

**UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET**

Nada J. Kraguljac Kurtović

**IMUNOFENOTIPSKA KARAKTERIZACIJA ĆELIJA
AKUTNE MIJELOIDNE LEUKEMIJE KOD ODRASLIH
I NJENA ULOGA U DIJAGNOZI, PRAĆENJU I
PROGNOZI BOLESTI**

doktorska disertacija

Beograd, 2016

**UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY**

Nada J. Kraguljac Kurtović

**IMMUNOPHENOTYPIC CHARACTERIZATION OF
ACUTE MYELOID LEUKEMIA IN ADULTS AND ITS
ROLE IN THE DIAGNOSIS, MONITORING, AND
PROGNOSIS OF THE DISEASE**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016

MENTORI

dr Nada Suvajdžić-Vuković, redovni profesor
Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Biljana Božić Nedeljković, vanredni profesor
Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

KOMISIJA

dr Nada Suvajdžić-Vuković, redovni profesor
Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Biljana Božić Nedeljković, vanredni profesor
Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Nataša Tošić, viši naučni savetnik
Institut za molekularnu genetiku i genetičko
inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane:

Istraživanje u ovoj disertaciji izvedeno je u okviru Podprojekta 41004 pod nazivom „Molekularnogenetički i imunofenotipski markeri klonskog preobražaja matičnih ćelija hematopoeze”, kojim rukovodi Prof. dr Nada Suvajdžić-Vuković. Navedeni Podprojekat 41004, deo je šireg istraživačkog Projekta III 41004 pod nazivom „Retke bolesti: molekularna patofiziologija, dijagnostički i terapijski modaliteti i socijalni, etički i pravni aspekti“ kojim rukovodi dr Sonja Pavlović, naučni savetnik Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo Univerziteta u Beogradu, pod pokroviteljstvom Ministarstva nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (oblast Biomedicina, projektni period 2011-2016.

Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije koji se odnosi na ispitivanje imunofenotipskih karakteristika Akutne mijeloidne leukemije, urađen je u Laboratoriji za imunofenotipizaciju i protočnu citometriju Polikliničko-dijagnostičkog odeljenja Klinike za hematologiju KCS, pod neposrednim rukovodstvom mentora Prof. dr Nade Suvajdžić-Vuković.

Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije koji se odnosi na ispitivanje molekularno-genetskih karakteristika Akutne mijeloidne leukemije, urađen je u Laboratoriji za molekularnu hematologiju, Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo Univerziteta u Beogradu, pod neposrednim rukovodstvom dr Nataše Tošić, višeg naučnog savetnika i dr Sonje Pavlović, naučnog savetnika.

Posebno se zahvaljujem svom učitelju i mentoru poštovanoj Prof. dr Nadi Suvajdžić-Vuković, na stručnoj pomoći i poverenju koje mi je ukazala, na strpljenju i moralnoj podršci tokom izrade disertacije.

Iskrena zahvalnost dr Sonji Pavlović, dr Nataši Tošić i njihovim saradnicima iz Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo Univerziteta u Beogradu na stručnoj podršci i izradi značajnog dela rezultata koji se odnose na molekularno-genetske karakteristike bolesnika.

Posebnu zahvalnost takođe dugujem mentoru poštovanoj Prof. dr Biljani Božić Nedeljković, na dragocenim savetima, diskusijama i uputstvima prilikom izrade doktorske disertacije.

Velika zahvalnost Prof. dr Dragani Vujić, Načelniku Odeljenja za transplantaciju kostne srži sa laboratorijom za kriokonzervaciju, Instituta za zdravstvenu zaštitu majke i deteta "Dr Vukan Čupić" u Beogradu, koja mi je omogućila dobijanje zdravih kontrolnih uzoraka koji su uključeni u ispitivanje.

Zahvaljujem se svim lekarima i biolozima Klinike za Hematologiju KCS koji su mi neposredno pomogli prilikom prikupljanja podataka o ispitanicima, a posebno Prof. Dr Andriji Bogdanoviću, Dr Marijani Virijević, Ass. dr Ireni Đunić, Ass. dr Mirjani Mitrović, Ass. dr Danijeli Leković i Jelici Jovanović, dipl. molekularnom biologu.

Izuzetnu zahvalnost dugujem Prof. dr Andriji Bogdanoviću na nesebičnoj pomoći tokom statističke obrade rezultata ovog ispitivanja.

Dragim kolegicama biolozima Vesni Knežević i Tijani Dragović-Ivančević iz Laboratorije za imunofenotipizaciju i protočnu citometriju, Klinike za hematologiju KCS, najiskrenije se zahvaljujem na stručnoj i nesebičnoj pomoći tokom pripreme i tehničke obrade podataka, kao i za izvođenje eksperimentalnog dela rada.

Ovaj rad posvećujem svojoj porodici, a posebno majci Milevi S. Kraguljac (rođ. Jovanović), mojoj zvezdi, prijatelju i učitelju

Imunofenotipska karakterizacija ćelija akutne mijeloidne leukemije kod odraslih i njena uloga u dijagnozi, praćenju i prognozi bolesti

SAŽETAK

U tezi su ispitivani savremeni aspekti primene imunofenotipizacije multiparametarskom protočnom citofluorimetrijom (IMPC) u dijagnostici i praćenju AML. Ispitivanjem je obuhvaćeno 320 odraslih bolesnika sa *de novo* AML, od kojih je 294 uključeno u retrospektivno ispitivanje (dijagnoza, klasifikacija i prognoza), dok je ostalih 26 bolesnika bilo uključeno u prospektivno ispitivanje (praćenje minimalne rezidualne bolesti - MRB). Bolesnici su klasifikovani kao AML-neklasifikovana (48%), AML sa rekurentnim genetskim poremećajima (37,4%) i AML sa znacima mijelodisplazije (14,6%). IPCM omogućava postavljanje dg AML analizom ks kod 98% bolesnika. Ispitivanjem 44 različita hLDM utvrđeno je da je njihova ekspresija na blastima deregulisana, o čemu govore aberacije u njihovoj ekspresiji kod svakog bolesnika. Heterogen ćelijski sastav populacije leukemijskih ćelija (leukemijski blasti i prekursori) utvrđen je kod 55% bolesnika sa AML. Imunološka i citomorfološka klasifikacija AML su saglasne kod 73% bolesnika, odnosno imunološka i SZO klasifikacija kod 68% bolesnika. Ispitivanje MRB sprovedeno je primenom jedne (42%) ili dve (58%) kombinacije IFSL po bolesniku. Primenom IMPC, pokazana je visoka učestalost MRB kod naših bolesnika sa AML posle lečenja indukcijom (69%) odnosno konsolidacionom terapijom (50%). Nivo MRB u ks bolesnika $\geq 0,1\%$ NČ posle indukcione terapije, svrstava bolesnike u grupu visokog rizika za razvoj relapsa bolesti. Ispitivanje prognostičkog značaja hLDM kod bolesnika sa AML, pokazalo je značajnu vezu između rane monocitne diferencijacije leukemijskih ćelija, ekspresije CD22 molekula i pojave rane smrti i ($p < 0,05$), odnosno niže incidence kompletne remisije ($p < 0,05$). Multivarijantnom analizom je pokazano da je obrazac ekspresije molekula

CD45^{low/med} na blastima, povezan sa dužim trajanjem KR (p=0,002), dok je ekspresija molekula CD7⁺CD22⁺CD34⁺ povezana sa kraćim preživljavanjem bolesnika sa AML (p<0,05).

Ključne reči: AML; imunofenotipizacija; protočna citofluorimetrija; hLDM; dijagnoza; minimalna rezidualna bolest; prognoza

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Imunobiologija

UDK broj: 616.155.392 : [575.21 : 616-097] (043.3)

Immunophenotypic characterization of acute myeloid leukemia in adults and its role in the diagnosis, monitoring, and prognosis of the disease

ABSTRACT

In the thesis are examined modern aspects of application immunophenotyping and multiparameter flow cytometry (IMPC) in the diagnosis and monitoring of AML. The study included 320 adult patients with *de novo* AML, of which 294 included in the retrospective study (diagnosis, classification and prognosis), while the other 26 patients were included in a prospective study (minimal residual disease - MRD). Patients were classified as AML-unclassified (48%), AML with recurrent genetic abnormalities (37.4%) and AML with signs of myelodysplasia (14.6%). IMPC allows setting dg AML by analysis of bone marrow (bm) in 98% of patients. By examining of 44 different HLDM, it was found that its expression is deregulated on the blasts, whereas at least one type of immunophenotypic aberrations was found per patient. Heterogeneous cellular composition of the population of leukemic cells (leukemic blasts and precursors) was found in 55% of patients with AML. Immunological and cytomorphological classification of AML agree with 73% of patients, respectively immunological and WHO classification in 68% of patients. MRD trial was conducted by one (42%) or two (58%) combination of IFSL per patient. By applying the IMPC, a high incidence of MRD was detected in our patients with AML, after induction (69%) and/or consolidation therapy (50%). The level of MRD in bm of patients $\geq 0,1\%$ NC after induction therapy, classified patients in the high risk group for the development of relapse. The prognostic significance of HLDM in patients with AML, showed a significant association between early monocytic differentiation of leukemia cells, the expression of CD22 molecule and the appearance of early death ($p < 0.05$), and lower incidence of complete remission ($p < 0.05$). Multivariate analysis showed that the

expression patterns of molecule CD45^{low/med} on the blasts, is associated with a longer duration of the CR ($p=0.002$), while the expression of the molecules CD22+CD7+CD34+ associated with shorter survival of patients with AML ($p<0.05$).

Key words: AML; immunophenotyping; flow cytometry; HLDM; diagnosis; minimal residual disease; prognosis

Research area: Biology

Area of special interest: Immunobiology

UDC number: 616.155.392 : [575.21 : 616-097] (043.3)

SKRAĆENICE

Ag - antigen

AL - akutna leukemija

ALL - akutna limfoblastna leukemija

AML - akutna mijeloidna leukemija

AML sa *CEBPA*^{mut} - AML sa *CEBPA* mutacijom

AML-MDS - AML sa znacima mijelodisplazije

AML-NK - AML sa normalnim kariotipom

AML sa *NPM1*^{mut} - AML sa *NPM1* mutacijom –

AML-NOS - *engl.* AML not otherwise specified (neklasifikovana AML)

AML-RGP - AML sa rekurentnim genetičkim poremećajima

APC - alofikocijanin

APL - akutna promijelocitna leukemija

BFU-E - *engl.* Burst Forming Unit – Erithroid

CBF - *engl.* Core binding factor

CD - *engl.* Cluster of Differentiation

CEBPA - *engl.* CCAAT/enhancer binding protein- α

CFU-E - *engl.* Colony forming unit – erithroid

CpG - Citidin-fosfat-guanozin dinukleotid

dg - dijagnoza

DFS - *engl.* Disease free survival (preživljavanje bez znakova bolesti)

EGIL - *engl.* European Group for the Immunological Characterization of Leukemias
(Evropska grupa za imunološku karakterizaciju leukemija)

ELN - *engl.* European LeukemiaNet (Evropska mreža za leukemije)

FAB - Francusko-Američko-Britanska grupa

FITC - fluorescein izotiocijanat

FL - fluorescencija

FLT3 - *engl.* fms related tyrosine kinase 3

FLT3-ITD - *engl.* FLT3 - internal tandem duplications

FLT3-TKD - *engl.* FLT3 - tyrosine kinase domen

FSC - *engl.* Forward scatter

G-CSF - *engl.* Granulocyte-Colony Stimulating Factor
(faktor stimulacije granulocitnih kolonija)

GM-CSF - *engl.* Granulocyte and Macrophage - Colony Stimulating Factor
(faktor stimulacije granulocitnih i monocitnih kolonija)

GpA - glikoforin A

HCTCI - *engl.* hematopoietic cell transplantation comorbidity index
(indeks komorbiditeta u sklopu transplantacije matičnih ćelija hematopoeze)

hLDM - humani leukocitni diferencijacioni molekuli

HMĆ - hematopoezne matične ćelije

HOX - *engl.* Homeobox (familija gena koji sadrže homeodomen, uključenih u transkripcionu regulaciju razvića višećelijskih organizama)

IFSL - imunofenotip specifičan za leukemiju

IL-3 - interleukin 3

IL-6 - interleukin 6
IPCM - imunofenotipizacija protočnom citofluorimetrijom
KR - kompletna remisija
ks - kostna srž
LDH - laktat dehidrogenaza
LFS - *engl.* long term leukemia free survival
(dugotrajno preživljavanje bez znakova bolesti)
Li - limfociti
LMĆ - leukemijske matične ćelije
M-CSF - *engl.* Macrophage - Colony Stimulating Factor (faktor stimulacije kolonija monocita)
MDS - mijelodisplazni sindrom
MGG - *engl.* May-Grunwald-Giemsa
MoAt - monoklonsko antitelo
MPC - multiparametarska protočna citofluorimetrija
MPN - mijeloproliferativna neoplazma
MPO - mijeloperoksidaza
MRB - minimalna rezidualna bolest
MRB-PCM - minimalna rezidualna bolest ispitivana protočnom citofluorimetrijom
MRB^{poz} – bolesnici kod kojih su prisutne rezidualne leukemijske ćelije
MRB^{neg} - bolesnici kod kojih nisu prisutne rezidualne leukemijske ćelije
MRP - *engl.* Multidrug resistance associated proteins
(proteini koji nose rezistenciju na lekove)
NĆ - nuklearne ćelije
NOD-SCID - *engl.* Nonobese diabetic severe combined immunodeficiency
NPM - nukleofosmin
OS - *engl.* Overall survival (ukupno preživljavanje)
PCM - protočna citofluorimetrija
PCR - *engl.* Polimerase chain (lančana reakcija polimeraze)
PE - fikoeritrin
PerCP - peridinhlorofil protein
pk - periferna krv
PMT - *engl.* photomultiplier tube (detektor i amplifikator fluorescentnih signala)
POX - mijeloperoksidaza
RAR α - *engl.* Retinoic acid receptor α (α receptor za retinoičnu kiselinu)
RT-PCR - *engl.* reverse transcriptase-PCR
RQ-PCR - *engl.* real-time quantitative polimerase chain reaction
SCF - *engl.* Stem cell factor (faktor rasta matičnih ćelija)
SSC - *engl.* Side scatter (relativna ćelijska granulacija)
SZO - Svetska zdravstvena organizacija
t-AML - *engl.* therapy-related AML (AML nastala posle primene citotoksične terapije)
TdT - terminalna dezoksinukleotidil transferaza
TMĆH - transplantacija matičnih ćelija hematopoete
zBĆN - zrela B-ćelijska neoplazma

SADRŽAJ

I UVOD	1
1. Imunobiologija hematopoeznog sistema	2
2. Humani leukocitni diferencijacioni molekuli	4
3. Ontogeneza ćelija mijeloidne loze	7
4. Akutna mijeloidna leukemija	15
5. Patobiologija AML	17
5.1. Patofiziološke karakteristike AML	17
5.2. Molekularno-genetske karakteristike AML	19
6. Imunobiologija AML	22
6.1. Imunofenotipizacija u dijagnostici i klasifikaciji AML	23
6.2. IMPC u ispitivanju minimalne rezidualne bolesti u AML	32
6.3. Humani LDM kao prognostički markeri u AML	35
6.4. IMPC u detekciji ciljnih molekula za imunoterapiju AML	37
7. Dijagnostika i klasifikacija AML	39
7.1. Prognostički parametri i lečenje AML	47
II CILJ RADA	49

III MATERIJAL I METODE	50
1. Izbor bolesnika	50
2. Kontrolni ispitanici	52
3. Metode	53
3.1. Morfološko-citohemijsko ispitivanje	53
3.2. Imunofenotipizacija metodom MPC	54
3.2.1. Monoklonska antitela	54
3.2.2. Paneli MoAt za ispitivanje ekspresije hLDM	56
3.2.3. Metoda direktne višekolorne imunofluorescencije za detekciju membranskih hLDM	58
3.2.4. Metoda direktne višekolorne imunofluorescencije za detekciju intracelularnih hLDM	59
3.3. Multiparametarska protočna citofluorimetrija	60
3.3.1. Princip rada protočnog citofluorimetra	61
3.3.2. Merenje i analiza uzoraka metodom MPC	64
3.3.3. Kriterijumi za definisanje imunofenotipskih profila specifičnih za leukemijske ćelije AML	69
3.3.4. Imunološka klasifikacija bolesnika sa AML	70
3.4. Citogenetsko ispitivanje	71
3.5. Molekularno - genetska ispitivanja	72
3.5.1. Izolacija mononuklearnih ćelija uzorka	72
3.5.2. Izolacija DNK iz mononuklearnih ćelija uzorka	73
3.5.3. Reakcija lančanog umnožavanja DNK	73
3.5.4. Detekcija mutacija u <i>NPM1</i> genu	74
3.5.5. Detekcija mutacija u <i>CEBPA</i> genu metodom analize dužine fragmenata	75
3.5.6. Detekcija <i>FLT3/ITD</i> mutacije	77
3.5.7. Detekcija <i>FLT3/D835</i> mutacije	78
3.5.8. Analiza DNK na agaroznom gelu	78
3.5.9. Analiza DNK na poliakrilamidnom gelu	79
3.5.10. Bojenje poliakrilamidnih gelova srebronitratom	79
3.6. Statističke metode	79

IV REZULTATI	81
1. Kliničko-hematološke karakteristike bolesnika sa AML	81
2. Analiza imunofenotipski definisanih populacija ćelija ks na dijagnozi AML	83
3. Ispitivanje imunofenotipskih karakteristika AML	87
3.1. Imunofenotipske karakteristike populacije leukemijskih blasta na dg AML	87
3.2. Imunofenotipske aberacije u ekspresiji hLDM na blastima AML na dg bolesti	92
3.3. Imunofenotipske karakteristike populacije granulocitnih prekursora AML na dg	97
3.4. Imunofenotipske karakteristike populacije monocitnih prekursora AML na dg	101
3.5. Ispitivanje ćelijskog sastava populacije leukemijskih ćelija AML na dg	102
4. Klasifikacija bolesnika sa AML na dg	106
4.1. Citomorfološka klasifikacija bolesnika sa AML	106
4.2. Imunološka klasifikacija bolesnika sa AML	107
4.3. Klasifikacija bolesnika sa AML prema SZO klasifikacionom sistemu	109
5. Ispitivanje imunofenotipskih karakteristika tipova AML	114
5.1. Analiza imunofenotipski definisanih populacija ks tipova AML	117
5.2. Analiza imunofenotipskih karakteristika populacije blasta glavnih tipova AML na dg	119
5.3. Analiza ektopične ekspresije limfoidnih hLDM na populaciji blasta tipova AML	126
5.4. Ispitivanje imunofenotipskih karakteristika populacije granulocitnih i monocitnih prekursora AML-MDS	129
5.5. Analiza loze zahvaćene leukemijskim procesom i stepena diferenciranosti leukemijskih ćelija glavnih tipova AML	131

6.	Ispitivanje imunofenotipskih karakteristika suptipova AML-RGP	133
6.1.	Analiza imunofenotipski definisanih populacija ks AML-RGP	135
6.2.	Analiza imunofenotipskih karakteristika populacije blasta suptipova AML-RGP	137
6.3.	Analiza ektopične ekspresije limfoidnih hLDM na populaciji blasta suptipova AML-RGP	142
6.4.	Ispitivanje imunofenotipskih karakteristika granulocitnih i monocitnih prekursora suptipova AML-RGP	144
6.5.	Analiza hematopoezne loze zahvaćene leukemijskim procesom i stepena diferenciranosti leukemijskih ćelija AML-RGP	146
7.	Ispitivanje imunofenotipskih karakteristika suptipova AML-NOS	148
7.1.	Analiza imunofenotipski definisanih populacija ks AML-NOS	151
7.2.	Analiza imunofenotipskih karakteristika populacije blasta suptipova AML-NOS	154
7.3.	Analiza ektopične ekspresije limfoidnih hLDM na populaciji blasta suptipova AML-NOS	160
7.4.	Ispitivanje imunofenotipskih karakteristika granulocitnih i monocitnih prekursora suptipova AML-NOS	162
7.5.	Analiza hematopoezne loze zahvaćene leukemijskim procesom i stepena diferenciranosti leukemijskih ćelija AML-NOS	165
8.	Ispitivanje MRB u AML primenom metodologije IMPC	167
8.1.	Analiza imunofenotipski definisanih populacija ćelija bolesnika sa AML posle lečenja hemioterapijom	169
8.2.	Identifikacija i kvantifikacija populacije leukemijskih ćelija bolesnika sa AML posle lečenja hemioterapijom	175

9. Lečenje i preživljavanje bolesnika sa AML	183
10. Ispitivanje značaja imunofenotipskih karakteristika za prognozu AML	192
10.1. Ispitivanje prognostičkih faktora rane smrti u AML	192
10.2. Ispitivanje prognostičkih faktora povoljnog odgovora na indukcionu terapiju i pojavu relapsa AML	193
10.3. Ispitivanje prognostičkih faktora koji utiču na trajanje KR bolesti i ukupno preživljavanje bolesnika sa AML	194
V DISKUSIJA	200
VI ZAKLJUČCI	267
VII LITERATURA	274
PRILOG 1.	292
PRILOG 2.	329
BIOGRAFIJA AUTORA	

I UVOD

Savremena istraživanja u oblasti akutne mijeloidne leukemije (AML), usmerena su na otkrivanje i definisanje patofizioloških i molekularnih mehanizama koji leže u osnovi ove bolesti i objašnjavaju njenu veliku biološku heterogenost (Jan i sar., 2012). Mada su u fenotipskom smislu i kliničkim manifestacijama entiteti AML veoma slični, među njima postoji suštinska biološka razlika, koja se ogleda u različitoj osetljivosti na savremene hemoterapeutske agense (Estey, 2011). Tokom prethodne dve decenije u izvesnoj meri je poboljšana uspešnost lečenja AML, ali je za većinu obolelih ovo i dalje neizlečiva bolest (Burnett, 2012).

Poslednjih godina je učinjen veliki pomak u razumevanju bazičnih fizioloških i molekularnih mehanizama koji objašnjavaju funkcionisanje zdravog hematopoeznog sistema, posebno matičnih ćelija i prethodnika (progenitora) (Lucas i sar., 2011). Transfer novih saznanja o zdravom hematopoeznom sistemu na nivou genoma, epigenoma i proteoma u polje istraživanja AML, omogućio je bolje razumevanje procesa leukemogeneze, biologije matičnih leukemijskih ćelija, kao i biološke heterogenosti AML (Roboz i Guzman, 2009; Welch, 2013; Parkin i sar. 2013).

Ovakva multidisciplinarna istraživanja trebalo bi da u budućnosti omoguće precizniju klasifikaciju AML, otkrivanje novih ćelijskih i molekularnih prognostičkih biomarkera i definisanje novih terapijskih modaliteta prilagođenih svakom pojedinačnom entitetu AML (Hoffman i sar. 2008).

1. Imunobiologija hematopoeznog sistema

Uvođenje imunoloških metoda u bazična istraživanja mehanizama i procesa koji se odvijaju tokom hematopoeze, omogućilo je potpuno novu dimenziju u razumevanju ove problematike. Analiza citomorfoloških i molekularno-genetičkih karakteristika, kao i obrazaca *in vitro* ćelijskog rasta zdravih hematopoeznih ćelija, dobila je na značaju tek kada su pomenute karakteristike mogle da se povežu i pridruže specifičnim populacijama ćelija, definisanim na osnovu ekspresije kombinacija humanih leukocitnih diferencijacionih molekula (hLDM), čiji su obrasci ekspresije reproducibilni i visoko specifični tokom ontogeneze (van Lochem i sar., 2004; Szczepanski i sar., 2006; 2008; Arnoulet i sar., 2010; Ortolani, 2011). Specifične kombinacije hLDM, eksprimiranih na populaciji ćelija, čine njen *imunofenotipski profil* odnosno njen *imunofenotip*. Više faktora je doprinelo uvođenju ovog vida ispitivanja, među kojima su: raspoloživost monoklonskih antitela, standardizacija imunofluorescentnih tehnika za obeležavanje ciljnih molekula i usavršavanje analitičkih instrumenata – protočnih citofluorimetara (Zola i sar., 2007; Wood, 2006; van Dongen i sar, 2012).

Prva primena imunoloških metoda u ispitivanjima hematopoeze, inicirana je sedamdesetih godina prošloga veka. Tokom kratkog istorijata se mogu izdvojiti događaji koja su usloveli tri kvalitativno različita nivoa ispitivanja: a) otkriće da nesenzitivisani ovčiji eritrociti formiraju rozete sa humanim T-limfocitima, b) produkcija ksenogenih poliklonskih antiseruma protiv definisanih membranskih struktura odnosno hLDM, u imunološkom smislu *antigena* (Ag), i razvijanje tehnologije hibridoma za produkciju monoklonskih antitela (MoAt) (Abbas i sar., 2015). Pre nego što su MoAt postala dostupna, poreklo ćelija je određivano slabo karakterisanim ksenogenim poliklonskim antiserumima. Poliklonski antiserumi su dobijani metodama imunizacije i višestruke adsorpcije, pri čemu je imunizacija vršena humanim ćelijama (zdravim ili leukemijskim) ili ekstraktima tkiva. Ovim su serumima uglavnom bile identifikovane Ag determinante hLDM lokalizovane na

spoljašnjoj strani ćelijske plazmamembrane, i bile su podeljene u dve velike grupe, receptore i Ag (Zola i sar., 2007; Matesanz-Isabel i sar, 2011; <http://hcdm.org>). Receptori su uključivali: receptor za ovčije eritrocite na T-limfocitima, receptor za Fc region molekula IgG, receptori za komponente sistema komplementa (na B-limfocitima, monocitima i granulocitima), receptor za mišje eritrocite na B-limfocitima, i membranski imunoglobulinski receptor. Od Ag je važno pomenuti membranski "Common ALL" Ag (CD10) i intranukleusni Ag TdT (terminalna dezoksinukleotidil transferaza).

Osnovni nedostaci pomenutih reagenasa (niska specifičnost, nizak titar i relativno male količine, dugotrajni i složeni postupci za njihovo dobijanje i vrlo mala reproducibilnost seruma sa istom specifičnošću) potpuno su prevaziđeni uvođenjem MoAt - novih visoko specifičnih "imunoloških" proba (Abbas i sar., 2015).

Tokom poslednjih četrdeset godina, proizvedena su mnogobrojna MoAt, pa je u svrhu njihove precizne sistematizacije stvoren i poseban sistem za klasifikaciju hLDM, odnosno grupa MoAt koja ih identifikuju, tzv. CD Sistem (*engl.* Cluster of Differentiation, CD) (Zola i sar, 2007; Matesanz-Isabel i sar., 2011; Abbas i sar., 2011; <http://hcdm.org>). U ovom sistemu, hLDM su precizno okarakterisani kroz: opis grupa MoAt koja prepoznaju određene epitope hLDM, definisanje tipova ćelija limfohematopoeznog sistema na kojima su eksprimirani, definisanje njihovih fizičko-hemijskih karakteristika i fizioloških funkcija.

Vizuelizacija kompleksa koji nastaje vezivanjem MoAt za specifičan epitop na hLDM, vrši se različitim tehnikama, među kojima je najsenzitivnija ona koja koristi molekule fluorescentnih boja, direktno (direktna imunofluorescentna tehnika) ili indirektno (indirektna imunofluorescentna tehnika – sendvič tehnika – sa primarnim i sekundarnim At) konjugovanim sa MoAt (Abbas i sar., 2015). Najsenzitivnija savremena metoda za kvantifikovanje emitovanih fluorescentnih signala koji potiču sa formiranih kompleksa MoAt-Ag na ćelijama uzorka, je metoda multiparametarske protočne citofluorimetrije (MPC), koja se standardno primenjuje za analizu uzoraka ćelijskih suspenzija.

MPC omogućava istovremenu analizu i kvantifikaciju deset i više različitih fluorescentnih signala koji potiču sa jedne ćelije u kombinaciji sa njenim fizičkim karakteristikama (Wood, 2006; van Dongen i sar., 2012).

2. Humani leukocitni diferencijacioni molekuli

Humani LDM predstavljaju deo humanog proteoma koji se sastoji od približno 20.500 proteina, koji predstavljaju skup reprezentativnih izoformi svih genskih lokusa (Clamp i sar., 2007). Zdrave ćelije različitih hematopoeznih loza mogu se precizno okarakterisati na osnovu dinamike ekspresije specifičnih kombinacija hLDM na različitim stupnjevima tokom njihove diferencijacije (van Lochem i sar., 2004; Szczepanski i sar., 2006; Arnoulet i sar., 2010; Ortolani, 2011). Obrasci ekspresije hLDM su determinisani i regulisani na genskom nivou, programom koji je aktivan tokom diferentovanja ćelija, i visoko su konzervisani u zdravim ćelijama hematopoeznog sistema (van Lochem i sar., 2004; Szczepanski i sar., 2006; Arnoulet i sar., 2010). S obzirom da hLDM imaju različite fiziološke funkcije, njihov ekspresioni profil na zdravim ćelijama, definiše fiziološki imunofenotipski profil datog stupnja ćelijske diferentovanosti/zrelosti.

Standardna nomenklatura za hLDM je CD i pridružena brojana oznaka, što se koristi da se opiše molekul koji prepoznaje grupa antitela (Zola i sar, 2007; <http://hcdm.org>). Komitet za Humane ćelijske diferencijacione molekule (*engl.* Human Cell Differentiation Molecules, HCDM) je predložio i osnovao nomenklaturu CD sistema na Prvoj međunarodnoj konferenciji koja je održana u Parizu 1982. godine (Zola i sar, 2007; Matesanz-Isabel i sar, 2011; <http://hcdm.org>). Na poslednjoj, Desetoj konferenciji o hLDM, koja je održana 2012. godine, CD sistem je sačinjavao 371 molekul (Abbas i sar., 2015; Engel i sar., 2015; <http://hcdm.org>). Zadatak pomenutog Komiteta je da okarakteriše strukturu, funkciju, i distribuciju leukocitnih membranskih molekula i drugih

molekula imunskog sistema. Ekspresija i funkcija nekih od leukocitnih molekula CD sistema prikazana je na Tabeli 1.

Tabela 1. CD Sistem humanih leukocitnih diferencijacionih molekula (Adaptirano prema: Zola i sar., 2007; Ortolani, 2011; <http://hcdm.org>)

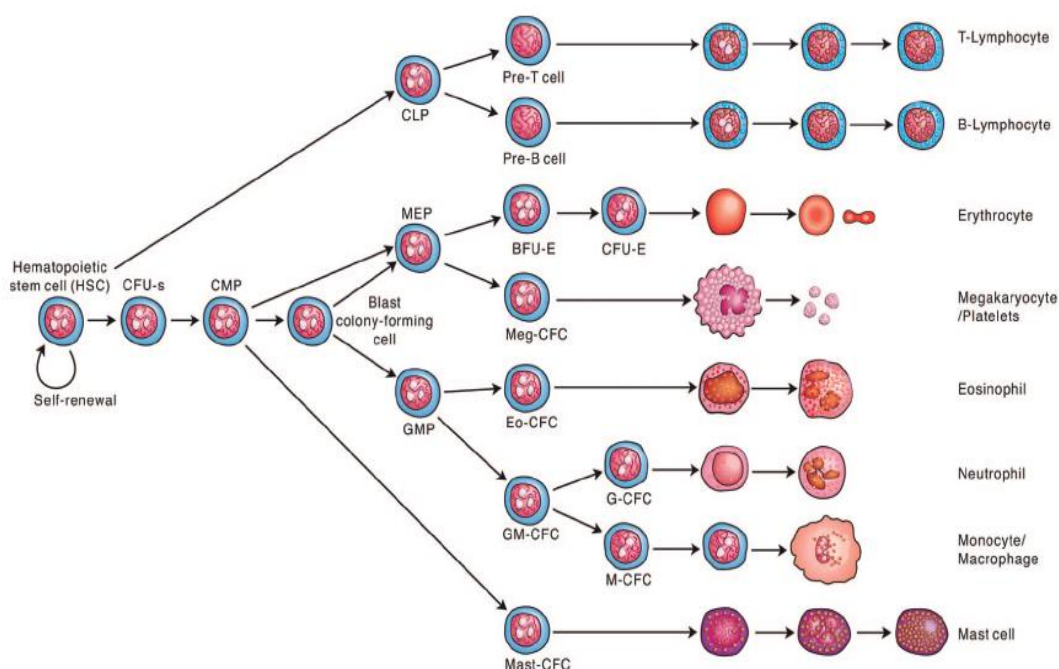
<i>Molekul</i>	<i>Karakteristike molekula / Funkcija</i>	<i>Limfo-hematopoezna loza / ćelijski tip na kome je molekul eksprimiran</i>
CD1a	familija MHC I klase / prezentacija Ag	kortikalni timocit, DČ
CD2	CD58 ligand / adhezija, T-ćelijska aktivacija	pan T-antigen, NK-ćelije
CD3	komponenta TCR / signalna transdukcija	pan T-antigen
CD4	koreceptor MHC II klase / T-ćelijska diferencijacija i aktivacija	subset timocita, subpopulacija T-ćelija, monociti, Mf
CD5	Receptor za CD72 / T-B interakcije	pan T-antigen, subpopulacija B-ćelija
CD7	Ligand za galektin/kostimulator T-ćelija, galektin-posredovana apoptoza	pan T-antigen, NK-ćelije, hematopoezni progenitori
CD8	koreceptor MHC I klase / T-ćelijska diferencijacija i aktivacija	subpopulacija timocita, subpopulacija T-ćelija
CD10	cink-vezujuća metaloproteinaza / razviće B-ćelija	B-prekursori, T-prekursori, neutrofili
CD11a	receptor za ICAM-1,-2,-3 / intercelularna adhezija	limfociti, granulociti, monociti, Mf
CD11b	vezuje CD54, ekstraćelijski matriks, inaktiviran C3b fragment komplementa/ adhezija	monocitna loza, granulocitna loza, NK-ćelije
CD11c	vezuje CD54, fibrinogen, inaktiviran C3b fragment komplementa/ adhezija	monocitna loza, granulocitna loza, subpopulacija NK-, T-, B-ćelija
CD13	cink-vezujuća metaloproteinaza/ obrada Ag za prezentaciju	pan antigen granulocitne i monocitne loze
CD14	receptor za LPS/LBP	monociti, Mf, granulociti
CD15	karbohidratni Ag / adhezija -ligand E i P selektina	granulocitna loza, monocitna loza
CD16a	FcR γ IIIa / fagocitoza, citotoksičnost zavisna od At	neutrofili, Mf, NK-ćelije
CD16b	FcR γ IIIb / fagocitoza, citotoksičnost zavisna od At	neutrofili
CD19	koreceptor BCR, formira kompleks sa CD21 i CD81 / B-ćelijska diferencijacija i aktivacija	pan B-antigen, folikularne DČ
CD20	Jonski kanal za kalcijum/ aktivacija ili regulacija B-ćelija	Zrele B-ćelije
CD22	Ig superfamilija, heterodimer/ adhezija, interakcije B-monocit i B-T ćelije	pan B-antigen, bazofili, mijeloidne DČ, PcDČ
CD24	CD62P ligand/ adhezija	pan B-antigen, granulocitna loza, epiteln ćelije
CD25	α lanac IL-2 receptora/vezuje CD122 i CD132	Aktivirane T-ćelije i B-ćelije, aktivirani makrofagi
CD33	Adhezija; transdukcija signala	pan antigen granulocitne i monocitne loze, mast ćelije
CD34	CD62L receptor / adhezija	matične ćelije i progenitori, kapilarni endotel
CD35	komplement receptor, vezuje fragmente komplementa C3b i C4b / adhezija, fagocitoza	B-loza, T subset, granulocitna loza, monociti
CD36	gpIV, recetor za ekstraćelijski matriks / adhezija, fagocitoza	monocitna, megakariocitna, eritrocitna loza
CD38	Ektoenzimciklični ADP ribozil-hidrolaza	Aktivirane T-ćelije, B-ćelije, NK-ćelije, monocitna loza, hematopoezni progenitori
CD41a	gpIIb / vezuje fibrinogen, fibronektin, vWF, trombospondin, aktivacija i ageagacija trombocita	megakariocitna loza, trombociti

CD42b	<i>gpIbα / vezuje CD42a,c,d, vWF, trombin, aktivacija i agregacija trombocita</i>	<i>megakariocitna loza, trombociti</i>
CD45	<i>tirozin fosfataza, multiple izoenzimske forme / signalna transdukcija preko TCR i BCR</i>	<i>Pa leukocitni antigen</i>
CD47	<i>Neurofilin /ligand za trombospondin</i>	<i>Panhematopoezni antigen</i>
CD49d	<i>Integrin α4, VLA-2α / CD106, MadCAM, Fibronektin, Paksilin</i>	<i>B-, T-, NK-ćelije, monociti/Mf, endotel, Hematopoezni progenitori</i>
CD56	<i>Neuralni ćelijski adhezioni molekul / Adhezija</i>	<i>NK-ćelije, subpopulacija T-ćelija, neuroni</i>
CD61	<i>gpIIIa, receptor za ekstraćelijski matriks / adhezija u formi heterodimera CD41/CD61 ili CD51/CD61</i>	<i>megakariocitna loza, trombociti, Mf</i>
CD62L	<i>L-selektin/ adhezija leukocita za endotel</i>	<i>B- i T-ćelije, monociti, granulociti, deo NK-ćelija</i>
CD64	<i>FcγRI, visokoafinitetni receptor za IgG / fagocitoza i ćelijska citotoksičnost zavisna od At</i>	<i>monocitna loza, DĆ, aktivirani granulociti</i>
CD65	<i>karbohidratni Ag / ćelijska adhezija, fagocitoza</i>	<i>granulocitna loza, monocitni subset</i>
CD66b	<i>ćelijska adhezija, neutrofilna aktivacija</i>	<i>granulocitna loza</i>
CD68	<i>makrosialin / receptor „čistač“</i>	<i>mijeloidni progenitori, monocitna i granulocitna loza</i>
CD71	<i>transferinski receptor / unos gvožđa u ćelije</i>	<i>eritrocitna loza, proliferišuće ćelije</i>
CD79a	<i>komponenta BĆR / signalna transdukcija</i>	<i>B-loza</i>
CD90	<i>Thy-1 /CD45, lck, fyn, P100 ligandi</i>	<i>Hematopoezni progenitori, endotelne ćelije</i>
CD96	<i>TACTILE, MGC22596</i>	<i>T-ćelije, NK-ćelije</i>
CD105	<i>Endoglin / TGF-β1, TGF-β3 ligandi</i>	<i>Hematopoezni progenitori, monociti/Mf, endotelne ćelije</i>
CD110	<i>Receptor za trombopoetin / Trombopoetin, JAK2 ligandi</i>	<i>Hematopoezni progenitori, trombociti, endotelne ćelije, epitelne ćelije</i>
CD114	<i>Receptor za G-CSF / G-CSF, Jak1, Jak2 ligandi</i>	<i>Hematopoezni progenitori, monociti, granulociti, trombociti, endotelne ćelije</i>
CD117	<i>receptor za SCF/ razviće i diferencijacija hematopoetskih progenitora</i>	<i>hematopoezni progenitori, mast ćelije</i>
CD123	<i>IL-3Rα / razviće i diferencijacija</i>	<i>hematopoezni progenitori, bazofili, Mf, DĆ</i>
CD135	<i>Flt3 tirozin kinaza / vezuje Flt3 ligand, razviće limfocita</i>	<i>progenitori mijelo-monocitne loze i B loze</i>
CD163	<i>M130/ hemoglobin</i>	<i>Monociti/Mf</i>
CD235a	<i>glikoforin A/ glavni glikoprotein na eritrocitnoj membrani</i>	<i>eritrocitna loza, kasni diferencijacioni molekul</i>
HLA-DR	<i>MHC II klasa, podklas HLA-DR</i>	<i>linijski nespecifičan, matične ćelije i progenitori</i>
MPO	<i>mijeloperoksidaza / lizozomalni enzim</i>	<i>mijeloidni progenitori, neutrofili i monociti</i>
Lizozim	<i>muramidaza / antimikrobijalno dejstvo</i>	<i>granulocitna loza, monocitna loza</i>
Laktoferin	<i>lipoprotein / vezuje gvožđe i vitamin B12, antimikrobno dejstvo</i>	<i>granulocitna loza</i>

Skraćenice: Ag, antigen; ADP, adenozin difosfat; At, antitelo; BĆR, B-ćelijski receptor; DĆ, dendritske ćelije; FcR, receptor Fc fragment antitela; G-CSF, faktor rasta granulocitnih kolonija; gp, glikoprotein; HLA-DR, humani leukocitni antigen DR klase; ICAM, intercelularni adhezivni molekul; IL, interleukin; JAK2, Janus kinaza 2; Mf, makrofagi; MHC, molekuli glavnog kompleksa tkivne podudarnosti; NK-ćelije, urođenoubilačke ćelije; Pc-plazmacitoidne; SCF, faktor rasta matičnih ćelija; TCR, T-ćelijski receptor; TGF- β , transformišući faktor rasta β ; vWF, von Willebrand faktor

3. Ontogeneza ćelija mijeloidne loze

Hematopoezne matične ćelije (HMĆ) su dugoživeće ćelije lokalizovane u koštanoj srži (ks) odraslih ljudi, koje imaju sposobnost samoobnove i diferentovanja u linijski-specifične opredeljene progenitore mijeloidne i limfoidne loze (Huang i Terstappen, 1994; Hoffman i sar., 2009). Pluripotentne HMĆ procesom opredeljivanja (*engl.* commitment), proliferacije i diferencijacije, generišu ćelije različitih mijeloidnih loza (Shema 1.).



Shema 1. Proces diferencijacije ćelija hematopoeznog sistema
(Prema: Metcalf, 2007.)

Postoje dva glavna “mijeloidna” transkripciona faktora, PU.1 i C/EBP α . Njihova ekspresija i različita koncentracija u ćelijama odgovorne su za početak i regulaciju procesa granulocitopoeze i monocitopoeze u HMĆ, dok njihova deregulacija ima ulogu u procesu leukemogeneze (Hoffman i sar., 2009; Vicente i sar., 2012). Transkripcioni faktor PU.1 ima nizak nivo ekspresije u ranim hematopoeznim progenitorima. Sa sazrevanjem ćelija, ekspresija PU.1 se dalje

snižava u ćelijama eritrocitne i megakariocitne loze, a povećava u ćelijama granulocitne i monocitne loze. Ciljni geni transkripcionog faktora PU.1 su receptori za citokine: faktor rasta monocitnih kolonija (*engl.* Monocyte-Colony Stimulating Factor, M-CSF), faktor rasta granulocitnih kolonija (*engl.* Granulocyte-Colony Stimulating Factor, G-CSF) i faktor rasta granulocitnih i monocitnih kolonija (*engl.* Granulocyte and Monocyte-Colony Stimulating Factor, GM-CSF) (Hoffman i sar. 2009). C/EBP α je transkripcioni faktor koji ima specifičan strukturni motiv tzv. leucinski zatvarač koji je domen za dimerizaciju molekula. On ispoljava svoja funkcionalna svojstva kao dimer, i može formirati homo- ili hetero-dimere sa članovima srodne familije: C/EBP β , γ , i ϵ . C/EBP α je predominantno eksprimiran u granulocitima, monocitima i njihovim progenitorima (Hoffman i sar., 2009).

Drugi transkripcioni faktori, koji su potrebni za regulisanje sazrevanja opredeljenih mijeloidnih progenitora do granulocita i monocita, su Egr1 i Erg2 u monocitima i C/EBP ϵ , Gfi-1, i RAR α u granulocitima (Hoffman i sar., 2009). Proto-onkogen *c-jun* koji kodira transkripcioni aktivator protein AP-1, služi kao koaktivator transkripcionog faktora PU.1 tokom razvića makrofaga. Nedavne studije su pokazale da je negativna regulacija *c-jun* proto-onkogene posredstvom transkripcionog faktora C/EBP α neophodna za granulocitnu maturaciju, što predstavlja mehanizam putem koga C/EBP α blokira razvoj makrofaga (Hoffman i sar., 2009).

Rani hematopoezni progenitori eksprimiraju receptore za veliki broj citokina, od kojih mnogi ispoljavaju sinergizam u svojoj aktivnosti. "Early-acting" citokini, su interleukini IL-1 i IL-6, faktor matičnih ćelija (*engl.* stem cell factor, SCF), FLT3 ligand, i G-CSF (Hoffman i sar., 2009). Opredeljivanjem ćelija za specifičnu lozu, ekspresija pomenutih citokina postaje ograničena. IL-3 je veoma bitan u opredeljivanju pluripotentnih HMC u pravcu mijelomonocitne loze. Dalju diferencijaciju ćelija regulišu citokini sa kasnim delovanjem - *engl.* "late-acting" citokini (Hoffman i sar., 2009). Glavni citokini koji posreduju maturaciju neutrofila su G-CSF i GM-CSF, a u slučaju monocitne maturacije GM-CSF i M-CSF.

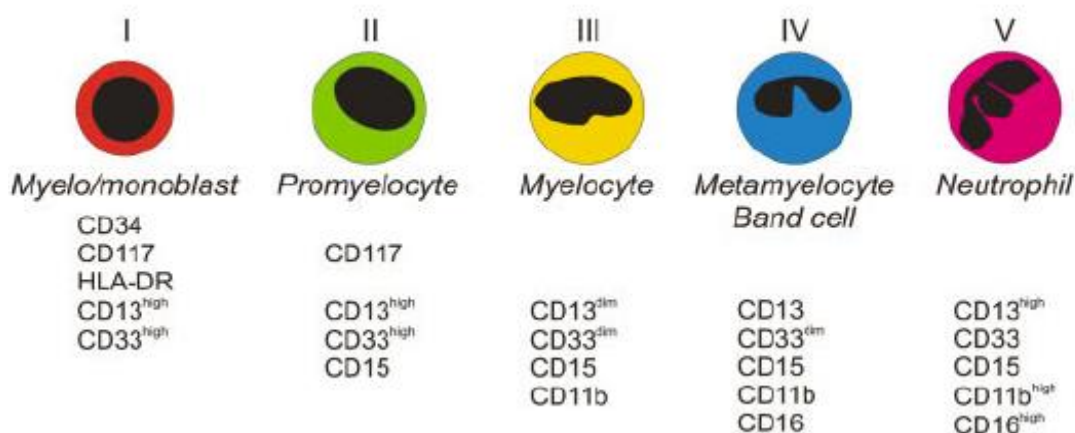
Granulocitopoeza – Granulocitni neutrofilni, eozinofili i bazofili su kratkoživeće ćelije koje su bitne za antimikrobni i inflamatorni odgovor. Kostna srž proizvodi granulocite u ogromnom broju kako bi osigurala stabilan broj cirkulirajućih ćelija, koje preživljavaju u perifernoj krvi tri do šest sati. Također, ona ima kapacitet da značajno poveća produkciju granulocita u odgovoru na brojne stresove. Regulaciju produkcije granulocita kontrolira čitav spektar citokina koji indukuju mijeloidni diferencijacioni program, kroz interakciju velikog broja općih i za mijeloidnu lozu specifičnih transkripcijskih faktora (Hoffman i sar., 2009). Razumijevanje sekvenci sazrijevanja neutrofila, osigurava istovremeno i razumijevanje normalnih neutrofilnih odgovora na infekcije, inflamaciju, alergijski stres, kao i na deregulaciju diferencijacije koja doprinosi nastanku mijelodisplaznog sindroma (MDS) i AML.

Granulocitna diferencijacija u ks je proces koji traje sedam do 10 dana. Ćelije sazrijevaju kroz više identifikovanih stupnjeva, tokom kojih stiču morfološki izgled i citoplazmatske granule koje karakterišu zrele granulocite (Hoffman i sar., 2009; Abbas i sar., 2015). Najraniji identifikovani granulocitni prekursor je mijeloblast. Tranzicija ka stupnju promijelocita je povezana sa sticanjem velike količine primarnih citoplazmatskih granula. Primarne granule sadrže mnogobrojne proteine (mijeloperoksidaza, lizozim, neutrofilna elastaza, defensini, mijeloblastin) neophodne za eliminaciju intracelularnih mikroorganizama. Tranzicija do stupnja mijelocita je povezana sa sticanjem sekundarnih granula, koje sadrže laktoferin, neutrofilnu kolagenazu, neutrofilnu želatinazu i transkobalamin 1, na osnovu kojih se neutrofilni razlikuju od eozinofila i bazofila. Na stupnju metamijelocita stvaraju se tercijarne granule. Neutrofilni prekursori čine oko polovinu ćelija ks zdrave odrasle osobe, uz dominaciju ćelija na stupnju mijelocit i metamijelocit (Hoffman i sar., 2009; Broimans i sar., 2009). Promijelociti i mijelociti predstavljaju primarni proliferativni pul granulocitnih prekursora ks. Od stupnja mijelocita ćelije prestaju da se dele i nastavljaju da sazrijevaju. "Štapovi" i segmentirani neutrofilni čine više od 50% ukupne granulocitne mase, i predstavljaju mobilizujući pul ćelija

ks. Samo 5% neutrofila cirkuliše u pk, obično tri do 12 sati, a zatim migriraju u tkiva, gde preživljavaju još dva do tri dana.

Regulisana ekspresija specifičnih hLDM karakteriše određene stupnjeve tokom granulocitne maturacije i ima važnu ulogu u obavljanju fizioloških funkcija neutrofila (Shema 2.) (van Lochem i sar., 2004; Hoffman i sar., 2009; Arnoulet i sar., 2010). Imunofenotip HMĆ karakteriše ekspresija grupe "ranih" hLDM (CD34⁺CD38⁻HLA-DR⁻CD123^{-/+low}CD90⁺CD117⁺CD71⁺Lin⁻) (Tabela 1), pri čemu neki od njih imaju ulogu u procesima homo- ili heterotipske adhezije HMĆ i drugih ćelija i/ili komponenata ekstracelularnog matriksa (CD34), ili su receptori uključeni u procese signalne transdukcije u HMĆ (CD117, CD123, CD135, CD38) (Huang i Terstappen, 1994; Ortolani, 2011; Béné i sar., 2011). Mijeloidno opredeljene progenitore karakteriše i koekspresija molekula CD13 i CD33. Tokom mijeloidne maturacije, CD13 se pojavljuje pre CD33 molekula na CD34⁺ progenitorima. CD13 je eksprimiran i na stupnju mijeloblasta, pri čemu nivo njegove ekspresije znatno opada od stupnja promijelocita do stupnja mijelocita, nakon čega ponovo počinje povećanje nivoa njegove ekspresije sve do stupnja neutrofila. CD13 je po svojoj funkciji ektoenzim N-aminopeptidaza koji je uključen u degradaciju regulatornih peptida, a čiji je gen lociran na hromozomu 15 (Ortolani, 2011). Ekspresija CD33 tokom granulocitne maturacije progresivno opada od stupnja mijeloblasta sve do stupnja neutrofila, koga karakteriše veoma nizak nivo ekspresije. Precizna biološka funkcija CD33 molekula još uvek nije poznata, ali je utvrđeno da pripada familiji lektina koji vezuju sijalinsku kiselinu, i koji imaju ulogu u međućelijskim interakcijama i transdukciji signala u ćelijama (Ortolani, 2011).

Karakteristični hLDM koji su eksprimirani na ranim mijeloidnim progenitorima opredeljenim za neutrofilnu lozu, počev od mijeloblasta, uključuju i CD38, CD45RA i mijeloperoksidazu (MPO) (van Lochem i sar., 2004; Ortolani, 2011). Dalja diferencijacija od stupnja mijelocita je povezana sa pojavom ekspresije molekula CD66b, CD15, CD11b, CD16 i leukocitne alkalne fosfataze, od kojih je većina visoko eksprimirana na zrelim neutrofilima (van Lochem i sar., 2004; Ortolani, 2011).

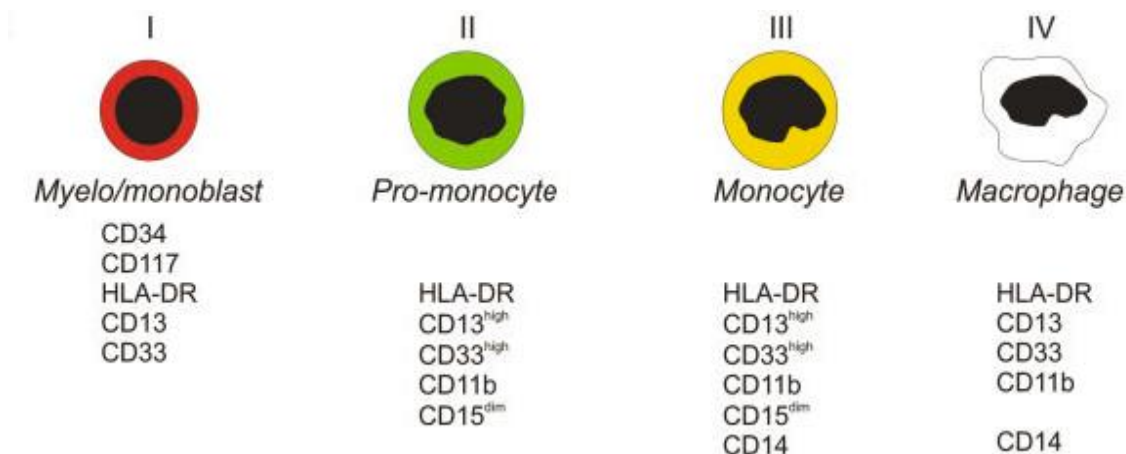


Shema 2. Granulocitopoeza – osnovni ćelijski stupnjevi tokom diferentovanja i njihove imunofenotipske karakteristike (Prema van Lochem i sar., 2004)

Eozinofilni prekursori čine oko 3% progenitora ks, od kojih su dve trećine eozinofilni prekursori na stupnju mijelocita. Zrele eozinofile odlikuje izrazito visok stepen ćelijske granulacije i specifičan imunofenotipski profil (CD45^{high}CD16^{low}CD23⁺CD49d⁺CD24^{high}CD11b⁺CD13⁺CD33⁺) (van Lochem i sar, 2004). Bazofili i mast ćelije posreduju alergijske odgovore i predstavljaju glavne ćelije uključene u IgE-indukovanim imunskim odgovorima na parazite i druge alergene. Oba ćelijska tipa vode poreklo od prekursora ks. Maturacija bazofila je posredovana IL- 3, koji takođe posreduje aktivaciju zrelih bazofila, koje karakteriše specifičan imunofenotipski profil (CD45^{low}CD13^{med}CD33⁺CD22⁺CD203c⁺) (van Lochem i sar., 2004; Abbas i sar., 2015).

Monocitopoeza – Monociti nastaju sazrevanjem njihovih prethodnika promonocita, koji čine oko 3% ukupnih ćelija zdrave ks (Shema 3.). (Hoffman i sar., 2009; Abbas i sar, 2015). Monociti sadrže primarne (MPO-pozitivne) i sekundarne (MPO-negativne) granule. Nakon stimulacije monocita sekundarne granule se fuzionišu sa plazmamembranom, što utiče na pozitivnu regulaciju

CD11b/CD18 molekula, koji imaju ulogu u adheziji i dijapedezi stimuliranih monocita (Hoffman i sar., 2009; Abbas i sar, 2015).



Shema 3. Monocitopoeza – osnovni ćelijski stupnjevi tokom diferentovanja i njihove imunofenotipske karakteristike (Prema van Lochem i sar., 2004)

Stresom indukovano oslobađanje monocita se dešava putem prevremenog oslobađanja iz proliferišućeg pula. Monociti u pk cirkulišu 8 do 72 sata, zatim ulaze u tkiva gde sazrevaju do makrofaga koji mogu živeti dva do tri meseca. Tkivni makrofagi se nalaze u plućima (alveolarni makrofagi), jetri (Kupfferove ćelije), slezini i centralnom nervnom sistemu (glijalne ćelije) (Hoffman i sar., 2009; Abbas i sar, 2015).

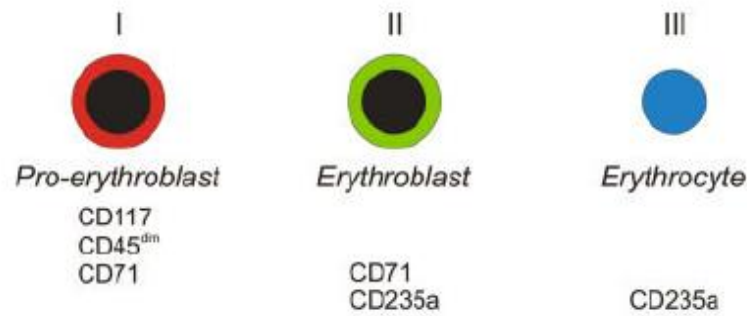
Pokazano je takođe da monociti mogu biti i prekursori subpopulacije dendritskih ćelija, profesionalnih Ag-prezentujućih ćelija, koje nastaju iz mijeloidnih prekursornih ćelija (Abbas i sar., 2015). Ove mijeloidne ćelije se alternativno mogu diferentovati i u makrofage.

