan S, Lakshmi KM, Arthur N, Srivastava VM, George B, Srivastava A, Mathews V, Balasubramanian P. ATP-binding cassette transporter expression in acute myeloid leukemia: association with in vitro cytotoxicity and prognostic markers. *Pharmacogenomics*. 2017;18(3):235-244. doi: 10.2217/pgs-2016-0150.
102. Hirsch P, Tang R, Marzac C, Perrot JY, Fava F, Bernard C, Jeziorowska D, Marie JP, Legrand O. Prognostic impact of high ABC transporter activity in 111 adult acute myeloid leukemia patients with normal cytogenetics when compared to FLT3, NPM1, CEBPA and BAALC. *Haematologica*. 2012;97(2):241-5. doi: 10.3324/haematol.2010.034447.
103. Marzac C, Teyssandier I, Calendini O, Perrot JY, Faussat AM, Tang R, Casadevall N, Marie JP, Legrand O. FLT3 internal tandem duplication and P-glycoprotein functionality in 171 patients with acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res*. 2006;12(23):7018-24. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-0641.
104. Smeets ME, Raymakers RA, Vierwinden G, Pennings AH, Wessels H, de Witte T. Triggering noncycling hematopoietic progenitors and leukemic blasts to proliferate increases anthracycline retention and toxicity by downregulating multidrug resistance. *Blood* 1999; 94: 2414-23. doi: 10.1182/blood.V94.7.2414.417k01_2414_2423

105. Marzac C, Garrido E, Tang R, Fava F, Hirsch P, De Benedictis C, Corre E, Lapiusan S, Lallemand JY, Marie JP, Jacquet E, Legrand O. ATP Binding Cassette transporters associated with chemoresistance: transcriptional profiling in extreme cohorts and their prognostic impact in a cohort of 281 acute myeloid leukemia patients. *Haematologica*. 2011;96(9):1293-301. doi: 10.3324/haematol.2010.031823.
106. Leith CP, Kopecky KJ, Godwin J, McConnell T, Slovak ML, Chen IM, Head DR, Appelbaum FR, Willman CL. Acute myeloid leukemia in the elderly: assessment of multidrug resistance (MDR1) and cytogenetics distinguishes biologic subgroups with remarkably distinct responses to standard chemotherapy. A Southwest Oncology Group study. *Blood*. 1997;89(9):3323-9.
107. Leith CP, Kopecky KJ, Chen IM, Eijdens L, Slovak ML, McConnell TS, Head DR, Weick J, Grever MR, Appelbaum FR, Willman CL. Frequency and clinical significance of the expression of the multidrug resistance proteins MDR1/P-glycoprotein, MRP1, and LRP in acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group Study. *Blood*. 1999;94(3):1086-99.
108. Steinbach D, Furchtbar S, Sell W, Lengemann J, Hermann J, Zintl F, Sauerbrey A. Contrary to adult patients, expression of the multidrug resistance gene (MDR1) fails to define a poor prognostic group in childhood AML. *Leukemia*. 2003;17(2):470-1. doi: 10.1038/sj.leu.2402806.
109. Galimberti S, Guerrini F, Carulli G, Fazzi R, Palumbo GA, Morabito F, Petrini M. Significant co-expression of WT1 and MDR1 genes in acute myeloid leukemia patients at diagnosis. *Eur J Haematol*. 2004;72(1):45-51. doi: 10.1046/j.0902-4441.2003.00185.x.
110. Guo X, Shi P, Chen F, Zha J, Liu B, Li R, Dong H, Zheng H, Xu B. Low MDR1 and BAALC expression identifies a new subgroup of intermediate cytogenetic risk acute myeloid leukemia with a favorable outcome. *Blood Cells Mol Dis*. 2014;53(3):144-8. doi: 10.1016/j.bcmd.2014.05.001.
111. Bartholomae S, Gruhn B, Debatin KM, Zimmermann M, Creutzig U, Reinhardt D, Steinbach D. Coexpression of Multiple ABC-Transporters is Strongly Associated with Treatment Response in Childhood Acute Myeloid Leukemia. *Pediatr Blood Cancer*. 2016;63(2):242-7. doi: 10.1002/pbc.25785.
112. Liu B, Li LJ, Gong X, Zhang W, Zhang H, Zhao L. Co-expression of ATP binding cassette transporters is associated with poor prognosis in acute myeloid leukemia. *Oncol Lett* 2018, 15: 6671-7. doi: 10.3892/ol.2018.8095
113. Dabrowska M, Pietruczuk M, Kostecka I, Suchowierska M, Kloczko J, Nasilowska B, Bany-Laszewicz U, Marianska B. The rate of apoptosis and expression of Bcl-2 and Bax in leukocytes of acute myeloblastic leukemia patients. *Neoplasma*. 2003;50(5):339-44.
114. Tzifi F, Economopoulou C, Gourgiotis D, Ardavanis A, Papageorgiou S, Scorilas A. The role of BCL2 family of apoptosis regulator proteins in acute and chronic leukemias. *Adv Hematol* 2012; 2012: 524308. doi:10.1155/2012/524308
115. Haes I, Dendooven A, Mercier ML, Puylaert P, Vermeulen K, Kockx M, Deiteren K, Maes MB, Berneman Z, Anguille S. Absence of BCL-2 Expression Identifies a Subgroup of AML with Distinct Phenotypic, Molecular, and Clinical Characteristics. *J Clin Med*. 2020;9(10):3090. doi: 10.3390/jcm9103090.
116. Andreeff M, Jiang S, Zhang X, Konopleva M, Estrov Z, Snell VE, Xie Z, Okcu MF, Sanchez-Williams G, Dong J, Estey EH, Champlin RC, Kornblau SM, Reed JC, Zhao S. Expression of Bcl-2-related genes in normal and AML progenitors: changes induced by chemotherapy and retinoic acid. *Leukemia*. 1999;13(11):1881-92. doi: 10.1038/sj.leu.2401573.
117. Bilbao-Sieyro C, Rodríguez-Medina C, Florido Y, Stuckey R, Sáez MN, Sánchez-Sosa S, González Martín JM, Santana G, González-Pérez E, Cruz-Cruz N, Fernández R, Molero Labarta T,