Monocitni prekursori eksprimiraju receptor za M-CSF, lizozim, CD64 (Fcy receptor I), i receptore “čistače” (*engl.* scavenger) (Ortolani, 2011; Béné i sar., 2011). Zreli monociti, kao i neutrofili, pokazuju visok nivo ekspresije CD11b/CD18 molekula koji pripada familiji $\beta 2$ integrina i ima ulogu u ćelijskoj adheziji (Ortolani, 2011). CD14 je glavni funkcionalni membranski protein

ekspresiran na monocitno/makrofagnoj lozi. CD14 je receptor za lipopolisaharid, bakterijski produkt koji aktivira monocite/makrofage. Najnovije studije ukazuju da CD14 takođe može imati ulogu u apoptozi (Ortolani, 2011; Abbas i sar, 2015). Nakon diferencijacije do makrofaga, započinje ekspresija makrosijalina (CD68), glikoproteina nepoznate funkcije koji može imati ulogu u metabolizmu lipoproteina. Makrofazi takođe ekspresiraju i sijaloadhezin, član familije receptora za sijalinsku kiselinu, koji verovatno učestvuje u interakcijama između makrofaga i drugih ćelija i komponenti ekstracelularnog matriksa (Ortolani, 2011; Béné i sar., 2011).

Eritrocitopoeza - Odeljak eritrocitnih prekursora (eritron), nastaje diferencijacijom eritrocitnih progenitora (Shema 4.), koji su definisani u funkcionalnom smislu na osnovu specifičnosti rasta u kulturi *in vitro* (*engl.* Burst forming unit – erithroid, BFU-E i Colony forming unit – erithroid, CFU-E) (Hoffman i sar., 2009). Najmlađa morfološki prepoznata eritroidna ćelija je proeritroblast, od koje posle četiri do pet mitotskih deoba i serijskih morfoloških promena daje zrele eritroidne ćelije. Proeritroblast diferencira u bazofilni eritroblast, koji dalje diferencira u polihromatofilni odnosno ortohromatofilni eritroblast. Njihove morfološke karakteristike odslikavaju akumulaciju specifičnih proteina eritrocitne loze, kao i pad u nukleusnoj aktivnosti. Nakon poslednje mitotske deobe, inaktivni nukleus ortohromatofilnog eritroblasta se ekstrudira, pri čemu nastaje retikulocit. Izmene u ćelijskoj morfologiji tokom eritrocitopoeze su praćene kompleksnim biohemijskim promenama, akumulacijom proteina specifičnih za eritrocitnu lozu, i progresivnim sniženjem proliferacije (Hoffman i sar., 2009).

Obrasci ekspresije receptora za transferin (CD71), trombospondin (CD36) i glikoforina A (GpA) (CD235) bili su korišćeni za definisanje kriterijuma za razdvajanje populacija humanih eritrocitnih prekursora, pri čemu ekspresija CD71 nije pouzdana, pošto pokazuje veliku individualnu varijabilnost: bazofilni - CD36^{high}/GpA^{medium}, polihromatofilni - CD36^{high}/GpA^{high}, i ortohromatofilni eritroblast - CD36^{low}/GpA^{high} (Hoffman i sar., 2009; van Lochem i sar., 2004).



Shema 4. Eritrocitopoeza – osnovni ćelijski stupnjevi tokom diferentovanja i njihove imunofenotipske karakteristike (Prema van Lochem i sar., 2004)

Megakariocitopoeza – Megakariociti su velike poliploidne ćelije koje sačinjavaju oko 0.1% nukleiranih ćelija ks u normalnim uslovima. Oni se razvijaju iz bipotentnih megakariocitno-eritrocitnih progenitora, koji vode poreklo iz zajedničkog mijeloidnog progenitora (Hoffman i sar., 2009). Jednom opredeljeni za megakariocitnu lozu, megakariocitni progenitori prolaze kroz seriju maturacionih koraka koji vode produkciji i oslobađanju trombocita. Veliko povećanje u veličini ćelija se odbija putem endomitoze, tokom koje ćelije repliciraju svoju DNK, ali bez citokineze. Zreli megakariociti dostižu dijametar od oko 100 μm , imaju DNK sadržaj od 128N, i karakteriše ih prisustvo multilobuliranih nukleusa. Mada se megakariociti dominantno nalaze u ks, oni su prisutni i u pk, slezini i plućima. Ekstramedularni megakariociti oslobađaju trombocite, ali je njihov doprinos ukupnoj trombocitopoezi procenjen na oko 7% do 15% ukupne produkcije trombocita (Hoffman i sar., 2009).

Promegakarioblasti su ćelije na intermedijarnom stupnju između proliferišućih progenitora i zrelih megakariocita. Ove ćelije nije lako identifikovati na osnovu morfoloških karakteristika, ali se mogu identifikovati na osnovu ekspresije specifičnih megakariocitno/trombocitnih markera, kakvi su trombocitna peroksidaza, glikoprotein GPIIb/IIIa (CD41a), i fon Willebrand faktor (Hoffman i sar., 2009; Ortolani, 2011). Od promegakarioblasta pod dejstvom interleukina 3 (IL-3), SCF, interleukina 6 (IL-6) i trombopoetina nastaju veliki poliploidni megakariociti koji se prema zrelosti klasifikuju na

megakarioblaste, promegakariocite i megakariocite. Stupanj promegakariocita karakteriše povećanje zapremine citoplazme i broja specifičnih trombocitnih granula (Hoffman i sar., 2009; Vardiman i sar., 2008). Postoji sve više dokaza da se proliferacija i terminalna maturacija megakariocitnih progenitora dešavaju u specifičnim odeljcima ks - niša osteoblasta, intermedijarna zona i vaskularna niša (Hoffman i sar., 2009).

4. Akutna mijeloidna leukemija

AML predstavlja klinički i biološki heterogenu grupu bolesti, koje nastaju malignom transformacijom HMC ili mijeloidnih progenitora, koje odlikuje ograničena sposobnost diferentovanja u pravcu jedne ili više mijeloidnih loza (Hoffman i sar., 2008). Sve tipove AML karakteriše klonska ekspanzija i visok proliferativni kapacitet, oštećena sposobnost diferencijacije i/ili apoptoze, što dovodi do akumulacije nezrelih imunonekompetentnih ćelija (blasta) u ks, pk ili drugim organima i tkivima (Abbas i sar., 2011).

Incidenca AML u ljudskoj populaciji je 2.5 do 3/100.000 stanovnika godišnje i značajno raste u populaciji iznad 65 godina. U populaciji iznad 80 godina, incidenca iznosi 22/100 000 stanovnika (Hoffman i sar., 2008). Medijana starosti na dg je 65 godina, sa blagom predominancijom muškog pola u većini zemalja (Vardiman i sar., 2008). AML čini oko 90% svih akutnih leukemija u grupi odraslih bolesnika, ali samo 13% leukemija kod dece mlađe od 10 godina (Hoffman i sar., 2008).

Etiološki faktori koji su direktno povezani sa povećanom incidencom AML u ljudskoj populaciji su: izlaganje različitim genotoksičnim agensima, jonizujuće zračenje, prethodno lečenje alkilišućim agensima ili inhibitorima topoizomeraze-2, kao i genetička predispozicija (Hoffman i sar., 2008). Hronično izlaganje organskim rastvaračima kakav je benzen, izlaganje produktima nafte, kao i pušenje, povezani su sa povećanim rizikom za nastanak AML. Prisustvo mutacija u *RAS* genu kod obolelih od AML koji su bili izloženi

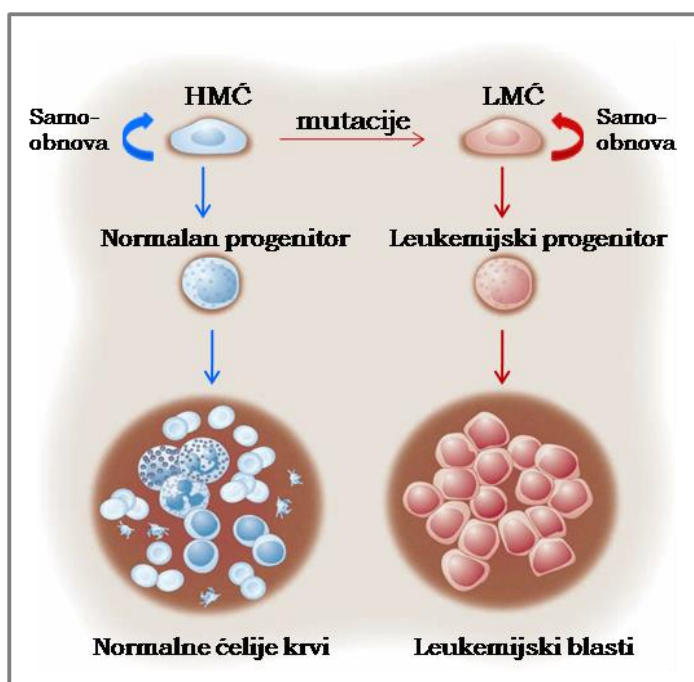
dejstvu navedenih hemijskih agenasa, ukazuje da ovakva izlaganja mogu indukovati genetička oštećenja koja dovode do nastanka AML (Hoffman i sar., 2008). Doza primljene radijacije posle izlaganja jonizujućem zračenju (atomska bomba u Hirošimi i Nagasakiju) korelira sa povećanim rizikom od nastanka AML kasnije u životu, uz latentni period od pet do 21 godine. Porast broja bolesnika sa AML, uočen je kod osoba lečenih primenom ^{32}P zbog policitemije rubre vere, i kod osoba lečenih zračenjem (zbog Hočkinskog limfoma, nehočkinskih limfoma i karcinoma dojke) (Čolović i Janković, 1999). Predispoziciju za razvoj AML je povezana sa nekoliko hematoloških bolesti. Naime, oboleli od MDS imaju relativno visok rizik od progresije u AML, dok je rizik niži među obolelima od mijeloproliferativnih neoplazmi (Hoffman i sar., 2008). Nasledna predispozicija oboljevanja od AML povezana je sa pojavom ove bolesti unutar porodica i to u kontekstu naslednih kliničkih sindroma. Naime, oboleli od Daunovog sindroma imaju 10 do 18 puta povećan rizik za nastanak AML, pri čemu kod dece mlađe od tri godine najčešće nastaje AML megakarioblastnog tipa, sa karakterističnim prisustvom mutacija koje inaktiviraju hematopoezni transkripcioni faktor GATA-1 (Hoffman i sar., 2008). Sindromi povezani sa defektima u sistemu za reparaciju DNK, hromozomskom nestabilnošću i hromozomskim prekidima, takođe su povezani sa sklonošću za nastanak hematoloških maligniteta, uključujući i AML: Bloomov sindrom, Fanconijeva anemija, kongenitalna neurofibromatoza, Li-Fraumenijev sindrom, Wiskott-Aldrich sindrom, sindrom X-vezane imunodeficijencije (Hoffman i sar., 2008).

Većina bolesnika sa AML na prezentaciji bolesti pokazuje jasne znake i simptome funkcionalnog oštećenja ks (Hoffman i sar., 2008). Osnovne kliničke manifestacije AML su posledica klonske ekspanzije maligno transformisanih hematopoeznih prethodnika, koji postepeno infiltrišu ks i suprimiraju zdravu hematopoezu, što dovodi do pojave anemije, trombocitopenije, neutropenije i drugih specifičnih simptoma. Broj leukocita u pk može biti snižen, normalan ili povišen, pri čemu su česte limfadenopatija, hepatomegalija i splenomegalija.

5. Patobiologija AML

5.1. Patofiziološke karakteristike AML

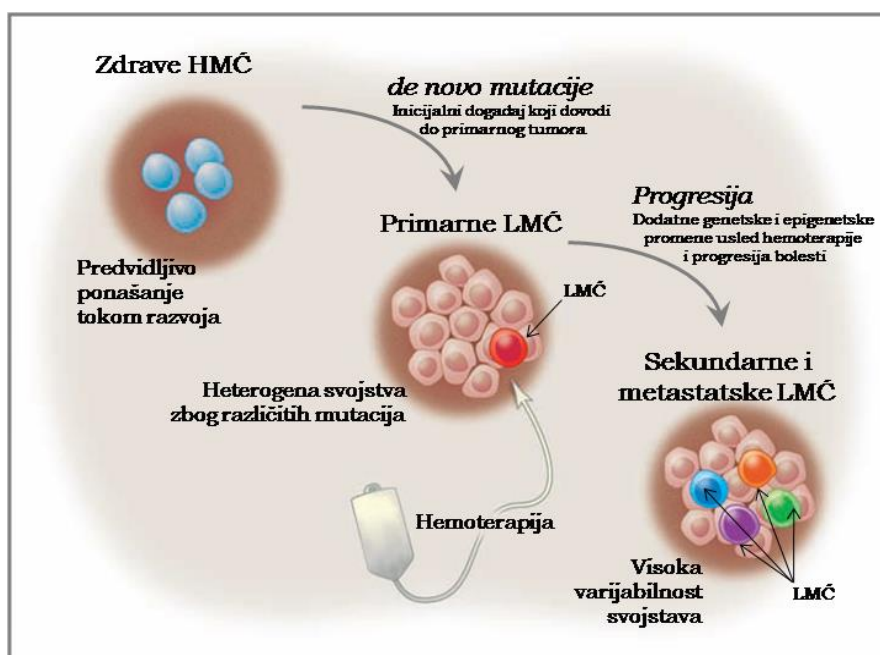
Prema savremenom modelu leukemogeneze, AML potiče iz male populacije ćelija nazvanih leukemijske matične ćelije (LMĆ), koje su sposobne da se samoobnavljaju, proliferišu i diferentuju u maligne blaste (Roboz i Guzman, 2009; Rosen i Jordan, 2009). LMĆ su po svojim karakteristikama analogne zdravim HMĆ ili progenitorima, koji su maligno transformisani usled akumulacije genetičkih i/ili epigenetičkih poremećaja (Roboz, 2009). Leukemijsku populaciju AML čini više ćelijskih subpopulacija: LMĆ sa potencijalom za samoobnovu, populacija leukemijskih progenitora sa ograničenim potencijalom samoobnove i populacija leukemijskih blasta bez ovog potencijala (Shema 5.) (Roboz, 2009; Rosen, 2009).



Shema 5. Model leukemijskih matičnih ćelija (prema: Rosen, 2009)

Studijom različitih frakcija humane AML je pokazano, da je veoma mala subpopulacija nezrelih CD34⁺CD38⁻Lin⁻ ćelija imala potencijal samoobnavljanja i da je bila sposobna da regeneriše leukemiju u NOD-SCID (*engl. nonobese diabetic severe combined immunodeficient*) mišjem ksenograft modelu (Bonnet i Dick, 1997). Odeljak LMĆ čini 0,1-1% leukemijske populacije u AML, a karakterišu ih aberantni imunofenotip, deregulisan i autonoman ćelijski program za preživljavanje, apoptozu i diferencijaciju, kao i abnormalne interakcije sa različitim ćelijama i strukturama mikrosredine ks (Bonnet i Dick, 1997; Chan i sar., 2008).

U pogledu imunofenotipa, LMĆ i zdrave HMĆ osim zajedničkih karakteristika, ali ispoljavaju i određene razlike (Chan i sar., 2008). Naime, za razliku od zdravih HMĆ, koje karakteriše imunofenotipski profil sa ekspresijom specifične kombinacije HLM - CD34⁺CD38⁻HLA-DR⁻CD123^{-/+low}CD90⁺CD117⁺CD71⁺CD13⁻CD33⁻CD96⁻Lin⁻, LMĆ AML obično ne ekspimiraju CD90 i CD117, ali su CD123⁺ i CD96⁺. Pomenute razlike nisu isključive, pošto LMĆ u AML ispoljavaju veoma heterogene imunofenotipove na dijagnozi (dg) bolesti, koji se mogu menjati tokom lečenja ili progresije bolesti (Shema 6.) (Rosen, 2009).



Shema 6. Stupnjevi evolucije primarnih LMĆ kao posledica akumulacije mutacija i/ili selektivnog delovanja hemoterapije (prema: Rosen i Jordan, 2009)

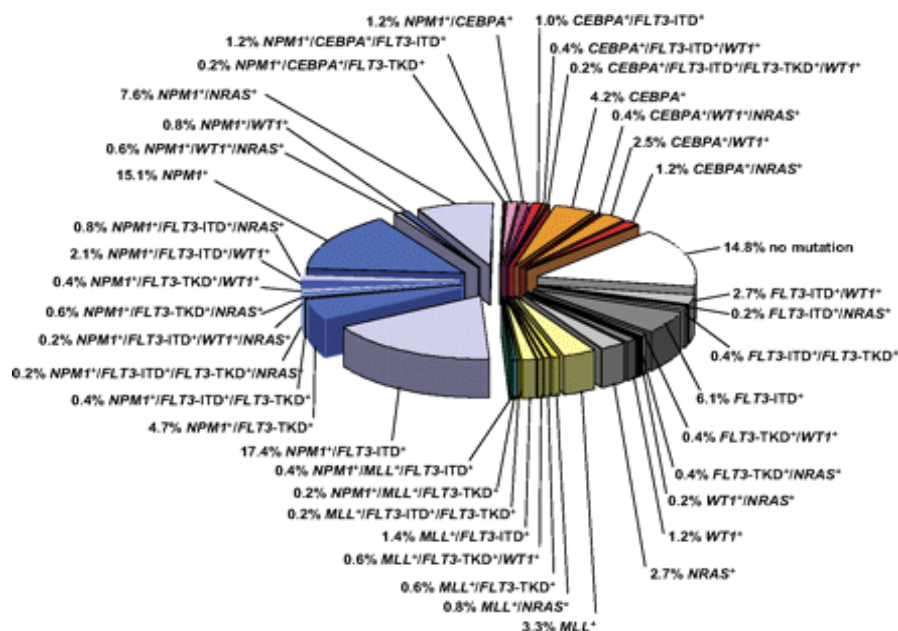
Kao i zdrave HMC, LMC su lokalizovane u hematopoeznim nišama, smeštenim u endoostealnim i vaskularnim odeljcima ks (Lane i sar., 2009). LMC se nalaze u dinamičkoj interakciji sa zdravim HMC i drugim ćelijama kostne srži, stvarajući specifičnu leukemijsku mikrookolinu, koja doprinosi njihovom preživljavanju. One sekretuju solubilne faktore, koji vrše autokrinu regulaciju njihovog rasta, proliferacije i migracije, istovremeno suprimirajući zdravu hematopoezu (Colmone i sar., 2008).

5.2. Molekularno-genetske karakteristike AML

Leukemogeneza je višestepen proces tokom koga inicijalni događaj u HMC ili mijeloidnim progenitorima dovodi do nastanka preleukemijske MC. Dalja akumulacija novih mutacija u preleukemijskim MC, dovodi do nastanka punog leukemijskog fenotipa i ispoljavanja bolesti (Yuan i sar., 2001; Jan i sar., 2012). Najnovija ispitivanja klonalne strukture AML ukazuju, da se svaka AML sastoji se od tzv. *engl.* "founder" klonova (nosioci inicijacionih mutacija koje se nalaze u svim leukemijskim ćelijama) i subklonova (nosioci mutacija koje se pojavljuju kasnije u leukemijskoj evoluciji i nalaze se samo u frakciji leukemijskih ćelija) (Welch, 2013; Parkin i sar., 2013).

Za malignu transformaciju ćelija i nastanak AML, neophodno je prisustvo najmanje dve mutacije (*engl.* two hit - hipoteza): primarne i sekundarne. Primarna mutacija može biti germinativna (*CEBPA*, *DDX41*, *RUNX1* geni) ili somatska (*IDH1/2*, *TET2*, *DNMT3A* geni), i obično uzrokuje nekontrolisanu proliferaciju ćelije, dok sekundarna mutacija (somatska) remeti diferencijaciju ćelija i ćelijski ciklus (Dash i sar., 2001). Najnovija istraživanja ukazuju da je u svakom pojedinačnom slučaju AML prisutno u proseku pet somatskih mutacija u rekurentno mutiranim genima (Shema 7.) (Döhner i sar., 2010; Jan i sar., 2012). Pri tome, mutacije tzv. "landscaping" gena, koji su uključeni u opšte remodeliranje hromatina kakvi su DNK metilacija, modifikacija histona, i hromatinski "looping", dešavaju se rano u evoluciji AML (pre-leukemijska faza), dok se mutacije u "proliferativnim" genima događaju kasnije. Epigenetičko

suprimiranje genske aktivnosti u AML se najčešće odvija pomoću dva mehanizma (Schoofs i Müller-Tidow, 2011).



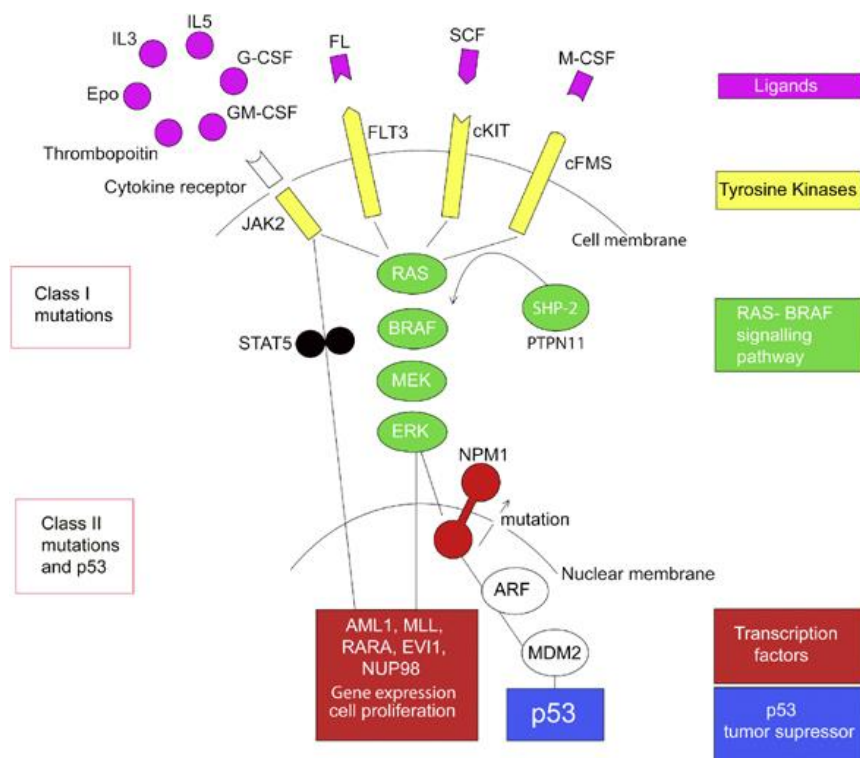
Shema 7. Distribucija molekularnih podgrupa AML-NK, bazirana na mutacijama *NMP1*, *CEBPA*, *FLT3*, *MLL*, *NRAS* i *WT1* gena (Döhner i sar., 2010)

Prvi mehanizam je aberantna prekomerna metilacija citidin-fosfat-guanozin dinukleotida (CpG), najčešće lokalizovanih u "CpG ostrvcima" genskih promotora tumor-supresor gena. Geni koji su najčešće zahvaćeni ovim vidom deregulacije su: *p15*, *E-kaderin*, *SOCS-1*, *p73*, *DAPK1*, *HIC1*, *RARβ2*, *ER* (Boulwood i Wainscoat, 2007). Drugi epigenetički mehanizam je deacetilacija histona, koja dovodi do jačeg vezivanja histona za DNK i posledično do represije transkripcije.

Jedna od karakteristika AML je postojanje blokade u procesu diferencijacije mijeloidnih progenitora, koja je uzrokovana poremećajem u ekspesiji normalnih transkripcionih faktora ili nastankom abnormalnih, hibridnih transkripcionih faktora (Tenen, 2003). Balansirane translokacije najčešće pogađaju transkripcione faktore kao što su: CBF (*engl. core binding factor*) kompleks u *t(8;21)(q22;q22)* i *inv(16)(p13.1;q22)* ili

t(16:16)(p13.1;q22), receptor retinoične kiseline (*engl.* retinoic acid receptor α , RAR α) u t(15;17)(q22;q12), MLL (*engl.* mixed lineage leukemia) protein u t(9;11)(p22;q23) i HOX (*engl.* homeobox) protein (Arber i sar., 2008a). Poremećaj procesa diferencijacije takođe može biti i posledica prisustva tačkastih mutacija u genima koji kodiraju hematopoezne transkripcione faktore: AML1, CEBPA (*engl.* CCAAT/enhancer binding protein- α), PU.1 i WT1 (Arber i sar., 2008a).

Osim blokade procesa diferencijacije, jedan od uzroka koji dovodi do razvoja kompletnog leukemijskog fenotipa je i poremećaj ćelijske proliferacije, koji omogućava da AML klon postane dominantan, odnosno da stekne proliferativnu prednost u odnosu na zdrave hematopoezne ćelije (Dash i sar., 2001). To se najčešće dešava usled mutacija u genima koji kodiraju tirozin kinazne receptore, što dovodi do konstitutivne ligand nezavisne aktivacije ovih receptora i deregulacije puteva signalne transdukcije u koje su oni uključeni (Pedersen-Bjergaard i sar., 2008) (Shema 8.).



Shema 8. Putevi signalne transdukcije i model leukemogeneze u AML (Iz: Pedersen-Bjergaard i sar., 2008)

Ovaj tip mutacija pogađa nekoliko gena *FLT3* (*engl.* fms related tyrosine kinase 3), *c-KIT* proto-onkogen i *RAS* onkogen. Poremećaji kontrole ćelijskog ciklusa i apoptoze su takođe važni za ispoljavanje potpunog leukemijskog fenotipa (Shema 8.). Do gubitka kontrole ćelijskog ciklusa kod AML dolazi prvenstveno usled prisustva mutacija u *NPM1* genu (nukleofozmin 1) sa posledičnom promenom strukture molekula i njegove aberantne lokalizacije u citoplazmi leukemijskih ćelija (Falini i sar., 2007). Mutacije u *NPM1* genu izazivaju istovremeno i poremećaj funkcije proteina p53, s obzirom da je jedna od fizioloških uloga nukleofozmina da stabilizuje p53. Mehanizmi kojim leukemijske ćelije izbegavaju ćelijsku smrt najčešće dovode do smanjenja njihove osetljivosti na proapoptotske stimulse. Jedan od takvih mehanizama je i deregulacija funkcije p53, kao posledica prisustva mutacija u *p53* genu (Prokocimer i sar., 1998), zatim povećanje ekspresije antiapoptotskih, odnosno smanjenje ekspresije proapoptotskih gena koji pripadaju Bcl-2 familiji (Hawkins i sar., 1997). Leukemijske ćelije izbegavaju apoptozu i izazivanjem poremećaja u Fas/Fas-ligand signalnom putu. U većini AML, leukemijske ćelije su rezistentne na Fas/Fas-ligand indukovanu apoptozu, a ovaj tip rezistencije je jedan od ključnih mehanizama pomoću koga leukemijske ćelije izbegavaju imunski odgovor i najčešći je mehanizam rezistencije na hemoterapeutike (Buzyn i sar., 1999).

6. Imunobiologija AML

Primena imunofenotipizacije i MPC (IMPC) u ispitivanju ekspresionih profila hLDM leukemijskih ćelija AML, ima tri osnovne kliničke primene: postavljanje precizne dg AML (Craig i Foon, 2008; Béné i sar., 2011), identifikacija aberantnih obrazaca ekspresije hLDM za procenu i praćenje rezidualne leukemijske populacije AML tokom i nakon primene hemioterapije (Craig i Foon, 2008; Béné i sar., 2009) i ispitivanje ekspresije hLDM koji su od prognostičkog značaja za AML i njenu stratifikaciju prema stepenu rizika

(Mason i sar., 2006; Liersch i sar., 2014). Sa druge strane, ispitivanjem ekspresionih profila hLDM na leukemijskim ćelijama AML stižu se bazičnih znanja o biologiji leukemijskih ćelija AML, posebno o ćelijskoj heterogenosti leukemijskih populacija i njihovom diferencijacionom potencijalu (Terstappen i sar., 1991; Welch, 2013; Parkin i sar., 2013).

6.1. Imunofenotipizacija u dijagnostici i klasifikaciji AML

Savremena dijagnostika AML bazirana je na primeni integrisanog panela dijagnostičkih metoda, među kojima važno mesto zauzima IMPC (Vardiman i sar., 2008; Béné i sar., 2011; van Dongen i sar., 2012). Ova složena metodologija omogućava precizno i pouzdano utvrđivanje prisustva ili odsustva ekspresije hLDM na populaciji leukemijskih ćelija, što definiše njen *imunofenotipski profil*, koji opisuje linijsko poreklo ćelija, stepen njihove diferencijacije i imunofenotipske aberacije (Béné i sar., 2011; van Dongen i sar., 2012). Sa druge strane, ova metodologija omogućava i procenu veličine imunološki definisane populacije leukemijskih ćelija AML u ispitivanom uzorku, izraženu kroz relativnu i/ili apsolutnu vrednost (CLSI document H42-A2, 2007; Craig i Foon, 2008). Finalni rezultat IPCM uključuje diferencijaciju između reaktivnih i malignih procesa u okviru limfo-hematopoeznog sistema, odnosno preciznu diferencijalnu dijagnozu AML u odnosu na druge maligne bolesti limfo-hematopoeznog sistema (Craig i Foon, 2008; Béné i sar., 2011; van Dongen i sar., 2012).

Imunofenotipizacija MPC ima značajne prednosti u odnosu na srodne metode imunofenotipizacije (Dunphy, 2004), među kojima se izdvaja mogućnost multiparametarske analize svake pojedinačne ćelije ispitivanog uzorka u suspenziji, koja podrazumeva istovremenu analizu širokog spektra hLDM u kombinaciji sa fizičkim karakteristikama ćelija (CLSI document H43-A2, 2007; Craig i Foon, 2008). Osim toga, metodologija je senzitivna, visoko

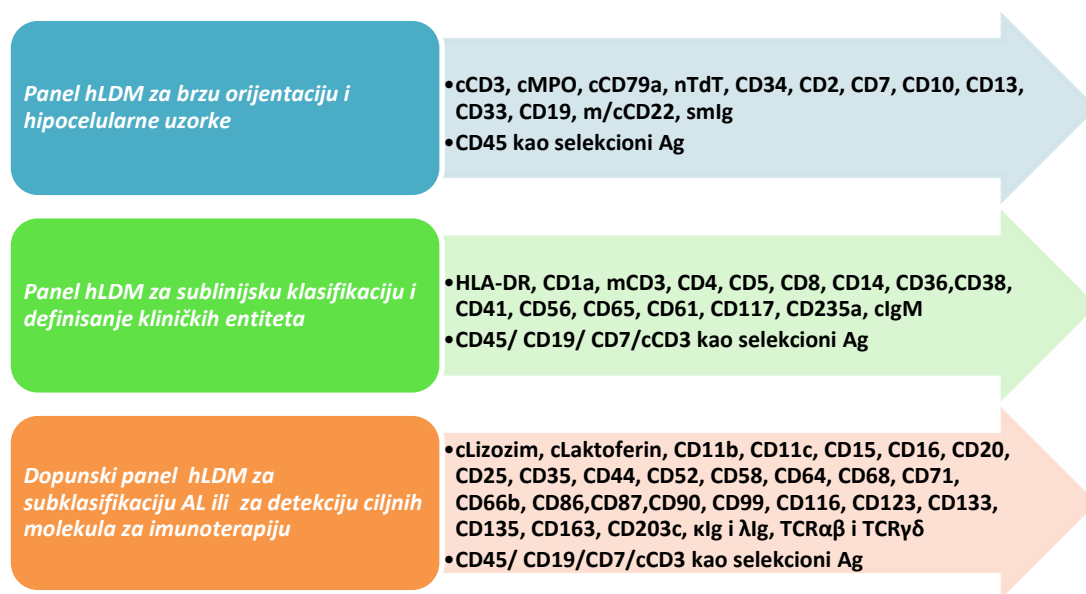
specifična i omogućava analizu velikog broja ćelija za relativno kratko vreme (Craig i Foon, 2008; Béné i sar., 2011).

U poslednjih deset godina došlo je do značajnih tehnoloških inovacija u protočnoj citofluorimetriji i razvoja novih fluorescentnih boja, kao i proizvodnje širokog panela MoAt specifičnih za hLDM (Wood, 2006; Béné i sar., 2011; van Dongen i sar., 2012), što je učinilo da ova kompleksna metodologija postane rutinska (Vardiman i sar., 2008; Béné i sar., 2011; van Dongen i sar., 2012). Istovremeno je postignut i značajan napredak u klasifikaciji hematoloških neoplazmi, a među njima i akutnih leukemija (AL). Naime, klasifikacija hematoloških neoplazmi koju je utvrdila Svetska zdravstvena organizacija (SZO) zasniva se na integrisanom multidisciplinarnom pristupu, u kome većina entiteta ima definisan imunofenotipski profil (Swerdlow i sar., 2008).

Prema preporukama međunarodne grupe eksperata za kliničku primenu IPCM u dijagnostici i praćenju hematoloških neoplazmi, medicinske indikacije za testiranje uzoraka protočnom citofluorimetrijom, uključuju sve slučajeve sa prisustvom atipičnih ćelija ili blasta u pk, ks ili telesnim tečnostima (Davis i sar., 2007; Craig i Foon, 2008). U kliničkim laboratorijama, citomorfološka analiza obično prethodi IPCM, što zajedno sa kliničkim i laboratorijskim podacima o bolesniku, značajno doprinosi racionalizaciji i dodatnom ubrzanju procesa imunofenotipizacije primenom ciljanih panela MoAt (Béné i sar., 2011; van Dongen i sar., 2012). Osim primarne primene u dijagnostici, IPCM se preporučuje i u cilju dokazivanja relapsa AML (Craig i Foon, 2008; Béné i sar., 2011).

Standardni paneli MoAt koji se primenjuju u dijagnostici i klasifikaciji AML su kompleksni i omogućavaju ispitivanje obrazaca ekspresije velikog broja hLDM, na populaciji leukemijskih ćelija (ELN – WP10, 2005; Wood i sar, 2007; Béné i sar., 2011; van Dongen i sar., 2012). Ispitivanjem su obuhvaćeni površinski plazmamembranski i unutarćelijski molekuli koji identifikuju ćelije različitih loza limfohematopoeznog sistema. Od molekula limfoidne loze, ispituju se molekuli koji su eksprimirani na ćelijama B, T, i NK loze, a od molekula mijeloidne loze, ispituju se molekuli eksprimirani na ćelijama

granulocitne, monocitne, megakariocitne, eritrocitne, bazofilne loze, mastocita i dendritskih ćelija. Osim linijski specifičnih molekula, ispituju se i linijski nespecifični diferencijacioni molekuli, koji su važni za identifikaciju različitih stupnjeva diferencijacije leukemijskih ćelija u ispitivanom uzorku (ELN – WP10, 2005; Wood i sar, 2007; Béné i sar., 2011; van Dongen i sar., 2012).

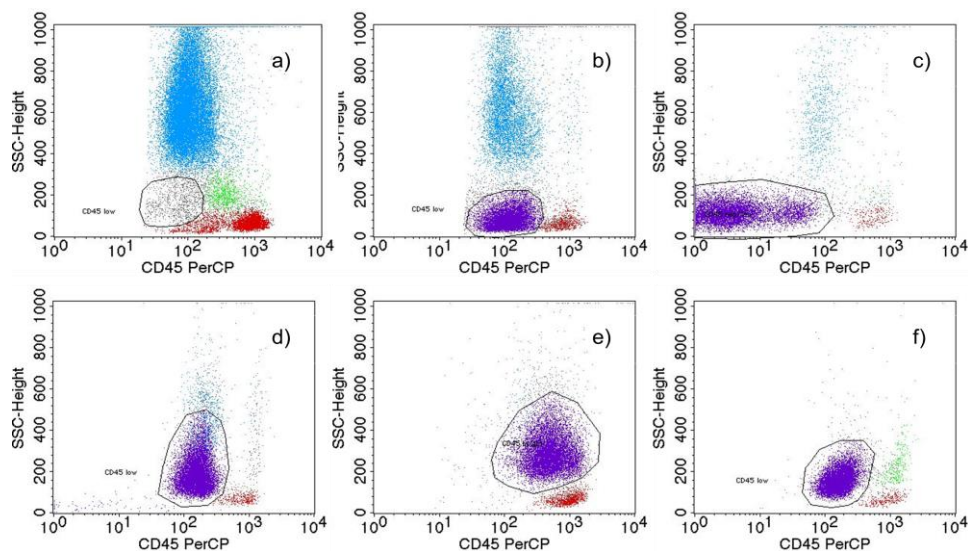


Shema 9. Paneli hLDM/Ag, koji se primenjuju u cilju postavljanja precizne imunofenotipske dijagnoze AML (Béné i sar., 2011; van Dongen i sar., 2012)

Kombinacije hLDM tj. Ag koje se ispituju su standardizovane, a svaka kombinacija daje specifične informacije o LĆ. Paneli se primenjuju postupno, počevši od primarnog panela za brzu orijentaciju, sekundarnog panela za sublinijsku klasifikaciju i tercijarnog panela za još detaljniju subklasifikaciju AL, odnosno diferencijalnu dg AML (Shema 9.).

U svakoj ispitivanoj kombinaciji hLDM u panelu, potrebno je uključiti jedan ili više tzv. Ag za softversku selekciju populacije leukemijskih ćelija (*engl.* gating antigen), što omogućava njenu reproducibilnu i preciznu analizu u složenim ćelijskim suspenzijama kakve su ks, pk, likvor, maligni izlivi, suspenzija limfnog čvora, suspenzija granuloma (Lacombe i sar., 1997; Béné i sar., 2011; van Dongen i sar., 2012). Kao standardni Ag za selekciju leukemijske

populacije ćelija koristi se molekul CD45, u kombinaciji sa fizičkom karakteristikom - relativnom ćelijskom granulacijom (*engl.* side scatter, SSC) (Lacombe i sar., 1997). CD45 molekul je tipično eksprimiran prema obrascu niske ekspresije ($CD45^{+low}$) na leukemijskim ćelijama, koje istovremeno imaju i svojstvo relativno snižene ćelijske granulacije (SSC^{low}) (Slika 1.).



Slika 1. Analiza uzoraka kostne srži primenom IMPC na dg AML. Selekcionisanje leukemijske populacije ćelija u uzorku kostne srži bolesnika sa različitim tipovima AML, na osnovu obrasca ekspresije molekula CD45 i stepena ćelijske granulacije, prikazanih na dvo-parametarskim "dot plot" histogramima u ljubičastoj boji: a) referentne populacije ćelija u zdravoj kostnoj srži, crveno – limfociti ($CD45^{high}$) i hematogoni ($CD45^{low-medium}$), zeleno - monocitni prekursori, plavo – granulocitni prekursori b) AML sa minimalnom diferencijacijom; c) Akutna eritroblastna leukemija; d) Akutna promijelocitna leukemija; e) Akutna monocitna leukemija; f) Akutna monoblastna leukemija.

Mada u većini slučajeva, leukemijske populacije ćelija AML eksprimiraju molekul CD45 prema niskom obrascu ekspresije, u pojedinim slučajevima AML (akutna eritroblastna leukemija, akutna megakarioblastna leukemija), ekspresija molekula CD45 je izrazito niska ili čak i odsutna (*engl.* $CD45^{neg/+low}$). Značajno viši nivo ekspresije CD45 molekula (*engl.* $CD45^{+medium/bright}$) viđa se na leukemijskim populacijama ćelija AML sa zahvaćenom monocitnom lozom (Lacombe i sar., 1997; Béné i sar., 2011; van Dongen i sar., 2012).

Osnovna imunološka tehnika koja se primenjuje za obeležavanja ćelija uzorka za IPCM je direktna višekolorna imunofluorescentna tehnika, koja uključuje primenu koktela MoAt direktno konjugovanih sa molekulima različitih fluorescentnih boja. Preporuka je da se koriste njene varijante od četvorokolorne do desetokolorne (Wood, 2006; Béné i sar., 2011; van Dongen i sar., 2012).

Uzorci ćelijskih suspenzija obeleženi MoAt se mere i analiziraju na protočnim citofluorimetrima (Paietta, 2003; Wood, 2006), primenom softvera koji su standardni za svaki tip instrumenta. Ovom metodom se istovremeno prikupljaju i memorišu podaci o fizičkim i fluorescentnim karakteristikama svake pojedinačne ćelije ispitivanog uzorka, a rezultati se prikazuju u jedno-parametarskim i dvo-parametarskim histogramima. U cilju detaljne imunofenotipske analize, leukemijska populacija se selekcioniše sukcesivno na osnovu fizičkih karakteristika, relativne ćelijske veličine (*engl.* forward scatter, FCS) i SSC, koje se dalje kombinuju sa odabranim molekulom za selekciju leukemijskih ćelija. Broj ćelija prikupljenih za analizu po alikvotu (reprezentativni deo uzorka koji se analizira u pojedinačnoj epruveti tj. pojedinačnoj kombinaciji MoAt) uzorka je 100.000 do 500.000 hematopoeznih nukleiranih ćelija. Pritom, optimalan broj leukemijskih ćelija prikupljenih za analizu, treba da se kreće u opsegu od 500 do 10.000 ćelija po epruveti (CLSI document H43-A2, 2007; CLSI document H42-A2, 2007).

Analizom prikupljenih podataka nastaje imunofenotipska informacija o ćelijama ispitivanog uzorka, koja je po svojoj strukturi složena i podrazumeva više nivoa interpretacije (Craig i Foon, 2008; Béné i sar., 2011). Primarna analiza počinje od identifikacije atipične populacije leukemijskih ćelija u miljeu prisutnih referentnih hematopoeznih populacija ćelija ks ili pk (Slika 1.). Već je pomenuto, da je ključni parametar za identifikaciju i kvantitativnu procenu leukemijske populacije ćelija u ispitivanom uzorku CD45/SSC obrazac (izražen kao % nukleiranih ćelija uzorka). Analiza uzorka ks u kontekstu obrasca CD45/SSC, omogućava potvrdu njegovog kvaliteta, jer u uzorku, pored populacije leukemijskih ćelija, treba očekivati i prisustvo referentnih populacija

limfocita, hematogona, populacija monocitnih, granulocitnih, i eritrocitnih prekursora, mada u izmenjenim relativnim odnosima (van Lochem i sar., 2004; Olaru i sar., 2008; Arnoulet i sar., 2010). Centralni deo analize podrazumeva definisanje imunofenotipskog profila leukemijske populacije ćelija, što podrazumeva definisanje grupe eksprimiranih hLDM tj. grupe eksprimiranih antigena (Ag^+) i grupe neekspimiranih antigena (Ag^-) na leukemijskim ćelijama, prema određenim kriterijumima (Del Vecchio i sar., 2004; ELN –WP10, 2005). Za sve hLDM koji su eksprimirani na leukemijskoj populaciji ćelija, definišu se i obrasci njihove ekspresije, prema relativnoj poziciji zapisa fluorescentnog signala na logaritamskoj skali intenziteta (van Lochem i sar., 2004; Wood i sar., 2007).

Na osnovu utvrđenog imunofenotipskog profila leukemijske populacije ćelija, identifikuje se krvna loza iz koje leukemijske ćelije potiču i utvrđuje se stepen njihove zrelosti (Craig i Foon, 2008; Béné i sar., 2011; van Dongen i sar., 2012). U AML, osim imunofenotipskog profila mijelo/monoblasta, potrebno je dodatno utvrditi i imunofenotipske karakteristike populacija granulocitnih, monocitnih, eritrocitnih i megakariocitnih prekursora ks, ukoliko su viđeni u uzorku, i to u cilju utvrđivanja uključenosti ovih populacija u leukemijski proces odnosno njihove pripadnosti rezidualnoj zdravoj hematopoezi (van Lochem i sar., 2004; Olaru i sar., 2008; Arnoulet i sar., 2010). Takav analitički pristup zasniva se na upoređivanju obrazaca ekspresije hLDM na pomenutim populacijama ispitivanog uzorka, i upoređivanju sa obrascima ekspresije istih molekula na referentnim populacijama zdrave ks i/ili pk (*engl.* pattern recognition), pri čemu se definišu kvalitativna i kvantitativna odstupanja u njihovim obrascima ekspresije, što ukazuje na uključenost tih populacija u leukemijski proces (Terstappen i sar., 1990; van Lochem i sar., 2004; Arnoulet i sar., 2010).

Poslednji korak u analizi predstavlja definisanje imunofenotipskih aberacija u ekspresiji diferencijacionih molekula na populaciji leukemijskih ćelija. Otkriveno je više tipova imunofenotipskih aberacija, odnosno odstupanja u ekspresiji hLDM u odnosu na fiziološki obrazac ekspresije, među kojima su

najučestalije: a) ektopična ekspresija molekula koji nisu tipični za određenu hematopoeznu lozu (*engl.* lineage infidelity), b) prekomerna ekspresija molekula (*engl.* overexpression), c) odsustvo ili snižena ekspresija molekula (*engl.* underexpression), d) asinhrona ekspresija molekula koji tipično nisu koeksprimirani na ćelijama (Terstappen i sar., 1991; Oлару i sar., 2008; Béné i sar., 2009). Na osnovu imunofenotipskih aberacija u ekspresiji diferencijacionih molekula definiše se imunofenotip specifičan za leukemiju (IFSL) koji se koristi za ispitivanje prisustva minimalne rezidualne leukemijske populacije ćelija, tokom procene terapijskog odgovora (Oлару i sar., 2008; Béné i sar., 2009). Osim toga, potrebno je proceniti i prognostičku vrednost dobijene imunofenotipske informacije, kao i identifikaciju molekula koji su potencijalni terapijski ciljevi za specifičnu imunoterapiju (npr. CD33 ili CD123 u AML) (Craig i Foon, 2008; Béné i sar., 2011, Wood i sar., 2007).

Na osnovu imunofenotipskih karakteristika leukemijske populacije ćelija vrši se imunološka klasifikacija AML (Tabela 2.) (Béné i sar., 2011). Imunofenotipska klasifikacija AL nastala je na inicijativu grupe EGIL (*engl.* European Group for the Immunological Characterization of Leukemias) i bazirana je na analogiji sa stupnjevima diferencijacije glavnih loza limfo-hematopoeznog sistema tokom procesa ontogeneze (Béné i sar., 1995; Béné i sar., 1998; Béné i sar., 2011).

Leukemijske ćelije u različitim tipovima AML u velikoj meri imaju očuvanu sposobnost da sekvencijalno eksprimiraju hLDM, prema obrascima koji karakterišu rane stupnjeve diferencijacije zdravih ćelija hematopoezne loze iz koje potiču. Istovremeno, ove ćelije uvek ispoljavaju manja ili veća odstupanja u obrascima ekspresije istih molekula, što definiše imunofenotipske aberacije u ekspresiji linijski specifičnih i/ili diferencijacionih molekula, a što reflektuje njihovu malignu prirodu (Terstappen i sar., 1990; Oлару i sar., 2008; Craig i Foon, 2008; Béné i sar., 2011). Imunofenotipizacija MPC omogućava visoko senzitivnu i pouzdanu diferencijaciju između AML i drugih tipova AL sa jedne strane i limfoma, MDS, mijeloproliferativnih neoplazmi (MPN),

nehematopoeznih neoplazmi i reaktivnih procesa sa druge strane (Vardiman i sar., 2008; Craig i Foon, 2008; Béné i sar., 2011).

Tabela 2. Imunološka klasifikacija AML (Prema: Béné i sar., 2011)

Imunološki suptipovi AML
AML sa minimalnom diferencijacijom
AML sa granulocitnom diferencijacijom (bez sazrevanja / sa sazrevanjem)
AML sa monocitnom diferencijacijom (bez sazrevanja / sa sazrevanjem)
AML sa granulocitnom i monocitnom diferencijacijom
Akutna promijelocitna leukemija
Akutna eritroblastna leukemija
Akutna megakarioblastna leukemija
Akutna bazofilna leukemija
Neoplazma blastnih plazmacitoidnih dendritskih ćelija

Utvrđen imunološki suptip AML se kao informacija dalje integriše sa drugim karakteristikama leukemijske populacije (morfologija, kariotip, molekularno-genetičko ispitivanje), na osnovu čega se AML klasifikuje u odgovarajući tip odnosno suptip, prema kriterijumima SZO (Vardiman i sar., 2008). U odnosu na entitete AML koji su klasifikovani prema prisustvu karakterističnih rekurentnih citogenetičkih ili molekularno-genetičkih aberacija (Arber i sar., 2008a), ne postoji direktna korelacija imunofenotipskog profila i pomenutih aberacija. Međutim, u slučaju pojedinih hLDM zapažena je veza sa pojedinim aberacijama, te se njihova ekspresija može smatrati surogat markerima (tzv. *imunofenotipski otisak*) prisustva specifične translokacije odnosno molekularno-genetičke aberacije u genomu leukemijskih ćelija (Paietta, 2010). Na primer, kod AML sa t(8;21)(q22;q22) se javlja aberantna ekspresija molekula CD19, dok se u suptipu akutne promijelocitne leukemije sa t(15;17)(q22;q12) i mikrogranularnom morfologijom, javlja aberantna

ekspresija molekula CD2 i CD34, bar na subpopulaciji leukemijskih ćelija (Arber i sar., 2008a; Paietta, 2010).

Imunofenotipski profil populacije leukemijskih ćelija AML, može da pokaže i stepen unutarpopulacione ćelijske heterogenosti svake pojedinačne AML (Campos i sar., 1990; de Figueiredo-Pontes i sar, 2008; Schubert i sar., 2011), što je važna karakteristika posebno sa aspekta lečenja bolesnika i praćenja rezidualne leukemijske populacije tokom lečenja (de Figueiredo-Pontes i sar, 2008).

Veoma važan klinički aspekt primene IPCM na dg ili tokom praćenja bolesnika sa AML je i analiza uzoraka likvora za prisustvo leukemijskih ćelija (Bromberg i sar., 2007; Kraan i sar., 2008). U slučaju AML, učestalost neuroleukemije na dg bolesti je niska (~5%), mada može varirati u različitim grupama bolesnika sa AML, zavisno od stepena leukocitoze i/ili drugih karakteristika (Döhner i sar, 2010). Značajan klinički aspekt primene IMPC je i u ispitivanju stepena diseminacije AML putem analize uzoraka telesnih izliva (pleuralni, peritonealni, perikardni) za prisustvo leukemijskih ćelija (Zimmerlin i sar., 2001).

Jedna od inovacija u primeni IMPC u dijagnostici AML, ogleda se i u korišćenju MoAt specifičnih za različite hibridne proteine, produkte fuzionih gena koji nastaju u leukemijskim ćelijama kao produkt balansiranih translokacija (Arber i sar., 2008a). Do danas je sintetisan čitav spektar MoAt koja su objedinjena u multipleks imuno-setove za brz i visoko pouzdan skrining AML za prisustvo hibridnih proteina, mada je ova metodologija još uvek u povoju (Dekking i sar., 2010).

Specifičan praktičan doprinos IMPC u oblasti kliničkih istraživanja AML, leži u mogućnosti izolovanja leukemijskih ćelija i subpopulacija unutar osnovnog leukemijskog klona zasnovanog na njihovim imunofenotipskim karakteristikama, i dalje ispitivanje njihovih funkcionalnih (*in vitro* kultivisanje) i/ili molekularno-genetičkih karakteristika (de Figueiredo-Pontes i sar, 2008; Welch i sar., 2013; Parkin i sar., 2013; Eppert i sar., 2011). Osim toga, sinteza

MoAt specifičnih za native odnosno fosforilisane forme intracelularnih fosfoproteina, uključenih u puteve signalne transdukcije u leukemijskim ćelijama, omogućila je ispitivanje zahvaćenosti različitih ćelijskih signalnih puteva leukemijskim procesom (Krutzik i sar., 2004).

6.2. IMPC u ispitivanju minimalne rezidualne bolesti u AML

Većina bolesnika sa AML, mlađih od 60 godina, nakon lečenja indukcijom hemioterapijom postiže kompletnu remisiju (KR) bolesti standardno definisanu na citomorfološkom nivou (<5% blasta u ks) (Döhner i sar, 2010). Međutim, bolesnici u KR se međusobno značajno razlikuju na osnovu veličine tumorske mase tzv. minimalne rezidualne bolesti (MRB), koja je preostala posle primene hemioterapije (Béné i Kaeda, 2009; Al-Mawali i sar., 2009b; Jaso i sar., 2014). Precizna procena i praćenje MRB tokom daljeg lečenja bolesnika ima važnu kliničku primenu, pošto može poboljšati stratifikaciju bolesnika prema stepenu rizika od nastanka relapsa (Kern i sar., 2004; Al-Mawali i sar, 2009a) i omogućiti optimizaciju i personalizaciju daljeg lečenja MRB^{poz} bolesnika (Buccisano i sar., 2010). Osim toga, prisustvo i kvantifikacija MRB je pokazala visoku prediktivnu vrednost za dužinu preživljavanja bez znakova bolesti (*engl. disease free survival, DFS*) i ukupno preživljavanje (*engl. overall survival, OS*) bolesnika sa AML (Vidrales i sar., 2003; Buccisano i sar., 2010; Terwijn i sar., 2013).

Dva glavna metodološka modaliteta za ispitivanje MRB kod bolesnika sa AML su molekularno-genetičko testiranje u slučaju postojanja specifičnog molekularnog defekta na dg i IMPC koju je moguće primeniti kod onih bolesnika sa AML kod kojih je na dg definisano prisustvo specifičnih imunofenotipskih aberacija tzv. leukemija specifičnih imunofenotipova (LSIF) na populaciji leukemijskih mijelo/monoblasta (Terstappen i sar., 1991; Béné i sar., 2009; Jaso i sar., 2014). Primena višekolornih (≥ 4) kombinacija za imunofenotipizaciju leukemijskih ćelija AML na dg bolesti, omogućava detekciju prisustva jedne do dve LSIF kombinacije kod $\sim 80\%$ bolesnika (Vidrales i sar., 2003; Olaru i sar.,

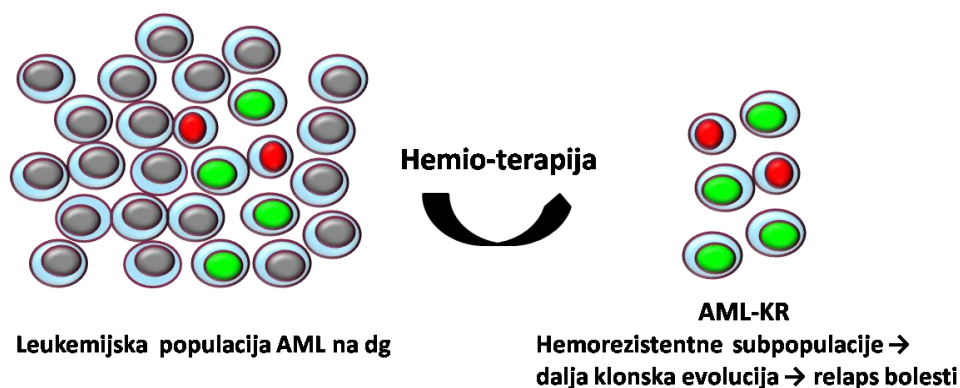
2008). Upoređivanjem obrazca ekspresije hLDM u specifičnim LSIF kombinacijama na leukemijskim ćelijama AML, sa jedne strane i mijeloidnim progenitorima zdrave i/ili regenerativne kostne srži, sa druge strane, omogućava identifikaciju leukemijskih ćelija koje se pojavljuju na atipičnim pozicijama u dvo-parametarskim histogramima fluorescencije tzv. "empty spaces" (Campana i sar., 1999; Kern i sar., 2005).

Mada su obe pomenute metodologije visoko informativne, senzitivnost je veća u slučaju RQ-PCR (*engl.* rreal-time quantitative polimerase chain reaction) metodologije (10^{-4} – 10^{-5}). Međutim, jedna od važnih prednosti IPCM u odnosu na RQ-PCR metodologiju, je mogućnost izuzetno brze i takođe visoko senzitivne (10^{-3} – 10^{-4}) i specifične kvantifikacije kako vijabilnih leukemijskih ćelija sa LSIF karakteristikama tako i njihove proporcije od ukupnih leukocita analiziranog uzorka (Craig i sar., 2008; Béné i Kaeda, 2009; Jaso i sar., 2014). Savremeni protočni citofluorimetri omogućavaju efikasnu analizu velikog broja ćelija po analiziranom višekolorno-obeleženom alikvotu ispitivanog uzorka ($0.5 - 1 \times 10^6$ ćelija), što omogućava pouzdanu detekciju 0.01% leukemijskih ćelija (1 leukemijska ćelija na 10^4 zdravih ćelija), i prikupljanje bar 10 – 100 ćelija od interesa (Craig i sar., 2008; Béné i Kaeda, 2009; Jaso i sar., 2014).

Glavna tehnička ograničenja primene IMPC za praćenje MRB kod bolesnika sa AML, predstavlja odsustvo IFSL na dg bolesti kod ~20% pacijenata (Vidriales i sar, 2003), promena u obrascu ekspresije pojedinig hLDM tokom lečenja (Baer i sar., 2001; Vidriales i sar, 2003; Voskova i sar, 2004; Langebrake i sar, 2005), kao i selekcija i povećanje populacije rezistentnih minornih subklonova na dg AML pod dejstvom hemioterapije (Vidriales i sar, 2003; Parkin i sar, 2013; Zeijlemaker i sar, 2014) (Shema 10.).

Rezistentni subklonovi leukemijskih mijelo/mono blasta su obično nezreliji po svojim imunofenotipskim i funkcionalnim karakteristikama i oni postaju predominantne subpopulacije tokom relapsa bolesti (Vidriales i sar, 2003; Parkin i sar, 2013) (Slika 2.). Dosadašnja ispitivanja još uvek nisu definisala najoptimalniji pristup za ispitivanje MRB metodologijom IPCM kod odraslih bolesnika sa AML, pri čemu savremeni vodiči za dijagnozu i lečenje

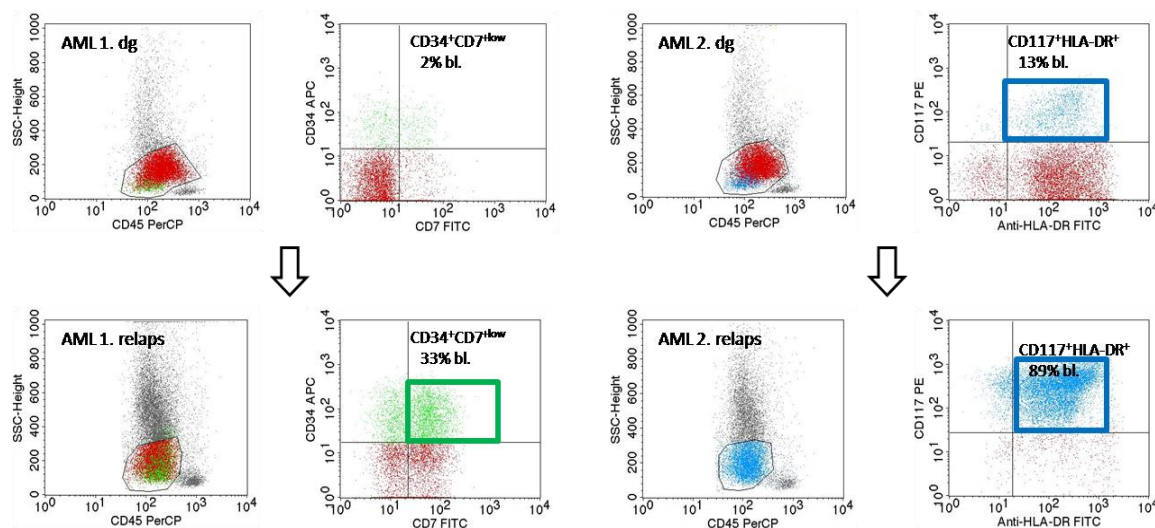
AML preporučuju ovu vrstu ispitivanja MRB prevashodno kod bolesnika sa AML uključenih u kliničke studije (Döhner i sar, 2010; Terwijn i sar., 2013).



Shema 10. Shematski prikaz selekcije hemoresistentnih leukemijskih subklonova tokom lečenja bolesnika hemioterapijom (Adaptirano prema: Parkin i sar., 2013).

Kada se radi o vremenu ispitivanja MRB primenom IPCM, preporučuje se analiza posle indukciono terapije (d28), kao i posle konsolidacione terapije (Venditti i sar., 2000; Buccisano i sar., 2010).

Takođe, pojedine studije su pokazale da je rana procena MRB u fazi aplazije ks posle primene indukciono terapije (d14) takođe važan prognostički parametar za procenu odgovora na indukcionu terapiju i OS (Lacombe i sar, 2009; Mattison i sar, 2013; Terwijn i sar., 2013).



Slika 2. Primeri selekcije mlađih leukemijskih subpopulacija ćelija posle lečenja hemioterapijom kod bolesnika sa AML – poređenje zastupljenosti subpopulacije na dg i tokom relapsa bolesti (dvo-parametarski “dot plot” histogrami fluorescentnih zapisa). *AML 1.* – relativno povećanje subpopulacije ćelija $CD13^+CD34^+CD7^{low}$ (u zelenoj boji) sa 2% na dg na 33% tokom relapsa AML; *AML 2.* – relativno povećanje subpopulacije ćelija $CD33^+CD117^+HLA-DR^+$ (u plavoj boji) sa 13% na dg na 89% tokom relapsa AML.

6.3. Humani LDM kao prognostički markeri u AML

Prognostički značaj imunofenotipskih karakteristika AML još uvek nije jasno ustanovljen. U poslednje dve decenije pojavio se veliki broj radova, često sa kontraverznim rezultatima o prognostičkoj ulozi pojedinačnih i/ili grupa hLDM, što je posledica razlika u veličini i heterogenosti grupa analiziranih bolesnika, broju i vrsti ispitivanih hLDM, razlika u primenjenim tehnikama za obeležavanje i analizu ekspresije hLDM, kao i kriterijuma za procenu značajnosti nivoa njihove ekspresije na populaciji LĆ (Schabath i sar, 2003; Casasnovas i sar., 2003). Među hLDM koji nose loš prognostički efekat, navodi se ekspresija molekula: HLA-DR, CD34, CD56, CD7, CD11b, CD14, CD13, CD9 i TdT, dok je sa druge strane kao nosilac dobrog prognostičkog efekta navedena ekspresija molekula: CD15, CD65, i CD2 na leukemijskim ćelijama AML (Schabath i sar, 2003; Repp i sar, 2003; Mason i sar., 2006; Derolf i sar., 2008).

Negativan prognostički značaj ekspresije CD34 molekula na leukemijskim ćelijama AML, potvrđen je u više nezavisnih studija koje su ukazale na povezanost sa nižom učestalošću KR, kraćim OS, ili predikcijom relapsa bolesti (Chang i sar., 2003; Casasnovas i sar., 2003; Repp i sar., 2003; Webber i sar., 2008). Pritom je ta povezanost još značajnija u slučaju koekspresije CD34 i HLA-DR molekula na leukemijskim ćelijama (Chang i sar., 2003; Webber i sar., 2008).

Skorašnja ispitivanja su pokazala i da povišena ekspresija CD47 molekula na LMĆ AML doprinosi patogenezi AML putem inhibiciju fagocitoze LMĆ, putem interakcije sa inhibitornim receptorom na fagocitama (Majeti i sar., 2009). Nivo ekspresije CD47 je mnogo viši na LMĆ AML nego na zdravim HMĆ, a povišena ekspresija je nezavistan loš prognostički faktor povezan sa kraćim OS (Majeti i sar., 2009).

Literaturni podaci pokazuju da je ekspresija CD25 (α lanac IL2 receptora) na LMĆ AML, takođe prediktor loše prognoze (Cerny i sar., 2013; Gönen i sar., 2012). Naime, pokazano je da CD25⁺CD34⁺CD38⁻ leukemijske ćelije ispoljavaju hemorezistenciju i iniciraju AML u ksenograft modelima (Cerny i sar., 2013). Ekspresija CD25 molekula na dg je takođe povezana sa lošim odgovorom AML na indukcionu terapiju, većom učestalošću relapsa bolesti i kraćim OS (Cerny i sar., 2013; Gönen i sar., 2012).

Najnovija ispitivanja su pokazala da je identifikacija populacije mijeloblasta sa ekspresijom "stem cell" imunofenotipa (CD34⁺CD38^{low/-}CD123⁺), kod odraslih bolesnika sa AML, pouzdan prediktor lošeg odgovora na indukcionu terapiju i kraćeg OS (Vergez i sar., 2011; Eppert i sar., 2011).

Molekul CD7, primarno eksprimiran na ćelijama T i NK loze, eksprimiran je i na frakciji AML (Ortolani, 2011), gde je pokazano da postoji značajna veza sa nižom učestalošću KR (Casasnovas i sar., 2003; Mason i sar., 2006). CD56, još jedan molekul čija je ekspresija karakteristika NKT i NK limfocita, eksprimiran je takođe i na frakciji AML (Ortolani, 2011), gde je u više studija pokazano, da je značajno povezan sa kraćim OS (Chang i sar., 2003; Mason i sar., 2006; Djunić i

sar., 2012). Nedavni literaturni podaci sugerišu prognostičku ulogu ekspresije CD56 molekula u AML sa t(8;21) i vezu sa značajno kraćim trajanjem KR i kraćim OS, što može biti korisno u stratifikaciji terapije za ovaj entitet AML (Arber i sar., 2008a). Veoma sličan nalaz je dobijen i u slučaju AML sa t(15;17), gde se ekspresija CD56 molekula pokazala kao indikator kraćeg DFS (Montesinos i sar., 2011).

Ekspresija i funkcionalna aktivnost faktora povezanih sa hemorezistencijom, uključujući proteinske membranske transportere lekova familije MRP (*engl.* Multidrug resistance associated proteins), kao i ekspresiju kombinacije molekula P-gp i anti-apoptoznog molekula Bcl-2, takođe ima loš prognostički uticaj na odgovor na indukcionu terapiju i OS bolesnika sa AML (Schabath i sar., 2003).

6.4. IMPC u detekciji ciljnih molekula za imunoterapiju AML

Terapeutska MoAt usmerena protiv specifičnih molekula na plazmamembrani tumorskih ćelija integrisana su u terapijske protokole različitih vrsta humanih tumora (Reff i sar., 2002; Morris, 2009). Nova saznanja o funkciji različitih receptora, lokalizovanih na površini plazmaćelijske membrane tumorskih ćelija, kao i njihovoj ulozi u kancerogenezi, povećala su mogućnost izbora novih kandidata za imunoterapiju. Sa druge strane, nova znanja o mehanizmima kojima MoAt aktiviraju odbrambeni sistem domaćina, omogućila su modifikacije strukture MoAt, što je dovelo do poboljšanja njihovog aktivacionog potencijala i povećanja njihovih efektornih funkcija. Osim toga, bolje razumevanje puteva metabolisanja MoAt i njihove lokalizacije u odnosu na tumorsko tkivo, omogućilo je proizvodnju MoAt sa poboljšanim profilima biodistribucije (Reff i sar., 2002).

Tri glavne klase terapeutskih MoAt su se pokazale korisnim u lečenju bolesnika kroz ispitivanja u kliničkim studijama: (1) nekonjugovana MoAt koja direktno indukuju signale koji suprimiraju rast ćelija i/ili indukuju apoptozu ili

indirektno aktiviraju odbrambene mehanizme domaćina koji posreduju anti-tumorsku aktivnost, (2) konjugati MoAt i citotoksičnih agenasa, u kojima MoAt služi kao nosač citotoksičnog agensa koga isporučuje ciljano do tumora, smanjujući tako sistemsku toksičnost, i (3) radioaktivna imunoterapija gde MoAt isporučuje odgovarajuću dozu zračenja do tumora (Reff i sar., 2002).

Savremena terapijska MoAt se proizvode tehnikama genetičkog inženjeringa, što je omogućilo uvođenje specifičnih modifikacija MoAt koje dovode do smanjenja njihove imunogeničnosti i povećanja afiniteta za ciljane molekule. Osim terapijskih monospecifičnih MoAt koja su najčešće u upotrebi, danas su u primeni i bispecifična MoAt čiji je cilj da se što više citotoksičnih T-ćelija aktivira i dovede u blizinu ciljanog tumora (Reff i sar., 2002). Savremena imunoterapija AML se bazira na upotrebi nekoliko različitih MoAt (Tabela 3.) (Morris, 2009; Döhner i sar., 2015).

Standardne terapijske opcije su posebno ograničene na bolesnike sa AML starije životne dobi (≥ 60 god.), gde je uvođenje anti-CD33 usmerene terapije pružilo novu nadu u lečenju ove grupe bolesnika (Reff i sar., 2002; Morris, 2009, Döhner i sar., 2015). Razvoj novih MoAt specifičnih za hLDM eksprimiranih na LMĆ i progenitorima AML (anti-CD123 i anti-CD44), čija su ispitivanja u ranoj fazi, ima za cilj eliminaciju populacije ćelija koja je odgovorna za nastanak i propagaciju AML (Morris, 2009; Döhner i sar., 2015).

Tabela 3. Monoklonska At u tretmanu AML (Adaptirano prema: Morris, 2009)

MoAt	Ciljni hLDM	Izotip-konjugat	Klinički status
Gemtuzumab ozogamicin (Myelotarg™)	CD33 , Adhezija	Humanizovano IgG4-g1-kalihemicin imunotoksin	FDA dozvolila upotrebu /AML
Lintuzumab (HuM195, SGN-33)	CD33 , Adhezija	Humanizovano IgG1	Faza III /AML
Anti-CD44 (A3D8)	CD44 , Adhezija	Mišje IgG1	Preklinička ispitivanja /AML
Anti-CD45 (BC8, YTH 24.5,	CD45 , Leukocitna protein tirozin	Radioobeleženo ¹³¹ I mišji IgG1; ^{99m} Tc	Faza I-II /AML, alogena

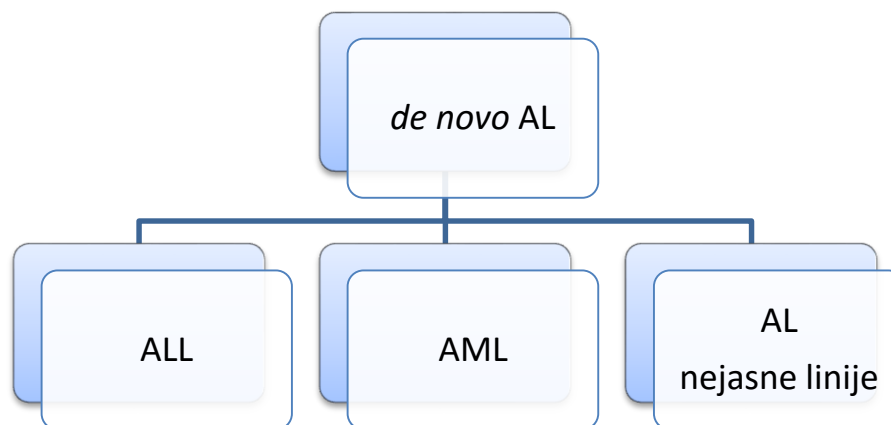
YAMEL568)	fosfataza	mišji IgG2b; ¹¹¹ In pacovski IgG2a- imidžing / biodistribucija	transplantacija matičnih ćelija hematopoeze, imidžing
Anti-CD66 (BW250/183)	CD66 , CEA familija granulocitnih molekula	Radioobeležen ¹⁸⁸ Re ⁹⁰ Y, mišji IgG1	Faza I–II / AML, alogeni transplantacija matičnih ćelija hematopoeze
Anti-CD123 (26292(Fv)-PE38- KDEL)	CD123 , IL-3Ra	Mišje anti-CD123-Fv- Pseudomonas eksotoksin A imunotoksin	Preklinička ispitivanja /AML

Skraćenice: CEA, karcinoembrionalni antigen; FDA, engl. Food and Drug Administration; I, jodine; IL-3Ra, interleukin-3 receptor- α ; In, indijum; Re, renijum; Tc, tehnicijum; Y, Itrium.

7. Dijagnostika i klasifikacija AML

Savremena dijagnostika i klasifikacija AML zasnivaju se na preporukama SZO (Vardiman i sar, 2008). Naime, važan preduslov za pravilno i uspešno lečenje AML predstavlja postavljanje precizne dg (Shema 11.). Važno je takođe utvrditi i da li se radi o primarnoj AML (*de novo* AML) ili o sekundarnoj AML (t-AML), nastaloj posle lečenja prethodnog maligniteta primenom zračne i/ili visokodozne hemioterapije ili na terenu prethodnog MDS ili MPN (Vardiman i sar., 2008).

AML se standardno dijagnostikuje prema morfološko-citohemijskim kriterijumima, ukoliko je u ks/pk ispitanika prisutno $\geq 20\%$ mijeloblasta/monoblasta/megakarioblasta ili njihovih ekvivalenata (promijelociti/promonociti) (Vardiman i sar, 2008; Lee i sar., 2008). Izuzetak u ovom slučaju su AML sa rekurentnim genetičkim poremećajima (Tabela 4.), kada se dijagnoza može postaviti i u slučaju kada je populacija blasta $< 20\%$.



Shema 11. Diferencijalna dg AML u odnosu na ostale tipove AL

Mada je u većini slučajeva, na osnovu citomorfoloških kriterijuma i specifičnih citohemijskih bojenja, posebno bojenja na peroksidazu (POX), moguće dijagnostikovati AML i svrstati je u jedan od morfoloških FAB (Francusko-Američko-Britanska grupa, FAB) suptipova (M0/M1/M2/M3/M4/M5/M6/M7) (Bennett i sar., 1985), precizna klasifikacija i subklasifikacija na specifične kliničko-biološke entitete danas zahteva primenu imunofenotipske, citogenetske i molekularno-genetske analize leukemijskih ćelija na dg bolesti (Vardiman i sar., 2008).

Primena IMPC na dg bolesti, predstavlja obaveznu komponentu dijagnostičkog ispitivanja AML (Vardiman i sar., 2008). IMPC je moguće primeniti na uzorcima ks ili pk svih bolesnika, osim retkih izuzetaka koje karakteriše izrazita mijelofibroza ks, kada se u cilju imunofenotipizacije primenjuje patohistološka analiza biopsata ks, primenom imunohistohemijskog metoda (Swerdlow i sar., 2008; Dunphy, 2004). IMPC omogućava preciznu i pouzdanu identifikaciju hematopoezne loze iz koje leukemijske ćelije potiču, kao i utvrđivanje stepena diferentovanosti populacije leukemijskih ćelija, na osnovu čega se vrši imunološka klasifikacija AML (Tabela 2.) (Béné i sar., 2011). IMPC je posebno važna u diferencijaciji AML u odnosu na akutne limfoblastne leukemije (ALL) i akutne leukemije mešovutih linija (ALML) (Döhner i sar., 2010; Béné i sar., 2011) (Shema 11.). Primena IMPC je takođe bitna za diferencijalnu

dg retkih suptipova neklasifikovane AML (*engl.* AML nototherwise specified, AML, NOS) (AML sa minimalnom diferencijacijom, Akutna megakarioblastna leukemija, Akutna bazofilna leukemija) i neoplazme plazmacitoidnih dendritskih ćelija (Lichtman i Segel, 2005; Arber i sar, 2008c). Značaj IMPC u dijagnostici AML se ogleda i u detekciji aberantna ekspresiju jednog ili više molekula limfoidne loze, čije je prisustvo na leukemijskim ćelijama povezano sa pojedinim entitetima AML sa rekurentnim genetičkim poremećajima (Tabela 4.) (Arber i sar., 2008a; Paietta, 2010). Konvencionalna citogenetska analiza je obavezna komponenta dijagnostičkog ispitivanja bolesnika sa sumnjom na AML. Hromozomske aberacije su detektovane u ~55% odraslih bolesnika sa AML (Mrózek i sar., 2004; Vardiman i sar., 2008). Sedam rekurentnih balansiranih translokacija i inverzija, i njihovih varijanti su detektovane u okviru kategorije AML sa rekurentnim genetičkim poremećajima (Tabela 4.). Osim toga, više citogenetičkih aberacija je krucijalno za postavljanje dg AML sa znacima mijelodisplazije, i to nezavisno od prisustva ili odsustva morfoloških znakova mijelodisplazije (Arber i sar., 2008b).

Primena metoda molekularne genetike, baziranih na reakciji lančanog umnožavanja DNK (*engl.* Polimerase chain reaction, PCR) i RT-PCR (*engl.* reverse transcriptase-PCR), važna je na dg AML zbog visoke senzitivnosti u detekciji rekurentnih genskih fuzija (*PML-RARA*, *RUNX1-RUNX1T1*, *CBFB-MYH11*, *MLLT3-MLL*, *CEK-NUP214*), i to posebno kada nema validne citogenetske analize ili je dobijen nalaz normalnog kariotipa (Mrózek i sar., 2001; Vardiman i sar., 2008). Osim toga, primenom ove metodologije je moguće detektovati prisustvo somatskih mutacija u velikom broju gena na dg AML, uključujući gene: *NPM1*, *CEBPA*, i *FLT3*. (Vardiman i sar., 2008). Preporuka SZO je da se prisustvo mutacija u pomenutim genima ispituje kod svih AML sa normalnim kariotipom (AML-NK), mada se sve pomenute mutacije mogu javiti i u drugim entitetima AML kod kojih je detektovan aberantan kariotip (Arber i sar., 2008a).

Sve prethodno navedene biološke karakteristike leukemijskih ćelija AML zajedno sa kliničko-hematološkim karakteristikama bolesnika, integrisane su u

važeci sistem za klasifikaciju AML, koji je definisala SZO (Vardiman i sar., 2008) (Tabela 4.).

Tabela 4. Osnovni tipovi AML prema SZO klasifikaciji (Vardiman i sar., 2008)

1) AML sa rekurentnim genetičkim poremećajima (AML-RGP)
2) AML sa znacima mijelodisplazije (AML-MDS)
3) AML nastale posle prethodnog lečenja (t-AML)
4) AML, neklasifikovane (AML-NOS)
5) Mijeloidni sarkom
6) Mijeloidne proliferacije povezane sa Down-ovim sindromom
7) Neoplazma blastnih plazmacitoidnih dendritskih ćelija

Tabela 5. AML sa rekurentnim genetičkim poremećajima (Adaptirano prema: Arber i sar., 2008a)

AML-RGP (učestalost entiteta / morfološki FAB korelat)
<u>AML sa t(8;21)(q22;q22); RUNX1-RUNX1T1</u> (5% AML / M2, često sa ↑Eo prekursorima) Poreklo: Mijeloidna matična ćelija sa predominantno granulocitnim potencijalom Imunofenotip: CD34 ⁺ HLA-DR ⁺ CD13 ⁺ CD33 ⁺ CD15 ^{P+} mijeloblasti sa znacima granulocitne diferencijacije i maturacije; često CD19 ⁺ cCD79a ⁺ PAX5 ⁺ ; deo bolesnika CD56 ⁺
<u>AML sa inv(16)(p13.1;q22) ili t(16;16)(p13.1;q22); CBFβ-MYH11</u> (5-8% AML/ M4Eo, M2, M5) Poreklo: Hematopoezna matična ćelija sa granulocitnim i monocitnim diferencijacionim potencijalom Imunofenotip: CD34 ⁺ CD117 ⁺ CD13 ⁺ CD33 ⁺ mijelomonoblasti sa populacijama zrelijih ćelija Gran. (CD15 ⁺ CD65 ⁺) i mono. (cLizozim ⁺ CD11b ⁺ CD11c ⁺ CD4 ⁺ CD64 ⁺ CD14 ^{P+}) loze; deo bolesnika CD2 ⁺
<u>Akutna promijelocitna leukemija sa t(15;17)(q22;q12); PML-RARA</u> (5-8% AML / M3, M3v) Poreklo: Mijeloidna matična ćelija sa granulocitnim potencijalom Imunofenotip - hipergarnularna: CD34 ⁺ HLA-DR ⁺ CD11b ⁺ CD11a ⁺ CD33 ⁺ CD117 ⁺ CD15 ^{P+} promijelociti Imunofenotip - mikrogranularna: CD34 ^{P+} HLA-DR ^{P+} CD11b ⁺ CD11a ⁺ CD33 ⁺ CD117 ⁺ CD15 ^{P+} promijelociti; često CD2 ⁺ ; deo bolesnika CD56 ⁺ (~20%) nezavisno od varijante

AML sa t(9;11)(p22;q23); MLLT3-MLL (2% AML / M4, M5)**Poreklo:** Hematopoezna matična ćelija sa multilinijskim potencijalom**Imunofenotip:** CD34^{p+}CD117^{p+}CD33⁺CD4⁺CD64⁺CD36^cLizozim⁺CD11b⁺CD11c⁺NG2⁺
mijelomonoblasti; deo bolesnika CD56⁺**AML sa t(6;9)(p23;q34); DEK-NUP214 (0.7-1.8% AML / M2, M4; često sa ↑ Bazo frakcija)****Poreklo:** Hematopoezna matična ćelija sa multilinijskim potencijalom**Imunofenotip:** CD34⁺CD117⁺CD38⁺HLA-DR⁺CD13⁺CD33⁺CD15⁺CD64^{p+} mijeloblasti**AML sa inv(3)(q21;q26.2) ili t(3;3)(q21;q26.2);RPN1-EVI1 (1-2% AML / morfološki MDS znaci)****Poreklo:** Hematopoezna matična ćelija sa multilinijskim potencijalom HLA-DR⁺CD38⁺CD13⁺CD33⁺CD41⁺**Imunofenotip:** CD34⁺CD61^{p+} mijeloblasti/megakariobl.; često CD7⁺**AML (megakarioblastna) sa t(1;22)(p13;q13); RBM15-MKL1 (<1% AML, dečki uzrast / M7)****Poreklo:** Mijeloidna matična ćelija sa predominantno megakariocitnom diferencijacijom**Imunofenotip:** CD34⁺CD13⁺CD33⁺CD36⁺CD41⁺CD61⁺CD42b^{p+}CD45⁺HLA-DR⁻MPO⁻ megakarioblasti

U hijerarhiji SZO klasifikacije AML, primat imaju rekurentni genetski poremećaji (Tabela 5.), čije prisustvo bez obzira na imunofenotipske i morfološke karakteristike, svrstava AML u jedan od sedam suptipova - AML sa rekurentnim genetičkim poremećajima (AML-RGP) (Arber i sar., 2008a).

Sledeći u hijerarhiji su genetski poremećaji koji se tipično javljaju u sklopu MDS, u grupi *de novo* AML ili AML nastalih transformacijom MDS, čije prisustvo definiše tip AML sa znacima mijelodisplazije (AML-MDS) (Arber i sar., 2008b) (Tabela 6).

Tabela 6. AML sa znacima mijelodisplazije (Prema: Arber i sar., 2008b)

AML-MDS (učestalost suptipa / morfološki FAB korelat)
<p>AML sa znacima mijelodisplazije (24-35% AML / multilinijska displazija)</p> <p>Genetika: hromozomske aberacije tipične za MDS (najčešće -7/del(7q), -5/del(5q), kompl kariotip</p> <p>Poreklo: Hematopoezna matična ćelija</p> <p>Imunofenotip: CD34⁺CD38^{-/+}HLA-DR^{-/+}CD13⁺CD33⁺ mijeloblasti; često CD7⁺, CD56⁺: Granulocitni prekursori, posebno neutrofili, često hipogranulirani i sa maturacionu asinhroniju u ekspresiji HLM</p>

AML koja nije klasifikovana u prethodne dve kategorije, a karakteriše je prisustvo genskih mutacija u *NPM1* ili *CEBPA* genu, klasifikuju se u okviru jednog od dva privremena SZO entiteta - AML sa genskim mutacijama (Arber i sar., 2008a) (Tabela 7.).

Tabela 7. AML sa genskim mutacijama (Prema: Arber i sar., 2008a)

Naziv suptipa AML (učestalost entiteta / morfološki FAB korelat)
Privremen entitet: <u>AML sa mutiranim <i>NPM1</i> genom</u> (27-35% AML, 45-64% AML-NK / M4, M5) Poreklo: Hematopoezna matična ćelija Imunofenotip: CD34 ⁺ CD13 ⁺ CD33 ⁺ CD11b ⁺ cCD68 ⁺ CD14 ^{P+} cNPM1 ⁺ mijelomonoblasti
Privremen entitet: <u>AML sa mutiranim <i>CEBPA</i> genom</u> (6-15% AML, 15-18% AML-NK / M2, M1) Poreklo: Hematopoezna matična ćelija Imunofenotip: CD34 ⁺ HLA-DR ⁺ CD13 ⁺ CD33 ⁺ CD11b ⁺ CD65 ⁺ CD15 ⁺ mijelomonoblasti; često CD7 ⁺

U suptipu AML sa mutiranim *NPM1* genom, mutacije obično pogađaju egzon 12, mada ređe i egzone 9 ili 11 ovoga gena, lociranog na hromozomu 5q35 (Falini i sar., 2005). Učestalost *NPM1* mutacija u adultnoj AML je oko 30%, dok u grupi AML sa normalnim kariotipom (AML-NK) učestalost iznosi i do 50%. Mutacije *NPM1* su tipično heterozigotne, a do danas je otkriveno oko 40 različitih varijanti. Među njima je najučestalija Tip A (TCTG tetranukleotid duplikacija na poziciji 964 do 959), koja se javlja kod 70-80% adultnih AML sa mutiranim *NPM1* genom. Nezavisno od tipa mutacije, one sve dovode do promene u strukturi C-terminusa NPM (zamena triptofana na poziciji 288 i 290, i kreiranje signala za nuklearni eksport), što dovodi do aberantne lokalizacije NPM u citoplazmi leukemijskih ćelija (Falini i sar., 2007).

CEBPA gen je lociran na hromozomu 19q13.1 i kodira transkripcioni faktor uključen u kontrolu proliferacije i diferencijacije mijeloidnih progenitora (Leroy i sar., 2005). Mutacije *CEBPA* gena su obično bialelske i dešavaju se na različitim pozicijama duž cele genske sekvence, pri čemu su najčešća dva tipa, "out-of-frame" insercije i delecije N-terminalnog regiona i "in-frame" insercije i delecije C-terminalnog regiona gena (Leroy i sar., 2005; Lin i sar., 2005).

Osim pomenutih gena, ispitivanje mutacija *FLT3* (*engl. fms-like tyrosine kinase 3*) gena se takođe preporučuje, posebno u grupi AML-NK, mada za sada nije definisan specifičan AML entitet povezan sa mutacijom *FLT3* gena (Arber i sar., 2008a). Mutacije u genu za *FLT3* su prisutne kod 25-45% adultnih AML. Postoje dva osnovna tipa *FLT3* mutacija – *FLT3-ITD* (*engl. FLT3 – internal tandem duplications*) i *FLT3-TKD* (*engl. FLT3 - tyrosine kinase domen*) mutacije koje pogađaju kodone 835 ili 836 drugog tirozin kinaznog domena. *FLT3-ITD* mutacije su učestalije (25% AML) u odnosu na *FLT3-TKD* mutacije (5-10% AML) (Mead i sar., 2007; Čolović i sar., 2007). *FLT3* gen je lociran na hromozomu 13q12 i kodira receptor za tirozin kinazu, koji je uključen u diferencijaciju i proliferaciju HMC. Ovaj receptor je eksprimiran i konstitutivno aktiviran na progenitorima i blastima većine AML. *FLT3-ITD* mutacije nose lošu prognozu u entitetima AML u kojima se javljaju, posebno u odnosu na ishod bolesti, dok značaj *FLT3-TDK* mutacija u prognoznom smislu još nije utvrđen (Döhner i sar., 2010).

AML koje ne ispunjavaju prethodno pomenute kriterijume, klasifikuju se u tip AML, neklasifikovane (*engl. AML not otherwise specified, AML-NOS*) (Tabela 8.), i to primarno na osnovu morfoloških kriterijuma i imunofenotipskih karakteristika leukemijskih ćelija (mijeloidna loza iz koje potiču i stepen diferentovanosti leukemijske populacije) (Arber i sar., 2008c).

Tabela 8. SZO sistem za klasifikaciju AML-NOS (Prema: Arber i sar., 2008c)

Naziv suptipa AML (učestalost entiteta / morfološki FAB korelat)
<p><u>AML sa minimalnom diferencijacijom (<5% AML / M0)</u></p> <p>Imunofenotip: CD34⁺CD38⁺HLA-DR⁺CD117⁺CD13⁺CD33⁺/-cMPOp⁺CD11b⁻CD15⁻CD64⁻CD14⁻ mijeloblasti; česta ekspresija CD7 (~40%)</p>
<p><u>AML bez sazrevanja (5-10% AML / M1, ≥90% blasta)</u></p> <p>Imunofenotip: CD34⁺HLA-DR⁺CD117⁺CD13⁺CD33⁺CD11b^{-/+}CD15⁻CD64⁻CD14⁻ mijeloblasti; deo bolesnika CD7⁺ (~30%), CD2⁺/CD4⁺/CD19⁺/CD56⁺ (pojedinačna ekspresija ~10-20%)</p>
<p><u>AML sa sazrevanjem</u></p> <p>(10% AML / M2, ≥10% granulocitnih prekursora, <20% ćelija monocitne loze)</p> <p>Imunofenotip: CD34⁺HLA-DR⁺CD117⁺CD13⁺CD33⁺CD11b⁺CD15⁺CD65⁺ mijeloblasti; deo bolesnika CD7⁺ (20-30%), a ređe CD56⁺/CD2⁺/CD19⁺/CD4⁺ (pojedinačna ekspresija ~10%)</p>

<p><u>Akutna mijelomonocitna leukemija</u> (5-10% AML / M4, ≥20% ćelija granulocitne loze i ≥20% ćelija monocitne loze) Imunofenotip: CD34^{P+}CD117^{P+}HLA-DR⁺CD13⁺CD33⁺CD15⁺CD65⁺CD11b⁺CD11c^{P+}CD4⁺CD64^{P+}CD14^{P+}cLizozim^{P+}cCD68⁺; česta ekspresija CD7 (~30%)</p>
<p><u>Akutna monoblastna/monocitna leukemija</u> (<5% AML/ M5, ≥ 80% leukemijskih ćelija monocitne loze) Imunofenotip: CD13⁺CD33⁺CD15⁺CD64⁺CD4⁺CD36⁺cLizozim⁺CD14^{P+}CD163^{P+}monoblasti/promonociti/monociti; česta ekspresija CD7 i/ili CD56 (~25-40%)</p>
<p><u>Akutna eritroidna leukemija / (M6)</u> Eritro/mijeloidna leukemija (<5% AML) – eritroblasti (≥50% ΣNĆ) i mijeloblasti (≥20% NĆ) Čista eritroidna leukemija (<1% AML) – eritroblasti (≥80% ΣNĆ) Imunofenotip eritroblasta: CD34⁻HLA-DR⁻CD117⁺CD71⁺CD36⁺CD235a^{+/-}</p>
<p><u>Akutna megakarioblastna leukemija (<5% AML)</u> megakarioblasti (≥50% pop) i mijeloblasti (≥20%) Imunofenotip megakarioblasta: CD34⁻CD45⁻HLA-DR⁻CD13⁺CD33⁺CD36⁺CD41a⁺CD61⁺CD42b^{+/-}</p>
<p><u>Akutna bazofilna leukemija (<1% AML)</u> Imunofenotip: CD34^{+/-}HLA-DR⁺CD117^{+/-}CD123⁺CD22^{+/-}CD13⁺CD33⁺CD11b⁺CD9⁺CD203c⁺</p>
<p><u>Akutna panmijeloza sa mijelofibrozom (<1% AML)</u> Imunofenotip blasta: CD34⁺CD117⁺CD13⁺CD33⁺ mijeloblasti; prisutna multilinijska proliferacija</p>

Pretpostavka je da svi suptipovi AML-NOS nastaju malignom transformacijom HMĆ. Klinički značaj nekih od suptipova AML, NOS nije potvrđen, pa ovaj tip AML najverovatnije očekuje reklasifikacija na osnovu rezultata budućih molekularno-genetičkih studija AML.

Pojedini bolesnici na dg mogu imati samo ekstramedularnu lokalizaciju bolesti, u vidu tumorske mase koja se najčešće sastoji od mijeloidnih blasta sa ili bez sazrevanja, i klasifikuju se u poseban tip AML – Mijeloidni sarkom (Vardiman i sar, 2008). Još jedan poseban i veoma redak tip AML je neoplazma blastnih plazmacitoidnih dendritskih ćelija, koja nastaje malignom transformacijom prekursora ovih ćelija, i često je karakteriše lokalizacija u koži (Vardiman i sar, 2008).

7.1. Prognostički parametri i lečenje AML

Prognostički parametri se dele na dve osnovne grupe. Prvu grupu čine parametri povezani sa karakteristikama samog bolesnika na dg bolesti (starost, opšte funkcionalno stanje, prisustvo komorbiditeta). Druga grupa parametara povezana je sa specifičnim karakteristikama klona AML (broj leukocita, prethodni MDS, citogenetičke i molekularno-genetičke karakteristike, prisustvo MRB) (Döhner i sar., 2010). Karakteristike bolesnika na dg su povezane sa predikcijom mortaliteta tokom lečenja i posebno dobijaju na značaju sa povećanjem starosti bolesnika. Sistem za skoriranje komorbiditeta na dg bolesti, bazira se na primeni indeksa komorbiditeta HCTCI (*engl. hematopoietic cell transplantation comorbidity index*) koji se primenjuje za skoriranje bolesnika, kandidata kako za alogenu TMČH, tako i za intenzivnu hemioterapiju (Sorrer i sar., 2005). Sa druge strane, karakteristike klona AML su povezane sa predikcijom rezistencije na konvencionalnu hemioterapiju. Pritom, kariotip leukemijskih ćelija udružen sa molekularno-genetskim karakteristikama je najsnažniji prognozni parametar odgovora na indukcionu terapiju i preživljavanje (Tabela 9.) (Döhner i sar., 2010; Döhner i sar., 2015).

Na dijagnozi bolesti, ~55% bolesnika sa AML je starije od 65 godina, pri čemu između 50% i 80% prethodno nelečenih bolesnika postiže KR primenom standardnih hemoterapeutskih protokola (Döhner i sar., 2010; Estey, 2012). Među bolesnicima koji su postigli KR, petogodišnje preživljavanje ima ~40% bolesnika, pri čemu je ishod značajno lošiji kod starijih bolesnika. Terapeutske opcije su posebno ograničene kod bolesnika sa relapsom AML koji su stariji od 60 godina, zbog manje učestalosti KR, povećane toksičnosti lečenja i čestih komorbiditeta (Döhner i sar., 2010; Estey, 2012). Primena protokola za lečenje odraslih bolesnika sa AML zasniva se na starosti bolesnika i grupi rizika u koju je bolesnik svrstan pre započinjanja lečenja (Döhner i sar, 2010; Estey, 2012).

Tabela 9. Grupe rizika bolesnika sa AML prema citogenetskim i molekularno-genetskim nalazima na dg bolesti (Döhner i sar., 2010; Döhner i sar., 2015)

Grupa rizika AML	Specifične genetske i molekularno-genetske karakteristike
Povoljna	t(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i> inv(16)(p13.1q22) ili t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i> mutiran <i>NPM1</i> bez FLT3-ITD (normalan kariotip) bialelno mutiran <i>CEBPA</i> (normalan kariotip)
Srednje povoljna-I	Mutiran <i>NPM1</i> i FLT3-ITD (normalan kariotip) "wild type" <i>NPM1</i> i FLT3-ITD (normalan kariotip) "wild type" bez FLT3-ITD (normalan kariotip)
Srednje povoljna-II	t(9;11)(q22;q23); <i>MLL3-KMT2A</i> citogenetske aberacije koje nisu klasifikovane kao povoljne ili nepovoljne
Nepovoljna	Inv(3)(q21q26.2) ili t(3;3)(q21;q26.2); <i>GATA2-MECOM (EVI1)</i> t(6;9)(p23;q34); <i>DEK-NUP214</i> t(v;11)(v;q23) <i>KMT2A</i> rearanžiran -5 ili del(5q); -7; abnl(17p); kompleksan kariotip

Prognoza adultne AML, u svetlu primene standardnih protokola lečenja, je nepovoljna, ali je ipak različita u različitim entitetima AML i različitim grupama rizika (Döhner i sar, 2010; Estey, 2012). Zlatni standard u lečenju odraslih mlađih bolesnika sa AML (<60 god) je indukcioni protokol "3+7", koji predstavlja kombinaciju dva citostatika (daunorubicin 45-60 mg/m² tokom tri dana i AraC 100-200 mg/m² kontinuirane infuzije tokom 7 dana). U slučaju velikih multicentričnih studija odraslih bolesnika sa AML, učestalost KR kreće se u opsegu od 60%-80%, a dugotrajno preživljavanje bez znakova bolesti (*engl.* long term leukemia free survival, LFS) je približno 35% (Döhner i sar, 2010). Savremeni indukciono protokoli za lečenje bolesnika sa akutnom promijelocitnom leukemijom (APL), kao što su PETHEMA protokoli, baziraju se na kombinaciji diferencijacionog agensa retinoične kiseline (*engl.* all trans retinoic acid, ATRA) i citostatika idarubicina (Sanz i sar., 2009). Mlađi bolesnici sa AML koji su srednjeg ili visokog rizika, selekcionišu se posle primene indukciono i postremisione terapije, za dalje lečenje alo-TMČH (Döhner i sar, 2010; Estey, 2012).

II CILJEVI RADA

Osnovna pretpostavka u ovom istraživanju je da imunofenotipska karakterizacija leukemijskih ćelija AML odraslih, primenom MPC, može da pruži specifične informacije o biologiji leukemijskih ćelija AML. Ove informacije mogu imati uticaj na preciznu dijagnozu i klasifikaciju, prognozu, kao i procenu odgovora na primenjenu terapiju detekcijom i kvantifikacijom rezidualne leukemijske populacije ćelija. U tom smislu su postavljeni i realizovani sledeći ciljevi istraživanja:

1. Utvrđivanje imunofenotipskog profila leukemijskih ćelija bolesnika sa AML na dg bolesti putem:
 - a) ispitivanja učestalosti i obrazaca ekspresije širokog panela hLDM,
 - b) utvrđivanja tipova i učestalosti aberacija u ekspresiji hLDM na leukemijskim blastima i zrelijim leukemijskim prekursorima,
 - c) utvrđivanja stepena heterogenosti leukemijske populacije AML definisane na osnovu imunofenotipskih karakteristika
2. Imunološka klasifikacija bolesnika sa AML na osnovu utvrđenog imunofenotipskog profila leukemijskih ćelija na dg bolesti, i korelacija imunofenotipske klasifikacije sa citomorfološkom klasifikacijom i SZO klasifikacijom,
3. Utvrđivanje imunofenotipskih profila različitih entiteta AML definisanih prema SZO klasifikaciji, i međusobna korelacija njihovih imunofenotipskih profila u cilju otkrivanja specifičnih imunofenotipskih karakteristika pojedinačnih entiteta,
4. Standardizacija metodologije IPCM za detekciju i kvantifikaciju rezidualne populacije leukemijskih ćelija tokom lečenja bolesnika sa AML, bazirane na prisusutvu populacija ćelija sa IFSL,
5. Određivanje značaja ekspresije pojedinačnih i/ili grupa hLDM za predikciju odgovora na indukcionu terapiju i ukupno preživljavanje bolesnika sa AML.

III MATERIJAL I METODE

Sva ispitivanja bolesnika u okviru doktorske disertacije je odobrio Etički komitet Kliničkog centra Srbije. Sa druge strane, Etički komitet Instituta za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije "Dr Vukan Čupić", odobrio je uzimanje i obradu uzoraka zdravih kontrolnih ispitanika. Ispitivanja su sprovedena u skladu sa preporukama Helsinške konvencije (World Medical Association Declaration of Helsinki, 1996). Svi bolesnici i kontrolni ispitanici su bili upoznati sa planiranim dijagnostičkim procedurama pre uzimanja uzoraka ks i/ili pk i dali su informisani pristanak za njihovo sprovođenje.

1. Izbor bolesnika

Ispitivanje je sprovedeno na uzorku od 320 novootkrivenih bolesnika sa *de novo* AML, koji su dijagnostikovani i lečeni na Klinici za hematologiju Kliničkog centra Srbije u Beogradu, u periodu od jula 2009. do decembra 2015. godine.

Retrospektivno ispitivanje, u cilju utvrđivanja značaja imunofenotipske karakterizacije ćelija AML za dg i prognozu bolesti, sprovedeno je na neselecionisanom uzorku od 294 bolesnika sa dg *de novo* AML, u periodu od jula 2009. do septembra 2013. godine. Prospektivno ispitivanje, u cilju utvrđivanja značaja imunofenotipske karakterizacije ćelija AML za praćenje prisustva rezidualne populacije leukemijskih ćelija tokom lečenja bolesnika hemioterapijom, sprovedeno je na selecionisanom uzorku od 26 bolesnika sa dg *de novo* AML, u periodu od marta 2014. do decembra 2015. godine.

Bolesnici su pripadali starosnoj grupi odraslih (≥ 18 god.), i u trenutku postavljanja dg AML, nisu imali predistoriju nekog drugog maligniteta (hematološkog ili nehematološkog), niti su bili na terapiji koja bi mogla uticati na rezultate ispitivanja.

Svi bolesnici su prošli standardni dijagnostički postupak koji je obuhvatao: citomorfološku analizu, imunofenotipizaciju metodom protočne citofluorimetrije i citogenetsku analizu. Bolesnici sa AML-NK su obrađeni molekularno-genetskim metodama za detekciju mutacija u *NPM1*, *FLT3* i *CEBPA* genima (Döhner i sar. 2010). Konačna dg AML je postavljana na osnovu preporuka SZO (Swerdlow i sar. 2008). Bolesnici su na osnovu citogenetičkih i molekularno-genetičkih karakteristika leukemijskih ćelija na dg svrstavani u ELN (*engl.* European LeukemiaNet) genetske grupe rizika: povoljna, srednje povoljna I, srednje povoljna II i nepovoljna grupa (Döhner i sar., 2010; Döhner i sar., 2015).

Na dg bolesti, za svakog bolesnika su iz osnovne medicinske dokumentacije prikupljani demografski (pol, starost), klinički (organomegalija, limfadenopatija), hematološki (leukociti, trombociti, hemoglobin, leukocitna formula, mijelogram, citohemijska reakcija za POX) i biohemijski (LDH) podaci, kao i podaci o lečenju i preživljavanju, koji su korišćeni u ispitivanju. Broj leukocita (Le) je definisani u odnosu na fiziološki opseg vrednosti kao: snižen ($<3,6 \times 10^9/l$), normalan ($3,6-10 \times 10^9/l$) i povišen ($>10 \times 10^9/l$). Definisane su i visoke vrednosti Le ($\geq 30 \times 10^9/l$), kao i hiperleukocitoza ($\geq 100 \times 10^9/l$). Broj trombocita (Tr) je definisan u odnosu na fiziološki opseg vrednosti kao: snižen ($<150 \times 10^9/l$) i normalan ($150-450 \times 10^9/l$). Nivo hemoglobina (Hb) je definisan u odnosu na fiziološke vrednosti kao: snižen ($<120 \text{ g/l}$) i normalan ($120-180 \text{ g/dl}$). Nivo LDH u serumu je definisan u odnosu na fiziološke vrednosti kao: normalan ($\leq 480 \text{ U/l}$) i povišen ($>480 \text{ U/l}$).

Nakon postavljanja dg AML, bolesnici su lečeni primenom hemioterapije prema standardnim protokolima koji se primenjuju na Klinici za hematologiju Kliničkog centra Srbije (Prilog 2.) (Estey, 2012; Döhner i sar., 2010; Sanz i sar., 2009). Bolesnici koji su umrli na dg bolesti pre započinjanja terapije, kao i bolesnici koji su započeli indukcionu terapiju, ali su umrli pre termina procene odgovora na terapiju, u daljem razmatranju su uključeni u grupu pod nazivom - rana smrt (RS). Status bolesti posle primene hemioterapije je procenjivan analizom kliničkih i hematoloških parametara i citomorfološkom analizom

uzoraka ks i pk bolesnika, između 21 i 28 dana od početka terapije (Döhner i sar., 2010). Nakon primene indukcione terapije vršena je procena statusa bolesti (Cheson i sar., 2003). Odgovor na indukcionu terapiju je definisan kao: KR – potpun nestanak kliničkih i hematoloških znakova bolesti u trajanju od najmanje četiri nedelje, parcijalna remisija (PR) – delimična redukcija kliničkih i hematoloških znakova bolesti, i rezistentna leukemija (RL) – odsustvo odgovora na primenjenu terapiju. Rana smrt je definisana kao smrt bilo koje etiologije, koja je nastupila od trenutku hospitalizacije do završetka indukcionog lečenja. Procena statusa bolesti je vršena i posle primene kura konsolidacione hemioterapije, prema pomenutim kriterijumima. Trajanje KR bolesti (*engl.* disease free survival, DFS) je procenjivano samo za bolesnike koji su postigli KR bolesti. Ukupno preživljavanje (*engl.* overall survival, OS) je procenjivano za sve bolesnike uključene u ispitivanje, i mereno je od dana uključivanja u ispitivanje do dana smrti od bilo kog uzroka. Bolesnici za koje nije bio poznat ishod bolesti na poslednjoj tački praćenja OS u celoj grupi AML, cenzorisani su kao živi na dan poslednjeg pregleda.

2. Kontrolni ispitanici

U kontrolnu grupu zdravih ispitanika je selekcionisano 13 odraslih zdravih osoba (starost Me 31 god., 8 m/5 ž), davalaca uzoraka ks i/ili pk za alogenu transplantaciju MČH bolesnika iz Instituta za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije “Dr Vukan Čupić”. Zdravi kontrolni uzorci ks i pk su imunofenotipizirani metodom MPC u cilju definisanja fizioloških vrednosti i granica zastupljenosti različitih populacija hematopoeznih ćelija u ispitivanim uzorcima.

Drugu kontrolnu grupu je činilo 10 odraslih bolesnika (starost Me 58.5 god., 5 m/5 ž) sa dg zrela B-ćelijska neoplazma (zBČN), koji su dijagnostikovani i lečeni na Klinici za hematologiju Kliničkog centra Srbije. U trenutku dg zBČN bolesnici nisu imali znake zahvaćenosti kostne srži malignim ćelijama, a njihovi uzorci kostne srži i periferne krvi su imunofenotipizirani metodom MPC posle

lečenja visokodoznom hemioterapijom u trenutku procene odgovora na istu. Cilj ovog dela ispitivanja bilo je definisanje fizioloških vrednosti i granica zastupljenosti različitih populacija hematopoeznih ćelija u ispitivanim uzorcima ks/pk u periodu regeneracije hematopoeze.

Za sve kontrolne ispitanike su prikupljani demografski (starost, pol) i hematološki (leukociti, trombociti, hemoglobin, leukocitna formula) podaci u trenutku ispitivanja.

3. Metode

3.1. Morfološko-citohemijsko ispitivanje

Prva faza standardne dijagnostičke obrade sprovedena je kod svih bolesnika i uključivala je morfološku i citohemijsku analizu razmaza ks i pk, koji su bili obojeni po metodi MGG (*engl.* May-Grunwald-Giemsa) (Lee i sar., 2008). Analiza mijelograma rađena je na razmazima aspirata ks dobijenih aspiracionom punkcijom grudne kosti ili ilijačnog grebena. Analizirano je 500 ćelija sa jedrom, što je uključivalo - procenu celularnosti uzorka, % blasta, citohemijskih karakteristika blasta prema bojenju za mijeloperoksidazu (POX), zastupljenosti hematopoeznih loza i opis znakova displazije istih (dismegakariopoeza, disgranulopoeza, diseritropoeza). Citomorfološka dg AML je postavljana na osnovu standardnih kriterijuma za morfološko-citohemijsku klasifikaciju FAB kooperativne grupe (Bennett i sar., 1985) i uključivala je prisustvo $\geq 20\%$ mijeloblasta u ispitivanom uzorku ks/pk (Vardiman i sar., 2008). Standardni hematološki parametri pk ispitanika su određivani na automatskom brojaču (Pentra DX Nexus, HORIBA ABX, Francuska). Diferencijalna leukocitna formula je određivana na razmazima pk analizom najmanje 200 nukleiranih ćelija.

3.2. Imunofenotipizacija metodom MPC

Imunofenotipizacija metodom MPC je sprovedena kod svih bolesnika sa dg AML uključenih u ispitivanje (n=320), kao i kod obe grupe kontrolnih ispitanika (n=23).

3.2.1. Monoklonska antitela

Za obeležavanje uzoraka ks/pk su korišćena komercijalna MoAt (mišja anti-humana), specifična za hLDM (Tabela 10.), izabrana prema međunarodnim preporukama (ELN, 2005b; ELN, 2007; van Dongen i sar., 2010; Béné i sar., 2011). Sva MoAt su bila direktno konjugovana molekulima jedne od četiri fluorescentne boje – fluorescein izotiocijanat (FITC), fikoeritrin (PE), peridinhlorofil protein (PerCP), alofikocijanin (APC) i primenjivana su u koncentracijama koje je preporučio proizvođač ili u optimalnim koncentracijama dobijenim nakon titracije u laboratorijskim uslovima. Kao mera nespecifične reakcije između MoAt i ćelija ispitivanog uzorka, korišćene su izotipske kontrole: mIgG1-FITC (klon X40), mIgG1-PE (klon X40) i mIgG1-APC (klon MOPC-21) (BD, SAD).

Tabela 10. Karakteristike MoAt korišćenih u panelima za utvrđivanje imunofenotipskih karakteristika AML (Adaptirano prema: Ortolani, 2011; <http://hcdm.org>)

Antigen	Klon	Izotip	FL boja	Reaktivnost MoAt
*CD1a	HI149	IgG1	FITC	Timociti; Dendritske ćelije
*CD2	RPA-2.10	IgG1	FITC	T- i NK-ćelije
*mCD3	SK7	IgG1	FITC	T-ćelije
*cCD3	UCHT1	IgG1	FITC / APC	T-ćelije
*CD4	SK3	IgG1	APC	T-ćelije; Monocitna loza
*CD5	UCHT2	IgG1	PE	T-ćelije
*CD7	M-T701	IgG1	FITC	T-ćelije; Mijeloidni prog-subpop.
*CD8	SK1	IgG1	PE	T- i NK-ćelije
*CD10	HI10a	IgG1	PE / APC	Mijeloidna loza; B-loza
*CD11a	HI111	IgG1	APC	Pan leukocitni Ag
*CD11b	ICRF44	IgG1	PE	Pan leukocitni Ag
*CD11c	S-HCL-3/ B-ly6	IgG2b / IgG1	PE / APC	Pan leukocitni Ag
*CD13	L138	IgG1	PE	Mijelomonocitna loza
*CD14	MøP9	IgG2b	APC	Monocitna loza
*CD15	MMA	IgM	FITC / PE	Mijelomonocitna loza

*CD16	B73.1	IgG1	PE	T- i NK-ćelije
*CD16	3G8	IgG1	PE	Mijelomonocitna loza
*CD19	HiB19 / SJ25C1	IgG1	PE / APC	B-loza
*CD20	L27	IgG1	FITC / APC	B-loza
*CD22	S-HCL-1	IgG2b	PE	B-loza
*CD24	ML5	IgG2a	FITC / PE	Mijelomonocitna loza; B-ćelije
*CD33	P67.6	IgG1	PE / APC	Mijelomonocitna loza
*CD33	WM53	IgG1	APC	Mijelomonocitna loza
*CD34	8G12	IgG1	PE / APC	Progenitori hematopoeze
*CD35	E11	IgG1	PE	Mijelomonocitna loza
*CD36	CB38	IgM	PE	Monocitna, eritorocitna, Mk loza
*CD38	HIT2	IgG1	FITC	Mijelomonocitna loza; Progenitori hematopoeze
*CD41a	HIP8	IgG1	FITC	Mk loza
*CD42b	HIP1	IgG1	PE	Mk loza
*CD45	2D1	IgG1	PerCP	Pan leukocitni Ag
*CD45RA	HI100	IgG2b	APC	Pan leukocitni Ag
*CD45RO	UCHL-1	IgG2a	APC	Pan leukocitni Ag
*CD56	MY31	IgG1	PE	Subpop. dendritskih ćelija i Mf
*CD56	NCAM16.2	IgG2b	PE	NK- i NKT-ćelije
*CD61	RUU-PL 7F12	IgG1	FITC	Mk loza
*CD62L	DREG-56	IgG1	APC	Mijelomonocitna loza
*CD64	10.1	IgG1	FITC	Mijelomonocitna loza
°CD64	# 276426	IgG1	FITC	Mijelomonocitna loza
*CD66b	G10F5	IgM	FITC	Mijelomonocitna loza
#cCD68	Ki-M7	IgG1	FITC	Mijelomonocitna loza
*CD71	L01.1	IgG2a	FITC	Eritrocitna loza; ćelije u deobi
*cCD79a	HM47	IgG1	PE	B-loza
*CD110	1.6.1	IgG2b	APC	Progenitori hematopoeze; Mk loza
*CD114	LMM741	IgG1	PE	Granulocitna loza
*CD117	104D2	IgG1	PE	Progenitori hematopoeze; mijelomonocitna loza
*CD123	7G3	IgG2a	APC	Progenitori hematopoeze; mijelomonocitna loza
*CD135	4G8	IgG1	PE	Progenitori hematopoeze; PcDĆ
*CD163	GHI/61	IgG1	PE	Monocitna loza
°CD163	# 215927	IgG1	PE	Monocitna loza
*CD235	GAR-2 (HIR-2)	IgG2b	PE	Eritrocitna loza
*HLA-DR	L243	IgG2a	FITC	Linijski nespecifičan
*cMPO	5B8	IgG1	FITC	Mijelomonocitna loza
#cLizozim	LZ-2	IgG1	FITC	Mijelomonocitna loza
#cLaktoferin	4C5	IgG1	PE	Granulocitna loza

Skraćenice: FL, fluorescentan; m–membranski; c-citoplazmatski; FITC, fluorescein izotiocijanat; PE, fikoeritrin; PerCP, peridin-hlorofil-A-protein; PcDĆ, plazmacitoidne dendritske ćelije; APC, alofikocijanin; Mf, magrofagi; Mk, megakariocitna; Proizvođač : *BD Biosciences, SAD; #Invitrogen, SAD; °R&D Systems, SAD

3.2.2. Paneli MoAt za ispitivanje ekspresije hLDM

MoAt su primenjivana na ispitivanim uzorcima ks/pk u vidu četvorokolornih panela koji su osmišljeni kao specifične kombinacije, izabrane da definišu lozu iz koje leukemijske ćelije potiču, stepen njihove diferentovanosti, kao i njihove aberantne karakteristike u ekspresiji hLDM (ELN, 2005b; ELN, 2007; van Dongen i sar., 2012; Béné i sar., 2011).