Gomez-Casares MT. BCL2 Expression at Post-Induction and Complete Remission Impact Outcome in Acute Myeloid Leukemia. *Diagnostics* (Basel). 2020;10(12):1048. doi: 10.3390/diagnostics10121048.

118. Pei S, Pollyea DA, Gustafson A, Stevens BM, Minhajuddin M, Fu R, Riemondy KA, Gillen AE, Sheridan RM, Kim J, Costello JC, Amaya ML, Inguva A, Winters A, Ye H, Krug A, Jones CL, Adane B, Khan N, Ponder J, Schowinsky J, Abbott D, Hammes A, Myers JR, Ashton JM, Nemkov T, D'Alessandro A, Gutman JA, Ramsey HE, Savona MR, Smith CA, Jordan CT. Monocytic Subclones Confer Resistance to Venetoclax-Based Therapy in Patients with Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Discov*. 2020;10(4):536-551. doi: 10.1158/2159-8290.CD-19-0710.

119. Kuusanmäki H, Leppä AM, Pölönen P, Kontro M, Dufva O, Deb D, Yadav B, Brück O, Kumar A, Everaus H, Gjertsen BT, Heinäniemi M, Porkka K, Mustjoki S, Heckman CA. Phenotype-based drug screening reveals association between venetoclax response and differentiation stage in acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2020;105(3):708-720. doi: 10.3324/haematol.2018.214882.