Bolesnici koji su uključeni u retrospektivno ispitivanje (n=294) su imunofenotipizirani samo na dijagnozi bolesti, primenom dijagnostičkog panela MoAt za AML (Tabela 11.). Tom prilikom su analizirani sveži nativni uzorci ks 280 (95,2%) ili pk 14 (4,8%) bolesnika. Prosečna zapremina uzorka ks je iznosila $2,28 \pm 0,59$ ml (0,5 – 3,5 ml), uz medijanu koncentracije nukleiranih ćelija uzorka od 85×10^6 /ml (2 – 750×10^6 /ml).

Tabela 11. Panel MoAt za imunofenotipizaciju AML na dg bolesti (Béné i sar., 2011; van Dongen i sar., 2012)

FITC	PE	PerCP	APC	Specifičnost kombinacije
MslgG1	MslgG1	CD45	MslgG1	Izotipska kontrola
CD2	CD56	CD45	CD19	Limfociti/ Aberantna ekspresija
CD7	CD13	CD45	CD34	Mijeloblasti/Aberantna ekspresija
HLA-DR	CD117	CD45	CD33	Mijeloblasti
CD38	CD135	CD45	CD123	Matične ćelije/ progenitori
CD64	CD163	CD45	CD14	Monocitna diferencijacija
CD64	CD11b	CD45	CD11c	Monocitna diferencijacija
CD41a	CD36	CD45	CD4	Monocitna/Megakariocitna diferencijacija
CD15	CD22	CD45	CD45RA	Neutrofilna/Bazofilna diferencijacija
CD24	CD114	CD45	CD11a	Monocitna/Neutrofilan diferencijacija
CD66b	CD16	CD45	CD10	Neutrofilna diferencijacija
CD71	CD35	CD45	CD62L	Neutrofilna diferencijacija
CD71	CD235a	CD45	CD110	Eritrocitna/Megakaiocitna loza
cIgG1	cIgG1	CD45	cIgG1	Izotipska kontrola
cMPO	cCD79a	CD45	cCD3	Mijeloidna loza/Limfociti
cCD68	CD11b	CD45	CD45RO	Monocitna/Neutrofilan diferencijacija
cLizozim	cLaktoferin	CD45	/	Monocitna/Neutrofilan diferencijacija

Skraćenice: c - citoplazmatski; MPO - mijeloperoksidaza; FITC, fluorescein izotiocijanat; PE, fikoeritrin; PerCP, peridin-hlorofil-A-protein; APC, alofikocijanin; mslg, mišji Ig

Tabela 12. Panel MoAt za imunofenotipizaciju uzoraka za praćenje MRB (Béné i sar., 2011; van Dongen i sar., 2012)

FITC	PE	PerCP	APC	Specifičnost kombinacije
MslgG1	MslgG1	CD45	MslgG1	Izotipska kontrola
CD3	CD56	CD45	CD19	Limfociti
HLA-DR	CD117	CD45	CD33	Mijeloblasti
CD38	CD34	CD45	CD123	Matične ćelije/ progenitori
CD64	CD163	CD45	CD14	Monocitna diferencijacija
CD66b	CD16	CD45	CD10	Neutrofilna diferencijacija
CD20	CD10	CD45	CD19	Hematogoni
Varijabilan Ag	Varijabilan Ag	CD45	Varijabilan Ag	IFSL 1
Varijabilan Ag	Varijabilan Ag	CD45	Varijabilan Ag	IFSL 2

Skraćenice: IFSL, imunofenotip specifičan za leukemiju; FITC, fluorescein izotiocijanat; PE, fikoeritrin; PerCP, peridin-hlorofil-A-protein; APC, alofikocijanin; mslg, mišji Ig

Tabela 13. Panel MoAt za imunofenotipizaciju kontrolnih uzoraka (Béné i sar., 2011; van Dongen i sar., 2012)

FITC	PE	PerCP	APC	Specifičnost kombinacije
MslgG1	MslgG1	CD45	MslgG1	Izotipska kontrola
CD3	CD56	CD45	CD19	Limfociti
CD7	CD13	CD45	CD34	Mijeloidni progenitori / Aberantna ekspresija
HLA-DR	CD117	CD45	CD33	Mijeloidni progenitori
CD38	CD135	CD45	CD123	Matične ćelije/ progenitori
CD38	CD34	CD45	CD123	Matične ćelije/ progenitori
CD2	CD34	CD45	CD33	Mijeloidni progenitori / Aberantna ekspresija
CD38	CD13	CD45	CD33	Mijeloidni progenitori
CD64	CD163	CD45	CD14	Monocitna diferencijacija
CD64	CD11b	CD45	CD11c	Monocitna diferencijacija
CD41a	CD36	CD45	CD4	Monocitna/Megakariocitna diferencijacija
CD15	CD22	CD45	CD45RA	Neutrofilna/Bazofilna diferencijacija
CD24	CD114	CD45	CD11a	Monocitna/Neutrofilna diferencijacija
CD64+CD24	CD117	CD45	CD34	Mijeloidni progenitori
CD66b	CD16	CD45	CD10	Neutrofilna diferencijacija
CD71	CD35	CD45	CD62L	Neutrofilna diferencijacija
CD71	CD235a	CD45	CD110	Eritrocitna/Megakariocitna loza
CD20	CD10	CD45	CD19	Progenitori B-loze (Hematogoni I/II)
CD24	CD34	CD45	CD19	Progenitori B-loze (Hematogoni I)
cIgG1	cIgG1	CD45	cIgG1	Izotipska kontrola
cMPO	cCD79a	CD45	cCD3	Mijeloidna loza/Limfociti
cCD68	CD11b	CD45	CD45RO	Monocitna/ Neutrofilna diferencijacija
cLizozim	cLaktoferin	CD45	/	Monocitna/Neutrofilna diferencijacija

Skraćenice: c - citoplazmatski; MPO - mijeloperoksidaza; FITC, fluorescein izotiocijanat; PE, fikoeritrin; PerCP, peridin-hlorofil-A-protein; APC, alofikocijanin; mslg, mišji Ig

Svi bolesnici sa dg AML koji su uključeni u prospektivno ispitivanje (n=26) su imunofenotipizirani na dg bolesti analizom uzoraka ks, primenom dijagnostičkog panela MoAt za AML (Tabela 11.).

Ova grupa bolesnika je analizirana i posle primene indukcione, a zatim i konsolidacione hemioterapije, i to paralelnom obradom svežih nativnih uzoraka ks i pk, primenom specifičnih panela MoAt za praćenje prisustva MRB (Tabela 12.).

Svi kontrolni ispitanici su imunofenotipizirani primenom specifičnih panela MoAt na uzorcima ks i pk (Tabela 13.).

3.2.3. Metoda direktne višekolorne imunofluorescencije za detekciju membranskih hLDM

Plazmamembranski hLDM na populaciji leukemijskih ćelija AML su detektovani metodom direktne višekolorne imunofluorescencije na svežim uzorcima pune ks ili pk (ELN, 2005a; CLSI, H43-A2, 2007; H42-A2, 2007). Uzorci ks i pk su prikupljeni na antikoagulansu dikalijum etilen diamin tetraacetat (K₂EDTA) (BD Vacutainer, K2E 5,4 mg, SAD) i čuvani su tokom obrade na sobnoj temperaturi u mraku. Koncentracija ćelija uzorka ks je određivana brojanjem ćelija u hemocitometru (Neubauer hemocytometer; Hausser Scientific, SAD), dok je u slučaju pk koncentracija ćelija određivana na hematološkom brojaču (Pentra DX Nexus, HORIBA ABX, Francuska). Alikvoti (jedinična zapremina uzorka koja sadrži određeni broj ćelija) uzoraka su obeležavani MoAt direktno konjugovanim sa fluorohromom, prema prethodno prikazanim standardnim panelima. U epruvete su prvo sipana MoAt u određenim zapreminama i u odgovarajućoj kombinaciji, a zatim je dodavano po 100µl (1x10⁶ ćelija) originalnog uzorka ili njegovog razblaženja u slučaju velike celularnosti. Na kraju je u svaku epruvetu dodato po 10µl humanog AB seruma (Sigma-Aldrich, SAD) i 10µl 1% NaN₃/PBS (Natrijum azid; Sigma-Aldrich, SAD). Uzorci su

mešani na automatskoj mešalici i inkubirani tokom 20min/20°C, u mraku. Nakon završene inkubacije sa MoAt, eritrociti su lizirani hipotoničnim rastvorom na bazi NH₄Cl u trajanju od 10 min/+20°C, u mraku, a zatim su uzorci centrifugirani na 1500 rpm/5min. Čelije uzorka su ispirane sa 2ml rastvora 2% FCS/PBS, pH 7.2, i centrifugirane na 1500 rpm/5min/20°C. Posle odlivanja supernatanta, čelije su resuspendovane u 0.5ml rastvora za fiksiranje čelija na bazi formaldehida (CellFIX, Becton Dickinson, SAD), u trajanju od 20min/20°C, u mraku. U slučaju odloženog merenja i analize (do 24h), fiksirani uzorci su čuvani na +4°C (ELN, 2005a).

3.2.4. Metoda direktne višekolorne imunofluorescencije za detekciju intracelularnih hLDM

Metoda za obeležavanje intracelularnih hLDM (cCD3, cCD79a, cMPO, cLizozim, cLaktoferin, cCD68) uključuje kao prvi korak fiksaciju čelija uzorka, a zatim i permeabilizaciju ćelijske plazmamembrane i ostalih membrana unutar čelija, što omogućava prodor MoAt u citoplazmu i ostale intracelularne strukture (CLSI document H43-A2, 2007.). Metoda fiksacije i permeabilizacije ima za cilj očuvanje strukturnog integriteta čelije, kao i antigenosti ispitivanih hLDM. U slučaju istovremenog ispitivanja ekspresije membranskih i intracelularnih molekula, primenjivan je metod za obeležavanje hLDM prema preporukama proizvođača komercijalnog reagensa za permeabilizaciju i fiksaciju čelija (FIX&PERM, CALTAG Laboratories, Invitrogen, Flow Cytometry Catalog, 2006). Po 100µl originalnog ili razblaženog svežeg nativnog uzorka ks/pk (1x10⁶ čelija) je prvo obeležavano MoAt specifičnim za membranske Ag, na način koji je prethodno opisan. Posle inkubacije u trajanju od 20min/+20°C, uzorci su ispirani dodavanjem 2ml fosfatnog pufera (CellWASH, Becton Dickinson, SAD) i centrifugirani na 1500 rpm/5min. Supernatant je odlivan, a na talog čelija je dodavano 100µl komercijalnog reagensa A (FIX&PERM, reagens A, Invitrogen, Austrija). Nakon inkubacije od 15min/+20°C, čelije su ispirane sa 2ml rastvora za ispiranje (0.1% NaN₃/ 5% FCS/PBS, pH 7.2), centrifugiranjem

na 1500 rpm/5min. Supernatant je odlivan, a na talog ćelija je dodavano po 100µl komercijalnog reagensa B (FIX&PERM, reagens B, Invitrogen, Austrija), a zatim su sipana MoAt specifična za intracelularne leukocitne Ag prema određenom panelu. Nakon inkubacije od 30min/+20°C, uzorci su ispirani fosfatnim puferom (CellWASH, Becton Dickinson, SAD), centrifugiranjem na 1500 rpm/5min. Supernatant je odlivan, talog ćelija resuspendovan u 0.5ml fosfatnog pufera (CellWASH, Becton Dickinson, SAD), i uzorci mereni i analizirani na protočnom citofluorimetru. Ukoliko je merenje bilo odloženo (do 24h), fiksirani uzorci su čuvani na +4°C.

3.3. Multiparametarska protočna citofluorimetrija

MPC je specifična analitička metoda koja omogućava analizu populacija i subpopulacija ćelija bioloških uzoraka koji su u formi ćelijskih suspenzija, i to na osnovu njihovih imunološki definisanih karakteristika (ekspresija kombinacija hLDM) (CLSI, H43-A2, 2007; H42-A2, 2007). MPC omogućava istovremeno ispitivanje više ćelijskih svojstava, uključujući dve fizičke karakteristike, ćelijsku veličinu i citoplazmatsku ćelijsku granulaciju u kombinaciji sa ekspresijom više plazmamembranskih i/ili intracelularnih leukocitnih molekula, koja se detektuju na osnovu emisije molekula fluorescentnih boja vezanih za kompleks MoAt-leukocitni molekul. PCM je visoko senzitivna i efikasna metoda koja omogućava detekciju retkih populacija ćelija ispitivanog uzorka putem analize velikog broja ćelija (do 1×10^6) u kratkom vremenskom periodu (Orfao i sar., 2006). Senzitivnost ove metode se ogleda i u mogućnosti detektovanja fluorescentnih signala niskog intenziteta, koji odražavaju niske nivoe ekspresije hLDM na ćelijama. PCM je objektivna metoda s obzirom da se registrovanje fluorescentnih signala koji potiču sa ispitivanih ćelija uzorka, vrši visoko osetljivom aparaturom sastavljenom od detektora i amplifikatora (FACSCalibur System User's Guide, BD Biosciences, 1996).

3.3.1. Princip rada protočnog citofluorimetra

Obrasci ekspresije hLDM na populaciji leukemijskih ćelija analizirani su metodom MPC (BD FACSCalibur 4CS, Becton Dickinson Biosciences, SAD), primenom softvera za merenje i analizu podataka (CellQuest Pro Software 4.0.2, BD Biosciences, SAD). Protočni citofluorimetar BD FACSCalibur je svakodnevno kalibrisan pre započinjanja rada sa uzorcima, primenom seta komercijalnih kalibracionih kuglica (CaliBRITE two-color kit, CaliBRITE PerCP Beads, CaliBRITE APC Beads; Becton Dickinson Biosciences, SAD) i standardnog softvera za kalibraciju (FACSComp Software 4.2, BD Biosciences, SAD). Optimizacija kalibracije protočnog citofluorimetra je obavljena na mesečnom nivou, primenom specifične procedure obeležavanja kontrolnog zdravog uzorka periferne krvi, u cilju fine optimizacije svih ispitivanih fizičkih i fluorescentnih parametara.

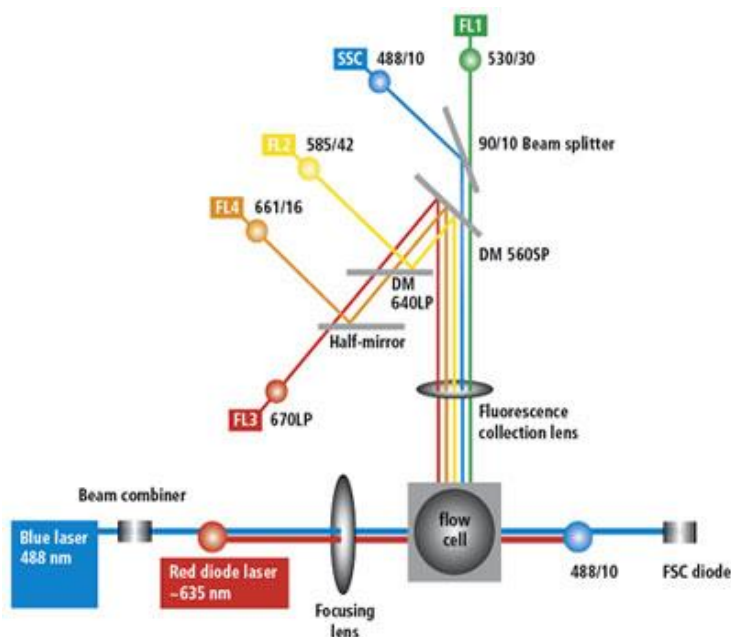
Protočni citofluorimetar je složen aparat pomoću koga je moguće istovremeno analizirati nekoliko ćelijskih karakteristika, uključujući relativnu ćelijsku veličinu (*engl.* forward light scatter, FSC) i relativnu ćelijsku citoplazmatsku granulaciju (*engl.* side light scatter, SSC), kao meru unutarćelijske složenosti, kao i nekoliko fluorescentnih parametara (FL1, FL2, FL3, FL4). Fluorescentni parametri predstavljaju detektovane fluorescentne signale, koje emituju molekuli fluorohroma konjugovani sa MoAt, koja su se vezala za specifične determinante hLDM na leukemijskim ćelijama. Sistem za analizu uzoraka se sastoji od protočnog citofluorimetra i njemu pridruženog kompjutera na kome se čuvaju i analiziraju podaci primenom različitih softvera (Slika 3.). Protočni citofluorimetar se sastoji od nekoliko funkcionalnih delova: sistema za prenos fluida, plavog lasera (Spectra Physics 163-A1202, 488 nm), crvenog lasera (Coherent Red Diode, ~635 nm), optičkog i elektronskog sistema (FACSCalibur System User's Guide, BD Biosciences, 1996).



Slika 3. Protočni citofluorimetar i kompjuter - sistem za merenje i analizu podataka (FACSCalibur 4CS, BD Biosciences, SAD)

Sistem za prenos fluida omogućava sprovođenje ćelija suspenzije u nizu, jedna po jedna, kroz posebnu komoricu u aparatu (*engl.* flow cell), gde se susreću sa snopom laserske svetlosti plavog i crvenog lasera (FACSCalibur System User's Guide, BD Biosciences, 1996).

Optički i elektronski sistem (Shema 12.) omogućavaju istovremeno prikupljanje nekoliko različitih parametara koji karakterišu ćelije. Pri prolasku svake pojedinačne ćelije kroz komoricu, laserska svetlost plavog lasera se odbija pod različitim uglovima od ćelije i njenih intracelularnih struktura, generišući tako njene fizičke parametre FSC i SSC, ili sa druge strane ekscitira molekule fluorohroma, vezanih za kompleks MoAt-leukocitni molekul, koje apsorbuju i reemituju svetlost generišući fluorescentne (FL) signale: FL1, FL2 i FL3 (FACSCalibur System User's Guide, BD Biosciences, 1996). Deo svetlosti koju emituje plavi laser, koja se reflektuje od ćelija uzorka pod malim uglom ($1-19^\circ$), odslikava relativnu veličinu ćelija i prikuplja se pomoću diode, generišući FSC signal. Drugi deo emitovane svetlosti plavog lasera, koja se od ćelija odbija pod uglom od 90° , prikuplja se pomoću sočiva, fokusira na seriju optičkih ogledala i filtera i šalje do specifičnih detektora u kojima se generišu SSC signal i fluorescentni signali. Svetlost odbijena od ćelija pod uglom od 90° se spektralno deli pomoću dihroičnih ogledala i filtera.



Shema 12. Optički sistem protočnog citofluorimetra FACSCalibur (www.bdbiosciences.com/instruments/facscalibur/features/index.jsp)

Prvo ogledalo (560 SP-Short Pass) susreće emitovanu žutozelenu svetlost čiji jedan deo propušta, a jedan deo reflektuje kao svetlost veće talasne dužine. Propuštena svetlost odlazi do FL1 detektora tipa PMT (*engl.* Photomultiplier Tube) gde nastaje FL1 signal. Drugi deo propuštene svetlosti (10%) se šalje na sledeći PMT detektor obezbeđujući nastanak SSC signala. Reflektovana svetlost veće talasne dužine se vraća do drugog ogledala (640 LP-Long Pass), koje jedan deo te svetlosti propušta kao crvenu svetlost do FL3 PMT detektora gde nastaje FL3 signal, a drugi deo reflektuje kao žuto-narandžastu svetlost do FL2 PMT detektora gde nastaje FL2 signal (FACSCalibur System User's Guide, BD Biosciences, 1996).

Emisija plavog lasera (svetlost talasne dužine 488 nm) ekscitira fluorohrome FITC, PE i PerCP, dok emisija crvenog lasera (svetlost talasne dužine ~635 nm) ekscitira fluorohromu APC.

Generisani optički signali se putem elektronskog sistema konvertuju u elektronske signale a zatim u digitalne vrednosti koje se šalju u kompjuter. Optički signal FSC se detektuje i konvertuje u proporcionalne elektronske signale pomoću fotodiode. SSC i fluorescentni optički signali se detektuju i konvertuju u

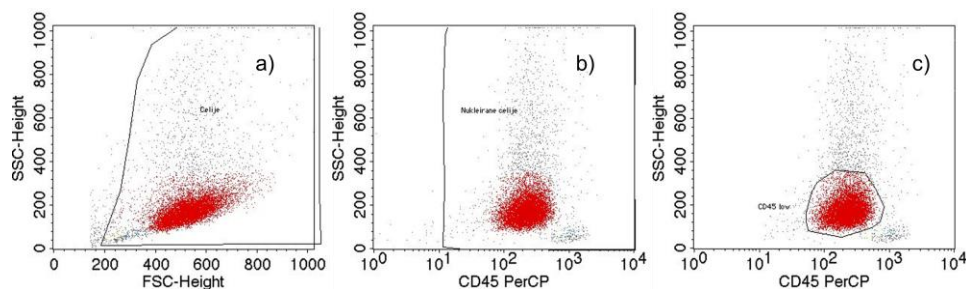
proporcionalne elektronske signale pomoću specifičnih detektora tipa PMT. U cilju optimalne detekcije, svi generisani signali se mogu proporcionalno amplifikovati tj. optimizovati, podešavanjem nivoa voltaže njihovih specifičnih detektora. Signali se zatim obrađuju u linearnim i logaritamskim amplifikatorima. Linearna amplifikacija, kojom se signali mogu amplifikovati 1.00 do 9.99 puta, se koristi prilikom analize signala malog opsega vrednosti (FCS i SSC). Logaritamska amplifikacija se koristi za analizu signala čiji intenzitet vrednosti varira u širokom opsegu kakav je slučaj kod FL signala (FACSCalibur System User's Guide, BD Biosciences, 1996).

3.3.2. Merenje i analiza uzoraka metodom MPC

Analiza podataka, dobijenih metodom MPC, predstavlja skup procedura koje se koriste da bi se definisao imunološki fenotip ispitivanih ćelija uzorka. Primenom odgovarajućih softvera, podaci se grafički prikazuju i statistički obrađuju (FACSCalibur System User's Guide, BD Biosciences, 1996). Finalni rezultat analize obrasca ekspresije svakog hLDM je brojčana vrednost, koja predstavlja procenat analiziranih leukemijskih ćelija koje eksprimiraju ispitivani molekul. Interpretacija podataka dobijenih imunofenotipskom analizom obezbeđuje postavljanje dg AML uz detaljnu imunološku subklasifikaciju svakog pojedinačnog slučaja (Béné i sar., 2011).

Nativni uzorci ks/pk koji se analiziraju metodom MPC su veoma heterogeni po svom ćelijskom sastavu, i da bi se identifikovale i analizirale ćelije od interesa, neophodno je primeniti poseban analitički pristup, koji se zasniva na selekcionisanju odnosno gejtiranju (*engl.* gating) populacije od interesa (H43-A2, 2007; H42-A2, 2007). Ćelije selekconisane na osnovu kombinacije njihovih fizičkih i imunofenotipskih karakteristika, definišu optimalnu "gejting" strategiju koja će biti primenjena u cilju njihove identifikacije (Slika 4.). U slučaju leukemijskih ćelija bolesnika sa AML optimalna "gejting" strategija predstavlja kombinaciju relativne veličine i granulacije ćelija (FSC/SSC gejting), u kombinaciji sa obrascem ekspresije leukocitnog molekula CD45 i stepena

ćelijske granulacije (CD45/SSC gejtng) (Borowitz i sar., 1993; Lacombe i sar., 1997). Ovo je visoko senzitivni analitički pristup za identifikaciju populacija leukemijskih ćelija AML i njihovu diferencijaciju od populacija ćelija zdravog hematopoeznog tkiva u ispitivanom uzorku.

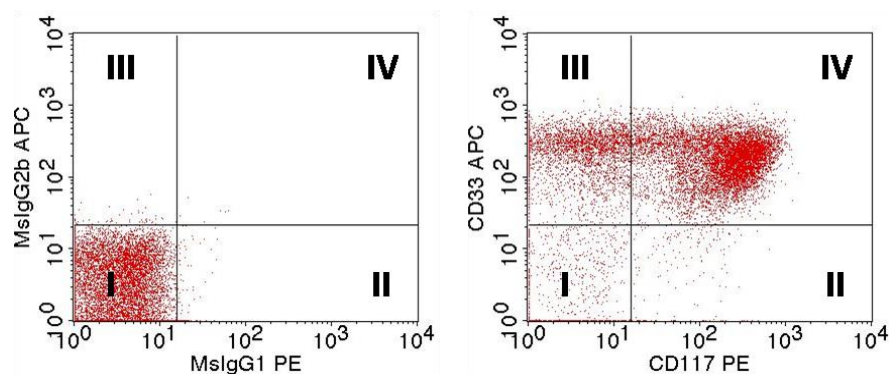


Slika 4. Postupak selekcionisanja leukemijske populacije ćelija kostne srži bolesnika sa AML, tokom merenja i analize MPCM, prikazan na dvo-parametarskim "dot plot" histogramima: a) selekcija ćelija uzorka od ćelijskog otpada na osnovu relativne ćelijske veličine (FSC) i granulacije (SSC); b) selekcija ukupnih nukleiranih ćelija kostne srži (CD45⁺) od nukleiranih ćelija eritrocitne loze i zaostalih eritrocita (CD45⁻); c) selekcija leukemijske populacije ćelija na osnovu obrasca snižene ekspresije molekula CD45 (CD45^{+medium}) i srednjeg stepena ćelijske granulacije (SSC^{medium}).

U ovom ispitivanju, populacija ćelija od interesa su bile ćelije AML. Prilikom merenja uzoraka prikupljano je po 10000 selekcionisanih leukemijskih ćelija po svakoj kombinaciji iz panela. Populacija leukemijskih ćelija je selekcionisana na osnovu protokola kojim je prvo isključivan ćelijski otpad na osnovu FSC/SSC karakteristika ćelija uzorka, a zatim je selekcionisana populacija ukupnih nukleiranih ćelija uzorka i među njima populacija leukemijskih ćelija na osnovu CD45/SSC karakteristika.

U populaciji selekcionisanih leukemijskih ćelija, analizirani su fluorescentni signali (FL1, FL2 i FL4) koji potiču od molekula fluorescentnih boja konjugovanih sa MoAt, pri čemu je leukocitni molekul CD45 uvek bio obeležen fluorohromom PerCP (FL3 signal). Emitovani FL signali definisani su kao parametri: FL1 (FITC emisija), FL2 (PE emisija), FL3 (PerCP emisija) i FL4 (APC emisija), i izražavani na logaritamskoj (log) skali u vidu jednoparametarskih ili dvoparametarskih histograma fluorescencije.

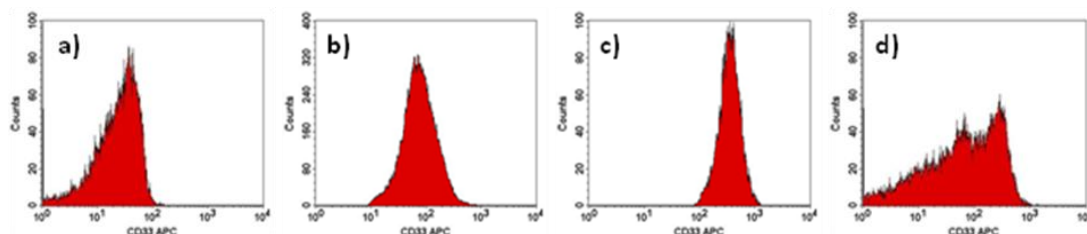
Dvoparametarski histogram fluorescencije omogućava istovremenu analizu ekspresije dva hLDM na populaciji leukemijskih ćelija. Na osnovu pozicije fluorescentne emisije na log skali intenziteta, koja potiče sa leukemijskih ćelija obeleženih odgovarajućim izotipskim kontrolama za svaki ispitivani leukocitni molekul, dvoparametarski histogram se deli na četiri kvadranta primenom dva kurzora postavljena pod uglom od 90°: donji levi (I), donji desni (II), gornji levi (III) i gornji desni (IV) (Slika 5.). Fluorescentni signali koji potiču od ćelija obeleženih izotipskom kontrolom, uvek mapiraju u I kvadrantu i predstavljaju meru nespecifičnog vezivanja, odnosno nespecifične fluorescentne emisije. U II i III kvadrantu mapiraju ćelije ispitivane populacije koje ekspimiraju samo po jedan hLDM, odnosno obeležene su samo jednim MoAt čiju fluorescentnu emisiju detektujemo. U IV kvadrantu mapiraju ćelije koje istovremeno na svojim strukturama ekspimiraju tj. koekspimiraju oba ispitivana leukocitna molekula (obeležene su sa dva MoAt za koja su vezane različite fluorescentne boje). Prilikom analize, na osnovu uzorka izotipske kontrole kurzori su postavljeni tako da je nivo specifične fluorescencije u kvadrantima II, III i IV bio maksimalno 1%.



Slika 5. Dvoparametarski histogram fluorescencije koji prikazuje relativne nivoe fluorescencije sa populacije leukemijskih ćelija uzorka bolesnika sa dg AML, obeleženog izotipskim kontrolama mslgG1-PE/mslgG1-APC i kombinacijom CD117-PE/CD33-APC. Kvadrant I: CD117⁻CD33⁻ ćelije; kvadrant II: CD117⁺CD33⁻ ćelije; kvadrant III: CD117⁻CD33⁺ ćelije; kvadrant IV: CD117⁺CD33⁺ ćelije.

Ekspresija hLDM na selekcionisanoj populaciji ćelija uzorka je izražavana kao procenat ćelija obeleženih MoAt u populaciji gejtiranih leukemijskih ćelija (opseg, 1% - 100%). Populacija leukemijskih ćelija je definisana kao pozitivna za ispitivani hLDM, ukoliko je $\geq 20\%$ ćelija eksprimiralo plazmamembranski, odnosno $\geq 10\%$ intracelularni molekul (EGIL, 1995; Bain i sar., 2002).

Obrazac ekspresije hLDM na leukemijskim/zdravim ćelijama predstavlja meru apsolutnog broja molekula eksprimiranih na plazmamembrani ili intracelularnim strukturama svake pojedinačne ćelije, kao i distribucije tog molekula na različitim ćelijama leukemijske/zdrave populacije (Terstappen i sar., 1991; van Lochem i sar., 2004; Wood i sar., 2007).



Slika 6. Primeri različitih obrazaca ekspresije membranskog CD33 Ag na leukemijskim ćelijama bolesnika sa AML. a) Nizak nivo ekspresije CD33 Ag (CD33^{low}); b) Srednji nivo ekspresije CD33 Ag (CD33^{medium}); c) Visok nivo ekspresije CD33 Ag (CD33^{high}); d) Heterogena ekspresija CD33 Ag (CD33^{hetero})

Obrazac ekspresije hLDM je procenjivan na osnovu relativne pozicije zapisa fluorescentnog signala na log skali jednoparametarskog histograma (Slika 6.). Obrazac niskog nivoa ekspresije hLDM (Ag^{low}), definisan je u slučaju kada je zapis FL signala mapirao na log skali u opsegu 10^0 - 10^2 . Obrazac srednjeg nivoa ekspresije (Ag^{med}), definisan je kada je zapis FL signala mapirao na log skali na poziciji 10^1 - 10^3 . Obrazac visokog nivoa ekspresije (Ag^{high}) je definisan kada je zapis FL signala mapirao na log skali u opsegu 10^2 - 10^4 , pri čemu je obrazac izrazito visoke ekspresije hLDM definisan (Ag^{bright}) kada je zapis FL signala mapirao na log skali na poziciji 10^3 - 10^4 . Ukoliko je zapis FL signala bio sa malim varijacijama u intenzitetu ekspresije na log skali za dati molekul (1 log dekada), obrazac ekspresije je bio definisan kao homogen (Ag^{homo}), dok je u

slučaju većih varijacija u nivou ekspresije (3 log dekade i više) obrazac ekspresije hLDM definisan je kao heterogen (Ag^{hetero}). U slučaju kada je antigen bio eksprimiran samo na subpopulaciji leukemijskih ćelija, obrazac ekspresije je definisan kao parcijalna ekspresija (Ag^{p+}).

Učestalosti obrazaca ekspresije ispitivanih hLDM na populaciji leukemijskih ćelija u različitim grupama bolesnika sa dg AML, izražavane su kao procenat bolesnika čije leukemijske ćelije eksprimiraju hLDM prema određenom obrascu, u odnosu na ukupan broj bolesnika koji su definisani kao pozitivni za ispitivani hLDM.

Osim populacija leukemijskih blasta u ispitivanim uzorcima ks bolesnika sa AML su analizirane i ostale populacije ćelija, inače prisutne u ks zdravih osoba u fiziološkim uslovima (Tabela 14.). Relativna vrednost ovih rezidualnih populacija ćelija je izražavana kao procenat nukleiranih ćelija izpitivanog uzorka (% NĆ).

Tabela 14. Imunofenotipske i SSC karakteristike ćelija (prema van Lochem i sar., 2004; Maecker i sar., 2012)

Populacija ćelija	Imunofenotipske/SSC karakteristike
Hematopoezni progenitori	CD34⁺CD45^{low-med}/SSC^{low-med}
Hematopoezni progenitori	CD117⁺CD45^{low-med}/SSC^{low-med}
Mijeloidni progenitori	HLA-DR⁺CD34⁺CD117⁺/SSC^{low-med}
B-ćelijski prekursori - Hematogoni I/II	CD34 ^{+/} -CD19 ⁺ CD10 ⁺ CD45 ^{low-med} /FSC ^{low} SSC ^{low}
B-ćelijski prekursori - Hematogoni I	CD34 ⁺ CD19 ⁺ CD10 ⁺ CD45 ^{low} /FSC ^{low} SSC ^{low}
Limfociti	CD45^{bright}/FSC^{low}SSC^{low}
B-limfociti	CD19 ⁺ CD45 ^{bright} /FSC ^{low} SSC ^{low}
T-limfociti	CD3 ⁺ CD45 ^{bright} /FSC ^{low} SSC ^{low}
CD4 ⁺ T-limfociti	CD4 ⁺ CD3 ⁺ CD45 ^{bright} /FSC ^{low} SSC ^{low}
NKT-limfociti	CD3 ⁺ CD56 ⁺ CD45 ^{bright} /FSC ^{low} SSC ^{low}
NK-limfociti	CD3 ⁻ CD56 ⁺ CD45 ^{bright} /FSC ^{low} SSC ^{low}

Monocitni prekursori	CD64^{+high}CD45^{high}/SSC^{med}
Promonocit	CD64 ^{+high} CD14 ⁻ CD45 ^{high} /SSC ^{med}
Monocit	CD64 ^{+high} CD14 ^{+high} CD45 ^{high} /SSC ^{med}
Granulocitni prekursori	CD45^{medium}/SSC^{med-high}
Promijelocit	CD66b ⁻ CD16 ⁻ CD10 ⁻ CD45 ^{med} /SSC ^{med-high}
Mijelocit	CD66b ⁺ CD16 ⁻ CD10 ⁻ CD45 ^{med} /SSC ^{med-high}
Metamijelocit	CD66b ⁺ CD16 ⁺ CD10 ⁻ CD45 ^{med} /SSC ^{med-high}
Neutrofil	CD66b ⁺ CD16 ⁺ CD10 ⁺ CD45 ^{med} /SSC ^{med-high}
Eozinofili	CD45^{bright}/SSC^{med-high}/FSC^{low}
Eritrocitni prekursori	CD36⁺CD41a⁻CD45⁻/SSC^{low}

3.3.3. Kriterijumi za definisanje imunofenotipskih profila specifičnih za leukemijske ćelije AML

Leukemijske ćelije bolesnika sa AML ispoljavaju samo relativnu analogiju sa ranim stupnjevima diferencijacije tokom ontogeneze mijeloidne hematopoezne loze u ekspresiji hLDM (Terstappen i sar., 1991; Olaru i sar., 2008; Béné i Kaeda, 2009). Leukemijske ćelije većine bolesnika sa AML na dg bolesti ispoljavaju različite tipove aberacija u ekspresiji hLDM: koekspresija dva molekula koji tokom normalne diferencijacije ćelija mijeloidne loze nisu koeksprimirani (*maturaciona asinhronija* u ekspresiji hLDM); *ektopična ekspresija* hLDM drugih hematopoeznih loza (ekspresija molekula T- i/ili B-limfoidne loze) na leukemijskim mijelo/monoblastima ili zrelijim prekursorima mijelo/monocitne loze. Osim toga, na leukemijskim ćelijama AML, obrasci ekspresije hLDM mogu biti izmenjeni u odnosu na fiziološke obrasce ekspresije istih molekula tokom diferencijacije, što uključuje *prekomernu* (engl. over) *ekspresiju*, *sniženu ekspresiju* ili potpuno *odsustvo ekspresije* hLDM. Izmenjen obrazac ekspresije hLDM je definisan za svaki ispitivan molekul, kao odstupanje pozicije FL zapisa na log skali relativnog intenziteta za ≥ 0.5

vrednosti log skale u odnosu na poziciju istog u fiziološkim uslovima (Wells i sar., 2003; van de Loosdrecht i sar., 2009). Koristeći literaturne podatke o ekspresiji hLDM tokom normalne ontogeneze ćelija mijeloidne loze (van Lochem i sar., 2004; Olaru i sar., 2008; Arnoulet I sar., 2010), kao i podatke dobijene analizom zdravih kontrolnih uzoraka ks i pk tokom ovog ispitivanja, utvrđena su odstupanja u ekspresiji izabrane grupe hLDM na populaciji leukemijskih blasta i populacijama mijelo/monocitnih prekursora ks u našoj grupi bolesnika sa AML na dg bolesti (Wells i sar., 2003; van de Loosdrecht i sar., 2009). Na osnovu utvrđenih odstupanja u ekspresiji hLDM tzv. imunofenotipskih aberacija u ekspresiji hLDM, definisane su LSIF karakteristike (Olaru i sar., 2008), koje su korišćene za praćenje prisustva MRB kod bolesnika tokom lečenja (Al-Mawali i sar., 2009; Béné i Kaeda, 2009).

3.3.4. Imunološka klasifikacija bolesnika sa AML

Imunološka klasifikacija bolesnika sa AML vršena je na osnovu EGIL kriterijuma Evropske mreže za leukemije (*engl.* European LeukemiaNet, ELN) (Béné i sar., 1995; Béné i sar., 2011), koja je integrisana u klasifikaciju AML koju je predložila SZO (Swerdlow i sar., 2008).

Primenom standardnog panela MoAt definisan je imunofenotipski profil AML svakog ispitivanog bolesnika, što je dalje omogućavalo imunološku klasifikaciju AML (Tabela 2.). Imunološki suptip AML je definisan na osnovu ekspresije kombinacije hLDM mijelomonocitne loze na populaciji blasta odnosno leukemijskih prekursora granulocitne i/ili monocitne loze: cMPO, cLizozim, CD117, CD13, CD33, CD64, CD36, CD14, CD163, CD11a, CD11b, CD11c, CD15, CD66b, CD16, CD10, cLaktoferin, CD123, CD135, CD41a, CD42b, CD61, CD71 i CD235a. Ekspresija diferencijacionih i linijski nespecifičnih antigena, CD34, CD38, HLA-DR, CD135 i CD123, definisala je fenotip mladih tj. nediferenciranih ćelija limfo-hematopoeznog sistema.

3.4. Citogenetsko ispitivanje

Citogenetsko ispitivanje je sprovedeno na uzorcima ks 98,3% (289/294) bolesnika sa AML, uključenih u retrospektivno ispitivanje. Analiza nije bila uspešna, zbog odsustva ćelija u mitozu, kod 2,8% (8/289) bolesnika. Citogenetsko ispitivanje je sprovedeno na dijagnozi bolesti kod svih 26 bolesnika uključenih u prospektivno ispitivanje MRB primenom MPC.

Korišćene su nestimulisane ćelije aspirata ks, uz primenu direktne preparacije i/ili nakon kratkotrajne (24-48h) nestimulisane ćelijske kulture. Primenom tehnike HG-traka (Novak i sar., 1994), koja se razlikuje od konvencionalne GTG-tehnike po istovremenoj primeni tripsina i kolcemida u hipotoničnoj fazi ćelijske preparacije, dobijani su hromozomi za dalju analizu. Pripremljeni preparati su bojeni 2% rastvorom boje Giemsa u fosfatnom puferu (0,9% KH₂PO₄ i 1,2% Na₂HPO₄, pH6,8), a zatim su analizirani na svetlosnom mikroskopu (Opton-Axiophot, ZEISS, Nemačka). Provera natalnog kariotipa bolesnika je vršena stimulacijom limfocita periferne krvi mitogenom fitohemaglutininom. Preparacija je rađena nakon 72-časovnog kultivisanja ćelija u optimalnim uslovima.

Citogenetska analiza je obavljena na deset pregledanih ćelija u metafazi, u slučaju normalnog, ili na dvadeset mitoze, u slučaju aberantnog kariotipa. Izabrane mitoze su fotografisane a kod bolesnika sa hromozomskim aberacijama je i fotodokumentovan kariogram.

Opisivanje kariotipa i definisanje hromozomskih aberacija, sprovedeno je prema preporukama Međunarodnog sistema nomenklature u humanoj citogenetici ISCN (*engl.* An International System for Human Cytogenetic Nomenclature) (Shaffer i sar., 2009). Prema ISCN preporukama, patološki klon je definisan nalazom najmanje dve metafaze sa istom strukturnom aberacijom ili trizomijom istog hromozoma, ili nalazom bar tri metafaze sa monozomijom istog hromozoma. Kao marker (mar) je podrazumevan strukturno izmenjen hromozom čiji se raspored traka ne može prepoznati, dok je derivat (der) definisan kao hromatinski prepoznatljiv hromozom, ali sa nepoznatim

strukturnim rearanžmanom. Citogenetska klasifikacija AML na posebne entitete, definisane prisustvom specifične genetičke aberacije, izvršena je na osnovu kriterijuma SZO (Swerdlow i sar., 2008).

3.5. Molekularno – genetska ispitivanja

Molekularno-genetska ispitivanja su sprovedena na dg bolesti na selekcionisanoj grupi bolesnika sa AML-NK, uključenih u retrospektivno ispitivanje. Ispitivano je prisustvo mutacija u genima: *NPM1* (177/294, 60,2%), *FLT3* (197/294, 67%), i *CEBPA* (60/294, 20,4%).

Kod 9/26 bolesnika sa dg AML-NK, koji su bili uključeni u prospektivni deo ispitivanja, takođe je sprovedeno ispitivanje na prisustvo mutacija u *NPM1* i *FLT3* genima na dg bolesti. Za sve vrste molekularno-genetskih ispitivanja korišćeni su uzorci aspirata ks, uzeti na 0.38% Na-citratu kao antikoagulansu. U slučaju retrospektivne analize mutacije u *FLT3* genu, izolacija DNK je rađena sa pločica razmaza ks.

3.5.1. Izolacija mononuklearnih ćelija uzorka

Mononuklearne ćelije ks su izolovane metodom centrifugiranja na diskontinuiranom separacionom gradijentu (Boyum, 1968). Na dno sterilne epruvete, zapremine 10 ml, sipano je 3 ml Ficoll-Plaque PLUS (1.077 g/ml, GE Healthcare), a zatim je na ovaj gradijent naneto 4 ml razblaženog uzorka (1:1, uzorak:fiziološki rastvor). Uzorci su potom centrifugirani na 1500 g/25 min na sobnoj temperaturi, u kliničkoj centrifugi, bez koćenja. Nakon centrifugiranja, pipetom je prebačena interfaza (*engl.* „buffy coat“) koja je sastavljena od mononuklearnih ćelija u novu sterilnu epruvetu a ćelije su potom isprane dva puta u PBS-u. Nakon svakog ispiranja ćelije su centrifugirane na 1500 g/15 min a zatim je talog-ćelija resuspendovan u PBS-u.

3.5.2. Izolacija DNK iz mononuklearnih ćelija uzorka

Za izolaciju DNK iz mononuklearnih ćelija (kostna srž / periferna krv) korišćen je QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Germany). Na dno tube je sipano 20 µl proteinaze K (20 mg/ml), dodato je 200 µl uzorka, 200 µl pufera AL i promešano je na automatskoj mešalici. Uzorak je inkubirana u vodenom kupatilu 10 min/56°C, pa je dodato 200 µl 96-100% etanola uz mešanje na automatskoj mešalici. Ovako pripremljen uzorak je nanet na QIAamp Mini spin kolonicu i centrifugiran je na 8000 rpm/1 min. Kolonica je isprana sa 500 µl pufera AW1 i centrifugirana na 8000 rpm/1 min. Kolonica je zatim isprana sa 500 µl pufera AW2 i centrifugirana na 13000 rpm/3 min. Kolonica je zatim prebačena u čistu epruvetu u koju je dodato 200 µl pufera AE i centrifugirana je na 8000 rpm/1 min.

3.5.3. Reakcija lančanog umnožavanja DNK

Reakcija lančanog umnožavanja DNK (PCR) je *in vitro* amplifikacija definisane DNK sekvence i predstavlja imitaciju procesa DNK replikacije (Oste, 1988). Reakcija koristi dva oligonukleotida, komplementarna krajevima sekvence koja se umnožava (prajmeri), koji su međusobno suprotno orijentisani i dugački 15-20 nukleotida. Sinteza DNK katalizovana je termostabilnom DNK polimerazom. Ponavljanje ciklusa, od kojih se svaki sastoji od denaturacije DNK, hibridizacije prajmera (aniling) i ekstenzije hibridizovanih prajmera od strane termostabilne DNK polimeraze kao rezultat ima eksponencijalnu amplifikaciju specifičnog DNK fragmenta. Krajevi amplifikovanog fragmenta su definisani 5' krajevima prajmera a njihova veličina određena je rastojanjem između sekvenci koje prajmeri prepoznaju. PCR reakciona smeša mora sadržati komponente potrebne za *in vitro* sintezu DNK: matrica (DNK koja se kopira), prajmere (oligonukleotidi komplementarni krajevima sekvence koja se kopira), nukleotide (gradivni elementi DNK), *Taq* polimerazu (termostabilna DNK polimeraza koja katalizuje ugradnju nukleotida po principu komplementarnosti

sa matricom), jone magnezijuma i pufer (neophodni za optimalni rad *Taq* polimeraze).

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

3.5.4. Detekcija mutacija u *NPM1* genu

Reakciona smeša zapremine 50 μ l, sastojala se od sledećih elemenata: 100 – 300 ng DNK, 1x PCR pufer, 1x Q-solution, dNTP (0,3 mM finalno), $MgCl_2$ (2,25 mM finalno), prajmeri NPM1-F i NPM1-R (Tabela) (500 mM finalno) i 2U HotStarTaq@DNA Polimerase (Qiagen, Nemačka) (Falini i sar., 2005). Temperaturni profil PCR reakcije: a) 15 min/95°C – aktivacija HotStarTaq polimeraze, b) 35 ciklusa (1 min/95°C – denaturacija \rightarrow 1 min/60°C – aniling \rightarrow 2 min/72°C – elongacija), c) 10 min/72°C – finalna elongacija.

Nakon PCR amplifikacije izvršeno je prečišćavanje na koloni (QIAquick PCR Purification kit, Qiagen) prema uputstvu proizvođača. Nakon toga je izvršena reakcija sekvenciranja upotrebom NPM1_1112R prajmera (Tabela 15.).

Tabela 15. Setovi prajmera za detekciju mutacija u <i>NPM1</i> genu	
Prajmer	sekvenca (5'-3')
NPM1-F	TTA ACT CTC TGG TGG TAG AAT GAA
NPM1-R	CAA GAC TAT TTG CCA TTC CTA AC
NPM1-1112R	CCT GGA CAA CAT TTA TCA AAC ACG GTA

3.5.5. Detekcija mutacija u *CEBPA* genu metodom analize dužine fragmenata

Analiza dužine fragmenta (*engl.* Fragment length analysis) je metoda koja se oslanja na detekciju promene u dužini konkretne DNK sekvence čije prisustvo označava postojanje mutacije. Procena veličine DNK fragmenta se vrši relativnim upoređivanjem sa standardima, DNK markerima, poznate dužine.

Četiri para prajmera su korišćena za amplifikaciju celokupnog kodirajućeg regiona *CEBPA* gena (Benthaus, 2008). „Forward“ prajmeri su bili obeleženi fluorescentnom bojom i to sa dve različite boje, FAM i VIC (Tabela 16).

Tabela 16. Setovi prajmera za detekciju mutacija u <i>CEBPA</i> genu	
Prajmer	sekvenca (5'-3')
1F-FAM	FAM-5'-GGCGAGCAGGGTCTCCGGGT-3'
1R	5'-TGTGCTGGAACAGGTCGGCCA-3'
2F-VIC	VIC-5'-GCTGGGCGGCATCTGCGA-3'
2R	5'-CCCCGACGCGCTCGTACAGG-3'
3F-FAM	FAM-5'-CCGGCTACCTGGACGGCAGG-3'
3R	5'-CGTTGCTGTTCTTGTCCACCGACTTCTT-3'
4F-VIC	VIC-5'-CTCGGTGCCGCCGGCCT-3'
4R	5'-AACCACTCCCTGGGTCCCCGC-3'

Puštane su dve multipleks reakcije A i B. Multipleks PCR A se sastojala od prajmera 1F-FAM, 1R, 2F-VIC i 2R, dok je multipleks PCR B sadžavao prajmere 3F-FAM, 3R, 4F-VIC i 4R. Reakciona smeša multipleks PCR reakcije A zapremine 25 µl, sastojala se od sledećih elemenata; 50 ng cDNK, 1x PCR pufer, 1x Q-solution, dNTP (0,4 mM finalno), prajmeri 1F-FAM i 1-R (200 mM finalno), 2F-VIC i 2-R (800 mM) i 2U HotStarTaq®DNA Polimerase (Qiagen, Nemačka). Reakciona smeša multipleks PCR reakcije B zapremine 25 µl, sastojala se od sledećih elemenata; 50 ng cDNK, 1x PCR pufer, 1x Q-solution, dNTP (0,4 mM finalno), prajmeri 3F-FAM i 3-R (800 mM finalno), 4F-VIC i 4-R (200 mM) i 2U HotStarTaq®DNA Polimerase (Qiagen, Nemačka). Temperaturni profil

multipleks PCR reakcije: a) 15 min/95°C – aktivacija HotStarTaq polimeraze, b) 36 ciklusa (1 min/95°C – denaturacija → 2 min/70°C – aniling → 3 min/70°C – elongacija), c) 10 min/72°C – finalna elongacija.

Nakon PCR reakcije produkti su razblaženi i pomešani sa 0.25 µl standardnog markera (GeneScan™ 500 LIZ™ dye Size Standard, Applied Biosystems) i Hi-Di formamidom. Celokupna količina je nanošena u bunarić na mikrotitarskoj ploči.

Produkt multipleks PCR reakcije je analiziran kapilarnom elektroforezom na automatskom sekvenceru (3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems). Dužina multiplex PCR produkta je određivana poređenjem sa markerom, uz pomoć programa Gene Mapper v.4.0 [<http://www.appliedbiosystems.com>].

Sekvenciranje DNK je rađeno BigDye™ Terminators Version 3.1 Ready Reaction Kit-om (Applied Biosystems), kapilarnom elektroforezom na automatskom sekvenceru (3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems). Ovaj kit omogućava sekvenciranje u PCR reakciji u kojoj se pored deoksinukleotida koriste i 2',3'-dideoksinukleotidi (Sanger F, 1977). DNK polimeraza kopira jedan lanac DNK matrice ugrađujući nukleotide na 3' kraj prajmera sve dok u rastući lanac ne ugradi neki od dideoksinukleotida. Dideoksinukleotidi nemaju OH-grupu na 3' poziciji, zbog čega nemaju sposobnost vezivanja sledećeg nukleotida, pa njihovom ugradnjom dolazi do terminacije polimerizacije. Reakcije se rade sa samo jednim prajmerom (asimetrični PCR) tako da se dobija serija fragmenata različitih dužina koji se završavaju dideoksinukleotidom. Svaki od 4 dideoksinukleotida obeležen je različitom fluorescentnom bojom čime je omogućena detekcija fragmenata u sekvenceru. Za razliku od kitova u kojima su dideoksinukleotidi obeleženi jednom istom fluorescentnom bojom, ovaj kit omogućava da se sekvenciranje jednog uzorka radi u jednoj PCR reakciji umesto u četiri odvojene. Smeša za sekvenciranje, finalne zapremine 8 µl, sadrži sledeće komponente: 3-20 ng prečišćenog PCR produkta (za dužine 200-1000 bp); 3,2 pmol prajmera za sekvenciranje i 3 µl Ready Reaction Mix (Applied

Biosystems). Temperaturni profili PCR reakcije za sekvenciranje: a) 1 min/96°C, b) 25 ciklusa (10 sec/96°C → 5 sec/50°C → 4 min/60°C), c) 4°C/∞.

Posle završene reakcije sekvenciranja uzorci su prečišćavani Na-acetatnom precipitacijom. U uzorke se doda 40 µl Na-acetata, promućka se i centrifugira 20 min na 13000 rpm, posle čega se supernatant uklanja. Talogu se doda 200 µl 70% etanola i centrifugira 10 min na 13000 rpm, posle čega se supernatant uklanja. Ovaj korak se ponavlja još jednom. Nakon drugog ispiranja etanolom talog je neophodno u potpunosti osušiti. Osušeni talog se rastvara u 25 µl HiDi i celokupna količina se nanosi na plejt za sekvenciranje.

3.5.6. Detekcija *FLT3/ITD* mutacije

Reakciona smeša zapremine 30 µl, sastojala se od sledećih elemenata: 100 – 300 ng DNK, 1x PCR pufer, 1x Q-solution, dNTP (2 mM finalno), MgCl₂ (2,75 mM finalno), prajmeri 14F i 15R (Tabela 17.) (350 mM finalno) i 2U HotStarTaq®DNA Polimerase (Qiagen, Nemačka) (Kiyoi i sar., 1997).

Tabela 17. Sekvence prajmera za detekciju i sekvenciranje <i>FLT3/ITD</i> i <i>FLT3/D835</i> mutacija	
Prajmer set <i>FLT3/ITD</i>	sekvenca (5'-3')
14F	GCA ATT TAG GTA TGA AAG CCA GC
15R	CTT TCA GCA TTT TGA CGG CAA CC
Prajmer set <i>FLT3/D835</i>	
21F	CCG CCA GGA ACG TGC TTG
21R	GCA GCC TCA CAT TGC CCC

Temperaturni profil PCR reakcije: a) 15 min/95°C – aktivacija HotStarTaq polimeraze, b) 35 ciklusa (1 min/95°C – denaturacija, 1 min/60°C – aniling, 2 min/72°C – elongacija), c) 10 min/72°C – finalna elongacija.

Analiza dobijenih PCR produkata je vršena elektroforezom na 4% agaroznom gelu. Očekivana dužina wt PCR produkta je 325 bp. Postojanje *FLT3/ITD* mutacije je praćeno prisustvom dodatnog PCR produkta veće dužine.

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

3.5.7. Detekcija *FLT3/D835* mutacije

Reakciona smeša zapremine 30 μ l, sastojala se od sledećih elemenata; 100 – 300 ng DNK, 1x PCR pufer, 1x Q-solution, dNTP (2 mM finalno), $MgCl_2$ (2,75 mM finalno), prajmeri 21F i 21R (Tabela 17.) (350 mM finalno) i 2U HotStarTaq® DNA Polimerase (Qiagen, Nemačka) (Yamamoto i sar., 2001). Temperaturni profil PCR reakcije: a) 15 min/95°C – aktivacija HotStarTaq polimeraze, b) 35 ciklusa (1 min/95°C – denaturacija → 1 min/58°C – aniling → 2 min/72°C – elongacija), c) 10 min/72°C – finalna elongacija.

Produkt PCR reakcije za *FLT3/D835* je 114 bp. Detekcija mutacije se vrši digestijom ovako dobijenog PCR fragmenta restrikcijom enzimom *EcoRV* (Fermentas). Prisustvo mutacije narušava restrikciono mesto za ovaj enzim, tako da će se seći samo nemutirani fragmenti. U slučaju digestije dobijamo produkte dužina 68 bp i 46 bp. Smeša za digestiju sadrži sledeće komponente: 10 μ l PCR produkta, 1 x pufer R, 20U *EcoRV* (Fermentas). Uslovi digestije su 12 sati na 37°C. Analiza fragmenata se vrši na 8% poliakrilamidnom gelu.

3.5.8. Analiza DNK na agaroznom gelu

Analiza DNK je vršena na horizontalnom agaroznom gelu odgovarajuće koncentracije (2–4%), u zavisnosti od veličine molekula DNK koje treba razdvojiti. U gelove je pre polimerizacije dodavan etidijum bromid (5 μ g/ml). Elektroforeza je tekla u 1XTAE puferu (40mM Tris, 20 mM Na-acetat, 1mM Na_2EDTA), pri voltaži od 4-7 V/cm. DNK je vizuelizovana osvetljavanjem gela UV svetlom talasne dužine 266 nm. Trajni zapis rezultata dobija se fotografisanjem

gela CCD kamerom integrisanom u sistem za automatsku digitalnu akviziciju slike, BioDocAnalyze sistemom. Veličina fragmenata DNK određuje se pomoću adekvatnih komercijalnih markera (Fermentas).

3.5.9. Analiza DNK na poliakrilamidnom gelu

Fragmenti DNK su razdvajani na nedenaturišućem 8% poliakrilamidnom gelu (Akrilamid: N,N-metilenbisakrilamid (29:1) (30% w/v), 100mM Tris, 83mM borna kiselina, 1mM EDTA pH 8; 0,1% (w/v) amonijumpersulfat, 0,01% (v/v) TEMED). Elektroforeza je tekla pri naponu od 10 V/cm u 1xTBE puferu (100mM Tris, 83 mM borna kiselina, 1mM EDTA pH 8). Po završetku elektroforeze, gelovi su bojeni srebronitratom.

3.5.10. Bojenje poliakrilamidnih gelova srebronitratom

Vizuelizacija DNK na poliakrilamidnim gelovima vršena je bojenjem srebronitratom. Poliakrilamidni gelovi su, nakon elektroforeze, najpre fiksirani 30 minuta u rastvoru 10% etanola i 0,5% sirćetne kiseline. Nakon toga, gelovi su bojeni u 0,1% rastvoru srebronitrata 10 minuta. Višak srebra je uklanjan ispiranjem najpre u bi-distilovanoj vodi, a zatim u razvijaču, koji je bio sledećeg sastava: 1,5% natrijumhidroksid, 0,01% natrijumborhidrid i 0,048% formaldehid. Gelovi su u razvijaču držani 20 minuta. Fiksiranje dobijenih traka vršeno je potapanjem gelova u 0,75% rastvor natrijumbikarbonata.

3.6. Statističke metode

Rezultati ispitivanja su obrađeni metodama deskriptivne, parametrijske i neparametrijske statistike, primenom statističkog paketa SPSS® 16.0. za Windows (IBM, SAD, 2008.) i Statistica 13.1 (Dell Software, SAD, 2016). Deskriptivna statistika je obuhvatala: aritmetičku srednju vrednost, medijanu,

standardnu devijaciju i koeficijent varijacije. Međusobna povezanost analiziranih kliničkih, imunofenotipskih, citogenetskih, i molekularno-genetskih karakteristika procenjavana je primenom metoda parametrijske i neparametrijske statistike u zavisnosti od tipa distribucije ispitivane karakteristike (Kolmogorov-Smirnov test). Od metoda parametrijske analize korišćene su: Studentov t-test i analiza varijanse ANOVA. Od metoda neparametrijske analize korišćeni su: Pearson χ^2 -test, Fisher-ov test egzaktnosti, Mann-Whitney U test, kao i neparametrijska analiza varijanse (Kruskal-Wallis test). Za analizu trajanja KR i ukupnog preživljavanja bolesnika korišćena je Kaplan-Meier-ova metoda, kao i log-rank test za poređenje među ispitivanim grupama. U svim analizama u kojima je nivo značajnosti (p) bio ≤ 0.05 odbacivana je nulta hipoteza, i rezultati su posmatrani kao statistički značajni. Multivarijantna analiza za testiranje veza između preživljavanja i ostalih karakteristika, ispitivana je Cox-ovim metodom proporcionalnih hazarda. Za ispitivanje povezanosti među testiranim parametrima, korišćen je Spearman-ov rho test korelacija.

IV REZULTATI

1. Kliničko-hematološke karakteristike bolesnika sa AML

Retrospektivno ispitivanje je sprovedeno na neselekcionisanom uzorku od 294 odrasla bolesnika sa *de novo* AML. Osnovni demografski i kliničko-hematološki podaci bolesnika na dg bolesti su prikazani u Tabeli 18.

Medijana starosti bolesnika je iznosila 58 godina, pri čemu je u starijoj životnoj dobi (≥ 60 godina) bilo 42,5% (125/294) bolesnika. Zastupljenost muškaraca je bila veća u odnosu na žene (m/ž, 1.32).

Među parametrima pk koji ukazuju na defektnu hematopoezu, analizirani su Tr i Hb. Prosečna vrednost broja Tr u celoj grupi bolesnika je iznosila $67,86 \times 10^9/l$, uz visok stepen varijacija pojedinačnih vrednosti. Učestalost trombocitopenije je 90,5% (266/294). Prosečna vrednost Hb je iznosila 95,03 g/l, a anemija je prisutna kod 91,5% (269/294) bolesnika.

Analizirano je i nekoliko parametara koji odražavaju veličinu leukemijske populacije bolesnika sa AML na dg bolesti: Le, limfadenopatija, hepatomegalija, splenomegalija, procenat blasta u pk i ks (Tabela 1). Naime, prosečna vrednost Le u celoj grupi AML je iznosila $40,71 \times 10^9/L$ (Me $14 \times 10^9/L$), uz visok stepen varijacija pojedinačnih vrednosti. Povišenu vrednost Le ima 53,7% (158/294) bolesnika, pri čemu visoke vrednosti Le ($\geq 30 \times 10^9/l$) ima 37,1% (109/294) a hiperleukocitozu ($\geq 100 \times 10^9/l$) 12,9% (38/294) bolesnika.

Limfadenopatija je registrovana kod 12,2%, a hepatomegalija i/ili splenomegalija kod 23,5% bolesnika. Prosečna vrednost LDH u serumu je iznosila 1551 U/l, uz veoma visok raspon varijacija pojedinačnih vrednosti. Povišenu vrednost LDH (>480 IU) ima 69,1% (134/194) bolesnika.

Tabela 18. Demografske i kliničko-hematološke karakteristike bolesnika sa AML na dg bolesti

Karakteristika	vrednost
Pol f(%)	n=294
muški	56,8 (167/294)
ženski	43,2 (127/294)
Starost	n=294
$\bar{x} \pm SD$ (god)	54,81 \pm 13,74
Me (opseg)	58 (19 - 84)
Leukociti	n=294
$\bar{x} \pm SD$ ($\times 10^9/l$)	40,71 \pm 58,77
Me (opseg)	14 (0,1 - 375,2)
Trombociti	n=294
$\bar{x} \pm SD$ ($\times 10^9/l$)	67,86 \pm 62,47
Me (opseg)	48 (1 - 420)
Hemoglobin	n=294
$\bar{x} \pm SD$ (g/l)	95,03 \pm 17,79
Me (opseg)	93 (46 - 169)
Blasti pk	n=289
$\bar{x} \pm SD$ (% Le)	41,19 \pm 32,50
Me (opseg)	39 (0 - 98)
Blasti ks	n=294
$\bar{x} \pm SD$ (% NĆ)	67,55 \pm 21,65
Me (opseg)	72 (19 - 100)
Limfadenopatija f(%)	n=213
prisutna	12,2 (26/213)
Hepato/splenomegalija f(%)	n=213
prisutna	23,5 (50/213)
LDH	n=153
$\bar{x} \pm SD$ (U/l)	1551,25 \pm 1774,21
Me (opseg)	1017 (150 - 14000)

Skraćenice: ks, kostna srž; LDH, laktat dehidrogenaza; Me, medijana; NĆ, nukleirane ćelije, pk, periferna krv; SD, standardna devijacija; \bar{x} , prosečna vrednost

Citomorfološka analiza ks bolesnika sa AML na dg je pokazala dominaciju leukemijskih ćelija (67,55% NĆ) u odnosu na normalnu hematopoezu. Prisustvo leukemijskih ćelija u pk je otkriveno kod većine bolesnika na dg AML (250/289, 86,5%), pri čemu je srednja vrednost populacije blasta iznosila 41,2% Le.

2. Analiza imunofenotipski definisanih populacija ćelija ks na dijagnozi AML

Populacije ćelija ks bolesnika sa AML na dg su identifikovane na osnovu specifičnih imunofenotipskih karakteristika (Tabela 18./19.).

Tabela 19. Imunološki definisane populacije ćelija ks bolesnika sa AML na dg

Populacije ćelija ks	AML bolesnici	Zdrave kontrole	*P
NĆ $\bar{x} \pm SD$ ($\times 10^6$ ćelija/ml) Me (opseg)	n=294 127,62 \pm 127,66 85 (2 - 750)	n=12 30,12 \pm 27,61 22,5 (12 - 115)	0,002
AĆ CD45/SSC $\bar{x} \pm SD$ (% NĆ) Me (opseg)	n=280 64,24 \pm 24,22 70 (8 - 98)	n=13 0 0	0,000
CD34+ pop. $\bar{x} \pm SD$ (% NĆ) Me (opseg)	n=280 30,17 \pm 27,60 26 (0 - 96)	n=13 0,96 \pm 0,30 1 (0,38 - 1,38)	0,000
CD117+ pop. $\bar{x} \pm SD$ (% NĆ) Me (opseg)	n=280 41,98 \pm 25,60 41 (0,2 - 96)	n=13 0,86 \pm 0,34 0,78 (0,5 - 1,74)	0,000
Σ B-prekursori $\bar{x} \pm SD$ (% NĆ) Me (opseg)	n=280 0,19 \pm 0,69 0 (0 - 8,82)	n=13 1,42 \pm 1,49 1,17 (0,09 - 5,82)	0,000
Granulocitni prekursori $\bar{x} \pm SD$ (% NĆ) Me (opseg)	n=280 31,65 \pm 18,88 25 (8 - 88)	n=13 77,38 \pm 6,10 79 (63 - 84)	0,000
Eozinofili $\bar{x} \pm SD$ (% NĆ) Me (opseg)	n=135 1,95 \pm 2,68 1,1 (0,12 - 19)	n=12 2,84 \pm 1,23 2,75 (1,40 - 5,80)	0,001
Monocitni prekursori $\bar{x} \pm SD$ (% NĆ) Me (opseg)	n=276 18,69 \pm 25,29 6 (0,1 - 96)	n=13 4,31 \pm 0,81 4,2 (3,3 - 5,9)	0,364
Eritrocitni prekursori $\bar{x} \pm SD$ (% Σ NĆ) Me (opseg)	n=186 9,18 \pm 11,57 5 (0 - 63)	n=13 6,15 \pm 3,08 6 (1 - 12)	0,653

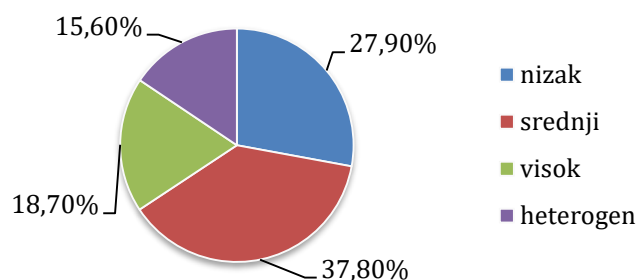
Skraćenice: AĆ, atipične ćelije; ks, kostna srž; Me, medijana; NĆ, nukleirane ćelije; pk, periferna krv; pop., populacija; SD, standardna devijacija; \bar{x} , prosečna vrednost; *Mann-Whitney test u slučaju svih parametara

Procenjavana je njihova relativna zastupljenost u ispitivanim uzorcima i upoređivana sa vrednostima istih populacija ks zdravih kontrolnih uzoraka.

Bolesnici sa AML imaju značajno višu celularnost ks na dg, u poređenju sa celularnošću ks kontrolnih uzoraka ($127,62$ vs. $30,12 \times 10^6$ ćelija/ml, $p=0,002$) (Tabela 19.).

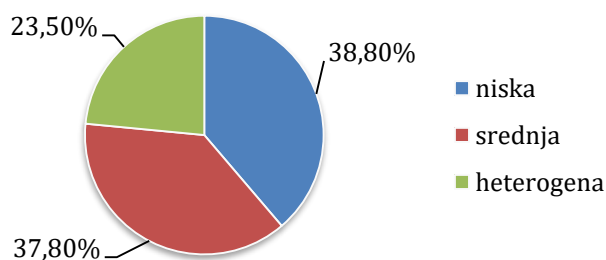
Populacija leukemijskih blasta. Na dg bolesti najzastupljenija populacija u ks bolesnika sa AML su leukemijski blasti, definisani kao atipična populacija prema obrascu CD45/SSC, koja u proseku čini 64,2% NČ ks. Ova vrednost je u značajnoj pozitivnoj linearnoj korelaciji sa prosečnom vrednošću iste populacije procenjene citomorfološki ($64,24$ vs. $67,55\%$, $r=0,65$, $p=0,000$).

Leukemijske ćelije svih bolesnika naše grupe AML eksprimiraju CD45 molekul, ali prema različitim obrascima (Grafikon 1.). Najučestaliji obrasci ekspresije CD45 molekula u AML su srednji ili nizak.



Grafikon 1. Obrasci ekspresije CD45 molekula na leukemijskim ćelijama AML

Populacije leukemijskih ćelija ispitivanih bolesnika sa AML razlikovale su se i po tipu ćelijske granulacije procenjene metodologijom MPC (Grafikon 2.). Najzastupljeniji tipovi ćelijske granulacije leukemijskih ćelija su niska ili srednja, pri čemu je utvrđena manja učestalost heterogene granulacije.



Grafikon 2. Tip ćelijske granulacije leukemijskih ćelija AML

Prosečne vrednosti populacije leukemijskih ćelija sa specifičnim imunofenotipskim karakteristikama, $CD34^+CD45^{low-med}/SSC^{low-med}$ (30,17%) ili $CD117^+CD45^{low-med}/SSC^{low-med}$ (41,98%), su značajno višestruko povišene u ks bolesnika sa AML u poređenju sa vrednostima istih u ks zdravih osoba (Tabela 19.). Ispitivanje korelacije između vrednosti navedenih populacija je pokazalo značajnu pozitivnu linearnu korelaciju ($r=0,356$, $p=0,000$). Pozitivna linearna korelacija je utvrđena i između vrednosti $CD117^+CD45^{low-med}/SSC^{low-med}$ populacije i atipične populacije ćelija definisane samo prema $CD45/SSC$ obrascu ($r=0,355$, $p=0,000$).

Populacija B-ćelijskih prekursora. Populacija B-ćelijskih prekursora – hematogona I/II ($CD19^+CD10^+CD34^{+/-}CD45^{low-med}/FSC^{low}SSC^{low}$), koja je karakteristična za ks zdravih osoba, detektovana je u ks bolesnika sa AML na dg sa učestalošću od 30,7% (86/280), pri čemu je prosečna vrednost iste značajno snižena u AML u odnosu na zdravu kontrolu (0,19% vs. 1,42% NĆ, $p=0,000$) (Tabela 19.).

Populacije granulocitnih prekursora. U ks bolesnika sa AML detektovane su populacije ćelija mijeloidne loze koje su karakteristične za ks zdravih osoba: granulocitni prekursori, monocitni prekursori, eritrocitni prekursori i populacija eozinofila (Tabela 19). Relativni odnosi ovih populacija u ks bolesnika sa AML su izmenjeni u odnosu na ks zdravih kontrola. Prosečna

vrednost populacije granulocitnih prekursora (CD45^{med}/SSC^{med-high}) bolesnika sa AML je značajno snižena u poređenju sa zdravom kontrolom (31,65% vs. 77,38% NĆ, p=0,000), što je slučaj i sa populacijom eozinofila (CD45^{bright}/SSC^{med-high}/FSC^{low})(1,95% vs. 2,84% NĆ, p=0,000). Prosečna vrednost populacije monocitnih prekursora (CD64^{high}CD45^{high}/SSC^{med}), višestruko je povišena u ks bolesnika sa AML u poređenju sa zdravom kontrolom (p>0,05). Prosečna vrednost populacije eritrocitnih prekursora ks (CD36⁺CD41a⁻CD45⁻/SSC^{low}) bolesnika sa AML se nije značajno razlikovala u odnosu na zdravu kontrolu.

Tabela 20. Zastupljenost populacija limfocita u ks bolesnika sa AML na dg

Populacije limfocita ks	AML bolesnici	Zdrave kontrole	*P
Li $\bar{x} \pm SD$ (% NĆ) Me (opseg)	n=280 11,17 \pm 11,99 6,5 (1 - 60)	n=13 14,08 \pm 5,39 12 (9 - 28)	0,005
B-Li $\bar{x} \pm SD$ (% Li) Me (opseg)	n=279 16,12 \pm 10,48 14 (0 - 73)	n=13 15,85 \pm 7,73 16 (6 - 35)	0,785
T-Li $\bar{x} \pm SD$ (% Li) Me (opseg)	n=256 67,90 \pm 12,17 69,5 (23 - 92)	n=13 72,31 \pm 12,23 77 (50 - 88)	0,152
CD4⁺ T-Li $\bar{x} \pm SD$ (% Li) Me (opseg)	n=250 35,09 \pm 9,26 35 (3 - 66)	n=12 38,67 \pm 6,17 37,5 (30 - 49)	0,187
NKT-Li $\bar{x} \pm SD$ (% Li) Me (opseg)	n=165 6,98 \pm 5,68 5,4 (0 - 28)	n=13 4,55 \pm 4,98 3 (1 - 17)	0,047
NK-Li $\bar{x} \pm SD$ (% Li) Me (opseg)	n=230 11,49 \pm 6,72 11 (0 - 39)	n=13 8,73 \pm 6,70 6 (3 - 25)	0,051

Skraćenice: ks, kostna srž; Li, limfociti; Me, medijana; NĆ, nukleirane ćelije; SD, standardna devijacija; \bar{x} , prosečna vrednost; *Mann-Whitni U test u slučaju svih parametara, osim CD4 T-Li (t-test).

Populacija limfocita. Prosečna relativna vrednost ukupne populacije limfocita (CD45^{bright}/SSC^{low}) u ks bolesnika sa AML na dg je značajno snižena u poređenju sa zdravom kontrolom (11% vs. 14% NĆ, p=0,005) (Tabela 20.).

U okviru populacije Li, relativni odnosi ispitivanih populacija T-Li, B-Li, NK-Li, i NKT-Li su očuvani u ks bolesnika sa AML u poređenju sa zdravim

kontrolnim uzorcima. Pritom, najzastupljenija je populacija T-Li (67,9% Li), a zatim B-Li (16,12% Li), NK-Li (11,49%), i NKT-limfocita (6,98% Li). Utvrđeno je značajno relativno povećanje populacije NKT-Limfocita, i na granici značajnog, povećanje populacije NK-limfocita u odnosu na zdravu kontrolu.

3. Ispitivanje imunofenotipskih karakteristika AML

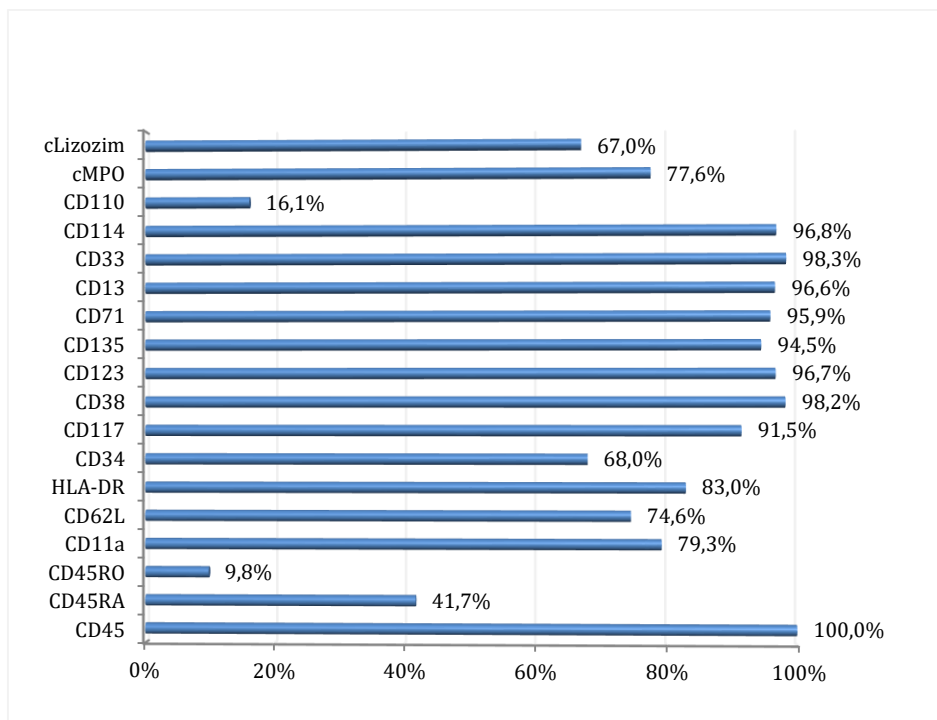
3.1. Imunofenotipske karakteristike populacije leukemijskih blasta na dg AML

Različiti aspekti ekspresije ranih linijski nespecifičnih i ranih mijelomonocitnih hLDM na populaciji leukemijskih blasta naše grupe bolesnika sa AML na dg, prikazani su na Grafikonu 3./4. i u Tabeli 21.

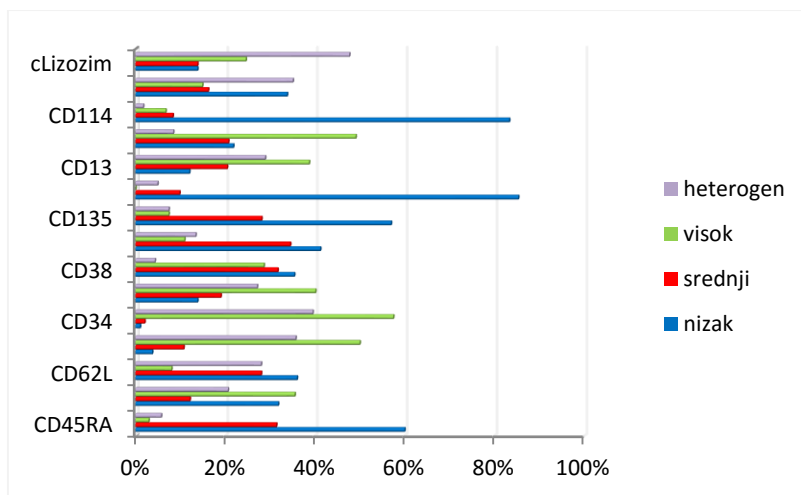
Ekspresija panleukocitnog molekula CD45 je utvrđena na leukemijskim blastima svih bolesnika sa AML, pri čemu je učestalost ekspresije izoforme CD45RA (41,7%) znatno veća u odnosu na izoformu CD45RO (9,8%). Molekul CD45RA je eksprimiran na subpopulaciji L^C, najčešće prema obrascu niske ekspresije.

Molekul HLA-DR kao i panleukocitni adhezioni molekuli CD11a i CD62L su eksprimirani na populaciji leukemijskih blasta sa visokom učestalošću (~80%), uz prosečnu ekspresiju na jednoj polovini (CD11a i CD62L) odnosno dve trećine (HLA-DR) populacije blasta. Molekul HLA-DR je eksprimiran prema obrascu visoke ili heterogene ekspresije. Populaciju blasta karakteriše najčešće visok ili nizak obrazac ekspresije CD11a molekula, dok su obrasci ekspresije CD62L molekula veoma varijabilni.

Među ranim linijski nespecifičnim hLDM, visoku učestalost ekspresije (>80%) na populaciji leukemijskih blasta su pokazali CD38, CD123, CD135, CD117, i CD71. Molekul CD34 je eksprimiran sa nešto nižom učestalošću (68%), dok je učestalost ekspresije CD110 veoma niska (16%).



Grafikon 3. Učestalost ekspresije ranih linijski nespecifičnih i ranih mijelomonocitnih hLDM na blastima AML



Grafikon 4. Učestalost obrazaca ekspresije ranih linijski nespecifičnih i ranih mijelomonocitnih hLDM na blastima AML

Svi navedeni leukocitni molekuli, izuzev CD110, ekspimirani su na oko dve trećine populacije leukemijskih ćelija. Nizak ili srednji obrazac ekspresije karakteriše CD38, CD123 i CD135, dok je CD71 ekspimiran pretežno prema

niskom obrascu na populaciji leukemijskih blasta. Visok ili heterogen obrazac ekspresije karakteriše molekule CD34, HLA-DR i CD117.

Rani diferencijacioni mijelomonocitni molekuli, CD13, CD33 i CD114, eksprimirani su sa visokom učestalošću (>96%) na oko tri četvrtine populacije LĆ. Molekul CD33 karakteriše pretežno visok obrazac ekspresije, molekul CD13 visok ili heterogen obrazac ekspresije, dok je CD114 eksprimiran pretežno prema niskom obrascu.

Tabela 21. Prosečna ekspresija ranih linijski nespecifičnih i ranih mijelomonocitnih hLDM na populaciji blasta AML

hLDM	$\bar{x} \pm SD$ (% LĆ)	medijana (opseg)
CD45RA (n=84)	24,75 ± 28,96	11 (1 - 93)
CD45RO (n=82)	6,63 ± 13,09	2 (0 - 71)
CD11a (n=135)	60,87 ± 34,49	69 (1 - 100)
CD62L (n=67)	48,31 ± 28,99	49 (1 - 98)
HLA-DR (n=294)	73,33 ± 34,12	90,5 (0 - 100)
CD34 (n=294)	52,26 ± 40,46	59,5 (1 - 100)
CD117 (n=294)	67,13 ± 29,95	78 (1 - 100)
CD38 (n=164)	83,87 ± 22,16	95 (8 - 100)
CD123 (n=123)	71,73 ± 23,91	81 (1 - 99)
CD135 (n=128)	73,45 ± 25,53	83 (2 - 100)
CD71 (n=170)	67,51 ± 22,78	71 (5 - 98)
CD13 (n=294)	77,74 ± 24,60	89 (1 - 100)
CD33 (n=290)	81,54 ± 25,30	95 (1 - 100)
CD114 (n=62)	68,37 ± 20,10	71,5 (8 - 99)
CD110 (n=62)	7,73 ± 11,71	2,5 (1 - 55)
cMPO (n=286)	46,92 ± 35,61	42 (0 - 100)
cLizozim (n=97)	35,18 ± 33,43	23 (1 - 100)

Skraćenice: c, citoplazmatski molekul; hLDM, humani leukocitni diferencijacioni molekul; SD, standardna devijacija; \bar{x} , prosečna vrednost

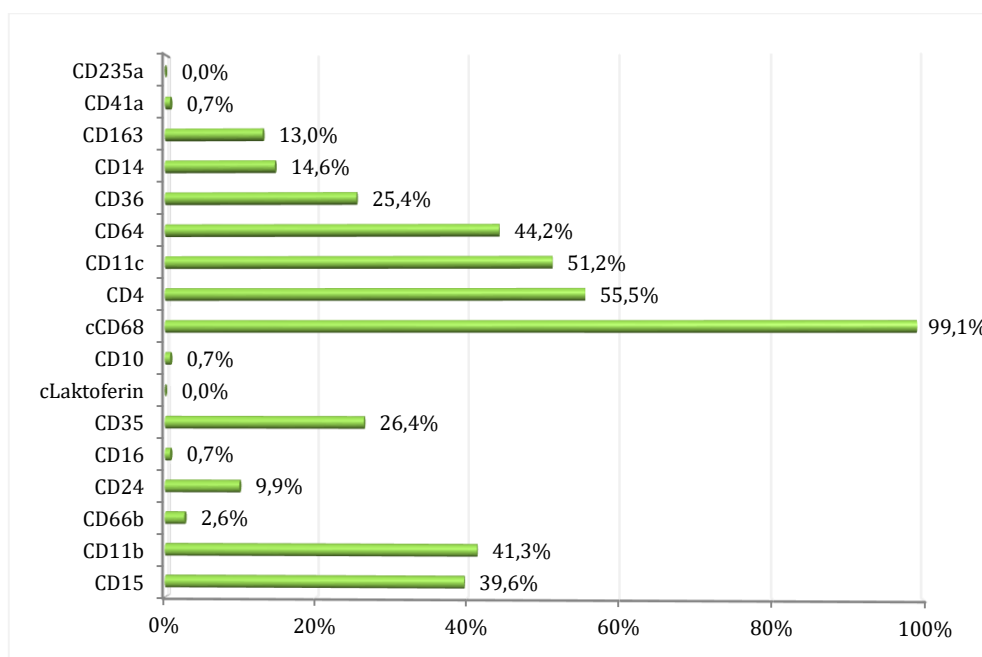
Različiti aspekti ekspresije kasnijih mijelomonocitnih hLDM na populaciji

Molekuli cMPO i cLizozim su eksprimirani sa višom učestalošću na leukemijskim blastima. Vrednost prosečne ekspresije ovih molekula (<50% LĆ) ukazuje da su eksprimirani na subpopulaciji leukemijskih blasta. Najučestaliji

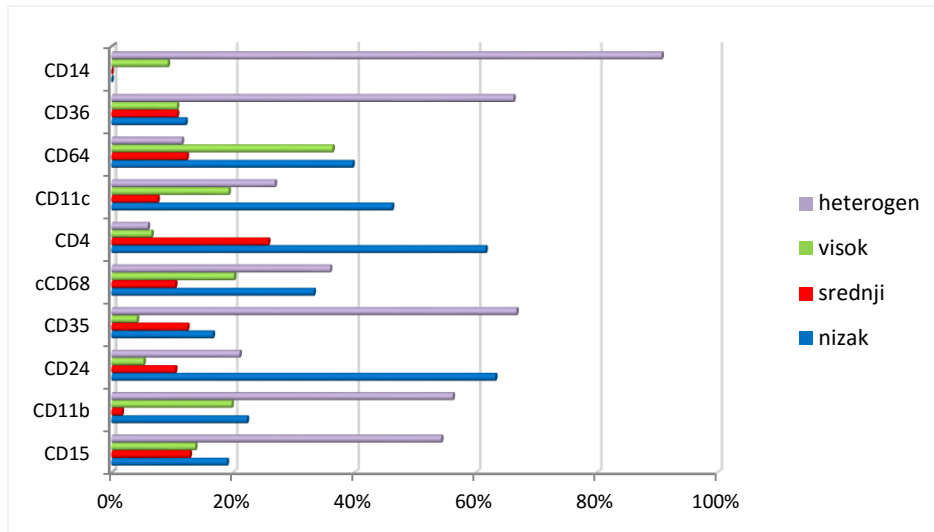
obrasci ekspresije u slučaju cMPO su nizak ili heterogen, a u slučaju cLizozima heterogen ili visok.

Različiti aspekti ekspresije kasnijih mijelomonocitnih hLDM na populaciji leukemijskih blasta naše grupe bolesnika sa AML prikazani su na Grafikonu 5./6. i Tabeli 22. Među kasnijim diferencijacionim mijelomonocitnim molekulima, najveću učestalost ekspresije–ispoljava cCD68 (99%). Sa druge strane, molekuli CD15, CD11b, CD11c, CD4, CD64, CD36 i CD35 su ekspimirani sa nižom učestalošću (<60% slučajeva), pri čemu je učestalost ekspresije CD14, CD163, CD24, CD66b, CD16, CD10 i CD41a veoma niska (<16% slučajeva). Molekuli cLaktoferin i CD235a nisu bili ekspimirani na populaciji leukemijskih ćelija.

Prosečna vrednost ekspresije cCD68 molekula ukazuje da je on ekspimiran na većini ćelija leukemijske populacije. Molekuli CD15, CD11b, CD4, CD11c i CD64 su ekspimirani na jednoj trećini populacije leukemijskih ćelija.



Grafikon 5. Učestalost ekspresije kasnih mijelomonocitnih hLDM na blastima AML



Grafikon 6. Učestalost obrazaca ekspresije kasnih mijelomonocitnih hLDM na blastima AML

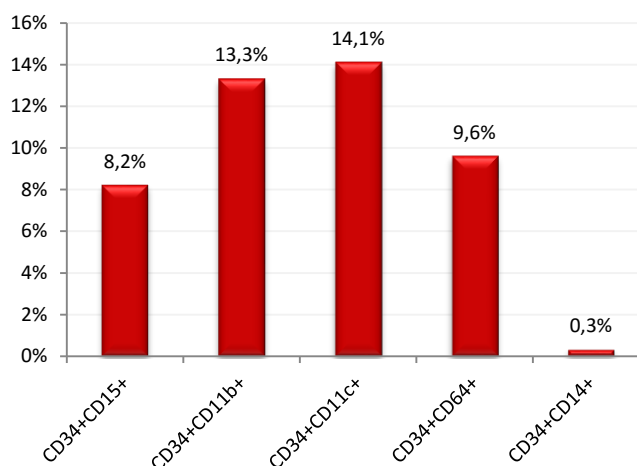
Tabela 22. Prosečna ekspresija kasnijih mijelomonocitnih hLDM na populaciji blasta AML

hLDM	$\bar{x} \pm SD$ (% LČ)	medijana (opseg)
CD15 (n=293)	25,03 ± 27,27	12 (1 - 98)
CD11b (n=293)	28,31 ± 29,70	15 (1 - 98)
CD66b (n=271)	3,49 ± 5,65	2 (0 - 52)
CD24 (n=191)	8,62 ± 14,20	4 (0 - 88)
CD16 (n=276)	2,82 ± 3,54	1,5 (0 - 32)
CD35 (n=91)	14,73 ± 18,33	7 (0 - 100)
cLaktoferin (n=33)	1,70 ± 1,55	1 (0 - 7)
CD10 (n=279)	2,34 ± 4,92	1 (0 - 71)
cCD68 (n=115)	80,91 ± 20,09	87 (7 - 100)
CD4 (n=272)	34,92 ± 30,31	24 (0 - 100)
CD11c (n=283)	31,34 ± 31,66	20 (1 - 100)
CD64 (n=274)	29,16 ± 30,85	14 (1 - 100)
CD36 (n=291)	18,68 ± 25,03	8 (1 - 93)
CD14 (n=294)	8,32 ± 13,50	2 (0 - 76)
CD163 (n=92)	7,82 ± 14,74	2 (0 - 81)
CD41a (n=287)	2,80 ± 3,90	1 (0 - 40)
CD235a (n=190)	4,76 ± 4,04	3 (0 - 19)

Skraćenice: c, citoplazmatski molekul; hLDM, humani leukocitni diferencijacioni molekul; SD, standardna devijacija; \bar{x} , prosečna vrednost

3.2. Imunofenotipske aberacije u ekspresiji hLDM na blastima AML na dg bolesti

Populacije leukemijskih blasta naše grupe bolesnika sa AML, ispitivane su na dg i za prisustvo različitih tipova imunofenotipskih aberacija u ekspresiji hLDM. U slučaju *maturacione asinhronije*, koekspresija CD34 i bar jednog od kasnijih diferencijacionih mijelomonocitnih molekula (CD15, CD11b, CD11c, CD64, CD14) (Slika 7.), otkrivena je kod 25,9% (76/294) naših bolesnika. Učestalost koekspresije CD34 i kasnijih diferencijacionih molekula mijelo/monocitne loze je prikazana na Grafikonu 7.

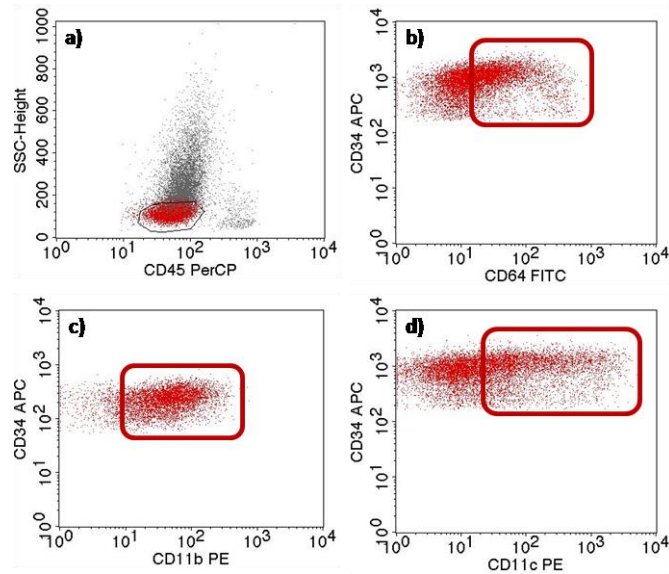


Grafikon 7. Učestalost različitih tipova maturacione asinhronije u ekspresiji CD34 i kasnijih mijelomonocitnih hLDM na blastima AML

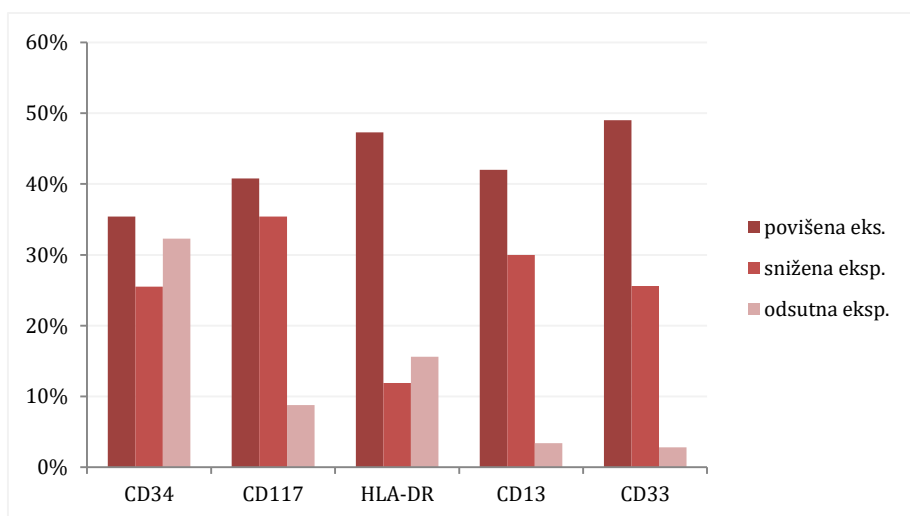
Pojedinačni tipovi maturacione asinhronije otkriveni su sa relativno niskom učestalošću u celoj grupi naših bolesnika sa AML (<15% svaki). Najveću učestalost su pokazali tipovi koji uključuju koekspresiju CD34/CD11c, CD34/CD11b, CD34/CD64 i CD34/CD15 molekula. S druge strane, najnižu učestalost ispoljila je koekspresija CD34/CD14 molekula. Najveći broj bolesnika je imao samo jedan (13,6%) ili dva (8,2%) tipa maturacione asinhronije na dg AML.

Atipično *povišen nivo ekspresije* bar jednog od pet ispitivanih hLDM je otkriven sa visokom učestalošću od 90,1% (265/294). Kod svih ispitivanih

hLDM, pokazano je prisustvo atipično povišenog nivoa ekspresije, sa učestalošću od ~40% za molekule CD34, CD117 i CD13, odnosno ~50% za molekule CD33 i HLA-DR (Grafikon 8.) Najveći broj bolesnika je imao povećanu ekspresiju samo jednog (23,8%), dva (29,3%) ili tri (21,8%) molekula.



Slika 7. Primeri maturacione asinhronije u ekspresiji CD34 i kasnijih diferencijacionih mijelomonocitnih molekula na populaciji blasta bolesnika sa AML, prikazani na dvoparametarskim „dot plot“ histogramima fluorescencije: a) populacija leukemijskih blasta prema CD45/SSC obrascu; b) parcijalna koekspresija CD34 i CD64 molekula; c) koekspresija CD34 i CD11b molekula; d) parcijalna koekspresija CD34 i CD11c molekula.

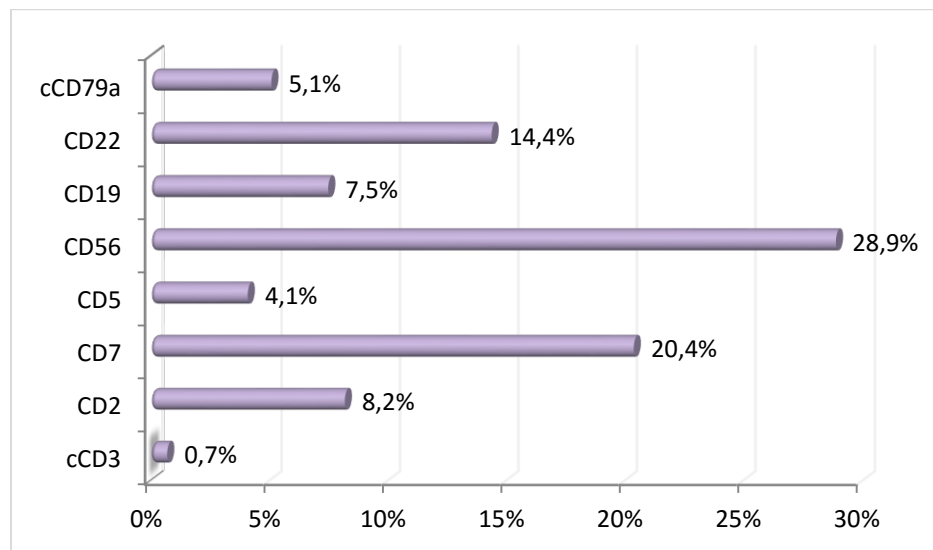


Grafikon 8. Učestalost imunofenotipskih aberacija u obrascu ekspresije pet ispitivanih hLDM na blastima AML

Atipično **snižen nivo ekspresije** bar jednog od ispitivanih hLDM, utvrđen je sa učestalošću od 75,5% (222/294) u celoj grupi bolesnika. Snižen nivo ekspresije CD117 ili CD13 je utvrđen kod jedne trećine, odnosno CD33 ili CD34 kod jedne četvrtine bolesnika, dok je u slučaju HLA-DR molekula učestalost ove aberacije bila niska (11,9%) (Grafikon 8.). Leukemijske ćelije najvećeg broja bolesnika sa AML, pokazale su snižen nivo ekspresije jednog (40,5%) ili dva (20,1%) ispitivana molekula.

Atipično **odsustvo ekspresije** bar jednog od ispitivanih hLDM, utvrđeno je kod 41,5% (122/294) bolesnika. Najučestalije atipično odsustvo ekspresije na leukemijskim ćelijama je utvrđeno u slučaju CD34 (32,3%) i HLA-DR (15,6%), dok je u slučaju CD117, CD13 i CD33, učestalost ovog tipa aberacije bila niska (<10% slučajeva) (Grafikon 8.). Najveći broj bolesnika sa AML je pokazao odsustvo ekspresije jednog (23,5%) ili dva (15,3%) molekula.

Ektopična ekspresija bar jednog od ispitivanih limfoidnih hLDM na leukemijskim ćelijama AML, otkrivena je sa učestalošću od 57,1% (168/294) u celoj grupi bolesnika.



Grafikon 9. Učestalost ekspresije limfoidnih hLDM na leukemijskim blastima bolesnika sa AML na dg

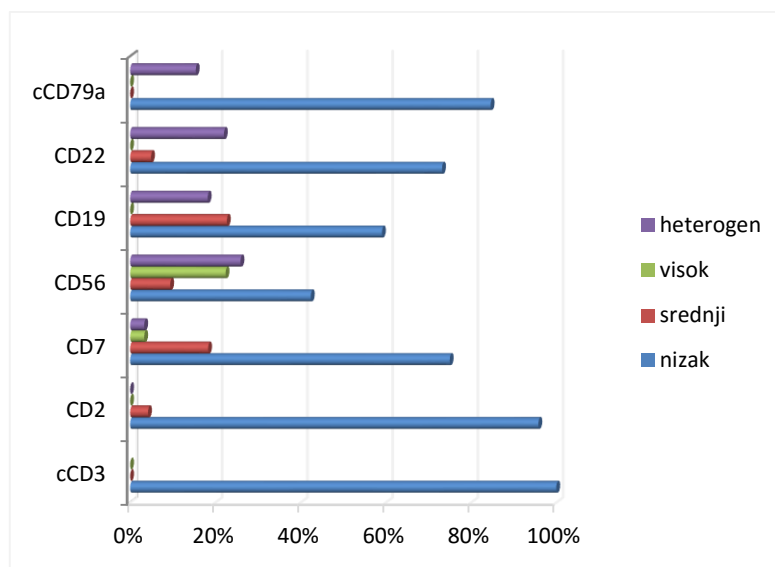
Različiti aspekti ekspresije limfoidnih hLDM na populaciji leukemijskih blasta je prikazana na Grafikonu 9./10. i Tabeli 23. Najveća učestalost ekspresije

je utvrđena u pogledu CD56 (28,9%), CD7 (20,4%) i CD22 (14,4%) molekula. Niža učestalost ekspresije je utvrđena u slučaju CD2, CD19, CD5 i cCD79a molekula (<10% slučajeva). Vrednosti prosečne ekspresije svih ispitivanih limfoidnih molekula (Tabela 23.), ukazuju da su u proseku eksprimirani na relativno maloj subpopulaciji LĆ (<20% pop.). Najveća prosečna ekspresija na subpopulaciji leukemijskih blasta karakteriše molekule CD56 (19%) i CD7 (15%). Ispitivanje povezanosti ektopične ekspresije grupe limfoidnih molekula, pokazalo je prisustvo pozitivne linearne korelacije u ekspresiji cCD79a i CD19 ($r=0,286$, $p=0,000$) i cCD79a i CD22 ($r=0,247$, $p=0,000$), pri čemu ni u jednom slučaju nije registrovana koekspresija cCD79a, CD19 i CD22 molekula. Molekuli CD56 i CD2 nisu pokazali povezanost u ekspresiji ni sa jednim od ostalih limfoidnih molekula.

Tabela 23. Prosečna vrednost ekspresije limfoidnih hLDM na blastima AML

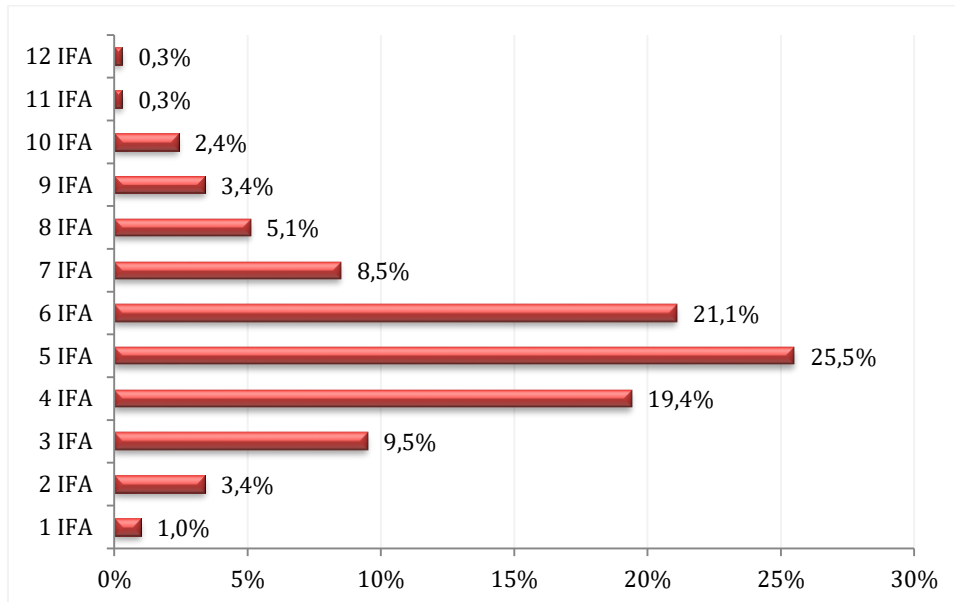
hLDM	$\bar{x} \pm SD$ (% LĆ)	medijana (opseg)
cCD3 (n=294)	1,45 ± 3,22	1 (0 - 44)
CD2 (n=294)	6,54 ± 12,93	2 (0 - 93)
CD7 (n=294)	14,70 ± 23,74	3 (0 - 98)
CD5 (n=49)	3,88 ± 6,04	1 (0 - 27)
CD56 (n=294)	19,17 ± 28,32	5 (0 - 100)
CD19 (n=294)	5,76 ± 12,96	1 (0 - 81)
CD22 (n=284)	9,93 ± 16,54	3 (0 - 95)
cCD79a (n=256)	2,52 ± 4,93	1 (0 - 43)

Skraćenice: c, citoplazmatski molekul; hLDM, humani leukocitni diferencijacioni molekul; SD, standardna devijacija; \bar{x} , prosečna vrednost



Grafikon 10. Učestalost obrazaca ekspresije limfoidnih hLDM na blastima naše grupe bolesnika sa AML

Najučestaliji obrazac ektopične ekspresije svih limfoidnih molekula na populaciji blasta AML je nizak (Grafikon 10.).



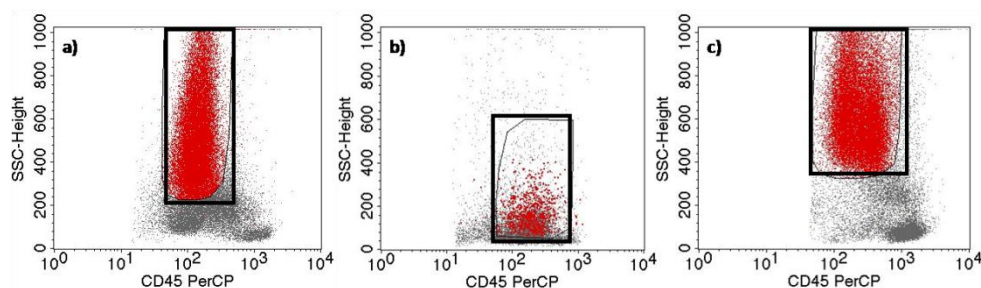
Grafikon 11. Učestalost broja imunofenotipskih aberacija (IFA) u ekspresiji hLDM na populaciji leukemijskih blasta AML na dg, izražena po bolesniku

Najveći broj bolesnika sa AML ekspirira samo jedan limfoidni molekul (35,7%), dok je koekspresija dva (16%) ili tri (4,8%) molekula niža.

Analiza učestalosti različitih tipova imunofenotipskih aberacija u ekspresiji hLDM u celoj grupi AML, pokazala je kod svakog od ispitivanih bolesnika prisustvo bar jednog od tipova imunofenotipskih aberacija (Grafikon 11.). Leukemijski blasti dve trećine bolesnika sa AML su pokazali istovremeno prisustvo četiri, pet ili šest imunofenotipskih aberacija u ekspresiji.

3.3. Imunofenotipske karakteristike populacije granulocitnih prekursora AML na dg

Populacija granulocitnih prekursora ks naše grupe bolesnika sa AML na dg, ispitivana je u cilju utvrđivanja poremećaja u ćelijskoj granulaciji (obrazac CD45/SSC), ćelijskom sastavu (ekspresije molekula CD66b, CD16, CD10), kao i u cilju utvrđivanja prisustva imunofenotipskih aberacija u ekspresiji hLDM (CD34, CD135, HLA-DR, CD13, CD33, CD15, cMPO, CD45) na ovoj populaciji ćelija. Pokazano je prisustvo bar jednog od navedenih poremećaja kod 54,6% (153/280) bolesnika.



Slika 8. Tipovi ćelijske granulacije populacije granulocitnih prekursora ks: a) atipična granulacija - bolesnik sa AML; b) atipična hipogranulacija - bolesnik sa AML; c) tipična granulacija - zdrava kontrolna ks.

Ispitivanje promene u obrascu *ćelijske granulacije* granulocitnih prekursora AML (Slika 8.), pokazalo je prisustvo *atipične granulacije* sa

učestalošću od 66,7% (108/162), dok je obrazac ćelijske granulacije po tipu **atipična hipogranulacija** bio prisutan sa učestalošću od 17,9% (29/162).

Prosečne vrednosti subpopulacija granulocitnih prekursora ks bolesnika sa AML na dg i zdravih kontrolnih uzoraka, prikazane su u Tabeli 24.

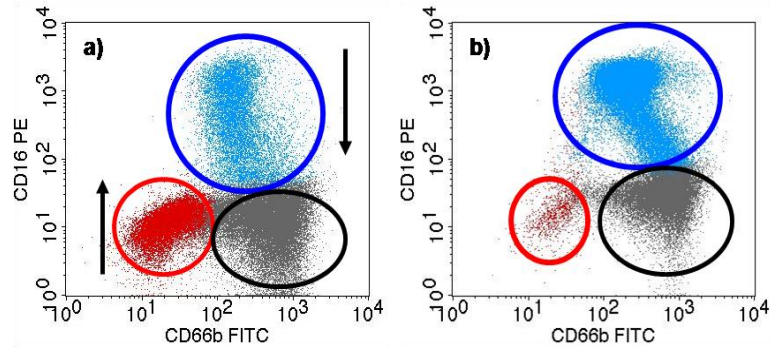
Tabela 24. Ćelijski sastav populacije granulocitnih prekursora ks bolesnika sa AML na dg i zdravih kontrolnih uzoraka

Subpopulacije granulocitnih prekursora ks	AML bolesnici	Zdrave kontrole	p
Promijelociti	n=150	(n=13)	
$\bar{x} \pm SD$ (% Gr prek)	37,11 \pm 20,24	1,62 \pm 0,77	0,000
Me (opseg)	32,5 (3 - 90)	1 (1 - 3)	
Mijelociti	n=152	n=13	
$\bar{x} \pm SD$ (% Gr prek)	38,27 \pm 15,10	37,54 \pm 10,71	0,818
Me (opseg)	39 (5 - 75)	38 (23 - 60)	
Metamijelociti	n=152	n=13	
$\bar{x} \pm SD$ (% Gr prek)	15,97 \pm 10,81	24,00 \pm 5,02	0,002
Me (opseg)	13,50 (0 - 60)	25 (16 - 31)	
Neutrofili	n=152	n=13	
$\bar{x} \pm SD$ (% Gr prek)	8,52 \pm 9,60	36,85 \pm 10,88	0,000
Me (opseg)	5 (0 - 44)	40 (20 - 60)	

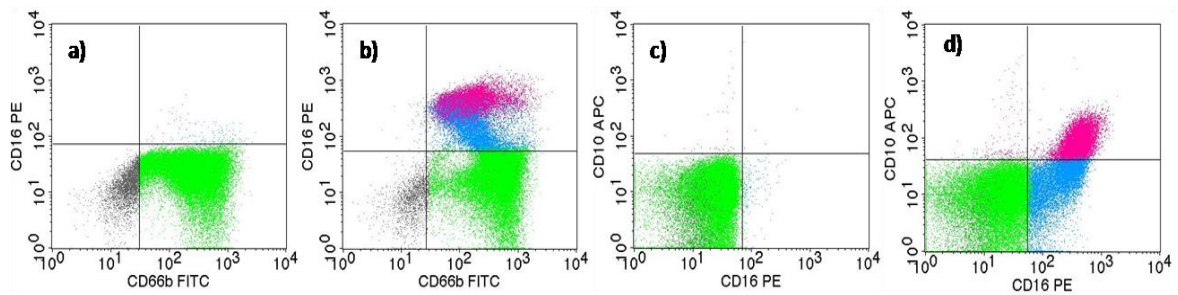
Skraćenice: ks, kostna srž; Me, medijana; SD, standardna devijacija; \bar{x} , prosečna vrednost.

Ispitivanje **ćelijskog sastava populacije granulocitnih prekursora** je pokazalo da kod bolesnika sa AML dolazi do višestrukog povećanja subpopulacije promijelocita i istovremenog značajnog sniženje subpopulacija metamijelocita i neutrofila u ks (Slika 9.).

„**Šift u levo**“ u populaciji granulocitnih prekursora je utvrđeno kod 94,7% (144/152) bolesnika, dok je blok u sazrevanju do stupnja metamijelocit ili neutrofil utvrđen kod 67,1% (102/152) bolesnika (Slika 10.).