120. Del Poeta G, Ammatuna E, Lavorgna S, Capelli G, Zaza S, Luciano F, Ottone T, Del Principe MI, Buccisano F, Maurillo L, Panetta P, de Fabritiis P, Stasi R, Venditti A, Amadori S, Lo Coco F. The genotype nucleophosmin mutated and FLT3-ITD negative is characterized by high bax/bcl-2 ratio and favourable outcome in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*. 2010 May;149(3):383-7. doi: 10.1111/j.1365-2141.2010.08098.x.

121. Sharawat SK, Bakhshi R, Vishnubhatla S, Gupta R, Bakhshi S. BAX/BCL2 RMFI ratio predicts better induction response in pediatric patients with acutemyeloid leukemia. *Pediatr Blood Cancer* 2013, 60: E63-6. doi: 10.1002/pbc.24518

122. Kim KI, Huh IS, Kim IW, Park T, Ahn KS, Yoon SS, Yoon JH, Oh JM. Combined interaction of multi-locus genetic polymorphisms in cytarabine arabinoside metabolic pathway on clinical outcomes in adult acute myeloid leukaemia (AML) patients. *Eur J Cancer*. 2013 Jan;49(2):403-10. doi: 10.1016/j.ejca.2012.07.022.

123. Lo C, Nguyen S, Yang C, Witt L, Wen A, Liao TV, Nguyen J, Lin B, Altman RB, Palaniappan L. Pharmacogenomics in Asian Subpopulations and Impacts on Commonly Prescribed Medications. *Clin Transl Sci*. 2020 Sep;13(5):861-870. doi: 10.1111/cts.12771.

124. Zhang F, Finkelstein J. Inconsistency in race and ethnic classification in pharmacogenetics studies and its potential clinical implications. *Pharmgenomics Pers Med* 2019; 12: 107-123. doi: 10.2147/PGPM.S207449.

Publikovani radovi iz teze

1. Pravdic Z, Vukovic NS, Gasic V, Marjanovic I, Karan-Djurasevic T, Pavlovic S, Tosic N. The influence of BCL2, BAX, and ABCB1 gene expression on prognosis of adult de novo acute myeloid leukemia with normal karyotype patients. *Radiol Oncol.* 2023;57(2):239-248. doi: 10.2478/raon-2023-0017. **(M22 IF 2,4)**
2. Pravdić Zlatko, Suvajdžić Vuković Nada. Farmakogenomika i regulacija apoptoze u akutnoj mijeloidnoj leukemiji. *Medicinski podmladak* 2020;71(4):10-16. doi.org/10.5937/mp71-28140 **(M52)**
3. Pravdić Z, Suvajdžić Vuković N, Virijević M, Mitrović M, Pantić N, Sabljic N, Pavlović Đ, Marjanović I, Bukumirić Z, Vidović A, Jaković L, Pavlović S, Gašić V. Can pharmacogenetics impact the therapeutic effect of cytarabine and anthracyclines in adult acute myeloid leukaemia patients? A Serbian experience. *J Med Biochem.* 2024;43(4):545-55. doi: 10.5937/jomb0-47459 **(M23, IF 2,5)**

Biografija autora

Zlatko Pravdić rođen je 1991. godine u Beogradu, gde je završio osnovnu školu i XIV beogradsku gimnaziju. Diplomirao je 2016. na Medicinskom fakultetu, Univerziteta u Beogradu sa prosečnom ocenom 9,62. Tokom studija bio je autor četiri studentska naučna rada, od kojih je jedan izabran kao najbolji u sesiji na 9th *LIMSC - Leiden International Medical Student Conference*, održanog marta 2015. u Lajdenu (Holandija). Po diplomiranju boravio je na dve jednomesečne razmene: na Odeljenju za poremećaje srčanog ritma na Univerzitetskoj klinici za kardiologiju (*Universitäres Herzzentrum*) Univerzitetskog kliničkog centra Ependorf – Hamburg, Nemačka (septembar 2016) i na Odeljenju Interne medicine u Bolnici *Sant'Andrea*, Fakultet medicine i psihologije, Univerzitet *Sapienza* – Rim, Italija (oktobra 2016).