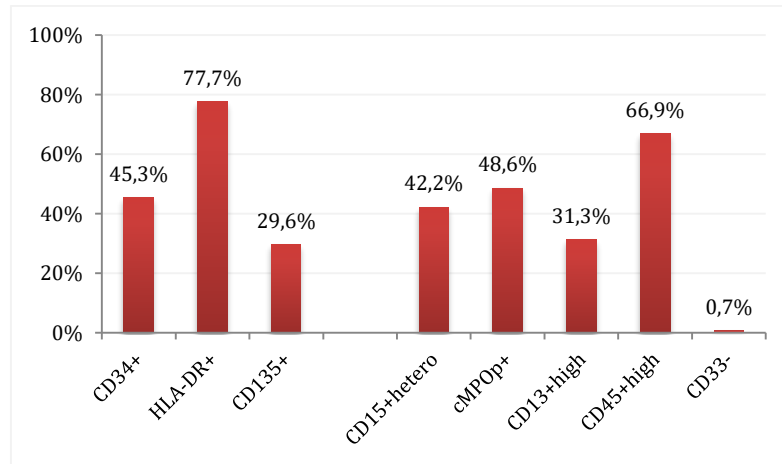


Slika 9. Ćelijski sastav populacije granulocitnih prekursora ks, definisan na osnovu imunofenotipskih karakteristika: a) AML sa prisutnim „šiftom u levo” ka nezrelim ćelijama; b) zdrava kontrolna ks. Dvoparametarski „dot plot” histogrami fluorescencije: crvena subpopulacija - promijelociti (CD66b-CD16⁻), siva populacija - mijelociti (CD66b⁺CD16⁻), plava populacija - metamijelociti/neutrofil (CD66b⁺CD16⁺).

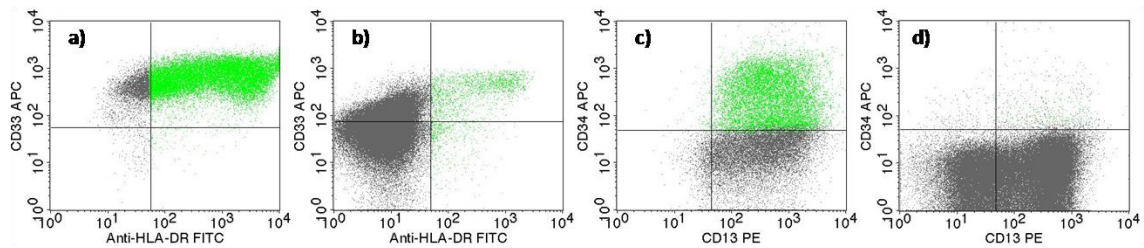


Slika 10. Ćelijski sastav populacije granulocitnih prekursora ks definisan na osnovu imunofenotipskih karakteristika: a) i c) bolesnik sa AML na dg sa blokom u sazrevanju leukemijskih granulocitnih prekursora do stupnja metamijelocit/neutrofil; b) i d) zdrava kontrolna ks. Dvoparametarski „dot plot” histogrami fluorescencije: siva subpopulacija - promijelociti (CD66b-CD16-CD10⁻), zelena subpopulacija - mijelociti (CD66b⁺CD16-CD10⁻), plava subpopulacija - metamijelociti (CD66b⁺CD16⁺CD10⁻), ružičasta subpopulacija - neutrofil (CD66b⁺CD16⁺CD10⁺).

Prisustvo maturacione asinhronije u ekspresiji ranih linijski nespecifičnih hLDM na populaciji granulocitnih prekursora, ispitivano je u slučaju molekula CD34, HLA-DR i CD135 (Grafikon 12./ Slika 11.).



Grafikon 12. Učestalost imunofenotipskih aberacija u ekspresiji hLDM na populaciji granulocitnih prekursora ks bolesnika sa AML na dg



Slika 11. Primeri imunofenotipskih aberacija u ekspresiji ranih hLDM na granulocitnim prekursorima ks naših bolesnika sa AML na dg, prikazani na dvoparametarskim „dot plot“ histogramima fluorescencije: a) maturaciona asinhronija u ekspresiji HLA-DR molekula; b) regularan obrazac ekspresije HLA-DR molekula na granulocitnim prekursorima zdrave ks; c) maturaciona asinhronija u ekspresiji CD34 molekula i atipično visok nivo ekspresije CD13 molekula; b) regularan obrazac ekspresije CD34 i CD13 molekula na granulocitnim prekursorima zdrave ks.

Najveća učestalost je utvrđena u pogledu molekula HLA-DR, dok je u slučaju CD34 i CD135 bila dvostruko niža. Imunofenotipske aberacije po tipu promene u obrascu ekspresije CD45 i grupe diferencijacionih mijelomonocitnih molekula, otkrivene su sa najvećom učestalošću u slučaju molekula CD45 (CD45^{+high}, 66,9%), cMPO (cMPO^{p+}, 48,6%), CD15 (CD15^{+hetero}, 42%) i CD13 (CD13^{+high}, 31,3%).

Ektopična ekspresija bar jednog od ispitivanih molekula limfoidne loze na populaciji granulocitnih prekursora, otkrivena je sa učestalošću od 19,9% (30/151). Najveća učestalost ektopične ekspresije je utvrđena u slučaju CD56 (11,3%) i CD7 (5,9%) molekula, pri čemu je koekspresija CD56/CD7 (1,3%) odnosno CD56/CD2 (0,7%) bila veoma retka. Sa druge strane, učestalost ektopične ekspresije CD2 (2,7%) i CD19 (2%) molekula je bila veoma niska.

3.4. Imunofenotipske karakteristike populacije monocitnih prekursora AML na dg

Populacija monocitnih prekursora ks bolesnika sa AML na dg, analizirana je u cilju utvrđivanja poremećaja u njenom ćelijskom sastavu (ekspresija molekula CD64 i CD14), kao i u cilju utvrđivanja prisustva imunofenotipskih aberacija u ekspresiji hLDM (CD56, CD2, CD24). Dokazano je prisustvo bar jednog od navedenih poremećaja kod 38,6% (108/280) bolesnika sa AML. Prosečne vrednosti subpopulacija ćelija koje sačinjavaju populaciju monocitnih prekursora ks bolesnika sa AML na dg i zdravih kontrolnih uzoraka, prikazane su u Tabeli 25./Slika 11.

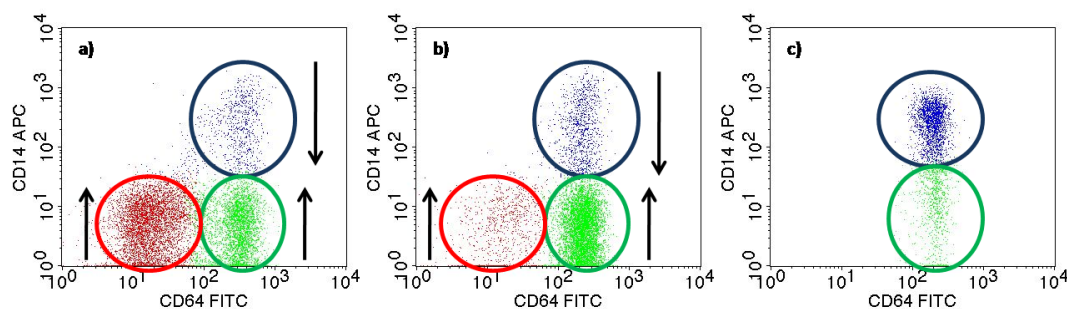
Ispitivanje *ćelijskog sastava populacije monocitnih prekursora*, pokazalo je da u ks bolesnika sa AML dolazi do značajnog povećanja subpopulacija mijelo/monoblasta i promonocita, uz značajno sniženje subpopulacije monocita u poređenju sa zdravim kontrolama ($p < 0,05$).

Ektopična ekspresija bar jednog od ispitivanih limfoidnih hLDM na populaciji monocitnih prekursora, otkrivena je sa učestalošću od 18,9% u celoj grupi AML. Najveća učestalost ektopične ekspresije je utvrđena u pogledu molekula CD56 (12,5%), pri čemu je koekspresija CD56/CD2 (1,9%) bila retka. Ektopična ekspresija molekula CD2 (3,8%) i CD24 (2,9%) je bila niska.

Tabela 25. Čelijski sastav populacije monocitnih prekursora ks bolesnika sa AML na dg i zdravih kontrolnih uzoraka

Subpopulacije monocitnih prekursora ks	AML bolesnici	Zdrave kontrole	*p
Mijelo/monoblasti $\bar{x} \pm SD$ (% Mo prek.) Me(opseg)	n=101 33,05 \pm 28,93 23 (0 - 99)	-	-
Promonociti $\bar{x} \pm SD$ (% Mo prek.) Me (opseg)	n=103 38,34 \pm 24,80 34 (0 - 97)	n=13 21,69 \pm 9,38 20 (11 - 47)	0,016
Monociti $\bar{x} \pm SD$ (% Mo prek.) Me (opseg)	n=103 28,98 \pm 24,84 22 (1 - 93)	n=13 78,31 \pm 9,38 80 (53 - 89)	0,000

Skraćenice: ks, kostna srž; Me, medijana; Mo prek., monocitni prekursori; SD, standardna devijacija; \bar{x} , prosečna vrednost; *, Mann-Whitney test



Slika 11. Čelijski sastav populacije monocitnih prekursora ks definisan na osnovu imunofenotipskih karakteristika: a) Akutna mijelomonocitna leukemija sa prisutnim šiftom u levo ka nezreljim ćelijama – monoblasti i promonociti; b) Akutna monocitna leukemija sa prisutnim šiftom u levo ka nezreljim ćelijama – predominacija promonocita; c) zdrava kontrolna ks. Dvoparametarski “dot plot” histogrami fluorescencije: crvena subpopulacija - mijelomonoblasti (CD64⁻CD14⁻), zelena populacija – promonociti (CD64^{high}CD14⁻), plava populacija - monociti (CD64^{high}CD14⁺).

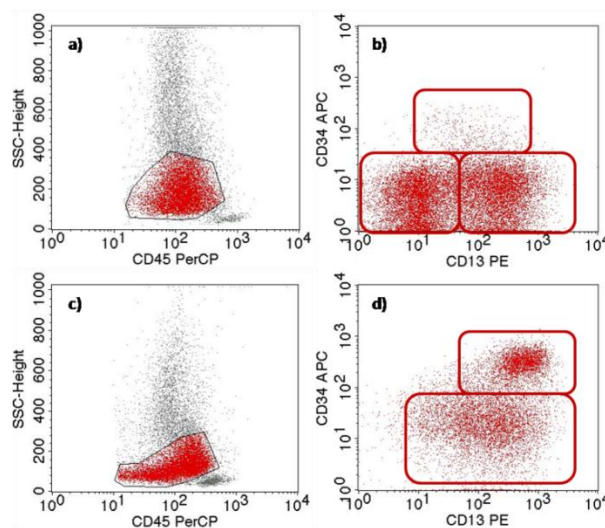
3.5. Ispitivanje ćelijskog sastava populacije leukemijskih ćelija AML na dg

Populacije leukemijskih ćelija bolesnika su ispitivane za prisustvo nekoliko vidova ćelijske heterogenosti. Bar jedan od ispitivanih vidova ćelijske

heterogenosti leukemijske populacije AML otkriven je kod 83,4% (242/290) bolesnika.

U odnosu na ekspresiju leukocitnih molekula **CD34/CD13** u AML na dg (n=280) (Slika 12.), prisustvo samo jedne populacije leukemijskih ćelija je utvrđeno kod 41,4% bolesnika, dok je kod ostalih bolesnika utvrđeno prisustvo dve (49,6%), tri (8,2%) ili četiri (0,7%) subpopulacije leukemijskih ćelija.

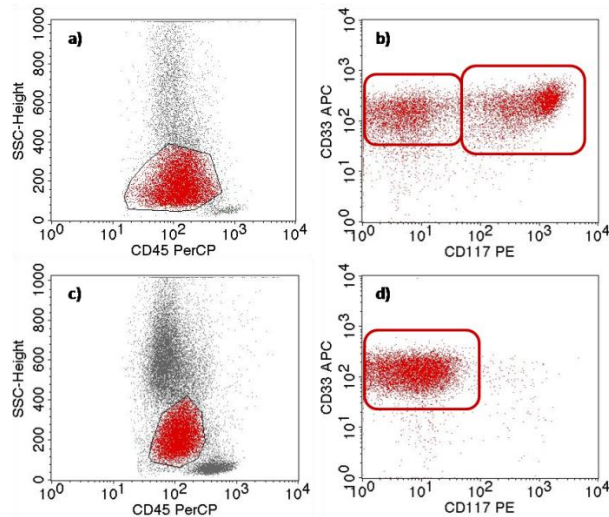
U odnosu na ekspresiju leukocitnih molekula **CD117/CD33** u AML na dg (n=288) (Slika 13.), prisustvo samo jedne populacije leukemijskih ćelija je utvrđeno kod 46,9% bolesnika, dok je kod ostalih bolesnika utvrđeno prisustvo dve (48,6%) ili tri (4,5%) subpopulacije leukemijskih ćelija.



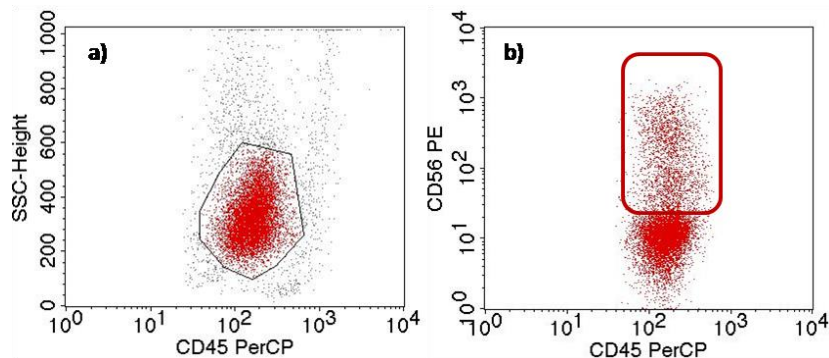
Slika 12. Primeri heterogenosti leukemijske populacije ćelija bolesnika sa AML na dg: a) i c) populacije leukemijskih ćelija (crvena boja) definisane na osnovu CD45/SSC obrasca; b) tri subpopulacije leukemijskih ćelija definisane na osnovu ekspresije CD13/CD34 molekula; d) dve subpopulacije leukemijskih ćelija definisane na osnovu ekspresije CD13/CD34 molekula.

Heterogenost leukemijske populacije ćelija bolesnika sa AML, definisana je i na osnovu broja subpopulacija ćelija koje karakteriše ektopična **parcijalna ekspresija molekula limfoidne loze** (Slika 14.). Prisustvo bar jedne subpopulacije leukemijskih ćelija sa parcijalnom ektopičnom ekspresijom molekula limfoidne loze je utvrđeno kod 44,6% (131/294) AML bolesnika. Najveći broj bolesnika je imao jednu (31,3%) ili dve (10,5%) subpopulacije

leukemijskih ćelija sa parcijalnom ekspresijom molekula limfoidne loze, dok je tri subpopulacije imao mali broj bolesnika (2,7%).



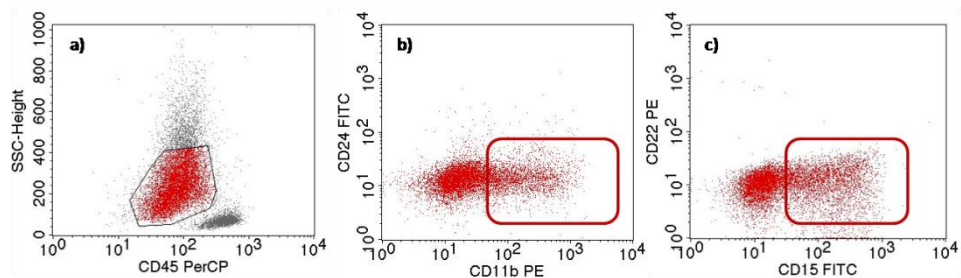
Slika 13. Primeri heterogenosti leukemijske populacije ćelija AML na dg: a) i c) populacije leukemijskih ćelija (crvena populacija) definisane na osnovu CD45/SSC obrasca; b) dve subpopulacije leukemijskih ćelija definisane na osnovu ekspresije CD117/CD33 molekula; d) jedna populacija leukemijskih ćelija definisane na osnovu ekspresije CD117/CD33 molekula.



Slika 14. Primer ektopične parcijalne ekspresije molekula limfoidne loze na leukemijskoj populaciji ćelija AML na dg: a) populacija leukemijskih ćelija (crvena populacija) definisana na osnovu CD45/SSC obrasca; b) parcijalna ekspresija CD56 molekula na populaciji leukemijskih ćelija

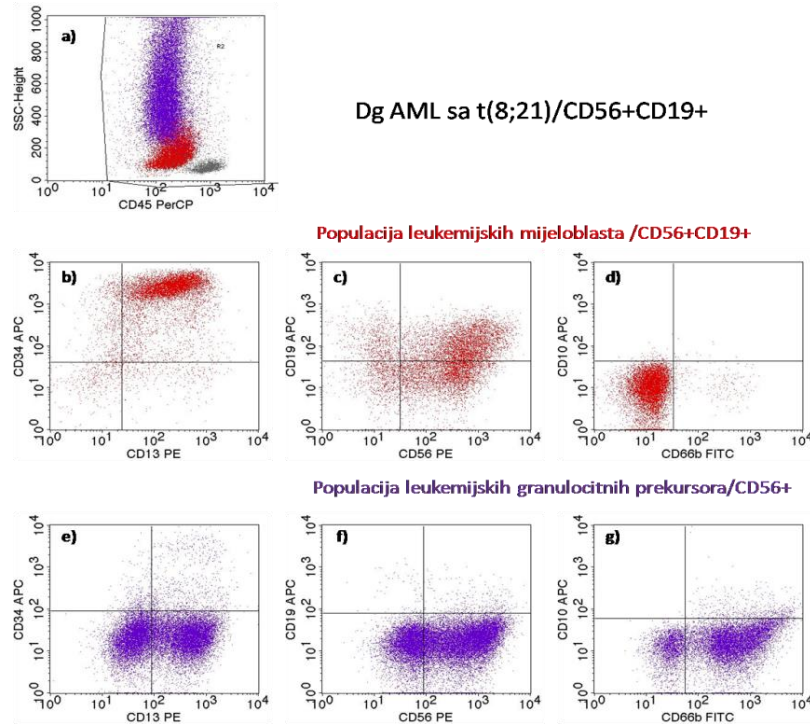
Ispitivanje heterogenosti populacije leukemijskih ćelija AML u pogledu prisustva imunofenotipskih znakova **diferencijacije unutar leukemijske populacije**, baziralo se na ispitivanju istovremenog prisustva populacija ćelija

sa imunofenotipskim karakteristikama leukemijskih mijeloblasta/monoblasta i zrelijih populacija ćelija sa imunofenotipskim karakteristikama leukemijskih granulocitnih i/ili monocitnih prekursora. Prisustvo samo jedne populacije leukemijskih ćelija sa homogenim imunofenotipskim karakteristikama mijeloidnih progenitora, otkriveno je sa niskom učestalošću kod 11,2% (33/294) bolesnika. Prisustvo populacije leukemijskih ćelija sa karakteristikama mijeloidnih progenitora, uz znake diferencijacije u toj populaciji (parcijalna ekspresija jednog ili više sledećih diferencijacionih molekula - CD34 / CD117 / HLA-DR / CD11b / CD11c / CD15 / CD4 / CD64 / CD36 / CD14), utvrđeno je kod 34% (100/294) bolesnika (Slika 15.).



Slika 15. Primer parcijalne ekspresije molekula mijelomonocitne loze na leukemijskoj populaciji ćelija AML na dg: a) populacija leukemijskih ćelija (crvena boja) definisana na osnovu CD45/SSC obrasca; b) parcijalna ekspresija CD11b molekula na populaciji leukemijskih ćelija; c) parcijalna ekspresija CD15 molekula na populaciji leukemijskih ćelija

Najveći broj bolesnika sa AML (161/294, 54,8%) pokazao je istovremeno prisustvo dve leukemijske populacije - leukemijske blaste i leukemijske granulocitne i/ili monocitne prekursore (Slika 16.).



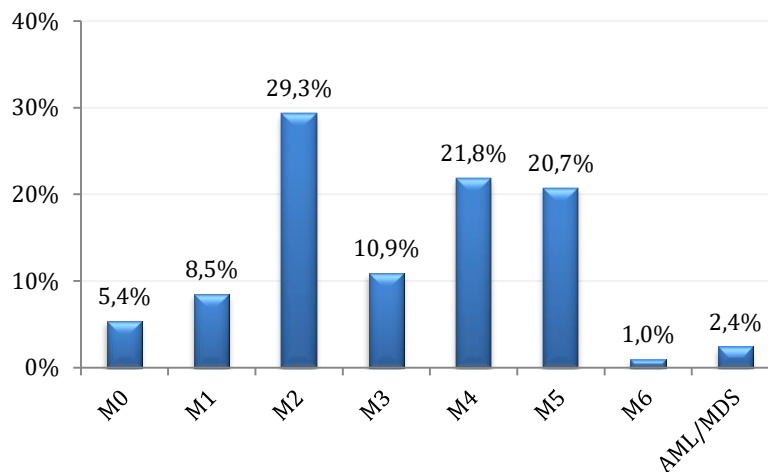
Slika 16. AML sa t(8;21)/CD56+CD19+, heterogenog ćelijskog sastava, koju sačinjavaju dve populacije ćelija definisane prema CD45/SSC obrascu: a) populacija mijeloblasta/CD56+CD19+ (crvena populacija ćelija) i populacija granulocitnih prekursora/CD56+ (ljubičasta populacija ćelija); b) i e) obrasci ekspresije CD13 i CD34 molekula; c) i f) obrasci ekspresije CD56 i CD19 molekula; d) i g) obrasci ekspresije CD66b i CD10 molekula.

4. Klasifikacija bolesnika sa AML na dg

4.1. Citomorfološka klasifikacija bolesnika sa AML

Ispitivanje distribucije FAB citomorfoloških suptipova u grupi AML (n=294), pokazalo je najveću učestalost tipova M2, M4 i M5 (Grafikon 13.). Suptip M7 nije otkriven ni u jednom slučaju, dok je AML sa trilinejskom displazijom otkrivena sa niskom učestalošću (2,4%). Morfološka mijelodisplazija u sklopu različitih FAB suptipova je otkrivena kod 17,3% (51/294) bolesnika. Citoheмиjska reakcija POX je bila pozitivna sa učestalošću

od 81,8% (238/291) u celoj grupi AML. Među POX–negativnim slučajevima, najveći broj bolesnika je imao FAB suptipove M5 (26/53, 49%) ili M0 (17/53, 32%).



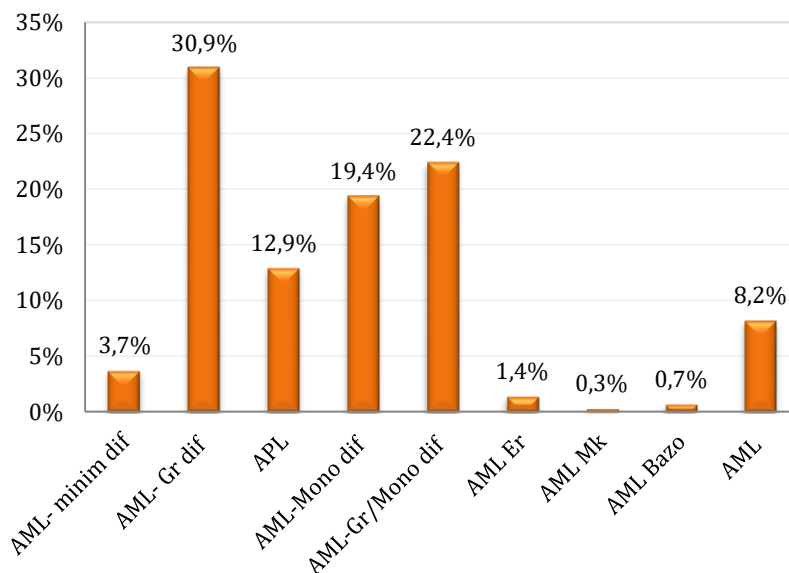
Grafikon 13. Učestalost FAB morfoloških suptipova u grupi bolesnika sa AML

4.2. Imunološka klasifikacija bolesnika sa AML

Ispitivanje imunofenotipskih karakteristika leukemijskih populacija ćelija u našoj grupi bolesnika (n=294) na dg, pokazalo je da je leukemijskim procesom najčešće zahvaćena samo granulocitna loza (54,4%), zatim istovremeno granulocitna i monocitna loza (22,4%) ili samo monocitna loza (20,1%). Istovremena zahvaćenost granulocitne i eritrocitne loze (1,7%), granulocitne i megakariocitne loze (0,7%), ili bazofilne loze (0,7%) je bila veoma retka.

Na osnovu specifičnih imunofenotipskih karakteristika, svaki bolesnik je klasifikovan u određen EGIL imunološki suptip AML (Grafikon14.). Najučestaliji imunološki suptip u našoj grupi je AML sa granulocitnom diferencijacijom (30,9%). U okviru ovoga suptipa, varijanta sa granulocitnom diferencijacijom i sazrevanjem je učestalija (66/91, 72,5%) u odnosu na varijantu bez sazrevanja (35/91, 27,5%). Sledeći po učestalosti su AML sa granulocitnom i monocitnom diferencijacijom (22,4%) i AML sa monocitnom diferencijacijom (19,4%). U okviru poslednjeg suptipa, varijanta sa monocitnom diferencijacijom i

sazrevanjem je učestalija (33/57, 57,9%) u odnosu na varijantu bez sazrevanja (24/57, 42,1%). Nižu učestalost su imali imunološki suptipovi APL (12,9%) i AML sa minimalnom diferencijacijom (3,7%).



Grafikon 14. Učestalost imunoloških suptipova u grupi bolesnika sa AML

Ostali imunološki suptipovi ispoljili su izuzetno nisku učestalost. Sa druge strane, u maloj grupi bolesnika sa AML (24/294, 8,2%) nije bilo moguće utvrditi precizan imunološki suptip. Među ovim bolesnicima (23/294, 7,8%), većina je ispoljila specifične imunofenotipske aberacije u populaciji granulocitnih prekursora koji su istovremeno bili i hipogranulirani, što predstavlja karakteristike AML nastale na bazi MDS-a.

Upoređivanjem analognih suptipova u okviru imunološke i citomorfološke FAB klasifikacije u našoj grupi bolesnika sa AML, pokazana je potpuna saglasnost kod 66,2% (194/293), delimična saglasnost kod 6,8% (20/293), a odsustvo saglasnosti kod 27% (79/293) ispitivanih slučajeva.

4.3. Klasifikacija bolesnika sa AML prema SZO klasifikacionom sistemu

Završna klasifikacija bolesnika sa AML je vršena prema SZO klasifikacionom sistemu, u kome primaran značaj imaju specifični molekularno-genetički poremećaji.

U našoj grupi bolesnika sa AML, citogenetička analiza uzoraka ks je uspešno sprovedena kod 95,6% (281/294) bolesnika. Kod 4,4% (13/294) bolesnika citogenetička analiza nije urađena (5/13) ili je bila neuspešna (8/13). Usled toga, kod ovih bolesnika nije bilo moguće primeniti SZO klasifikaciju. Normalan kariotip je utvrđen kod 50,9% (143/281) a patološki kod 49,1% (138/281) bolesnika.

Prisustvo mutacija u genima *NPM1*, *FLT3* i *CEBPA* je ispitivano u grupi bolesnika sa AML-NK. Prisustvo mutacije u ***NPM1* genu** je utvrđeno sa učestalošću od 27,7% (49/177). Mutacija *NPM1* gena tipA je bila izrazito učestalija (48/49, 98%), u odnosu na mutaciju tipD (1/49, 2%).

Prisustvo mutacije u ***FLT3* genu** je utvrđeno kod 30,6% (60/196) ispitivanih bolesnika. Mutacija *FLT3-ITD* je detektovana kod 76,7% (46/60), a *FLT3-d835* kod 26,7% (16/60) bolesnika. Kod dva bolesnika je otkriveno istovremeno prisustvo oba tipa mutacija *FLT3* gena (3,3%).

Prisustvo mutacije u ***CEBPA* genu** je detektovano kod 13,3% (8/60) bolesnika (Tabela 26.). Pritom su homozigotna i heterozigotna mutacija *CEBPA* gena bile zastupljene sa podjednakom učestalošću, u po četiri bolesnika. Polimorfizam *CEBPA* gena je utvrđen kod 10% (6/60) bolesnika.

Tabela 26. Mutacije *CEBPA* gena u grupi bolesnika sa AML na dijagnozi

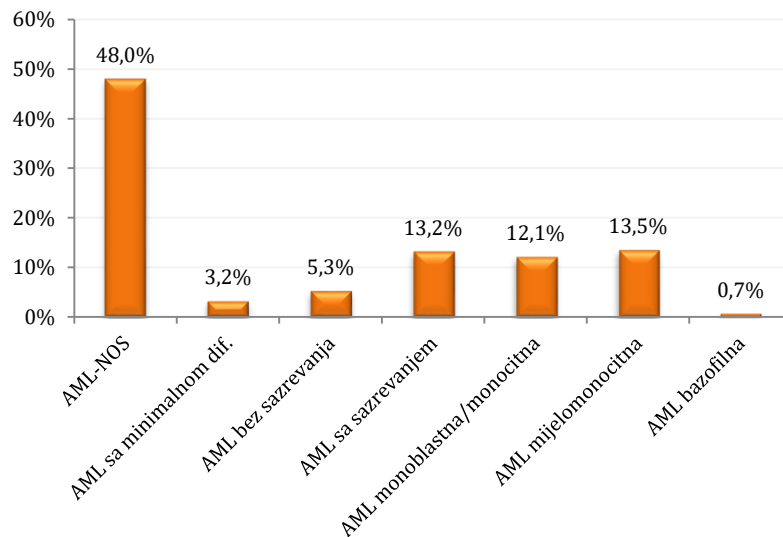
AML broj	Tip mutacije <i>CEBPA</i> gena	Rezultati sekvenciranja produkata četiri različite PCR amplifikacije <i>CEBPA</i> gena
12	Heterozigotna	Ampl 4: c.951_952insCTG p.L317_T318insL COSM 18899 Insercija - inframe Ampl 1/2/3: wt
57	Polimorfizam 690	Ampl 3: c.690G>T p.T230S Substitucija - Missense Ampl 1/2/4: wt

60	Homozigotna	Ampl 1: c.102_111del10 p.R35fs*122 COSM 18533 Delecija – Frameshift Ampl 3: c.560_561ins8 (CTCTCACC) p.P187_P198insSHP Insercija –inframe Ampl 4: c.936_937insCCA p.Q312_K313insP Insercija - In frame Ampl 2: wt
73	Polimorfizam 690	Ampl 3: c.690G>T p.T230S Substitucija – Missense Ampl 1/3/4: wt
72	Homozigotna	Ampl 1: c.178_194del17 p.T60fs*? Ampl 2: c.178_194del17 p.T60fs*? Ampl 4: c.920_921ins9 (GCAGCGCAA) p.R306_N307insKQR COSM 5064954 Insercija - In frame Ampl 3: wt
87	Homozigotna	Ampl 4: c.922T>G homozigot p.L331R Substitucija – Missense Ampl 1/2/3: wt
94	Polimorfizam 584	Ampl 3: c.588_589insCACCCG .P196_P197insHP COSM 1666668 Insercija - In-frame Ampl 1/2/4: wt
102	Polimorfizam 584	Ampl 3: c.589_590insACCCGC .P196_P197insHP COSM 4170207 Insercija - In-frame Ampl 1/2/4: wt
123	Polimorfizam 690	Ampl 3: c.690G>T p.T230S Substitucija – Missense Ampl 1/2/4: wt
137	Heterozigotna	Ampl 4: c.1066_1071delAACTGC .N356_C357del COSM 97060 Delecija - In-frame Ampl 1/2/3: wt
143	Heterozigotna	Ampl 2: c.247delC p.Q83fs*77 COSM 18161 Delecija – Frameshift Ampl 1/3/4: wt
198	Polimorfizam 690	Ampl 3: c.690G>T p.T230S Substitucija – Missense Ampl 1/2/4: wt
229	Homozigotna	Ampl 2: c.247delC p.Q83fs*77 COSM 18161 Delecija – Frameshift Ampl 4: c.952_953insTGA p.L317_T318insM Insercija - In-frame Ampl 1/3: wt
242	Heterozigotna	Ampl 1: c.98_99delTT p.F33fs*74 COSM 29502 Delecija – Frameshift Ampl 2/3/4: wt

Skraćenice: Ampl, amplifikacija; wt, *engl.* wild type, divlji tip alela

U našoj grupi bolesnika, glavni tipovi AML prema SZO klasifikaciji bili su zastupljeni sa sledećom učestalošću: 48% AML-NOS (135/281), 37,4% AML-RGP (105/281) i 14,6% AML-MDS (41/281). Međutim, neoplazmu blastnih plazmacitoidnih dendritskih ćelija i neoplazme povezane sa Daunovim sindromom nismo detektovali.

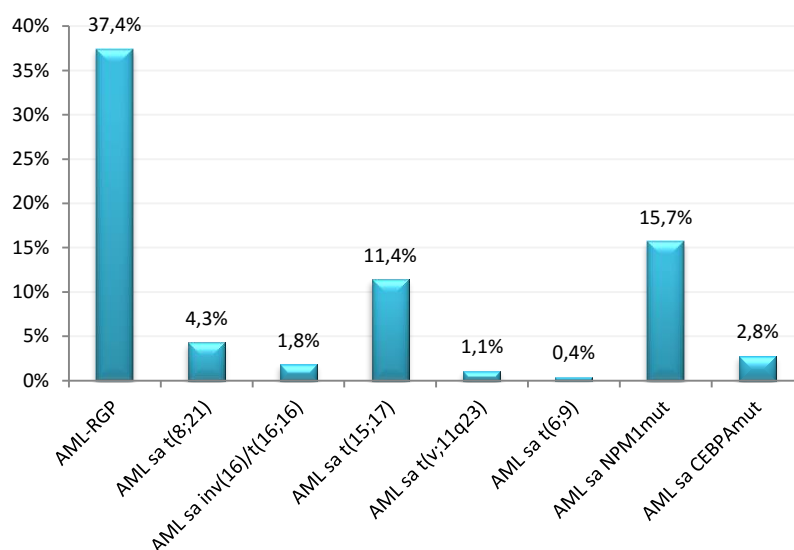
Najučestaliji suptipovi u tipu AML-NOS su: Akutna mijelomonocitna leukemija, AML sa sazrevanjem i Akutna monoblastna/monocitna leukemija, dok su ostali suptipovi bili ređi (Grafikon 15.).



Grafikon 15.. Učestalost različitih suptipova u grupi bolesnika AML-NOS

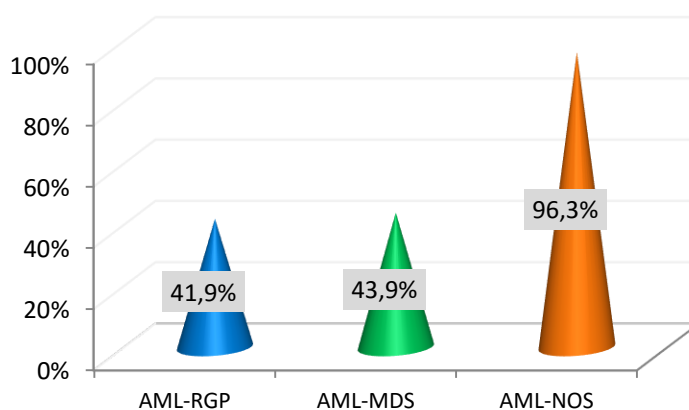
Akutnu megakarioblastnu leukemiju, akutnu eritroblastnu leukemiju i akutnu panmijelozu sa mijelofibrozmom nismo detektovali.

Najučestaliji suptipovi u okviru AML-RGP su AML sa *NPM1^{mut}* i APL (Grafikon 16.). Nisku učestalost su imali AML sa t(8;21), AML sa *CEBPA^{mut}* i AML sa inv(16)/t(16;16). Veoma nisku učestalost su ispoljili su AML sa t(v;11q23) i AML sa t(6;9).



Grafikon 16. Učestalost različnih suptipova u grupi bolesnika AML-RGP

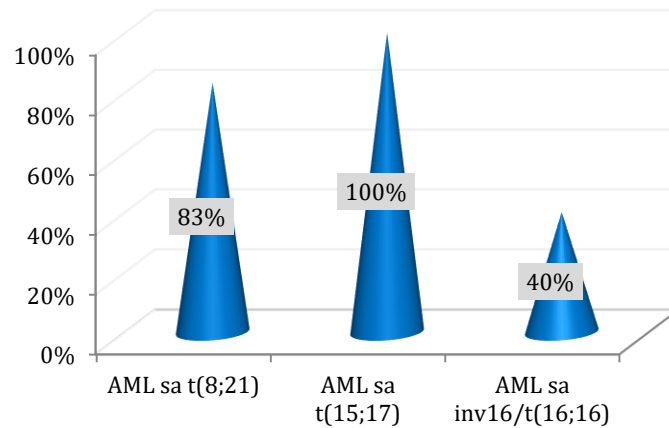
Doprinos imunofenotipske klasifikacije finalnoj dg bolesnika sa AML je prikazan na Grafikonu 17. Ispitivanje stepena saglasnosti između imunološke klasifikacije i SZO klasifikacije u celoj grupi bolesnika sa AML, pokazalo je saglasnost kod 68,2% (191/280) bolesnika.



Grafikon 17. Stepen saglasnosti između imunološke klasifikacije i klasifikacije suptipova AML-NOS prema SZO klasifikaciji

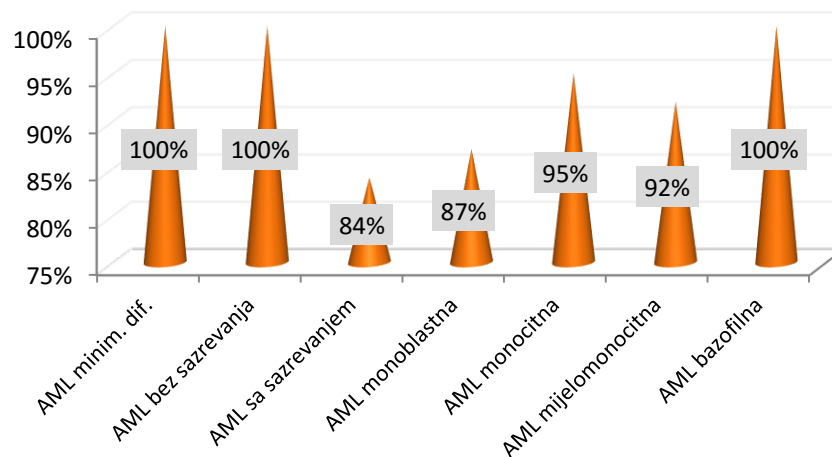
Doprinos imunofenotipske klasifikacije finalnoj dg bolesnika sa AML-RGP je prikazan na Grafikonu 18. Stepen saglasnosti između imunološke dg i suptipova AML-RGP je u proseku niži i kreće se u opsegu od 0% do 100%.

Najviši stepen saglasnosti karakteriše APL (100%) i AML sa t(8;21) (83%). Potpuno odsustvo saglasnosti karakteri suptipove AML sa *NPM1^{mut}* i AML sa *CEBPA^{mut}*, AML sa t(v;11q23) i AML sa t(6;9).



Grafikon 18. Stepen saglasnosti između imunološke klasifikacije i suptipova AML-RGP prema SZO klasifikaciji

Doprinos imunofenotipske klasifikacije finalnoj dg bolesnika sa AML-NOS je prikazan na Grafikonu 19.



Grafikon 19. Stepen saglasnosti između imunološke klasifikacije i finalne klasifikacije suptipova AML-NOS prema SZO

Stepen saglasnosti između imunološkog suptipa i suptipa AML-NOS prema klasifikaciji SZO je veoma visok - 84% do 100%. Niži stepen saglasnosti je postignut u AML sa sazrevanjem i akutnoj monoblastnoj lukemiji.

5. Analiza imunofenotipskih karakteristika tipova AML

Demografske i kliničko-hematološke karakteristike grupa bolesnika glavnih tipova AML na dg prikazane su u Tabeli 27.

Osobe muškog **pol**a čine dve trećine bolesnika u većini tipova AML. Medijana starosti je značajno viša u tipu AML-MDS (64 god.), kao i učestalost starijih bolesnika (73%) u poređenju sa AML-RGP (52 god.), gde je i značajno nižu učestalost starijih bolesnika (29%) ($p < 0,05$).

U pogledu prosečnih vrednosti **Le**, utvrđena je niža vrednost u tipu AML-MDS ($< 30 \times 10^9/l$) u poređenju sa ostalim tipovima AML, koje karakterišu više prosečne vrednosti **Le** ($\geq 30 \times 10^9/l$) ($p > 0,05$).

Prosečne vrednosti **Tr** svih suptipova AML-NOS su snižene ($< 80 \times 10^9/l$), uz visoku učestalost trombocitopenije ($\geq 88\%$ slučajeva). Prosečne vrednosti **Hb** svih tipova AML su takođe snižene, uz prisustvo značajnih razlika ($p < 0,05$). Naime, najniže prosečne vrednosti **Hb** karakterišu tip AML-MDS (88 g/l). Učestalost anemije je veoma visoka u svim tipovima AML ($\geq 89\%$ slučajeva).

Prosečne vrednosti **LDH** u serumu su povišene u svim tipovima AML, pri čemu su više vrednosti utvrđene u AML-MDS u poređenju sa AML-NOS i AML-RGP ($p > 0,05$). Povišenu vrednost **LDH** u serumu ima oko dve trećine bolesnika u svim suptipovima AML.

Analiza prisustva **limfadenopatije** je pokazala nisku učestalost u svim tipovima AML ($< 20\%$). **Hepatomegalija i/ili splenomegalija** je utvrđena u svim tipovima AML, ali je učestalost veća u AML-MDS (37%) u poređenju sa ostalim tipovima ($\sim 20\%$) ($p > 0,05$).

Tabela 27. Demografske i kliničko-hematološke karakteristike tipova AML

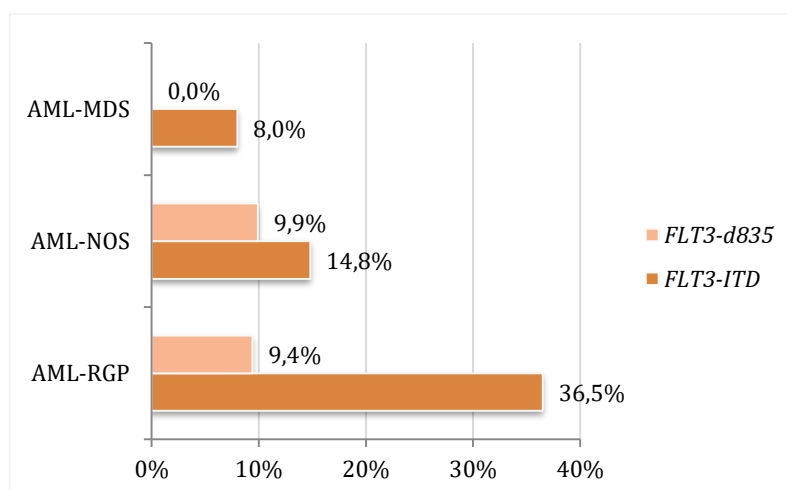
Karakteristika	AML-NOS n=135	AML-RGP n=105	AML-MDS n=41	P1	P2
Pol f (%)					
muški	58,5 (79/135)	58,1 (61/105)	56,1 (23/41)		0,963
ženski	41,5 (56/135)	41,9 (44/105)	43,9 (18/41)		
Starost	n=135	n=105	n=41		
$\bar{x} \pm SD$ (god.)	55,17 \pm 13,44	50,88 \pm 13,65	62,34 \pm 11,20	*0,015	*0,022
Me (opseg)	58 (19-84)	52 (20-78)	64 (30-79)	\$0,002	\$0,001
≥ 60 god. f (%)	43 (58/135)	28,6 (30/105)	73,2 (30/41)	#0,000	#0,000
Le	n=135	n=105	n=41		
$\bar{x} \pm SD$ ($\times 10^9/l$)	43,24 \pm 68,58	39,44 \pm 48,73	27,68 \pm 39,31	0,411	
Me (opseg)	13,8 (0,7-375,2)	16 (0,6-195)	4,7 (0,1-182,4)		
Le nivo f (%)					
snižen	31,9 (43/135)	26,7 (28/105)	39,0 (16/41)		0,479
povišen	54,1 (73/135)	56,2 (59/105)	41,5 (17/41)		
Tr	n=135	n=105	n=41		
$\bar{x} \pm SD$ ($\times 10^9/l$)	71,02 \pm 59,90	62,99 \pm 64,78	77,61 \pm 67,80	0,395	
Me (opseg)	55,0 (1-402)	39 (3-420)	59 (8-330)		
Tr nivo					
Snižen f (%)	88,1 (119/135)	92,4 (97/105)	92,7 (38/41)		0,470
Hb	n=135	n=105	n=41		
$\bar{x} \pm SD$ (g/dl)	93,62 \pm 17,59	98,80 \pm 16,84	87,49 \pm 15,32	*0,022	
Me (opseg)	92,0 (46-138)	98 (65-140)	88 (56-122)	\$0,046	
				#0,000	
Hb nivo					
Snižen f (%)	92,6 (125/135)	88,6 (93/105)	97,6 (40/41)		0,185
Blasti pk	n=133	n=104	n=41		
$\bar{x} \pm SD$ (% NČ)	39,96 \pm 32,62	45,17 \pm 32,55	32,80 \pm 29,42	*0,223	
Me (opseg)	30 (0-98)	50 (0-98)	26 (0-89)	\$0,211	
				#0,036	
Blasti ks	n=135	n=105	n=41		
$\bar{x} \pm SD$ (% NČ)	66,41 \pm 21,40	72,52 \pm 20,46	57,07 \pm 24,45	*0,016	
Me (opseg)	71 (19-97)	79 (3-100)	66 (20-95)	\$0,025	
				#0,000	
LDH	n=71	n=58	n=18		
$\bar{x} \pm SD$ (U/l)	1283,31 \pm 1467,53	1568,26 \pm 1355,20	2179,50 \pm 3341,53	0,073	
Me (opseg)	830 (150-9144)	1090 (189-7180)	1062 (315-4000)		
LDH nivo					
Povišen f (%)	63,1 (53/84)	74,0 (57/77)	69,2 (18/26)		0,328
Limfadenopatija					
prisutna f (%)	10,2 (10/98)	14,1 (11/78)	16,7 (5/30)		0,571
Hep/Splmeg.					
Prisutna f (%)	21,4 (21/98)	21,8 (17/78)	36,7 (11/30)		0,200

Skraćenice: NČ, nukleirane ćelije; Hb, hemoglobin; LDH, laktat dehidrogenaza; ks, kostna srž; Le, leukociti; Me, medijana; pk, periferna krv; SD, standardna devijacija; Tr, trombociti; x, prosečna vrednost; p1 - upoređivanja kontinuiranih varijabli; p2 - upoređivanja diskontinuiranih varijabli; *p - AML-NOS vs. AML-RGP; \$p - AML-NOS vs. AML-MDS; #p - AML-RGP vs. AML-MDS. *, \$; # - simboli

Citomorfološki procenjena prosečna vrednost populacije **blasta pk** bolesnika, značajno je niža u AML-MDS (33% Le) u poređenju sa AML-RGP (45% Le) ($p=0,040$), pri čemu razlika nije potvrđena kao značajna u odnosu na tip AML-NOS (40% Le). Citomorfološki procenjene prosečne vrednosti populacije **blasta ks** bolesnika su značajno varirale među tipovima AML ($p<0.05$). Najnižu prosečnu vrednost blasta ks ima AML-MDS (57% NĆ) i ova se vrednost značajno razlikuje u poređenju sa AML-RGP (72% NĆ) ($p=0,000$) i AML-NOS (66% NĆ) ($p=0,019$), kao i među poslednja dva tipa ($p=0,026$).

Citogenetska analiza je pokazala prisustvo **aberantnog kariotipa** u svim tipovima AML, ali sa značajno različitim učestalošću ($p=0,000$). Najveća učestalost aberantnog kariotipa je utvrđena u tipu AML-MDS (39/41, 95,1%) u odnosu na AML-RGP (52/105, 49,5%) i AML-NOS (47/135, 34,8%).

Ispitivanje prisustva **FLT3 mutacije**, pokazalo je prisustvo bar jednog od tipova ove mutacije u svim tipovima AML, ali sa značajnim razlikama u učestalosti ($p=0,001$). Najveća učestalost **FLT3** mutacije je utvrđena u AML-RGP (37/85, 43,6%), niža u AML-NOS (20/81, 24,7%) i najniža u AML-MDS (2/25, 8%). Mutacija **FLT3-ITD** je detektovana u svim tipovima AML, dok **FLT3-d835** nije detektovana samo u tipu AML-MDS (Grafikon 20.).



Grafikon 20. Učestalost različitih tipova **FLT3** mutacije u tipovima AML

5.1. Analiza imunofenotipski definisanih populacija ks tipova AML

Zastupljenost imunološki definisanih populacija ćelija u ks bolesnika sa različitim tipovima AML je prikazana u Tabeli 28.

Populacija leukemijskih blasta, definisana prema obrascu ekspresije CD45/SSC, predstavlja dominantnu populaciju u ks svih tipova AML ($\geq 58\%$ NĆ). Značajno viša prosečna vrednost populacije leukemijskih blasta je utvrđena u AML-RGP u poređenju sa AML-NOS i AML-MDS ($p \leq 0.01$).

Tabela 28. Zastupljenost imunološki definisanih populacija ćelija ks u glavnim tipovima AML na dg

Karakteristika	AML-NOS n=135	AML-RGP n=105	AML-MDS n=41	p
AĆ CD45/SSC	n=128	n=99	n=41	
$\bar{x} \pm SD$ (%NĆ)	62,49 \pm 24,08	70,57 \pm 23,14	57,68 \pm 24,47	*0,008
Me (opseg)	67 (17-97)	78 (8-97)	50 (18-98)	\$0,323
				#0,003
AĆ CD45 obr f(%)				
nizak	24,4 (33/135)	33,3 (35/105)	29,3 (12/41)	0,584
srednji	35,6 (48/135)	38,1 (40/105)	41,5 (17/41)	
visok	22,2 (30/135)	15,2 (16/105)	14,6 (6/41)	
heterogen	17,8 (24/135)	13,3 (14/105)	14,6 (6/41)	
AĆ SSC f(%)				
niska	45,9 (62/135)	20 (21/105)	61 (25/41)	*0,000
srednja	35,6 (48/135)	46,7 (49/105)	22 (9/41)	\$0,195
heterogena	18,5 (25/135)	33,3 (35/105)	17,1 (7/41)	#0,000
CD34+ pop.	n=128	n=99	n=41	
$\bar{x} \pm SD$ (% NĆ)	35,10 \pm 28,23	18,86 \pm 23,33	43,42 \pm 26,43	*0,000
Me (opseg)	33,5 (0,1-96)	6 (0-84)	42 (0,2-93)	\$0,111
				#0,000
CD117+ pop.	n=128	n=99	n=41	
$\bar{x} \pm SD$ (% NĆ)	38,29 \pm 24,45	46,49 \pm 28,48	43,03 \pm 21,02	*0,027
Me (opseg)	36 (0,2-96)	52 (0,34-91)	43 (4,3-89)	\$0,145
				#0,411
Σ B prek	n=128	n=99	n=41	
$\bar{x} \pm SD$ (% NĆ)	0,20 \pm 0,82	0,10 \pm 0,41	0,40 \pm 0,78	*0,003
Me (opseg)	0 (0-8,82)	0 (0-3)	0 (0-3,8)	\$0,213
				#0,002
Limfociti	n=128	n=99	n=41	
$\bar{x} \pm SD$ (% NĆ)	11,91 \pm 13,27	9,98 \pm 10,54	11,66 \pm 10,55	0,209
Me (opseg)	6 (1-60)	5 (1-49)	9 (1-50)	
Gr prek	n=127	n=94	n=39	
$\bar{x} \pm SD$ (% NĆ)	21,04 \pm 18,53	16,71 \pm 18,38	23,85 \pm 16,91	*0,021
Me (opseg)	15 (1-72)	9 (0,4-82)	24 (0,25-65)	\$0,249
				#0,013

Eozinofili	n=74	n=44	n=19	
$\bar{x} \pm SD$ (% NĆ)	2,00 \pm 2,74	1,53 \pm 2,19	2,18 \pm 3,43	*0,050
Me (opseg)	1,2 (0,12-19)	0,9 (0,16-11)	1,24 (0,5-16)	\$0,413
				#0,016
Mono prek	n=126	n=97	n=41	
$\bar{x} \pm SD$ (% NĆ)	20,83 \pm 26,41	16,75 \pm 24,93	17,26 \pm 23,86	0,141
Me (opseg)	9 (0,2-96)	4 (0,16-95)	74 (0,1-93)	
Eritro prek	n=91	n=59	n=28	
$\bar{x} \pm SD$ (% NĆ)	9,20 \pm 10,28	7,32 \pm 11,80	14,48 \pm 14,69	*0,016
Me (opseg)	6 (0,5-63)	3 (1-57)	7,5 (1-46)	\$0,263
				#0,021

Skraćenice: AĆ, atipične ćelije; Eritro, eritrocitni; Gr, granulocitni; Le, leukociti; Me, medijana; Mono, monocitni; pop., populacija; prek, prekursori; SD, standardna devijacija; SSC, ćelijska granulacija; \bar{x} , prosečna vrednost; *p - AML-NOS vs. AML-RGP; \$p - AML-NOS vs. AML-MDS; #p - AML-RGP vs. AML-MDS; *, \$; # - simboli

Analiza **obrazaca ekspresije CD45 molekula** u tipovima AML je pokazala najveću učestalost niskog i/ili srednjeg obrasca ekspresije CD45 molekula ($\geq 60\%$ slučajeva) u svim tipovima AML ($p > 0,05$). Analiza tipova **ćelijske granulacije** je pokazala da niska i/ili srednja ćelijska granulacija predstavljaju najučestalije obrasce u AML-NOS i AML-MDS, pri čemu u AML-RGP dominiraju srednja i/ili heterogena granulacija populacije blasta ($p = 0,000$).

Analiza prosečnih vrednosti populacije **leukemijskih ćelija**, definisanih prema **CD34/CD45/SSC** obrascu, pokazala je značajno nižu vrednost u AML-RGP (19% NĆ) u poređenju sa AML-NOS (35% NĆ) ($p = 0,000$) i AML-MDS (43% NĆ) ($p = 0,000$), pri čemu između dva poslednja tipa nije potvrđena značajnost razlike ($p = 0,085$).

Analiza prosečnih vrednosti **populacije leukemijskih ćelija**, definisanih prema **CD117/CD45/SSC** obrascu, pokazala je relativno ujednačene vrednosti ove populacije u svim tipovima AML, uz značajnu razliku samo između AML-RGP i AML-NOS (47% vs. 38% NĆ, $p = 0,027$).

Analiza populacije **B-ćelijskih prekursora** – hematogona I/II, pokazala je njihove niske prosečne vrednosti u svim tipovima AML, uz prisustvo značajnih razlika među njima ($p = 0,002$). Najniže prosečne vrednosti su registrovane u AML-RGP u odnosu na ostale tipove AML ($p \leq 0,01$).

Analiza prosečnih vrednosti populacije **granulocitnih prekursora** ks različitih tipova AML, pokazala je prisustvo značajnih razlika među njima

($p=0,014$). Naime, najniža prosečna vrednost je utvrđena u slučaju AML-RGP u poređenju sa ostalim tipovima AML ($p<0,05$). Prosečna vrednost populacije **eoziñofila** je takođe značajno niža u AML-RGP u poređenju sa AML –MDS ($p=0,016$).

Prosečna vrednost populacije **monocitnih prekursora** različitih tipova AML čini relativno malu populaciju ks ($\leq 21\%$ NĆ), i ne razlikuje se značajno između različitih tipova AML ($p<0,01$).

Prosečna vrednost populacije **eritrocitnih prekursora** ks je značajno niža u AML-RGP u poređenju sa AML-NOS i AML-MDS ($p\leq 0,05$).

Analiza prosečne zastupljenosti populacije **limfocita** u ks bolesnika sa različitim tipovima AML, nije pokazala prisustvo značajnih razlika između ispitivanih tipova ($p\geq 0,05$).

5.2. Analiza imunofenotipskih karakteristika populacije blasta glavnih tipova AML na dg

Različiti aspekti ekspresije ranih linijski nespecifičnih i ranih mijelomonocitnih hLDM na populaciji leukemijskih blasta glavnih tipova AML su prikazani u Tabeli 29. / Grafikonu 21.

Molekuli **HLA-DR i CD11a** su eksprimirani na populaciji leukemijskih blasta u svim tipovima AML, pri čemu značajno viša učestalost ekspresije kao i veća prosečna ekspresija karakteriše AML-MDS i AML-NOS u poređenju sa AML-RGP ($p=0,000$). U AML-MDS, najučestaliji obrazac ekspresije CD11a molekula je visok (43%), dok su u slučaju HLA-DR molekula najčešći obrasci heterogen (45%) ili visok (34%).