Po sprovedenom obaveznom pripravničkom stažu, volontiranje je nastavio u Klinici za hematologiju Univerzitetskog Kliničkog centra Srbije (UKCS). Putem programa 100 najboljih diplomiranih studenata medicine zaposlen je u Klinici za hematologiju, od jula 2017. na određeno, a od juna 2018. na neodređeno vreme. Iste godine upisao je specijalizaciju iz Interne medicine, a specijalistički ispit je položio oktobra 2023. sa odličnom ocenom. Od školske 2016/17. je na doktorskim akademskim studijama na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu - prva godina na modulu Neuronauka, a od druge godine (školske 2017/18) na modulu Biologija tumora i oksidativna oboljenja.

Dr Zlatko Pravdić je autor i koautor većeg broja publikacija i apstrakata. Učestvovao je na brojnim domaćim i međunarodnim hematološkim sastancima. Imao je nekoliko oralnih i poster prezentacija na kongresima u zemlji i inostranstvu. Imao je iskustva u kliničkoj studiji iz oblasti akutne mijeloidne leukemije. Član je Srpskog lekarskog društva (SLD) i Evropske hematološke asocijacije (EHA).

Izjava o autorstvu

Ime i prezime autora: **Zlatko Pravdić**

Broj indeksa: **5123/2017**

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom „PROGNOSTIČKI I PREDIKTIVNI ZNAČAJ POLIMORFIZAMA I EKSPRESIJE GENA ZA PROTEINE UKLJUČENE U TRANSPORT I METABOLIZAM CITARABINA I ANTRACIKLINA I REGULACIJU APOPTOZE U AKUTNOJ MIJELOIDNOJ LEUKEMIJI ODRASLIH”

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

Potpis autora

U Beogradu, 16.7.2024.



Zlatko Pravdić

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: **Zlatko Pravdić**

Broj indeksa: **5123/2017**

Studijski program: **Biologija tumora i oksidativna oboljenja**

Naslov rada: **PROGNOSTIČKI I PREDIKTIVNI ZNAČAJ POLIMORFIZAMA I EKSPRESIJE GENA ZA PROTEINE UKLJUČENE U TRANSPORT I METABOLIZAM CITARABINA I ANTRACIKLINA I REGULACIJU APOPTOZE U AKUTNOJ MIJELOIDNOJ LEUKEMIJI ODRASLIH**

Mentor: **prof. dr Nada Suvajdžić Vuković**

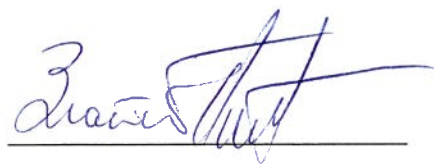
Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la radi pohranjivanja u **Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog naziva 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 autora

U Beogradu, 16.7.2024.



Zlatko Pravdić

Izjava o korišćenju

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

**PROGNOSTIČKI I PREDIKTIVNI ZNAČAJ POLIMORFIZAMA I EKSPRESIJE GENA
ZA PROTEINE UKLJUČENE U TRANSPORT I METABOLIZAM CITARABINA I
ANTRACIKLINA I REGULACIJU APOPTOZE U AKUTNOJ MIJELOIDNOJ
LEUKEMIJI ODRASLIH**

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje. Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu i dostupnu u otvorenom pristupu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo (CC BY)
2. Autorstvo – nekomercijalno (CC BY-NC)
- 3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada (CC BY-NC-ND)**
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima (CC BY-NC-SA)
5. Autorstvo – bez prerada (CC BY-ND)
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima (CC BY-SA)

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci. Kratak opis licenci je sastavni deo ove izjave).

Potpis autora

U Beogradu, 16.7.2024.



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 prerada. 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 prerada. 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.