Rani linijski nespecifični hLDM, **CD38, CD123 i CD135**, pokazuju visoku učestalost ekspresije u svim tipovima AML ($\geq 89\%$ slučajeva). Prosečna vrednost ekspresije CD38, CD123 i CD135 ukazuje da su ovi molekuli eksprimirani bar na 2/3 populacije leukemijskih ćelija ($p<0,05$).

Tabela 29. Različiti aspekti ekspresije ranih linijski nespecifičnih i ranih mijelomonocitnih hLDM na populaciji blasta glavnih tipova AML na dg

hLDM	AML-NOS n=135	AML-RGP n=105	AML-MDS n=41	P1	P2
CD11a f (%) $\bar{x} \pm SD$ (%) Me (opseg)	n=50 94 (47/50) 76,26 \pm 25,20 84 (4-100)	n=59 57,6 (34/59) 40,75 \pm 36,19 31 (1-100)	n=21 100 (21/21) 78,71 \pm 20,06 86 (38-100)	*0,000 \$0,550 #0,000	*0,000 \$0,920 #0,000
CD38 f (%) $\bar{x} \pm SD$ (%) Me (opseg)	n=74 100 (74/74) 89,35 \pm 13,60 95 (35-100)	n=63 95,2 (60/63) 78,56 \pm 27,10 94 (8-100)	n=21 100 (21/21) 77,43 \pm 27,65 95 (25-99)	0,100	0,248
CD123 f (%) $\bar{x} \pm SD$ (%) Me (opseg)	n=54 100 (54/54) 77,35 \pm 19,20 84 (23-99)	n=47 95,7 (45/47) 66,87 \pm 25,96 76 (8-98)	n=17 100 (17/17) 76,59 \pm 19,83 84 (25-97)	0,215	0,120
CD135 f (%) $\bar{x} \pm SD$ (%) Me (opseg)	n=52 100 (52/52) 81,19 \pm 17,72 86,5 (30-100)	n=53 88,7 (47/53) 69,09 \pm 29,68 78 (2-99)	n=17 100 (17/17) 73,06 \pm 18,64 73 (39-98)	0,016 *0,027 #0,324	0,088
CD71 f (%) $\bar{x} \pm SD$ (%) Me (opseg)	n=84 95,2 (80/84) 66,81 \pm 22,18 69 (6-97)	n=48 95,8 (46/48) 65,02 \pm 24,77 71 (7-98)	n=29 96,6 (28/29) 72,00 \pm 22,50 80 (5-98)	0,954	0,361
HLA-DR f (%) $\bar{x} \pm SD$ (%) Me (opseg)	n=135 94,1 (127/135) 84,42 \pm 23,98 94 (1-100)	n=105 63,8 (67/105) 55,39 \pm 41,25 76 (0-100)	n=41 92,7 (38/41) 80,27 \pm 25,38 91 (1-99)	*0,000 \$0,720 #0,000	*0,000 \$0,021 #0,010
CD34 f (%) $\bar{x} \pm SD$ (%) Me (opseg)	n=135 73,3 (99/135) 59,12 \pm 39,60 78 (1-100)	n=105 53,3 (56/105) 32,82 \pm 36,21 12 (1-99)	n=41 87,8 (36/41) 76,59 \pm 32,70 94 (1-100)	*0,001 \$0,055 #0,000	*0,000 \$0,066 #0,000
CD117 f (%) $\bar{x} \pm SD$ (%) Me (opseg)	n=135 90,4 (122/135) 66,68 \pm 31,72 82 (1-100)	n=105 90,5 (95/105) 63,69 \pm 29,51 72 (1-100)	n=41 95,1 (39/41) 75,85 \pm 25,21 88 (7-100)	0,620	*0,110 \$0,220 #0,008
CD13 f (%) $\bar{x} \pm SD$ (%) Me (opseg)	n=135 96,3 (130/135) 77,79 \pm 24,99 89 (5-100)	n=105 98,1 (103/105) 74,08 \pm 23,45 81 (3-100)	n=41 95,1 (39/41) 84,76 \pm 24,87 94 (1-100)	0,591	*0,026 \$0,077 #0,000
CD33 f (%) $\bar{x} \pm SD$ (%) Me (opseg)	n=133 94,7 (126/133) 77,62 \pm 27,96 93 (3-100)	n=103 100 (103/103) 89,81 \pm 17,51 97 (25-100)	n=41 100 (41/41) 74,71 \pm 25,23 85 (20-100)	*0,020 \$0,201	*0,000 \$0,202 #0,000
cMPO f (%) $\bar{x} \pm SD$ (%) Me (opseg)	n=132 73,5 (97/132) 39,83 \pm 33,84 28 (0-99)	n=103 91,3 (94/103) 62,14 \pm 33,98 72 (1-100)	n=38 63,2 (24/38) 35,26 \pm 31,63 31 (1-97)	*0,001 \$0,216 #0,000	*0,000 \$0,450 #0,000

clizozim	n=38	n=37	n=15		
f (%)	55,3 (21/38)	75,7 (28/37)	73,32 (11/15)		
$\bar{x} \pm SD$ (%)	33,08 \pm 36,07	37,57 \pm 33,43	31,33 \pm 28,70	0,144	0,429
Me (opseg)	14 (1-100)	27 (1-99)	18 (1-89)		

Skraćenice: f, učestalost ekspresije; Me, medijana; SD, standardna devijacija; \bar{x} , prosečna vrednost. p1 - upoređivanja diskontinuiranih varijabli; p2 - upoređivanja kontinuiranih varijabli; *, \$; # - simboli; *p - AML-NOS vs. AML-RGP; \$p - AML-NOS vs. AML-MDS; #p - AML-RGP vs. AML-MDS.

U tipu AML-MDS, obrazac ekspresije CD38 molekula je veoma varijabilan, dok su u slučaju CD123 i CD135 najzastupljeniji nizak ili srednji obrazac ekspresije.

Molekul **CD71** je eksprimiran sa visokom učestalošću u svim tipovima AML ($\geq 95\%$), uz prosečnu ekspresiju na dve trećine populacije blasta ($p < 0,05$). U tipu AML-MDS, obrazac ekspresije CD71 je veoma varijabilan, pri čemu obrazac visoke ekspresije nije detektovan.

Molekul **CD34** je pokazao značajne razlike u ekspresiji među tipovima AML ($p = 0,000$). Tip AML-MDS karakterišu najveća učestalost ekspresije i najveća prosečna ekspresija na populaciji blasta u poređenju sa AML-NOS i AML-RGP. U AML-MDS, obrazac ekspresije CD34 je predominantno visok (81% slučajeva).

Molekul **CD117** je eksprimiran sa visokom učestalošću ($\geq 90\%$) u glavnim tipovima AML, uz prosečnu ekspresiju koja obuhvata bar dve trećine populacije blasta. Značajno veća CD117⁺ frakcija leukemijskih blasta karakteriše AML-MDS u poređenju sa AML-RGP ($p = 0,008$). U tipu AML-MDS, obrazac ekspresije CD117 molekula je najčešće visok (62%).

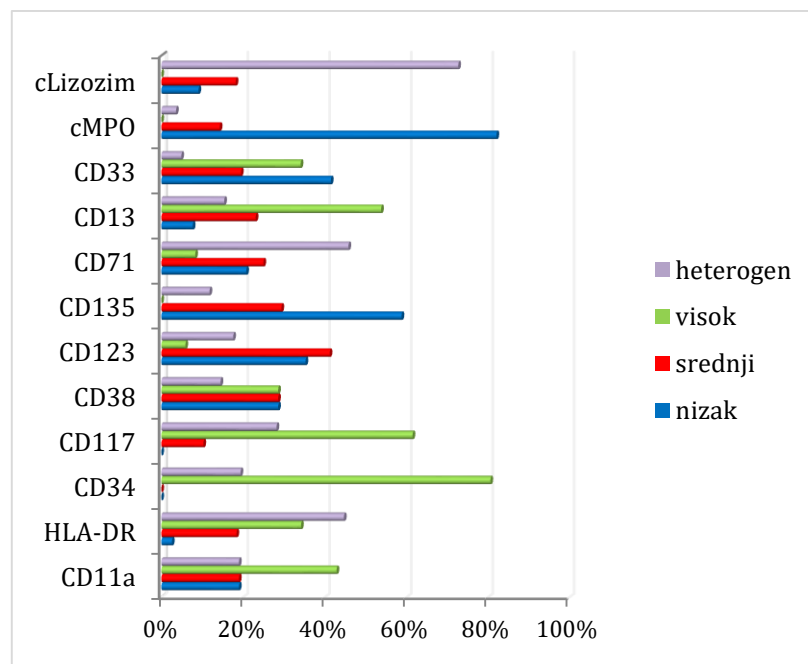
Ispitivanje učestalosti koekspresije molekula **CD34⁺CD117⁺HLA-DR⁺** na populaciji blasta u AML-MDS, pokazalo je visoku učestalost koekspresije ova tri molekula (32/41, 78%).

Rani diferencijacioni mijelomonocitni molekul **CD13** je eksprimiran sa visokom učestalošću ($\geq 95\%$) uz visoku prosečnu ekspresiju, koja je obuhvatala oko tri četvrtine populacije LĆ. Značajno veća CD13⁺ frakcija leukemijskih blasta karakteriše AML-MDS u odnosu na AML-RGP (85% vs. 74%, $p = 0,000$). Molekul

CD13 karakterišu pretežno visok (54%) ili srednji (23%) obrazac ekspresije na populaciji blasta u AML-MDS.

Rani diferencijacioni mijelomonocitni molekul **CD33** je eksprimiran sa visokom učestalošću ($\geq 95\%$ slučajeva) na populaciji leukemijskih ćelija tipova AML, uz visoku prosečnu ekspresiju koja je obuhvatala oko tri četvrtine populacije LĆ. Značajno veća CD33+ frakcija blasta karakteriše AML-RGP (90% LĆ) u odnosu na AML-NOS (78% LĆ) i AML-MDS (74% LĆ) ($p=0,000$). Obrasci ekspresije CD33 molekula su veoma varijabilni u AML-MDS.

Molekul **cMPO** je pokazao značajne razlike u ekspresiji među tipovima AML ($p=0,000$). Naime, AML-RGP karakterišu značajno veća učestalost ekspresije i najveća prosečna ekspresija na populaciji blasta u poređenju sa AML-NOS i AML-MDS. U AML-MDS, obrazac ekspresije cMPO molekula je predominantno nizak (82% slučajeva).



Grafikon 21. Učestalost obrazaca ekspresije ranih linijski nespecifičnih i ranih mijelomonocitnih hLDM na blastima tipa AML-MDS

Ekspresija **cLizozima** je utvrđena u svim tipovima AML, pri čemu je učestalost ekspresije niža u AML-NOS u odnosu na ostale tipove ($p>0,05$).

Frakcija cLizozim⁺ leukemijskih blasta čini trećinu populacija blasta u svim tipovima AML. U tipu AML-MDS, obrazac ekspresije cLizozima je predominantno heterogen (73% slučajeva).

Različiti aspekti ekspresije kasnijih mijelomonocitnih hLDM na populaciji leukemijskih blasta tipova AML su prikazani u Tabeli 30. / Grafikonu 22. Među kasnijim diferencijacionim mijelomonocitnim molekulima, najveću učestalost ekspresije u različitim tipovima AML ispoljava **cCD68** ($\geq 95\%$), uz prosečnu vrednost ekspresije koja je značajno veća u AML-RGP u poređenju sa ostalim tipovima AML ($p=0,000$). Obrazac ekspresije molekula cCD68 u tipu AML-MDS je najčešće nizak (47%) ili heterogen (42%).

Molekuli **CD15** i **CD11b** su eksprimirani u svim tipovima AML sa nižom učestalošću (<50% slučajeva), uz prosečnu vrednost ekspresije koja obuhvata samo frakciju leukemijske populacije ($\leq 31\%$ LĆ) ($p>0,05$). Najučestaliji obrasci ekspresije CD15 molekula u tipu AML-MDS su nizak ili heterogen (42% svaki), dok u slučaju CD11b molekula predomira obrazac visoke ekspresije (63%).

Molekul **CD11c** je eksprimiran sa značajno nižom učestalošću u tipu AML-MDS (39%) u odnosu na AML-NOS (58%) ($p=0,032$). Prosečna vrednost ekspresije ukazuje da je CD11c eksprimiran na subpopulaciji leukemijskih ćelija ($\leq 36\%$ LĆ) u svim tipovima AML, uz značajno višu vrednost u tipu AML-NOS u odnosu na ostale tipove AML ($p<0,05$). U tipu AML-MDS, najučestaliji obrazac ekspresije CD11c je nizak (62% slučajeva).

Molekul **CD4** je eksprimiran u svim tipovima AML sa nižom učestalošću (50%-60%), uz prosečnu vrednost ekspresije koja obuhvata oko 1/3 leukemijske populacije ($p>0,05$). Najučestaliji obrazac ekspresije CD4 molekula u tipu AML-MDS je nizak (75% slučajeva).

Molekul **CD64** je eksprimiran sa značajno višom učestalošću u AML-RGP (58% slučajeva) u odnosu na AML-NOS (38%) i AML-MDS (28%) ($p<0,01$). Prosečna vrednost ekspresije ukazuje da je molekul CD64 eksprimiran na frakciji leukemijskih ćelija ($\leq 33\%$ LĆ) u svim tipovima AML, uz značajno veću

frakciju u AML-RGP u odnosu na ostale tipove (p<0,05). U AML-MDS, najučestaliji obrasci ekspresije CD64 molekula su srednji (46%) ili nizak (36%).

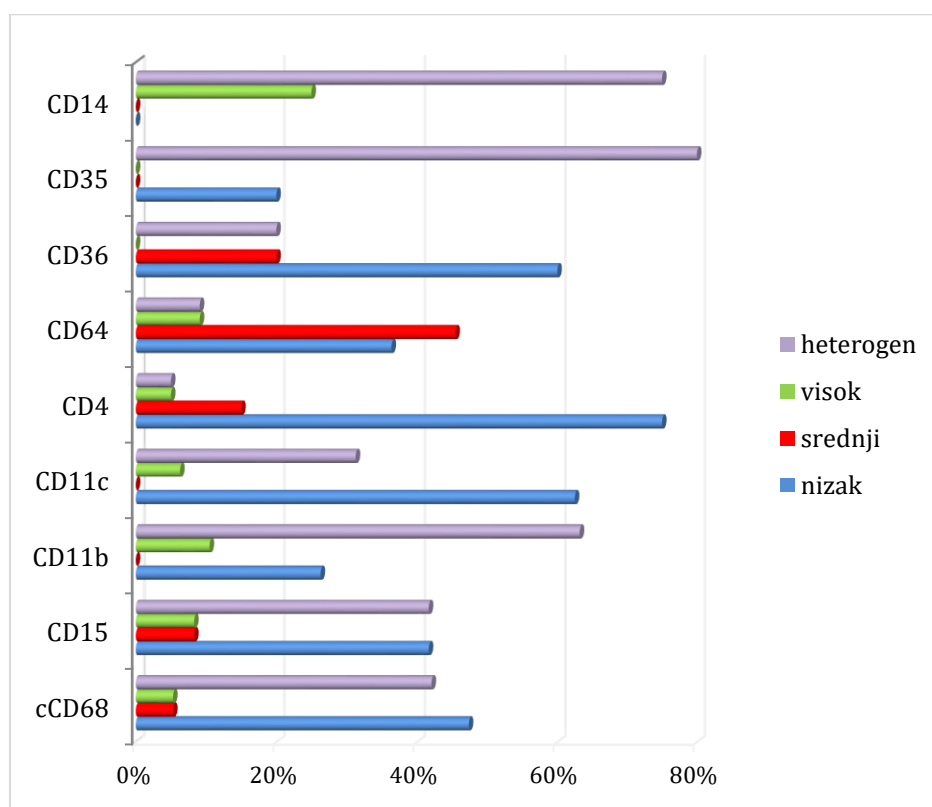
Tabela 30. Različiti aspekti ekspresije kasnih mijelomonocitnih hLDM na populaciji blasta tipova AML na dg

hLDM	AML-NOS n=135	AML-RGP n=105	AML-MDS n=41	P1	P2
cCD68 f (%) $\bar{x} \pm SD$ (%) Me (opseg)	n=48 100 (48/48) 77,58 \pm 21,15 84,5 (20-100)	n=41 100 (41/41) 90,85 \pm 12,30 96 (49-100)	n=20 95 (19/20) 70,30 \pm 22,66 76,5 (7-100)	0,106	*0,000 \$0,125 #0,000
CD15 f (%) $\bar{x} \pm SD$ (%) Me (opseg)	n=135 37,8 (51/135) 25,61 \pm 28,38 11 (1-98)	n=104 45,2 (47/104) 27,07 \pm 28,07 17,5 (1-97)	n=41 29,3 (12/41) 19,22 \pm 22,76 10 (1-94)	0,185	0,445
CD11b f (%) $\bar{x} \pm SD$ (%) Me (opseg)	n=135 45,9 (62/135) 31,04 \pm 30,54 17 (1-98)	n=104 33,7 (35/104) 25,38 \pm 30,79 10 (1-97)	n=41 46,3 (19/41) 24,71 \pm 21,07 17 (1-75)	0,127	0,190
CD11c f (%) $\bar{x} \pm SD$ (%) Me (opseg)	n=127 58,3 (74/127) 35,49 \pm 31,69 27 (1-100)	n=102 46,1 (47/102) 29,52 \pm 34,01 11,5 (1-99)	n=41 39 (16/41) 21,15 \pm 22,97 16 (1-99)	*0,066 \$0,032 #0,442	*0,017 \$0,023 #0,961
CD4 f (%) $\bar{x} \pm SD$ (%) Me (opseg)	n=125 60,8 (76/125) 36,11 \pm 29,79 29 (0-100)	n=95 50,5 (48/95) 33,46 \pm 31,93 21 (0-96)	n=39 51,3 (20/39) 32,79 \pm 27,43 26 (1-99)	0,265	0,717
CD64 f (%) $\bar{x} \pm SD$ (%) Me (opseg)	n=127 37,8 (48/127) 28,39 \pm 33,02 10 (1-100)	n=96 58,3 (56/96) 32,70 \pm 29,82 23 (1-99)	n=39 28,2 (11/39) 22,13 \pm 26,02 12 (1-99)	*0,002 \$0,274 #0,002	*0,026 \$0,787 #0,038
CD36 f (%) $\bar{x} \pm SD$ (%) Me (opseg)	n=135 31,1 (42/135) 22,10 \pm 27,12 9 (1-93)	n=102 23,5 (24/102) 17,97 \pm 26,09 5 (1-93)	n=41 12,2 (5/41) 9,83 \pm 8,62 8 (1-42)	*0,197 \$0,016 #0,127	*0,010 \$0,144 #0,544
CD35 f (%) $\bar{x} \pm SD$ (%) Me (opseg)	n=36 33,3 (12/36) 17,33 \pm 20,01 9 (0-100)	n=36 20,0 (7/35) 12,36 \pm 18,00 4,5 (1-71)	n=15 33,3 (5/15) 16,73 \pm 16,82 15 (1-64)	0,361	0,110
CD14 f (%) $\bar{x} \pm SD$ (%) Me (opseg)	n=135 19,3 (26/135) 10,48 \pm 15,20 3 (0-63)	n=105 11,4 (12/105) 6,70 \pm 13,28 2 (0-81)	n=41 9,8 (4/41) 6,20 \pm 7,82 3 (0-32)	0,145	*0,003 \$0,979 #0,006
CD163 f (%) $\bar{x} \pm SD$ (%) Me (opseg)	n=36 19,4 (7/36) 10,17 \pm 15,62 2 (0-64)	n=33 15,6 (5/32) 8,79 \pm 17,76 1 (0-76)	n=15 0,0 (0/15) 2,53 \pm 2,36 2 (1-10)	0,192	0,384

Skraćenice: f, učestalost ekspresije; Me, medijana; SD, standardna devijacija; x, prosečna vrednost. p1 - upoređivanja diskontinuiranih varijabli; p2 - upoređivanja kontinuiranih varijabli; *, \$, # - simboli; *p - AML-NOS vs. AML-RGP; \$p - AML-NOS vs. AML-MDS; #p - AML-RGP vs. AML-MDS.

Učestalost ekspresije molekula **CD36** je niska u svim tipovima AML ($\leq 33\%$), a posebno u tipu AML-MDS u poređenju sa AML-NOS (12% vs. 31%, $p=0,016$). Molekul CD36 je eksprimiran na maloj subpopulaciji leukemijskih blasta ($\leq 22\%$ LĆ). Najčešći obrazac ekspresije CD36 u AML-MDS je nizak (60% slučajeva).

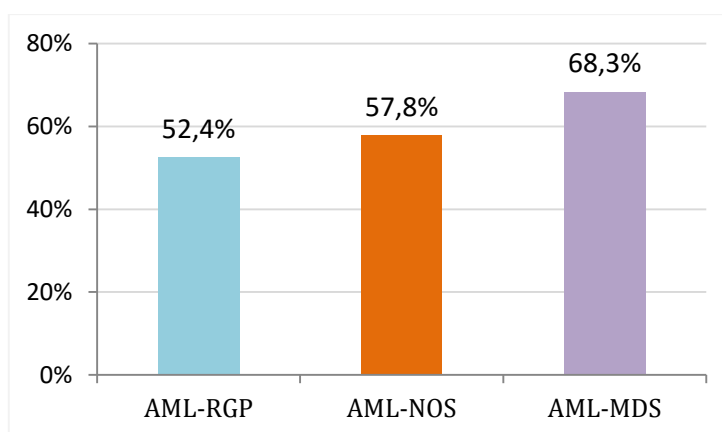
Učestalost ekspresije molekula **CD14** i **CD163** je niska u svim tipovima AML ($\leq 19\%$), pri čemu u slučaju AML-MDS nije utvrđena ekspresija CD163 ni u jednom od ispitivanih bolesnika. Prosečna vrednost ekspresije oba molekula ukazuje da su eksprimirani na maloj subpopulaciji leukemijskih ćelija ($\leq 10\%$ LĆ). U AML-MDS, CD14 je eksprimiran pretežno prema heterogenom obrascu ekspresije (75% slučajeva).



Grafikon 22. Učestalost obrazaca ekspresije kasnih mijelomonocitnih hLDM na blastima tipa AML-MDS

5.3. Analiza ektopične ekspresije limfoidnih hLDM na populaciji blasta tipova AML

Analiza ektopične ekspresije bar jednog od ispitivanih limfoidnih hLDM na populaciji blasta tipova AML, pokazala je najveću učestalost u tipu AML-MDS (Grafikon 23).



Grafikon 23. Učestalost ektopične ekspresije bar jednog od ispitivanih limfoidnih hLDM na populaciji blasta tipova AML

Različiti aspekti ektopične ekspresije limfoidnih hLDM na populaciji blasta tipova AML su prikazani u Tabeli 31./Grafikonu 24. Molekul **CD56** ispoljava ekspresiju u svim tipovima AML, uz značajno veću učestalost u AML-MDS u poređenju sa AML-RGP (44% vs. 24%, $p=0,017$). Subpopulacija CD56⁺ blasta je u relativno mala u svim tipovima AML ($\leq 25\%$ LĆ). Najučestaliji obrasci ekspresije CD56 molekula u tipu AML-MDS su nizak ili heterogen (39% svaki).

Molekul **CD7** je eksprimiran u svim tipovima AML, ali sa značajno višom učestalošću u AML-MDS (37%) u poređenju sa ostalim tipovima ($\leq 18\%$) ($p<0,05$). Prosečna vrednost subpopulacije CD7⁺ leukemijskih blasta je takođe znatno veća u AML-MDS u poređenju sa ostalim tipovima AML ($p>0,05$).

Najčešći obrazac ekspresije CD7 molekula u tipu AML-MDS je nizak (73% slučajeva).

Molekul **CD2** je ekspimiran sa niskom učestalošću u svim tipovima AML, pri čemu je značajno veća učestalost utvrđena u tipu AML-RGP (13%) u odnosu na ostale tipove ($\leq 6\%$) ($p=0,040$).

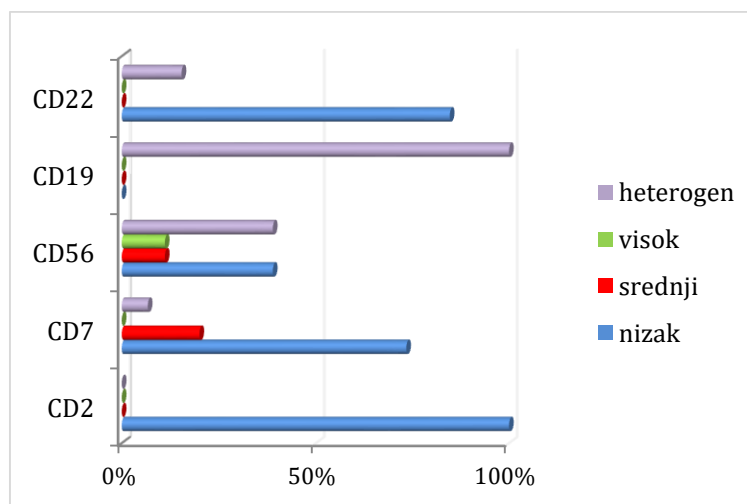
Tabela 31. Različiti aspekti ektopične ekspresije limfoidnih hLDM na populaciji blasta glavnih tipova AML

hLDM	AML-NOS n=135	AML-RGP n=105	AML-MDS n=41	P1	P2
CD2 f (%) $\bar{x} \pm SD$ (%) Me (opseg)	n=135 5,9 (8/135) 4,98 \pm 7,08 2 (0-40)	n=105 13,3 (14/105) 9,30 \pm 18,54 2 (0-93)	n=41 2,4 (1/41) 4,20 \pm 7,29 2 (0-45)	*0,049 \$0,687 #0,068	0,789
CD7 f (%) $\bar{x} \pm SD$ (%) Me (opseg)	n=135 16,3 (22/135) 12,22 \pm 20,36 4 (1-98)	n=105 18,1 (19/105) 14,17 \pm 24,74 3 (0-92)	n=41 36,6 (15/41) 21,17 \pm 27,81 4 (1-89)	*0,713 \$0,005 #0,018	0,108
CD56 f (%) $\bar{x} \pm SD$ (%) Me (opseg)	n=135 28,2 (38/135) 17,64 \pm 26,48 5 (0-100)	n=105 23,8 (25/105) 18,65 \pm 29,63 4 (0-99)	n=41 43,9 (18/41) 24,95 \pm 29,35 8 (1-99)	*0,449 \$0,058 #0,017	0,133
CD19 f (%) $\bar{x} \pm SD$ (%) Me (opseg)	n=135 6,7 (9/135) 4,82 \pm 10,88 1 (0-81)	n=105 11,4 (12/105) 8,28 \pm 16,86 1 (0-75)	n=41 2,4 (1/41) 3,59 \pm 8,03 1 (1-50)	0,150	0,685
CD22 f (%) $\bar{x} \pm SD$ (%) Me (opseg)	n=128 18,1 (23/127) 11,43 \pm 17,56 4 (0-95)	n=102 2,9 (3/102) 3,78 \pm 5,03 2 (0-29)	n=41 31,7 (13/41) 20,61 \pm 24,67 10 (0-91)	*0,000 \$0,062 #0,000	*0,000 \$0,017 #0,000
cCD79a f (%) $\bar{x} \pm SD$ (%) Me (opseg)	n=120 5,8 (7/120) 2,58 \pm 5,09 1 (0-43)	n=92 4,4 (4/92) 2,20 \pm 3,94 1 (0-30)	n=33 0,0 (0/33) 1,79 \pm 1,64 1 (0-8)	0,357	0,479

Skraćenice: f, učestalost ekspresije; Me, medijana; SD, standardna devijacija; \bar{x} , prosečna vrednost. p1 - upoređivanja diskontinuiranih varijabli; p2 - upoređivanja kontinuiranih varijabli; *, \$, # - simboli; *p - AML-NOS vs. AML-RGP; \$p - AML-NOS vs. AML-MDS; #p - AML-RGP vs. AML-MDS.

Molekul CD2 je ekspimiran na maloj subpopulaciji (<10% LČ), isključivo prema obrascu niske ekspresije u svim tipovima AML, pri čemu je ta frakcija takođe najveća u tipu AML-RGP.

U grupi hLDM B loze, molekul **CD19** je eksprimiran sa niskom učestalošću u svim tipovima AML, pri čemu je znatno veća učestalost utvrđena u tipu AML-RGP (11%) u odnosu na ostale tipove ($\leq 7\%$) ($p > 0,05$). Molekul CD19 je eksprimiran na maloj frakciji blasta ($< 10\%$ LĆ) isključivo prema obrascu heterogene ekspresije, pri čemu je ta frakcija takođe najveća u tipu AML-RGP.



Grafikon 24. Učestalost obrazaca ekspresije limfoidnih hLDM na blastima tipa AML-MDS

Ekspresija **CD22** molekula je utvrđena u svim tipovima AML, uz značajno nižu učestalost ekspresije u tipu AML-RGP (3%) u poređenju sa AML-NOS (18%) i AML-MDS (32%) ($p = 0,000$). Prosečna vrednost CD22⁺ subpopulacije blasta je značajno veća u tipu AML-MDS u odnosu na ostale tipove AML ($p = 0,000$). Molekul CD22 karakteriše nizak obrazac ekspresije u tipu AML-MDS.

Molekul **cCD79a** je selektivno eksprimiran samo u tipovima AML-NOS i AML-RGP, i to sa veoma niskom učestalošću ($\leq 6\%$) i na veoma maloj subpopulaciji leukemijskih ćelija.

5.4. Ispitivanje imunofenotipskih karakteristika populacije granulocitnih i monocitnih prekursora AML-MDS

Zastupljenost i ćelijski sastav populacije *granulocitnih prekursora*, kao i njihova ćelijska granulacija u ks naše grupe bolesnika sa AML-MDS na dg, analizirana je u cilju utvrđivanja različitih vidova poremećaja u navedenim karakteristikama. Analiza je pokazala da u ks bolesnika sa AML-MDS populacija granulocitnih prekursora čini relativno malu populaciju ks (24% NĆ) (Tabela 32.).

"*Šift u levo*" u populaciji granulocitnih prekursora je utvrđeno kod većine bolesnika sa AML-MDS (93%), dok je *blok u sazrevanju* do stupnja metamijelocit i/ili neutrofil utvrđen kod tri četvrtine bolesnika.

Ispitivanje promena u obrascu *ćelijske granulacije* populacije granulocitnih prekursora bolesnika sa AML-MDS, pokazalo je prisustvo *atipične granulacije* kod 40% bolesnika, dok je *atipična hipogranulacija* bila prisutna kod polovine bolesnika.

Ispitivanje prisustva *maturacione asinhronije* u ekspresiji grupe hLDM (HLA-DR, CD45, CD34, CD135, CD13, CD33, CD15, cMPO) na populaciji granulocitnih prekursora ks bolesnika sa AML-MDS, pokazalo je prisustvo bar jednog od navedenih poremećaja kod svih bolesnika (Tabela 32.). Najveću učestalost su ispoljili poremećaji u ekspresiji molekula HLA-DR, CD34 i CD45.

Ektopična ekspresija bar jednog od ispitivanih molekula limfoidne loze na populaciji granulocitnih prekursora, utvrđena je kod četvrtine bolesnika, gde je najveću učestalost ektopične ekspresije ispoljio molekul CD56 (24%).

Tabela 32. Karakteristike populacije granulocitnih prekursora bolesnika sa AML-MDS

Karakteristike	AML-MDS
Gr prekursori $\bar{x} \pm SD$ (% NĆ) Me (opseg)	n=39 23,85 ± 16,91 24 (0,25 - 65)
Promijelociti $\bar{x} \pm SD$ (% Gr prek.) Me (opseg)	n=29 33,76 ± 14,40 33 (12 - 60)
Mijelociti $\bar{x} \pm SD$ (% Gr prek.) Me (opseg)	n=30 41,50 ± 14,23 40 (18 - 67)
Metamijelociti $\bar{x} \pm SD$ (% Gr prek.) Me (opseg)	n=30 17,20 ± 9,96 17 (0 - 43)
Neutrofili $\bar{x} \pm SD$ (% Gr prek.) Me (opseg)	n=30 8,37 ± 9,38 5 (1 - 44)
Šift u levo	93,3% (28/30)
Blok u sazrevanju	73,3% (22/30)
Maturaciona asinhronija	100% (29/29)
CD34+	85,7% (24/28)
HLA-DR+	92,9% (26/28)
CD45^{high}	78,6% (22/28)
CD135+	27,3% (3/11)
CD15^{het}	67,9% (19/28)
cMPO^{p+}	61,5% (16/26)
CD33-	0% (0/28)
CD13^{high}	35,7% (10/28)
Aberantna ekspresija Li Ag	27,6% (8/29)
CD56+	24,1% (7/29)
CD2+	3,4% (1/29)
CD7+	6,9% (2/29)
CD19+	0% (0/29)
Granulacija Gr prek.	
Atipična hipogranulacija	40% (12/30)
Atipična granulacija	50% (15/30)

Skraćenice: Ag, antigen; Gr prek., granulocitni prekursori; Li, limfoidni; Me, medijana; NĆ, nukleirane ćelije; SD, standardna devijacija; \bar{x} , srednja vrednost

Ćelijski sastav populacije *monocitnih prekursora* ks bolesnika sa AML-MDS, analiziran je u cilju utvrđivanja poremećaja u ovoj populaciji (Tabela 33). Ukupna populacija monocitnih prekursora čini relativno malu populaciju u ks

bolesnika ($\leq 17\%$ NĆ). Ispitivanje ćelijskog sastava ove populacije je pokazalo da monoblasti u proseku čine četvrtinu populacije monocitnih prekursora, pri čemu je zastupljenost populacije promonocita i monocita podjednaka ($\sim 36\%$ svaka).

Tabela 33. Ćelijski sastav populacije monocitnih prekursora bolesnika sa AML-MDS

Subpopulacije monocitnih prekursora ks	AML-MDS
ΣMonocitni prekursori	n=41
$\bar{x} \pm SD$ (% NĆ)	17,26 \pm 23,86
Me (opseg)	7 (0,1 - 93)
Mijelo/monoblasti	n=15
$\bar{x} \pm SD$ (% Mo prek)	25,87 \pm 22,96
Me (opseg)	19 (0 - 74)
Promonociti	n=15
$\bar{x} \pm SD$ (% Mo prek)	35,73 \pm 25,42
Me (opseg)	28 (6 - 90)
Monociti	n=15
$\bar{x} \pm SD$ (% Mo prek)	37,27 \pm 27,30
Me (opseg)	39 (2 - 80)

Skraćenice: NĆ, nukleirane ćelije; Me, medijana; SD, standardna devijacija; \bar{x} , srednja vrednost

5.5. Analiza loze zahvaćene leukemijskim procesom i stepena diferenciranosti leukemijskih ćelija glavnih tipova AML

Na osnovu imunofenotipskog profila leukemijske populacije ćelija glavnih tipova AML na dg, utvrđene su specifične imunofenotipske karakteristike koje su uključivale tip hematopoezne loze zahvaćene

leukemijskim procesom i stepen diferenciranosti populacije leukemijskih ćelija (Tabela 34.).

Tabela 34. Imunofenotipski definisane opšte karakteristike leukemijske populacije ćelija glavnih tipova AML

	AML-NOS	AML-RGP	AML-MDS	P
<i>Loza zahvaćena leukemijskim procesom</i>				
Gr loza f(%)	45,9 (62/135)	64,8 (68/105)	58,5 (24/41)	0,190
Mo loza f(%)	25,2 (34/135)	17,1 (18/105)	12,2 (5/41)	
Gr i Mo loza f(%)	25,9 (35/135)	16,2 (17/105)	26,8 (11/41)	
Gr i Eritro loza f(%)	1,5 (2/135)	1,9 (2/105)	2,4 (1/41)	
Gr i Bazo loza f(%)	1,5 (2/135)	0 (0/105)	0 (0/41)	
<i>Nivo diferencijacije leukemijskih ćelija</i>				
Blasti bez diferencijacije	14,1 (19/135)	8,7 (9/104)	7,3 (3/41)	0,210
Blasti sa diferencijacijom	27,4 (37/135)	40,4 (42/104)	36,6 (15/41)	
Leukemijski blasti i prek	58,5 (79/135)	51,0 (53/104)	56,1 (23/41)	

Skraćenice: f, učestalost ekspresije; Bazo, bazofilna; Eritro, eritrocitna; Gr, granulocitna; Mo, monocitna; Me, medijana; prek, prekursori; SD, standardna devijacija; x, prosečna vrednost.

U svim glavnim tipovima AML, leukemijskim procesom je najčešće zahvaćena samo granulocitna loza, pri čemu su veoma retko zahvaćene eritrocitna i bazofilna loza. Osim toga, u svim tipovima AML leukemijska populacija se najčešće sastoji iz populacije leukemijskih blasta i leukemijskih prekursora (>50%) ili samo iz populacije blasta koji ispoljavaju diskretan stepen diferencijacije.

6. Ispitivanje imunofenotipskih karakteristika suptipova AML-RGP

Bolesnici sa dg AML-RGP čine 37,4% (105/281) naše grupe bolesnika sa AML. Demografske i kliničko-hematološke karakteristike suptipova AML-RGP su prikazane u Tabeli 35./Prilog 1. Muškarci čine većinu bolesnika u suptipovima AML-RGP, izuzev APL i AML sa *NPM1*^{mut}, gde je odnos polova ujednačen ($p>0,05$). Posebno velika zastupljenost muškog pola karakteriše AML sa t(8;21) i AML sa inv(16)/t(16;16) (~80%).

Medijana **starosti** bolesnika svih suptipova AML-RGP je bila ≤ 58 godina, pri čemu je najniža vrednost utvrđena u AML sa (v;11q23) (33 g.) i APL (44 g.). Oko dve trećine bolesnika u svim suptipovima AML-RGP je mlađe od 60 godina. Razlike u prosečnoj starosti bolesnika suptipova AML-RGP nisu potvrđene kao značajne ($p>0,05$).

Različiti suptipovi AML-RGP značajno su se razlikovali u pogledu prosečnih vrednosti **Le** ($p=0,000$). Najniže prosečne vrednosti Le imaju APL i AML sa t(8;21) ($<12 \times 10^9/l$). Svi ostali suptipovi AML-RGP imaju značajno više prosečne vrednosti Le (50 - $65 \times 10^9/l$).

Prosečne vrednosti **Tr** svih suptipova AML-RGP su snižene ($<90 \times 10^9/l$), uz posebno niske vrednosti ($<50 \times 10^9/l$) u APL, AML sa t(8;21), AML sa (v;11q23) i AML sa *CEBPA*^{mut} u odnosu na ostale suptipove ($p=0,011$). Učestalost trombocitopenije je veoma visoka u svim suptipovima AML-RGP ($\geq 80\%$).

Prosečne vrednosti **Hb** svih suptipova AML-RGP su snižene, pri čemu postojeće razlike nisu potvrđene kao signifikantne ($p>0,05$). Anemija je utvrđena u većini suptipova AML-RGP ($\geq 66\%$ slučajeva) ($p>0,05$).

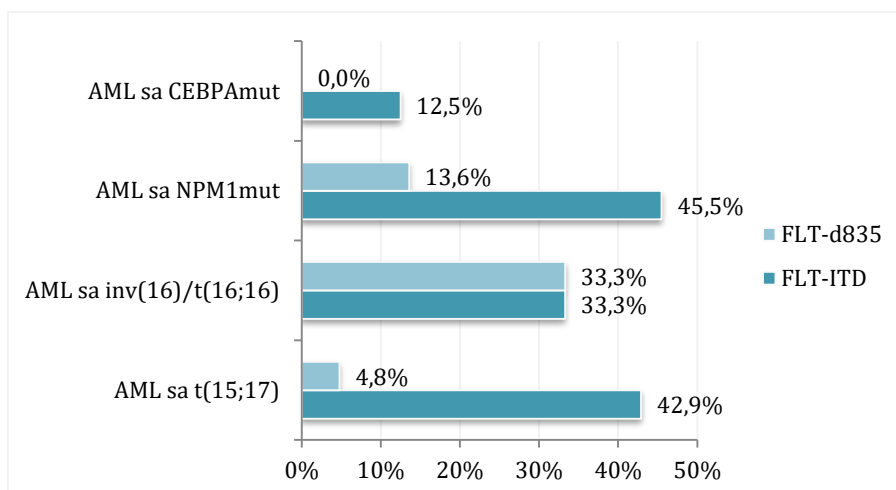
Prosečne vrednosti **LDH** u serumu su povišene u svim suptipovima AML-RGP, pri čemu su najniže vrednosti utvrđene u APL i AML sa *CEBPA*^{mut} (<1000 U/l) u poređenju sa ostalim suptipovima (>1200 U/l) ($p=0,066$). Učestalost bolesnika sa povišenom vrednošću LDH u serumu, značajno je varirala među

suptipovima AML-RGP, uz najnižu vrednost utvrđenu u APL (39% slučajeva), odnosno najviše vrednosti u AML sa $inv(16)/t(16;16)$ i AML sa $NPM1^{mut}$ (>90% slučajeva) ($p=0,002$).

Najviša učestalost **limfadenopatije** je utvrđena u suptipu AML sa $inv(16)/t(16;16)$ (50%), dok je u ostalim suptipovima AML-RGP pokazala nisku učestalost ($\leq 16\%$), a u slučaju APL nije detektovana ($p>0,05$). **Hepatomegalija i/ili splenomegalija** je bila prisutna u više suptipova AML-RGP, uz najveću učestalost u AML sa $inv(16)/t(16;16)$ (30%), odnosno AML sa $NPM1^{mut}$ i AML sa $CEBPA^{mut}$ (25% svaki). Hepatomegalija i/ili splenomegalija nisu registrovane u APL, pri čemu primećene razlike nisu potvrđene kao značajne ($p>0,05$).

Citomorfološki procenjene vrednosti populacije **blasta pk**, znatno variraju zavisno od suptipa AML-RGP ($p>0,05$). Naime, najnižu prosečnu vrednost populacije blasta u pk ima suptip AML sa $t(8;21)$ (22% Le), pri čemu najviše prosečne vrednosti imaju AML sa $t(v;11q23)$, AML sa $NPM1^{mut}$ i AML sa $CEBPA^{mut}$ ($\geq 51\%$ Le). Citomorfološki procenjene vrednosti populacije **blasta ks** bolesnika, takođe značajno variraju među suptipovima AML-RGP ($p=0,000$). Naime, nižu prosečnu vrednost blasta u ks ima suptip AML sa $t(8;21)$ (49% NĆ), dok u slučaju većine suptipova populacija blasta čini najmanje dve trećine NĆ ks.

Citogenetska analiza je pokazala prisustvo **aberantnog kariotipa** u većini suptipova AML-RGP, uz značajne razlike u učestalosti među njima (0,000). Naime, u slučaju suptipova AML sa $t(8;21)$, AML sa $inv(16)/t(16;16)$ i AML sa $t(v;11q3)$, dokazano je prisustvo specifične aberacije na citogenetskom nivou kod svih bolesnika. U slučaju APL, specifična aberacija je utvrđena na citogenetskom nivou kod 81,3% (26/32) bolesnika, dok je kod preostalih potvrđena na molekularnom nivou na osnovu prisustva rearanžmana *PML-RARA1*. Najniža učestalost aberantnog kariotipa je utvrđena u slučaju AML sa $NPM1^{mut}$ (5/44, 11,4%), dok u AML sa $CEBPA^{mut}$ citogenetske aberacije nisu detektovane.



Grafikon 25. Učestalost tipova *FLT3* mutacija u suptipovima AML-RGP

Prisustvo bar jednog od tipova ***FLT3* mutacije** (Grafikon 25.), utvrđeno je samo u pojedinim suptipovima AML-RGP ($p=0,013$). Pritom, najveću učestalost *FLT3* mutacije pokazuju AML sa *NPM1*^{mut} (26/44, 59,1%), APL (9/21, 42,9%) i AML sa inv(16)/t(16;16) (1/3, 33,3%). Pritom, niska učestalost ove mutacije je utvrđena u AML sa *CEBPA*^{mut} (1/8, 12,5%), pri čemu ona nije detektovana u AML sa t(8;21) i AML sa t(v;11q23).

Mutacija *FLT3*-ITD tipa je detektovana u svim suptipovima AML-RGP, pri čemu *FLT3*-d835 nije detektovana samo u AML sa *CEBPA*^{mut} (Grafikon 25.).

6.1. Analiza imunofenotipski definisanih populacija ks AML-RGP

Zastupljenost imunološki definisanih populacija ćelija u ks naše grupe bolesnika sa različitim suptipovima AML-RGP je prikazana u Tabeli 36./Prilog 1.

Populacija leukemijskih blasta definisana prema obrascu CD45/SSC, predstavlja dominantnu populaciju u ks većine suptipova AML-RGP ($\geq 67\%$ NĆ), izuzev suptipa AML sa t(8;21) koga karakteriše značajno niža vrednost populacije blasta (38% NĆ) ($p=0.000$).

Analiza distribucije **obrazaca ekspresije CD45 molekula** u AML-RGP je pokazala prisustvo značajnih razlika među suptipovima ($p=0.000$). Najveću učestalost niske ili srednje ekspresije CD45 molekula ispoljavaju APL, AML sa $t(8;21)$ i AML sa $CEBPA^{mut}$. Suptip AML sa $inv(16)/t(16;16)$ karakteriše pretežno heterogena ili visoka, dok AML sa $(v;11q23)$ karakteriše pretežno visoka ili srednja ekspresija CD45. Veoma heterogeni obrasci ekspresije CD45 molekula karakterišu AML sa $NPM1^{mut}$.

Analiza distribucije tipova **ćelijske granulacije** u AML-RGP, pokazala je prisustvo značajnih razlika među suptipovima ($p=0.000$). Niska ćelijska granulacija predstavlja najučestaliji tip u AML sa $CEBPA^{mut}$ (100%) i AML sa $t(8;21)$ (58%), dok srednja granulacija karakteriše AML sa $t(v;11q23)$ (100%) i AML sa $NPM1^{mut}$ (68%). Heterogena ćelijska granulacija je najzastupljenija u APL (62%).

Prosečne vrednosti populacije **leukemijskih ćelija** definisanih prema **CD34/CD45/SSC** karakteristikama, značajno se razlikuju između suptipova AML-RGP ($p=0,000$). Naime, značajno veće prosečne vrednosti populacije $CD34^+$ leukemijskih ćelija karakterišu AML sa $CEBPA^{mut}$ i AML sa $inv(16)/t(16;16)$ ($\sim 50\%$ NĆ), u poređenju sa suptipovima APL, AML sa $NPM1^{mut}$ i AML sa $t(v;11q23)$ ($\leq 21\%$ NĆ) ($0,000$).

Prosečne vrednosti **populacije leukemijskih ćelija** definisanih prema **CD117/CD45/SSC** karakteristikama, takođe se značajno razlikuju između suptipova AML-RGP ($p=0,003$). Značajno više prosečne vrednosti $CD117^+$ leukemijskih ćelija ($\geq 43\%$ NĆ) su utvrđene u većini suptipova AML-RGP u poređenju sa AML sa $t(8;21)$ i AML sa $t(v;11q23)$ ($\leq 28\%$ NĆ) ($p=0.003$).

B-ćelijski prekursori – hematogoni I/II, detektovani su sa niskim prosečnim vrednostima u većini suptipova AML-RGP, pri čemu njihovo prisustvo nije otkriveno u suptipovima AML sa $CEBPA^{mut}$ i AML sa $t(v;11q23)$ ($p>0,05$).

Analiza prosečnih vrednosti populacije **granulocitnih prekursora** ks u različitim suptipovim AML-RGP, pokazala je prisustvo značajnih razlika

($p=0,000$). Najveća prosečna vrednost populacije granulocitnih prekursora je utvrđena u slučaju AML sa $t(8;21)$ (43% NĆ), pri čemu je u svim ostalim suptipovima značajno niža ($\leq 20\%$ NĆ) ($p=0,000$). Posebno niska prosečna vrednost granulocitnih prekursora karakteriše APL (8% NĆ). Prosečna vrednost populacije **eoziñofila** je značajno viša u AML sa $inv(16)/t(16;16)$ (6,6% NĆ) u poređenju sa svim ostalim suptipovima AML-RGP ($\leq 2,2\%$ NĆ) ($p=0,050$).

Prosečna vrednost populacije **monocitnih prekursora** ks, značajno je povišena u AML sa $t(v;11q23)$ (40% NĆ) odnosno AML sa $inv(16)/t(16;16)$ i AML sa $NPM1^{mut}$ (28% NĆ, svaki), u poređenju sa ostalim suptipovima AML-RGP ($\leq 11\%$ NĆ) ($p=0,000$).

Prosečna vrednost populacije **eritrocitnih prekursora** ks je znatno viša u AML sa $t(8;21)$ (13% Σ NĆ) i AML sa $CEBPA^{mut}$ (10% Σ NĆ), dok je u ostalim suptipovima AML-RGP niža ($< 10\%$ NĆ) ($p>0,05$).

Analiza prosečne zastupljenosti populacije **limfocita** u ks suptipova AML-RGP, pokazala je značajno veću prosečnu vrednost ove populacije u AML sa $t(8;21)$ (16% NĆ) i APL (14% NĆ) u odnosu na ostale suptipove AML-RGP ($\leq 7\%$ NĆ) ($p=0,007$).

6.2. Analiza imunofenotipskih karakteristika populacije blasta suptipova AML-RGP

Različiti aspekti ekspresije **ranih linijski nespecifičnih i ranih mijelomonocitnih hLDM** na populaciji blasta u našoj grupi bolesnika sa različitim suptipovima AML-RGP na dg, prikazani su u Tabeli 37./Prilog 1.

Molekul **HLA-DR** kao i panleukocitni adhezioni molekul **CD11a** su eksprimirani na populaciji blasta većine suptipova AML-NOS sa visokom učestalošću ($\geq 80\%$, svaki), pri čemu značajno niža učestalost ekspresije oba molekula karakteriše APL ($p=0,000$). Subpopulacije HLA-DR⁺ ili CD11a⁺ blasta u većini suptipova AML-RGP, obuhvataju više od polovine populacije, pri čemu je u slučaju oba molekula subpopulacija značajno manja u APL ($p=0,000$). Molekul

HLA-DR karakteriše visoka ili heterogena ekspresije u većini suptipova AML-RGP. U slučaju molekula CD11a, niska ekspresija karakteriše APL, visoka AML sa t(v;11q23), dok je u ostalim suptipovima obrazac ekspresije veoma varijabilan ($p > 0,05$).

Među ranim linijski nespecifičnim hLDM, visoku učestalost ekspresije u većini suptipova AML-RGP su pokazali molekuli **CD38**, **CD123** i **CD135**. Prosečna vrednost ekspresije sva tri molekula obuhvata ~dve trećine populacije u većini suptipova AML-RGP. U suptipu APL je utvrđeno prisustvo značajno manje frakcije CD38⁺ i CD135⁺ LĆ u odnosu na ostale suptipove AML-RGP ($p < 0,01$). Molekul CD38 karakteriše pretežno niska ekspresija u suptipu APL, pri čemu je u ostalim suptipovima ekspresija srednja ili visoka ($p = 0,001$). Molekuli CD123 i CD135 su pretežno eksprimirani prema niskom ili srednjem obrascu u većini suptipova AML-RGP.

Molekul **CD71** je eksprimiran sa visokom učestalošću u svim suptipovima AML-RGP, i to dominantno prema niskom obrascu ekspresije. Subpopulacija CD71⁺ LĆ je značajno niža u APL i AML sa t(v;11q23) u poređenju sa ostalim suptipovima ($p = 0,001$).

Molekul **CD34** je pokazao diferencijalnu ekspresiju na populaciji blasta u različitim suptipovima AML-RGP ($p = 0,000$). Mada je u većini suptipova eksprimiran sa visokom učestalošću, niža učestalost je utvrđena u APL (56%), a posebno u AML sa *NPM1*^{mut} (27%). Molekul CD34 je u većini suptipova eksprimiran na bar dve trećine LĆ, ali je CD34⁺ subpopulacija značajno manja u APL (24% LĆ) i AML sa *NPM1*^{mut} (12% LĆ) ($p = 0,000$). Heterogen obrazac ekspresije CD34 molekula predomina u suptipu APL, dok je u preostalim suptipovima AML-RGP eksprimiran prema visokom ili heterogenom obrascu ($p = 0,000$).

Molekul **CD117** je eksprimiran sa visokom učestalošću ($\geq 97\%$) na populaciji blasta većine suptipova AML-RGP, uz znatno nižu učestalost u suptipu AML sa t(v;11q23) (67%) ($p > 0,05$). Prosečna ekspresija molekula CD117 obuhvata bar dve trećine blasta u većini suptipova, pri čemu najveća CD117⁺

subpopulacija karakteriše AML sa *CEBPA*^{mut} (91% LĆ), a najniža subpopulacija AML sa t(v;11q23) (44% LĆ) (p=0,022). Obrasci ekspresije CD117 molekula su visok ili heterogen u većini suptipova AML-RGP, izuzev APL gde su najučestaliji nizak ili srednji obrazac ekspresije (p=0,002).

Ispitivanje učestalosti koekspresije molekula *CD34+CD117+HLA-DR+* na populaciji blasta u različitim suptipovima AML-RGP, pokazalo je visoku učestalost koekspresije u tri suptipa: AML sa t(8;21) (12/12, 100%), AML sa *CEBPA*^{mut} (7/8, 87,5%) i AML sa inv(16)/t(16;16) (4/5, 80%). Niža učestalost koekspresije ovih molekula je utvrđena u AML sa t(v;11q23) (1/3, 33,3%) i AML sa *NPMA1*^{mut} (12/44, 27,3%), a posebno niska u suptipu APL (5/32, 15,6%). U poslednjem suptipu leukemijski blasti ili eksprimiraju samo CD117 molekul (13/32, 40,6%) ili koeksprimiraju molekule CD34 i CD117 (13/32, 40,6%).

Rani diferencijacioni mijelomonocitni molekul *CD13* je eksprimiran sa visokom učestalošću (≥96% slučajeva) na populaciji blasta suptipova AML-RGP. Prosečna vrednost subpopulacije CD13⁺ blasta u većini suptipova obuhvata bar dve trećine populacije. Molekul CD13 ispoljava veoma varijabilne obrasce ekspresije u suptipu APL, dok u AML sa t(8;21) i AML sa *CEBPA*^{mut} dominiraju nizak ili srednji, a u ostalim suptipovima srednji ili heterogen obrazac (p=0,005).

Rani diferencijacioni mijelomonocitni molekul *CD33* je eksprimiran sa maksimalnom učestalošću na populaciji blasta svih suptipova AML-RGP. Subpopulacija CD33⁺ blasta je predominantna u većini suptipova AML-RGP (≥90% LĆ), ali je značajno niža subpopulacija utvrđena u AML sa t(8;21) (69% LĆ) (p=0,000). Pretežno visoka ekspresija CD33 molekula karakteriše APL, AML sa *NPM1*^{mut} i AML sa t(v;11q23), dok je u slučaju ostalih suptipova prisutna velika varijabilnost u obrascima ekspresije ovog molekula (p=0,000).

Učestalost ekspresije *cMPO*, kao i prosečna ekspresija ovog molekula značajno variraju u različitim suptipovima AML-RGP (p<0,01). Učestalost ekspresije cMPO je visoka u svim suptipovima AML-RGP, izuzev u AML sa t(v;11q23) (33% slučajeva). Većina suptipova ispoljava ekspresiju bar na dve

trećine populacije blasta, pri čemu značajno niža prosečna ekspresija ovog molekula karakteriše AML sa *NPM1*^{mut} (41% LĆ) i AML t(v;11q23) (11% LĆ). Predominantno visoka ekspresija cMPO karakteriše AML sa *CEBPA*^{mut} i APL, heterogena ekspresija AML sa t(v;11q23) i AML sa inv(16)/t(16;16), dok pretežno niska ekspresija karakteriše AML sa t(8;21) i AML sa *NPM1*^{mut} (p=0,000).

Ekspresija ***cLizozima*** je ispitivana u pojedinim suptipovima AML-RGP, gde je pokazana visoka učestalost ekspresije (≥80%), izuzev suptipa AML sa t(8;21) (40%) (p>0,05). Značajno manja cLizozim⁺ frakcija LĆ je utvrđena u APL (22% LĆ) i AML sa t(8;21) (11% LĆ) (p=0,013), uz heterogen obrazac ekspresije (p=0,015).

Različiti aspekti ekspresije ***kasnih mijelomonocitnih hLDM*** na populaciji leukemijskih blasta suptipova AML-RGP su prikazani u Tabeli 38./Prilog 1. Među kasnijim diferencijacionim mijelomonocitnim molekulima, maksimalnu učestalost ekspresije u svim suptipovima AML-RGP ispoljava ***cCD68***, uz visoku prosečnu vrednost ekspresije u svim suptipovima (≥80% LĆ) (p>0,05). Obrazac ekspresije molekula cCD68 je najčešće visok ili heterogen.

Molekul ***CD15*** je eksprimiran sa značajno većom učestalošću u AML sa inv(16)/t(16;16) (100%) u odnosu na AML sa *CEBPA*^{mut} i AML sa *NPM1*^{mut} (~60%) (p=0,002). Subpopulacija CD15⁺ ćelija je najniža u APL (10% LĆ), dok u ostalim suptipovima čini ~ jednu trećinu populacije (p=0,001). Niska ekspresija CD15 molekula je najučestalija u suptipovima APL i AML sa *CEBPA*^{mut}, odnosno heterogena u AML sa t(8;21) i AML sa inv(16)/t(16;16) (p=0,052).

Najveća učestalost ekspresije ***CD11b*** molekula karakteriše AML sa t(v;11q23) (100%), AML sa inv(16)/t(16;16) (60%) i AML sa *NPM1*^{mut} (54%) (p=0,000), uz pretežno heterogen ili visok obrazac ekspresije. Navedene suptipove karakteriše i značajno veća frakcija CD11b⁺ blasta (30-60% LĆ), u poređenju sa APL i AML sa *CEBPA*^{mut} (<10% LĆ) (p=0,000).

Molekul ***CD11c*** je eksprimiran sa najvećom učestalošću u AML sa t(v;11q23) (100%), AML sa inv(16)/t(16;16) (80%) i AML sa *NPM1*^{mut} (74%)

($p=0,000$), uz veoma varijabilan obrazac ekspresije u navedenim suptipovima. Navedene suptipove karakteriše i značajno veća frakcija CD11c⁺ blasta (38-66% LĆ) u poređenju sa AML sa t(8;21) i AML sa *CEBPA*^{mut} ($\leq 15\%$ LĆ) ($p=0,000$).

Najveća učestalost ekspresije molekula **CD4** je utvrđena u AML sa t(v;11q23) (100%), AML sa inv(16)/t(16;16) (80%) i AML sa *NPM1*^{mut} (65%) ($p=0,000$), uz pretežno nizak ili srednji obrazac ekspresije. Navedene suptipove karakteriše i značajno veća frakcija CD4⁺ blasta (47-68% LĆ), u poređenju sa suptipovima APL, AML sa t(8;21) i AML sa *CEBPA*^{mut} ($<27\%$ LĆ) ($p=0,000$).

Molekul **CD64** je eksprimiran u većini suptipova AML-RGP (50-80% slučajeva), uz odsustvo ekspresije samo u AML sa t(8;21) ($p=0,039$). CD64 je eksprimiran na znatnoj populaciji blasta većine suptipova (40-60% LĆ), pretežno prema obrascu visoke ekspresije ($p=0,000$). Relativno mala subpopulacija CD64⁺ blasta karakteriše APL i AML sa *CEBPA*^{mut} ($\leq 28\%$ LĆ), uz karakteristično nizak obrazac ekspresije.

Ekspresija molekula **CD36** je takođe vezana za tri suptipa AML-RGP, AML sa t(v;11q23) (66%), AML sa inv(16)/t(16;16) (60%) i AML sa *NPM1*^{mut} (41%) ($p=0,000$), uz pretežno heterogen obrazac ekspresije. Navedena tri suptipa karakteriše i značajno veća frakcija CD36⁺ ćelija (30-50% LĆ) ($p=0,000$).

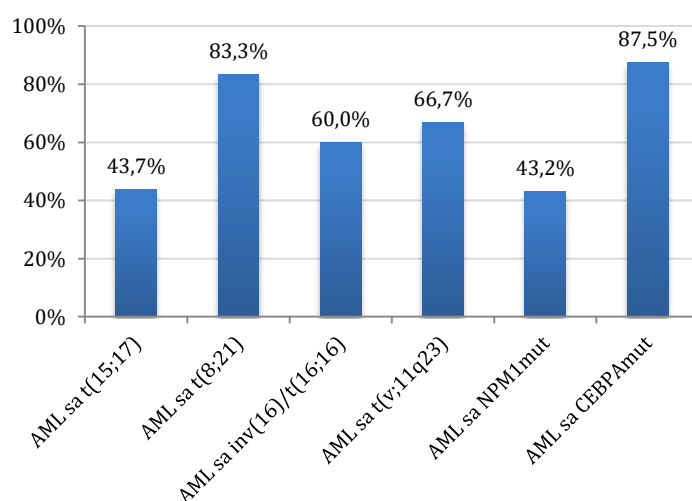
I ekspresija molekula **CD14** je vezana za tri suptipa AML-RGP, AML sa inv(16)/t(16;16) (40%), AML sa t(v;11q23) (33%) i AML sa *NPM1*^{mut} (20%) ($p=0,008$), uz pretežno heterogen obrazac ekspresije. Navedena tri suptipa karakteriše i značajno veća frakcija CD14⁺ ćelija (10-28% LĆ) ($p=0,000$).

Ekspresija molekula **CD163** je utvrđena sa niskom učestalošću u suptipu AML sa *NPM1*^{mut} (25%) ($p=0,046$), na veoma maloj subpopulaciji ćelija (12% LĆ) ($p=0,012$), uz varijabilan obrazac ekspresije.

6.3. Analiza ektopične ekspresije limfoidnih hLDM na populaciji blasta suptipova AML-RGP

Analiza ektopične ekspresije bar jednog od ispitivanih limfoidnih hLDM loze na populaciji leukemijskih blasta, pokazala je visoku učestalost, posebno u AML sa t(8;21) i AML sa *CEBPA*^{mut} (≥80% slučajeva), odnosno najnižu učestalost u APL i AML sa *NPM1*^{mut} (~43% slučajeva) (Grafikon 26).

Različiti aspekti **ektopične ekspresije limfoidnih hLDM** na populaciji leukemijskih blasta suptipova AML-RGP su prikazani u Tabeli 39./Prilog 1. Ekspresija **CD56** molekula je bila odsutna samo u AML sa *CEBPA*^{mut}, dok u ostalim suptipovima AML-RGP ovaj molekul ispoljava varijabilnu ekspresiju, uz znatno višu učestalost u AML sa t(8;21) (50%) i AML sa t(v;11q23) (33%) u poređenju sa većinom ostalih suptipova (~20%) (p>0,05). Molekul CD56 je u eksprimiran samo na frakciji leukemijskih ćelija, pri čemu je CD56⁺ subpopulacija znatno veća u suptipovima AML sa t(8;21) (39%) i AML sa t(v;11q23) (33% LĆ) (p>0,05). Pretežno niska ekspresija CD56 molekula karakteriše APL, visoka ili heterogena AML sa t(8;21), uz varijabilan obrazac ekspresije u AML sa *NPM1*^{mut} (p=0,020).



Grafikon 26. Učestalost ektopične ekspresije bar jednog od ispitivanih limfoidnih hLDM na populaciji blasta suptipova AML-RGP

Najveća učestalost ekspresije **CD7** molekula karakteriše AML sa *CEBPA*^{mut} (88%), pri čemu je u ostalim suptipovima značajno niža (20-33%) ($p=0,000$). Subpopulacija CD7⁺ blasta je značajno veća u AML sa *CEBPA*^{mut} (65% LĆ) u poređenju sa AML sa t(v;11q23) (33% LĆ) i ostalim suptipovima ($\leq 15\%$ LĆ) ($p=0,000$). Predominantan obrazac ekspresije CD7 molekula je nizak u svim suptipovima AML-RGP.

Ektopična ekspresija molekula **CD2** utvrđena je sa varijabilnom učestalošću u većini suptipova AML-RGP, izuzev u AML sa specifičnim mutacijama ($p=0,001$). Najviša učestalost karakteriše APL i AML sa t(v;11q23) (~ jedna trećina slučajeva), odnosno AML sa inv(16)/t(16;16) (20%). Prosečna vrednost CD2⁺ subpopulacije ukazuje da je on ekspimiran na maloj frakciji blasta (10-20% LĆ), predominantno prema obrascu niske ekspresije.

U grupi hLDM B loze, molekul **CD19** ispoljava selektivnu ektopičnu ekspresiju prema niskom ili srednjem obrascu u AML sa t(8;21) (75%), odnosno prema niskom obrascu u suptipu AML sa *NPM1*^{mut} (7%) ($p=0,000$). Subpopulacija CD19⁺ blasta je značajno veća u suptipu AML sa t(8;21) u poređenju sa AML sa *NPM1*^{mut} (42% vs. 5% LĆ, $p=0,000$).

Ekspresija **CD22** molekula je utvrđena sa niskom učestalošću isključivo u suptipovima AML sa t(8;21) (9%) i AML sa *NPM1*^{mut} (5%). Subpopulacija CD22⁺ blasta je izrazito mala ($\leq 10\%$ LĆ) ($p=0,000$), uz pretežno nisku ekspresije.

Molekul **cCD79a** je selektivno ekspimiran samo u suptipu AML sa t(8;21) (33%) ($p=0,010$), na veoma maloj subpopulaciji ćelija (8% LĆ), isključivo prema obrascu niske ekspresije.

6.4. Ispitivanje imunofenotipskih karakteristika granulocitnih i monocitnih prekursora suptipova AML-RGP

Analiza populacije *granulocitnih prekursora* pokazala je da većina suptipova AML-RGP ima relativno malu populacija granulocitnih prekursora u ks ($\leq 18\%$ NĆ), a da je ova populacija značajno veća u AML sa t(8;21), AML sa inv(16)/t(16;16) i AML sa *CEBPA*^{mut} (Tabela 40.) ($p=0,000$). Navedeni suptipovi se međusobno značajno razlikuju u prosečnoj veličini populacije promijelocita, koja predomina u AML sa inv(16)/t(16;16) i AML sa t(8;21) u odnosu na AML sa *CEBPA*^{mut}, gde dominantnu populaciju čine mijelociti ($p<0,05$).

"Šift u levo" u populaciji granulocitnih prekursora je utvrđen sa visokom učestalošću u sva tri suptipa AML-RGP ($\geq 82\%$). Blok u sazrevanju je prisutan sa nižom učestalošću u AML sa t(8;21) (73%) u poređenju sa ostala dva suptipa (100% svaki).

Ispitivanje promena u tipu *ćelijske granulacije* populacije granulocitnih prekursora bolesnika sa AML-RGP, pokazalo je veću učestalost *atipične granulacije* u AML sa t(8;21) (91%) u odnosu na ostale suptipove (67%). Atipična hipogranulacija je utvrđena samo u AML sa inv(16)/t(16;16) i AML sa *CEBPA*^{mut}, i to sa nižom učestalošću ($<33\%$).

Tabela 40. Karakteristike granulocitnih prekursora tri suptipa AML-RGP

Karakteristika	AML sa t(8;21)	AML sa inv(16)/t(16;16)	AML sa <i>CEBPA</i> ^{mut}	p
Gr prek ks $\bar{x} \pm SD$ (% NĆ) Me (opseg)	(n=12) 42,83 ± 24,16 44 (6 - 82)	(n=4) 20,00 ± 8,76 23,5 (7 - 26)	(n=7) 20,43 ± 16,40 21 (2 - 48)	0,065
Promijelociti $\bar{x} \pm SD$ (% Gr prek.) Me (opseg)	(n=11) 37,64 ± 21,89 29 (7 - 66)	(n=3) 56,33 ± 21,73 60 (33 - 76)	(n=5) 16,80 ± 3,11 18 (13 - 20)	0,045
Mijelociti $\bar{x} \pm SD$ (% Gr prek.) Me (opseg)	(n=11) 29,91 ± 14,15 25 (12 - 63)	(n=3) 22,67 ± 6,81 25 (15 - 28)	(n=5) 53,00 ± 6,96 50 (47 - 61)	0,018

Metamijelociti $\bar{x} \pm SD$ (% Gr prek.) Me (opseg)	(n=11) 24,73 ± 12,67 28 (7 - 50)	(n=3) 15,33 ± 8,50 12 (9 - 25)	(n=5) 26,60 ± 11,13 25 (14 - 38)	0,341
Neutrofili $\bar{x} \pm SD$ (% Gr prek.) Me (opseg)	(n=11) 7,91 ± 11,67 2 (0 - 31)	(n=3) 3,33 ± 5,77 0 (0 - 10)	(n=5) 3,60 ± 2,88 2 (1 - 8)	0,666
Šift u levo Blok u sazrevanju	81,8% (9/11) 72,7% (8/11)	100% (3/3) 100% (3/3)	100% (5/5) 100% (5/5)	0,444 0,274
Gran Gr prek. Atipična hipogran. Atipična gran.	0% (0/11) 90,9% (10/11)	33,3% (1/3) 66,7% (2/3)	33,3% (2/6) 66,7% (4/6)	0,303
Maturaciona asinh. CD34+ HLA-DR+ CD45^{high} CD135+ CD15^{het} cMPO^{p+} CD33- CD13^{high}	100% (11/11) 45,5% (5/11) 100% (11/11) 63,6% (7/11) 16,7% (1/6) 40% (4/10) 45,5% (5/11) 9,1% (1/11) 0% (0/11)	100% (3/3) 66,7% (2/3) 66,7% (2/3) / 33,3% (1/3) 0% (0/3) 0% (0/3) 33,3% (1/3)	100% (5/5) 80% (4/5) 100% (5/5) 40% (2/5) 0% (0/1) 40% (2/5) 0% (0/5) 0% (0/5) 0% (0/5)	1,000
Aber. eksp. Li Ag CD56+ CD2+ CD7+ CD19+	45,5% (5/11) 36,4% (4/11) 0% (0/11) 0% (0/11) 9,1% (1/11)	0% (0/3) 0% (0/3) 0% (0/3) 0% (0/3) 0% (0/3)	20% (1/5) 0% (0/5) 0% (0/5) 20% (1/5) 0% (0/5)	0,296

Skraćenice: Gr prek., granulocitni prekursori; gran, granulacija; ks, kostna srž; Li, limfoidni; Me, medijana; NĆ, nukleirane ćelie; SD, standardna devijacija; \bar{x} , srednja vrednost; Statistički testovi - Mann-Whitney U Test i Pirsonov χ^2 test

Ispitivanje prisustva **maturacione asinhronije** u ekspresiji velike grupe hLDM na populaciji granulocitnih prekursora ks tri suptipa AML-RGP (Tabela 40.), pokazala je prisustvo bar jednog od navedenih poremećaja kod sva tri ispitivana suptipa AML-RGP.

Učestalost **ektopične ekspresije** bar jednog od ispitivanih molekula limfoidne loze je utvrđena samo u AML sa t(8;21) (46%) i AML sa *CEBPA*^{mut} (20%) (p<0,05). Analiza **monocitnih prekursora** ks pokazala je da u većini suptipova AML-RGP ova populacija čini relativno malu populaciju (<10% NĆ), pri čemu je značajno povišena u tri suptipa, AML sa inv(16)/t(16;16), AML sa *NPM1*^{mut} i AML sa t(v;11q23) (Tabela 41.) (p=0.000).

Ispitivanje ćelijske strukture populacije monocitnih prekursora ks (Tabela 41.), pokazalo je da u AML sa inv(16)/t(16;16), dominantnu populaciju

čine mijelo/monoblasti (54%), dok populacija promonocit/monocit predominira u AML sa *NPM1*^{mut} i AML sa t(v;11q23) (p>0,05).

Tabela 41. Karakteristike monocitnih prekursora tri suptipa AML-RGP sa zahvaćenom monocitnom lozom

Karakteristika	AML sa inv(16)/t(16;16)	AML sa t(v;11q23)	AML sa <i>NPM1</i> ^{mut}	p
Mono prek. ks $\bar{x} \pm SD$ (% NČ) Me (opseg)	n=4 28,00 ± 12,78 22,5 (20 - 47)	n=3 40,67 ± 35,70 45 (3 - 74)	n=42 28,72 ± 30,91 13 (0,17 - 95)	0,144
Mijelo/monoblasti $\bar{x} \pm SD$ (% Mo prek.) Me (opseg)	n=4 53,50 ± 23,17 63 (19 - 69)	n=2 11,50 ± 9,19 11,5 (5 - 18)	n=21 30,86 ± 31,16 18 (1 - 99)	0,171
Promonociti $\bar{x} \pm SD$ (% Mo prek.) Me (opseg)	n=4 23,25 ± 6,95 23 (15 - 32)	n=2 47,50 ± 47,38 47,5 (14 - 81)	n=22 49,96 ± 23,44 54,5 (0 - 93)	0,161
Monociti $\bar{x} \pm SD$ (% Mo prek.) Me (opseg)	n=4 22,50 ± 18,27 16 (9 - 49)	n=2 41,00 ± 56,57 41 (1 - 81)	n=22 20,41 ± 16,67 16 (1 - 55)	0,897

Skraćenice: ks, kostna srž; NČ, nukleirane ćelike; Mo prek., monocitni prekursori; Me, medijana; SD, standardna devijacija; \bar{x} , srednja vrednost; Statistički testovi - Mann-Whitney U Test

6.5. Analiza hematopoezne loze zahvaćene leukemijskim procesom i stepena diferenciranosti leukemijskih ćelija AML-RGP

Na osnovu imunofenotipskog profila leukemijske populacije ćelija, utvrđen je tip hematopoezne loze zahvaćene leukemijskim procesom u suptipovima AML-RGP na dg (Tabela 42.). Tip hematopoezne loze zahvaćene leukemijskim procesom značajno se razlikuje između suptipova AML-RGP (p=0,000). Granulocitna loza je pretežno zahvaćena leukemijskim procesom u APL, AML sa t(8;21) i AML sa *CEBPA*^{mut} (>87%), sa druge strane granulocitna i monocitna loza su najčešće istovremeno zahvaćene u AML sa inv(16)/t(16;16) (80%). Monocitna loza je izolovano najčešće zahvaćena u AML sa t(v;11q23)

(67%), dok je zahvaćenost eritrocitne loze veoma retka, utvrđena samo u AML sa t(8;21) i AML sa *NPM1*^{mut}. Osim toga, u slučaju AML sa *NPM1*^{mut}, utvrđena je velika heterogenost u odnosu na tip loze zahvaćene leukemijskim procesom.

Tabela 42. Imunofenotipski definisan tip loze zahvaćene leukemijskim procesom u suptipovima AML-RGP

Suptip AML-RGP	Gr loza f (%)	Mono loza f (%)	Gr/ Mono loza f (%)	Gr/Eritro loza f (%)
AML sa t(15;17)	100 (32/32)	0 (0/32)	0 (0/32)	0 (0/32)
AML sa t(8;21)	91,7 (11/12)	0 (0/12)	0 (0/12)	8,3 (1/12)
AML sa inv(16)/t(16;16)	0 (0/5)	20 (1/5)	80,0 (4/5)	0 (0/5)
AML sa t(v;11q23)	33,3 (1/3)	66,7 (2/3)	0 (0/3)	0 (0/3)
AML sa <i>NPM1</i> ^{mut}	38,6 (17/44)	31,8 (14/44)	27,3 (12/44)	2,3 (1/44)
AML sa <i>CEBPA</i> ^{mut}	87,5 (7/8)	12,5 (1/8)	0 (0/8)	0 (0/8)

Skraćenice: Eritro, eritrocitna; f, učestalost ekspresije; Gr, granulocitna; Mono, monocitna.

Analiza prisustva znakova diferencijacije u leukemijskoj populaciji ćelija suptipova AML-RGP (Tabela 43.), pokazala je da se leukemijske ćelije u APL najčešće sastoje iz populacije leukemijskih blasta sa znacima diskretne diferencijacije (78%), što se značajno razlikuje od ostalih suptipova u kojima je najučestalije istovremeno prisustvo populacija leukemijskih blasta i prekursora ($p=0,000$).

Tabela 43. Imunofenotipski definisan stepen diferentovanosti populacije leukemijskih ćelija suptipova AML-RGP na dg

Suptip AML-RGP	Blasti bez diferencijacije	Blasti sa diferencijacijom	Leukemijski blasti i prekursori
AML sa t(15;17)	15,6 (5/32)	78,1 (25/32)	6,3 (2/32)
AML sa t(8;21)	0 (0/12)	16,7 (2/12)	83,3 (10/12)
AML sa inv(16)/t(16;16)	0 (0/5)	20 (1/5)	80,0 (4/5)
AML sa t(v;11q23)	0 (0/3)	0 (0/3)	100 (3/3)
AML sa <i>NPM1</i> ^{mut}	7,0 (3/43)	25,6 (11/43)	67,4 (29/43)
AML sa <i>CEBPA</i> ^{mut}	12,5 (1/8)	25,0 (2/8)	62,5 (5/8)

Skraćenice: Eritro, eritrocitna; f, učestalost ekspresije; Gr, granulocitna; Mono, monocitna.

7. Ispitivanje imunofenotipskih karakteristika suptipova AML-NOS

Bolesnici sa dg AML-NOS čine 48% (135/281) naše grupe bolesnika sa AML. Demografske i kliničko-hematološke karakteristike suptipova AML-NOS su prikazane u Tabeli 44./Prilog 1. Muškarci čine dve trećine bolesnika u većini suptipova AML-NOS, osim u akutnoj monocitnoj leukemiji gde je učestalost muškog i ženskog pola približno ista, dok je u akutnoj mijelomonocitnoj leukemiji ženski pol učestaliji ($p > 0,05$).

Medijana **starosti** bolesnika svih suptipova AML-NOS iznosi ≥ 54 godine. Posebno veća medijana starosti (≥ 60 godina) karakteriše suptipove - akutna monoblastna leukemija, AML sa minimalnom diferencijacijom i akutna bazofilna leukemija. Upoređivanje prosečne starosti bolesnika različitih suptipova AML-NOS nije potvrdilo značajnost razlika ($p > 0,05$).

U pogledu prosečnih vrednosti **Le** značajno niže prosečne vrednosti Le ($<10 \times 10^9/l$) imaju AML sa minimalnom diferencijacijom i akutna bazofilna leukemija; srednje prosečne vrednosti Le ($\leq 30 \times 10^9/l$) imaju suptipovi AML koje karakteriše zahvaćenost samo granulocitne loze – AML bez sazrevanja i AML sa sazrevanjem ($p=0,000$). Sa druge strane, značajno više prosečne vrednosti Le ($\geq 30 \times 10^9/l$) imaju suptipovi AML-NOS sa zahvaćenom monocitnom lozom – akutna monoblastna i akutna mijelomonocitna leukemija ($p<0,05$). Suptip akutna monocitna leukemija karakteriše izrazito visoka vrednost Le ($>100 \times 10^9/l$) u odnosu na ostale subtipove ($p<0,001$). Značajnost razlika je potvrđena i između i akutne monocitne i akutne monoblastne ($p=0,004$), odnosno akutne mijelomonocitne leukemije ($p=0,001$).

Prosečne vrednoste **Tr** svih suptipova AML-NOS su snižene, pri čemu postojeće razlike nisu značajne ($p>0,05$). Učestalost trombocitopenije je veoma visoka u svim suptipovima AML-NOS i iznosi $\geq 86\%$ slučajeva u svakom od suptipova. Prosečne vrednosti **Hb** svih suptipova AML-NOS su snižene, pri čemu postojeće razlike nisu značajne ($p>0,05$). Učestalost anemije je veoma visoka u svim suptipovima AML-NOS i iznosi $\geq 86\%$ slučajeva u svakom od suptipova.

Prosečne vrednosti **LDH** u serumu su povišene u svim suptipovima AML-NOS. Najniže vrednosti su utvrđene u suptipovima AML sa minimalnom diferencijacijom i akutna monoblastna leukemija, a najviše u suptipu AML bez sazrevanja. Međutim, razlike nisu potvrđene kao značajne ($p>0,05$), mada je upoređivanje vrednosti LHD u serumu između akutne monoblastne i akutne monocitne leukemije, potvrdilo značajnost razlika ($p=0,028$). Učestalost bolesnika sa povećanom vrednošću LDH je varirala među suptipovima AML-NOS, uz najnižu učestalost u AML sa minimalnom diferencijacijom (40%) i najvišu učestalost u akutnoj monocitnoj leukemiji (83%) ($p>0,05$).

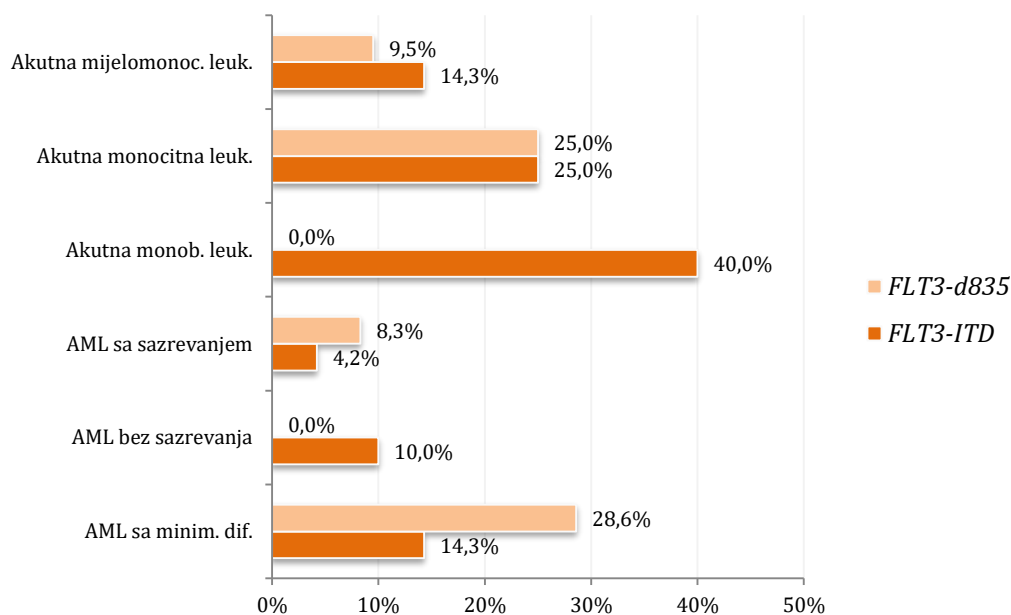
Analiza prisustva **limfadenopatije** je pokazala nisku učestalost samo u tri suptipa AML-NOS - akutna monocitna, akutna mijelomonocitna i AML sa maturacijom ($p>0,05$). **Hepatomegalija i/ili splenomegalija** su utvrđene u više suptipova AML-NOS, sa najvećom učestalošću u akutnoj monocitnoj i akutnoj

bazofilnoj leukemiji (50% svaki). Dvostruko nižu učestalost su imali suptipovi akutna mijelomonocitna i AML bez sazrevanja. Hepatomegalija i/ili splenomegalija nisu registrovane samo u AML sa minimalnom diferencijacijom. Primećene razlike nisu značajne ($p>0,05$).

Citomorfološki procenjene vrednosti **blasta pk** bolesnika su značajno varirale zavisno od suptipa AML-NOS ($p=0,004$). Najviša prosečna vrednost populacije blasta u pk je registrovana u Akutnoj monocitnoj leukemiji (68% Le), u poređenju sa AML sa minimalnom diferencijacijom ($p=0,004$), AML sa sazrevanjem ($p=0,000$), Akutnom monoblastnom leukemijom ($p=0,027$) i Akutnom mijelomonocitnom leukemijom ($p=0,000$). Najnižu prosečnu vrednost populacije blasta pk ima AML sa minimalnom diferencijacijom (25% Le). Citomorfološki procenjene vrednosti populacije **blasta ks** bolesnika su značajno varirale među suptipovima AML-NOS ($p=0,000$). Značajno niža prosečna vrednost blasta u ks registrovana je u AML sa sazrevanjem (55% NĆ) u poređenju sa AML sa minimalnom diferencijacijom, AML bez sazrevanja i Akutna monocitna leukemija ($p<0,05$). Relativno nižu prosečnu vrednost blasta u ks ima i akutna mijelomonocitna leukemija (64% NĆ), i ova se vrednost značajno razlikuje u poređenju sa AML bez sazrevanja i akutnom monocitnom leukemijom ($p=0,002$).

Citogenetska analiza je pokazala prisustvo **aberantnog kariotipa** u svim suptipovima AML-NOS, ali sa različitom učestalošću: AML sa minimalnom diferencijacijom (3/9, 33,3%), AML bez sazrevanja (4/15, 26,7%), AML sa sazrevanjem (11/37, 29,7%), akutna monoblastna leukemija (7/15, 46,7%), akutna monocitna leukemija (6/9, 31,6%), akutna mijelomonocitna leukemija (14/38, 36,8%) i akutna bazofilna leukemija (2/2, 100%) ($p>0,05$).

Ispitivanje **FLT3 mutacije**, pokazalo je prisustvo bar jednog od tipova ove mutacije u svim suptipovima AML-NOS, osim akutne bazofilne leukemije: AML sa minimalnom diferencijacijom (3/7, 42,9%), AML bez sazrevanja (1/10, 10%), AML sa sazrevanjem (3/24, 12,5%), akutna monoblastna leukemija (4/10, 40%), akutna monocitna leukemija (4/8, 50%) i akutna mijelomonocitna leukemija (3/21, 14,3%) ($p>0,05$).



Grafikon 27. Učestalost različitih tipova *FLT3* mutacije u suptipovima AML-NOS

Mutacija *FLT3*-ITD tipa je detektovana u svim suptipovima AML-NOS, dok je *FLT3*-d835 detektovana u većini suptipova, osim u AML bez sazrevanja i akutnoj monoblastnoj leukemiji (Grafikon 27.)

7.1. Analiza imunofenotipski definisanih populacija ks AML-NOS

Zastupljenost imunološki definisanih populacija ćelija u ks bolesnika sa različitim suptipovima AML-NOS je prikazana u Tabeli 45./Prilog 1.

Populacija leukemijskih blasta, definisana prema obrascu CD45/SSC, predstavlja dominantnu populaciju u ks bolesnika većine suptipova AML-NOS ($\geq 60\%$ NĆ), uz značajne razlike među njima ($p=0.000$). Značajno niža prosečnavrednost populacije blasta je utvrđena u slučaju AML sa sazrevanjem

(46% NĆ) u poređenju sa suptipom AML bez sazrevanja ($p=0.000$) i svim suptipovima sa zahvaćenom monocitnom lozom ($p<0.05$). Značajno viša prosečna vrednost populacije blasta je utvrđena u akutnoj monocitnoj leukemiji (86% NĆ) u poređenju sa akutnom monoblastnom leukemijom i akutnom mijelomonoblastnom leukemijom ($p<0.01$).

Analiza **obrazaca ekspresije CD45 molekula** u suptipovima AML-NOS pokazala je prisustvo značajnih razlika ($p=0,000$). Najveća učestalost niskog i/ili srednjeg obrasca ekspresije CD45 molekula, utvrđena je u suptipovima AML sa minimalnom diferencijacijom, AML bez sazrevanja i AML sa sazrevanjem. U akutnoj bazofilnoj leukemiji, kao i u suptipovima u kojima je leukemijskim procesom zahvaćena i monocitna loza, najučestaliji obrasci ekspresije CD45 su srednji i/ili visok obrazac. Heterogen obrazac ekspresije CD45 molekula je zastupljen sa najvećom učestalošću u akutnoj mijelomonocitnoj leukemiji (36%).

Analiza tipova **ćelijske granulacije**, pokazala je da niska ili srednja ćelijska granulacija predstavljaju najučestalije obrasce u svim suptipovima AML-NOS. Heterogen obrazac ćelijske granulacije je zastupljen sa višom učestalošću u akutnoj mijelomonocitnoj (32%) i akutnoj monocitnoj leukemiji (21%) ($p=0,000$).

Prosečne vrednosti populacije **leukemijskih ćelija** definisanih prema **CD34/CD45/SSC** karakteristikama, značajno su se razlikovale između suptipova AML-NOS ($p=0,000$). Značajno veće prosečne vrednosti CD34⁺ blasta su utvrđene u AML sa minimalnom diferencijacijom, AML bez sazrevanja i akutnoj monoblastnoj leukemiji ($\geq 57\%$ NĆ) u odnosu na AML sa sazrevanjem, akutnu monocitnu leukemiju i akutnu mijelomonocitnu leukemiju ($\leq 34\%$) ($p<0.05$). Značajno više prosečne vrednosti populacije CD34⁺ leukemijskih ćelija su utvrđene u AML sa sazrevanjem (34% NĆ) u poređenju sa akutnom mijelomonocitnom (25% NĆ) i akutnom monocitnom leukemijom (7% NĆ) ($p<0.01$), kao i u suptipu akutna mijelomonocitna leukemija (25%) u odnosu na akutnu monocitnu leukemiju ($p=0.000$).

Prosečne vrednosti **populacije leukemijskih ćelija**, definisanih prema **CD117/CD45/SSC** karakteristikama, značajno se razlikuju između suptipova AML-NOS ($p=0,000$). Značajno veće prosečne vrednosti CD117⁺ blasta su utvrđene u AML sa minimalnom diferencijacijom, AML bez sazrevanja i akutnoj monoblastnoj leukemiji ($\geq 46\%$ NĆ) u odnosu na akutnu monocitnu i akutna mijelomonocitnu leukemiju ($p<0,05$). Niže prosečne vrednosti populacije CD117⁺ blasta su utvrđene u AML sa sazrevanjem (38% NĆ) u poređenju sa akutnom monocitnom leukemijom (14% NĆ) ($p=0,000$), kao i između akutne mijelomonocitne leukemije (29%) i akutne monocitne leukemije ($p=0,003$).

Analiza populacije **B-ćelijskih prekursora** – hematogona I/II, pokazala je niske prosečne vrednosti ove populacije ćelija u svim suptipovima AML-NOS ($p>0,05$). Najniže prosečne vrednosti su utvrđene u suptipovima AML sa minimalnom diferencijacijom, AML bez sazrevanja i akutnoj monocitnoj leukemiji.

Analiza prosečnih vrednosti populacije **granulocitnih prekursora** ks različitih suptipova AML-NOS, pokazala je prisustvo značajnih razlika među njima ($p=0,000$). Najveća prosečna vrednost populacije granulocitnih prekursora je utvrđena u AML sa sazrevanjem (34% NĆ) i akutnoj mijelomonocitnoj leukemiji (26% NĆ). Pri tome su oba suptipa pokazala značajne razlike u odnosu na akutnu monoblastnu leukemiju ($p<0,05$), odnosno suptipove AML sa minimalnom diferencijacijom, AML bez sazrevanja i akutna monocitna leukemija, koje je karakterisala niska prosečna vrednost ove populacije ($\leq 10\%$ NĆ) ($p<0,01$). Prosečna vrednost populacije **eoziñofila** je značajno viša u suptipu akutna mijelomonocitna leukemija (4,6% NĆ) u poređenju sa svim ostalim suptipovima AML-NOS ($\leq 1,5\%$ NĆ) ($p=0,006$).

Prosečna vrednost populacije **monocitnih prekursora** ks višestruko je povišena u ks bolesnika sa akutnom monocitnom (70% NĆ), akutnom mijelomonocitnom (28% NĆ) u poređenju sa suptipovima AML-NOS koje karakteriše zahvaćenost granulocitne loze leukemijskim procesom ($\leq 5\%$ NĆ) ($p<0,01$). Značajnost razlika je potvrđena i između svih suptipova AML-NOS koje karakteriše zahvaćenost monocitne loze leukemijskim procesom ($p<0,01$).

Prosečna vrednost populacije *eritrocitnih prekursora* ks je značajno niža u akutnoj monocitnoj leukemiji (0,7% NĆ) u poređenju sa suptipovima AML sa sazrevanjem (13% NĆ) i akutnom mijelomonocitnom leukemijom (8% NĆ) ($p=0,001$) odnosno AML bez sazrevanja (8% NĆ) ($p=0.033$).

Analiza prosečne zastupljenosti populacije *limfocita* u ks bolesnika sa različitim suptipovima AML-NOS, pokazala je najveću prosečnu vrednost ove populacije u suptipu AML sa minimalnom diferencijacijom (23% NĆ), što je potvrđeno kao statistički značajno u odnosu na suptipove AML bez sazrevanja (8% NĆ) ($p=0.046$), akutna mijelomonocitna leukemija (9% NĆ) ($p=0.015$) i akutna monocitna leukemija (6% NĆ) ($p=0.002$).

7.2. Analiza imunofenotipskih karakteristika populacije blasta suptipova AML-NOS

Različiti aspekti ekspresije *ranih linijski nespecifičnih i ranih mijelomonocitnih hLDM* na populaciji blasta suptipova AML-NOS su prikazani u Tabeli 46/Prilog 1.

Molekul *HLA-DR* kao i panleukocitni adhezioni molekul *CD11a* su eksprimirani na populaciji blasta u svim suptipovima AML-NOS sa visokom učestalošću ($\geq 80\%$) ($p>0,05$). Subpopulacije HLA-DR⁺ ili CD11a⁺ blasta u suptipovima AML-NOS, obuhvataju više od dve trećine populacije ($p>0,05$). Molekul HLA-DR karakteriše visok ili heterogen obrazac ekspresije u većini suptipova AML-NOS, dok u slučaju molekula CD11a, nizak ili srednji obrazac ekspresije karakteriše suptipove AML-NOS u kojima je leukemijskim procesom zahvaćena granulocitna loza, dok visok ili heterogen obrazac karakteriše suptipove u kojima je leukemijskim procesom zahvaćena monocitna loza ($p>0,05$).

Među ranim linijski nespecifičnim hLDM, visoku učestalost ekspresije na blastima svih suptipova AML-NOS pokazuju molekuli *CD38*, *CD123* i *CD135* (100% svaki). Prosečna vrednost ekspresije sva tri molekula obuhvata $\geq 70\%$

populacije blasta u svim suptipovima AML-NOS ($p>0,05$). Molekul CD38 karakteriše nizak ili srednji obrazac ekspresije u suptipovima u kojima je zahvaćena granulocitna loza, odnosno srednji ili visok u suptipovima sa zahvaćenom monocitnom lozom ($p>0,05$). Molekul CD123 je pretežno eksprimiran prema niskom ili srednjem obrascu u većini suptipova AML-NOS. U slučaju akutne bazofilne leukemije, oba bolesnika su ispoljila srednji obrazac ekspresije, dok su u slučaju akutne monocitne leukemije predominirali visok ili heterogen obrazac ($p>0,05$). Najučestaliji obrasci ekspresije molekula CD135 su nizak ili srednji u svim suptipovima AML-NOS.

Molekul **CD71** je eksprimiran sa visokom učestalošću u većini suptipova AML-NOS, uz značajno nižu učestalost u suptipu AML bez sazrevanja (73%) ($p=0,018$). Subpopulacija CD71⁺ blasta u većini suptipova čini dve trećine populacije, uz najnižu vrednost u tipu AML bez sazrevanja (55% LĆ) ($p>0,05$). Pritom, CD71 molekul je eksprimiran pretežno prema niskom obrascu na populaciji blasta većine suptipova AML-NOS.

Molekul **CD34** pokazuje diferencijalnu ekspresiju u različitim suptipovima AML-NOS ($p=0,000$). Mada je u većini suptipova eksprimiran sa visokom učestalošću ($\geq 80\%$), niža učestalost ekspresije je utvrđena u akutnoj mijelomonocitnoj leukemiji (71%), a posebno u akutnoj monocitnoj leukemiji (21%). Molekul CD34 je u većini suptipova eksprimiran na bar dve trećine populacije blasta, ali je CD34⁺ frakcija značajno manja u akutnoj mijelomonocitnoj (47% LĆ) i akutnoj monocitnoj leukemiji (9% LĆ) ($p=0,000$). Visok obrazac ekspresije CD34 molekula je dominantan u većini suptipova AML-NOS, osim u slučaju akutne mijelomonocitne i akutne monocitne leukemije, koje karakteriše pretežno heterogen obrazac ($p=0,002$).

Molekul **CD117** je eksprimiran sa visokom učestalošću ($\geq 90\%$) u većini suptipova AML-NOS, uz značajno nižu učestalost u akutnoj monocitnoj leukemiji (53%) ($p=0,000$). Prosečna ekspresija molekula CD117 obuhvata bar dve trećine populacije blasta u većini suptipova, uz značajno nižu prosečnu ekspresiju u akutnoj mijelomonocitnoj leukemiji (53% LĆ) i akutnoj monocitnoj leukemiji (20% LĆ) ($p=0,000$). Obrasci ekspresije CD117 molekula značajno

variraju između suptipova AML-NOS ($p=0,000$). Srednja ili visoka ekspresija CD117 molekula karakteriše suptipove sa zahvaćenom granulocitnom lozom, pri čemu visoka ili heterogena ekspresija karakteriše suptipove sa zahvaćenom monocitnom lozom.

Ispitivanje učestalosti koekspresije tri molekula **CD34⁺CD117⁺HLA-DR⁺** na populaciji blasta u suptipovima AML-NOS, pokazalo je visoku učestalost koekspresije u većini suptipova: AML sa minimalnom diferencijacijom (8/9, 88,9%), AML bez sazrevanja (12/15, 80%), AML sa sazrevanjem (31/37, 83,8%), akutna monoblastna leukemija (15/15, 100%) i akutna bazofilna leukemija (2/2, 100%). Niža učestalost koekspresije je utvrđena u akutnoj mijelomonocitnoj (26/38, 68,4%) i akutnoj monocitnoj leukemiji (4/19, 21,1%). U poslednjem suptipu leukemijski blasti su ekspimirali samo HLA-DR molekul (10/19, 52,6%) ili su koeksprimirali HLA-DR⁺CD117⁺ molekule (5/19, 26,3%).

Rani diferencijacioni mijelomonocitni molekul **CD13** je ekspimiran sa visokom učestalošću ($\geq 90\%$) na populaciji blasta suptipova AML-NOS. Prosečna vrednost subpopulacije CD13⁺ blasta je visoka u većini suptipova ($\geq 80\%$ LĆ), osim u slučaju akutne mijelomonocitne (70% LĆ) i akutne monocitne leukemije (56% LĆ) ($p=0,000$). Molekul CD13 karakterišu pretežno visok ili srednji obrazac ekspresije, osim u slučaju akutne monocitne i akutne mijelomonocitne leukemije, kod kojih je CD13 obrazac pretežno heterogen ($p=0,000$).

Rani diferencijacioni mijelomonocitni molekul **CD33** je ekspimiran sa visokom učestalošću ($\geq 87\%$) na populaciji blasta suptipova AML-NOS. Subpopulacija CD33⁺ blasta obuhvata bar polovinu populacije u većini suptipova AML-NOS ($\geq 60\%$ LĆ), a najviša je u akutnoj monocitnoj (96% LĆ) i akutnoj mijelomonocitnoj leukemiji (85% LĆ) ($p=0,000$). Obrasci ekspresije CD33 molekula značajno variraju između suptipova AML-NOS, gde niska ili srednja ekspresija CD33 molekula karakteriše suptipove sa zahvaćenom granulocitnom lozom, dok srednja ili visoka ekspresija karakteriše suptipove sa zahvaćenom monocitnom lozom ($p=0,004$).

Učestalost ekspresije **cMPO**, kao i prosečna ekspresija ovog molekula značajno variraju u različitim suptipovima AML-NOS ($p=0,000$). Najniža učestalost ekspresije karakteriše AML sa minimalnom diferencijacijom i akutnu monoblastnu leukemiju (trećina slučajeva), gde je utvrđena i najniža prosečna ekspresija ovog molekula ($<20\%$ LĆ). Sa druge strane, najviša učestalost ekspresije je utvrđena u suptipu AML bez sazrevanja (93%). Vrednost prosečne ekspresije cMPO u ostalim suptipovima AML-NOS ($\leq 66\%$ LĆ) ukazuje da je ekspresija cMPO na subpopulaciji leukemijskih blasta. Najučestaliji obrasci ekspresije u slučaju cMPO su nizak ili heterogen ($p>0,05$).

Ekspresija **cLizozima** je utvrđena u suptipovima AML-NOS u kojima je leukemijskim procesom zahvaćena monocitna loza - akutna monocitna leukemija (100%), akutna mijelomonocitna leukemija (92%) i akutna monoblastna leukemija (67%) ($p=0,000$), kod kojih je utvrđena i značajno viša prosečna ekspresija na populaciji leukemijskih ćelija ($p=0,000$). Najučestaliji obrazac ekspresije cLizozima u akutnoj monocitnoj leukemiji je visok, dok je u akutnoj mijelomonocitnoj veoma varijabilan, a u akutnoj monoblastnoj leukemiji pretežno heterogen ($p>0,05$).

Različiti aspekti ekspresije **kasnih mijelomonocitnih hLDM** na populaciji leukemijskih blasta suptipova AML-NOS su prikazani u Tabeli 47./Prilog 1. Molekul **cCD68** je ekspresiran u svim suptipovima AML-NOS, uz prosečnu vrednost ekspresije koja je značajno veća u akutnoj monocitnoj leukemiji (96% LĆ), akutnoj mijelomonocitnoj leukemiji i AML bez sazrevanja ($\sim 85\%$ LĆ) u odnosu na ostale suptipove ($p=0,006$). Obrazac ekspresije molekula cCD68 je uglavnom nizak u suptipovima u kojima je granulocitna loza zahvaćena leukemijskim procesom, dok je u suptipovima u kojima je zahvaćena monocitna loza, najčešće ekspresiran prema heterogenom ili visokom obrascu ($p=0,010$).

Molekul **CD15** je ekspresiran samo u pojedinim suptipovima AML-NOS, uz značajno veću učestalost ekspresije u akutnoj monocitnoj leukemiji (100%) u poređenju sa akutnom mijelomonocitnom leukemijom (60%) i AML sa

sazrevanjem (22%) ($p=0,000$). Subpopulacija CD15⁺ blasta je značajno veća u akutnoj monocitnoj i (72% LĆ) i akutnoj mijelomonocitnoj leukemiji (35% LĆ), dok je u slučaju ostalih suptipova AML-NOS relativno mala (<14% LĆ) ($p=0,000$). Obrazac ekspresije u suptipu AML sa sazrevanjem je heterogen, dok u suptipovima sa zahvaćenom monocitnom lozom može biti heterogen ili visok ($p=0,004$).

Najveća učestalost ekspresije molekula **CD11b** je utvrđena u suptipovima AML-NOS u kojima je leukemijskim procesom zahvaćena monocitna loza - akutna monocitna leukemija (95%), akutna mijelomonocitna leukemija (77%) i akutna monoblastna leukemija (67%) ($p=0,000$). Prosečna vrednost ekspresije CD11b molekula je takođe značajno viša u suptipovima AML-NOS u kojima je leukemijskim procesom zahvaćena monocitna loza ($p=0,000$). Najučestaliji obrazac ekspresije u akutnoj monoblastnoj leukemiji je nizak, dok druga dva suptipa ispoljavaju pretežno heterogen ili visok obrazac ekspresije ovog molekula ($p=0,001$).

Molekul **CD11c** je eksprimiran u svim suptipovima AML-NOS, ali sa veoma varijabilnom učestalošću ($p=0,000$). Značajno viša učestalost ekspresije karakteriše suptipove u kojima je leukemijskim procesom zahvaćena monocitna loza - akutna monocitna (94%), akutna mijelomonocitna (92%) i akutna monoblastna leukemija (60%). Molekul CD11c eksprimiran je na značajno većoj frakciji blasta u suptipovima AML-NOS u kojima je leukemijskim procesom zahvaćena monocitna loza ($p=0,000$).

Pritom, najučestaliji obrazac ekspresije u akutnoj monoblastnoj leukemiji je nizak, dok druga dva suptipa ispoljavaju pretežno heterogen ili visoko obrazac ekspresije ovog molekula ($p=0,010$).

Molekul **CD4** je eksprimiran u svim suptipovima AML-NOS, ali sa veoma varijabilnom učestalošću ($p=0,000$). Najveća učestalost ekspresije CD4 molekula karakteriše suptipove u kojima je leukemijskim procesom zahvaćena monocitna loza ($\geq 87\%$). Relativno niska učestalost ekspresije karakteriše suptipove u kojima je leukemijskim procesom zahvaćena granulocitna loza (20 – 30%

slučajeva), uz prosečnu ekspresiju koja zahvata značajno manju subpopulaciju blasta (<20% LĆ) ($p=0,000$). Niska ekspresija CD4 molekula karakteriše suptipove sa zahvaćenom granulocitnom lozom, dok se niska, ali i srednja ekspresija javlja u suptipovima sa zahvaćenom monocitnom lozom ($p>0,05$).

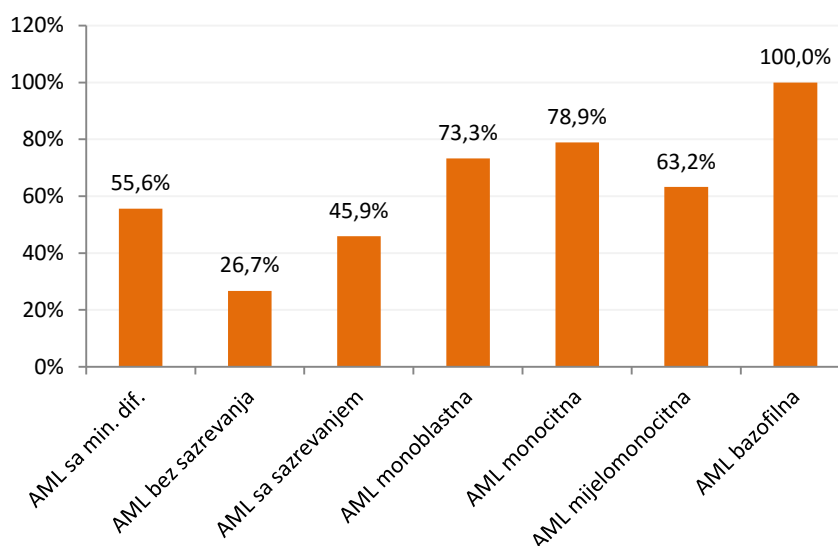
Visoka učestalost ekspresije molekula **CD64** takođe karakteriše suptipove AML-NOS u kojima je leukemijskim procesom zahvaćena monocitna loza uz znake sazrevanja - akutna monocitna leukemija (100%) i akutna mijelomonocitna leukemija (74%) ($p=0,000$). Prosečna vrednost ekspresije ukazuje da je CD64 eksprimiran na većini populacije blasta u akutnoj monocitnoj (86% LĆ), odnosno na frakciji blasta u akutnoj mijelomonocitnoj leukemiji (43% LĆ) ($p=0,000$), i to prema visokom ili heterogenom obrascu u poređenju sa ostalim suptipovima ($p=0,001$). CD64 molekul je eksprimiran sa veoma niskom učestalošću u suptipu AML sa sazrevanjem (8%), na maloj subpopulaciji (11% LĆ) i prema niskom obrascu ekspresije.

Ekspresija molekula **CD36** je povezana za tri suptipa AML-NOS, koje karakteriše zahvaćenost monocitne loze leukemijskim procesom. Učestalost ekspresije CD36 molekula, kao i njegova prosečna vrednost ekspresije je značajno niža u akutnoj monoblastnoj i akutnoj mijelomonocitnoj leukemiji u poređenju sa akutnom monocitnom leukemijom ($p=0,000$). Najčešći obrazac ekspresije CD36 molekula je heterogen.

Ekspresija molekula **CD14** i **CD163** je povezana za dva suptipa AML-NOS, koje karakteriše zahvaćenost monocitne loze leukemijskim procesom uz prisustvo sazrevanja - akutna monocitna i akutna mijelomonocitna leukemija. Učestalost ekspresije oba molekula, kao i njihova prosečna vrednost ekspresije na populaciji blasta, značajno je viša u akutnoj monocitnoj i akutnoj mijelomonocitnoj leukemiji u poređenju sa ostalim suptipovima AML-NOS ($p<0,01$). Molekul CD14 je eksprimiran prema obrascu heterogene ekspresije u oba suptipa AML-NOS, dok su u slučaju molekula CD163 obrasci ekspresije varijabilni.

7.3. Analiza ektopične ekspresije limfoidnih hLDM na populaciji blasta suptipova AML-NOS

Analiza ektopične ekspresije bar jednog od ispitivanih limfoidnih hLDM na populaciji blasta, pokazala je najveću učestalost u suptipovima AML-NOS u kojima je leukemijskim procesom zahvaćena monocitna loza ($\geq 63\%$ slučajeva), dok je najniža učestalost registrovana u suptipu AML bez sazrevanja (27% slučajeva) (Grafikon 28.).



Grafikon 28. Učestalost ektopične ekspresije bar jednog od ispitivanih limfoidnih hLDM na populaciji blasta suptipova AML-NOS

Različiti aspekti **ektopične ekspresije limfoidnih hLDM** na populaciji leukemijskih blasta suptipova AML-NOS su prikazani u Tabeli 48./Prilog 1. Molekul **CD56** ispoljava ekspresiju u svim suptipovima AML-NOS, ali uz značajno višu učestalost ekspresije u akutnoj monocitnoj leukemiji (74%) u poređenju sa ostalim suptipovima ($\leq 27\%$ slučajeva) ($p=0,000$).

Molekul **CD56** je u proseku eksprimiran na relativno maloj frakciji leukemijskih ćelija ($\leq 16\%$ LĆ) u većini suptipova AML-NOS, pri čemu je frakcija

CD56⁺ ćelija značajno veća u akutnoj monocitnoj leukemiji (44% LĆ) ($p=0,001$). Obrasci ekspresije CD56 molekula su varijabilni u svim suptipovima AML-NOS.

Najveća učestalost ekspresije **CD7** molekula je utvrđena u akutnoj bazofilnoj (50%) i akutnoj monoblastnoj leukemiji (27%), dok je učestalost ekspresije niža u ostalim suptipovima AML-NOS ($p>0,05$). Molekul CD7 je eksprimiran na maloj subpopulaciji blasta (<20% LĆ) u većini suptipova AML-NOS ($p=0,010$). Niska ekspresija CD7 karakteriše većinu suptipova, ali kod manjeg broja bolesnika u suptipovima AML sa sazrevanjem i akutna mijelomonocitna leukemija, ekspresija može biti i prema srednjem obrascu ($p=0,025$).

Molekul **CD2** je eksprimiran sa niskom učestalošću u suptipu AML sa sazrevanjem (5,4%), i dvostruko višom učestalošću u akutnoj monocitnoj i akutnoj mijelomonocitnoj leukemiji (10,5%) ($p>0,05$). Prosečna vrednost populacije koja ekspirira CD2 molekul, ukazuje da je on ekspimiran samo na subpopulaciji ($\leq 10\%$ LĆ) prema obrascu niske ekspresije, ali je ta subpopulacija značajno veća u suptipovima AML-NOS u kojima je leukemijskim procesom zahvaćena monocitna loza ($p=0.001$).

U grupi hLDM B loze, **CD19** molekul ispoljava selektivnu ekspresiju u suptipovima AML sa sazrevanjem (19%) i akutnoj mijelomonocitnoj leukemiji (5%) ($p=0,038$). Subpopulacija CD19⁺ blasta veća je u suptipu AML sa sazrevanjem (10% LĆ) u poređenju sa akutnom mijelomonocitnom leukemijom (4% LĆ) ($p>0,05$), uz pretežno nizak obrazac ekspresije.

Ekspresija **CD22** molekula je utvrđena u većini suptipova AML-NOS, uz najveću učestalost ekspresije u akutnoj bazofilnoj leukemiji (100%), AML sa minimalnom diferencijacijom (50%) i akutnoj monoblastnoj leukemiji (40%) ($p=0,000$). Osim u slučaju akutne bazofilne leukemije (77% LĆ), vrednost prosečne ekspresije CD22 molekula ukazuje da je eksprimiran na subpopulaciji leukemijskih blasta ($\leq 20\%$ LĆ), uz značajne varijacije između suptipova ($p=0.000$). Molekul CD22 karakteriše nizak ili heterogen obrazac ekspresije u većini suptipova AML-NOS.

Molekul **cCD79a** je selektivno eksprimiran u tri suptipa AML-NOS, uz najveću učestalost u AML sa minimalnom diferencijacijom (33%), AML sa sazrevanjem (10%) i akutnoj mijelomonocitnoj leukemiji (3%) ($p=0,010$). Značajno veća frakcija cCD79a⁺ ćelija karakteriše AML sa minimalnom diferencijacijom (9% LĆ) u poređenju sa ostalim suptipovima AML-NOS ($\leq 3\%$ LĆ) ($p=0.012$). Molekul cCD79a karakteriše pretežno nizak ili heterogen obrazac ekspresije na leukemijskim ćelijama.

7.4. Ispitivanje imunofenotipskih karakteristika granulocitnih i monocitnih prekursora suptipova AML-NOS

Analiza populacije **granulocitnih prekursora** ks suptipova AML-NOS, pokazala je da granulocitni prekursori čine relativno malu populaciju u većini suptipova ($\leq 15\%$ NĆ), a da je prosečna veličina ove populacije značajno veća u AML sa sazrevanjem i Akutnoj mijelomonocitnoj leukemiji (Tabela 49.) ($p=0.000$).

"Šift u levo" u populaciji granulocitnih prekursora je utvrđen kod većine bolesnika oba ispitivana suptipa AML-NOS (97%), dok je blok u sazrevanju do stupnja metamijelocit i/ili neutrofil utvrđen sa većom učestalošću u AML sa sazrevanjem (72%) u odnosu na akutnu mijelomonocitnu leukemiju (59%).

Ispitivanje promena u obrascu **ćelijske granulacije** populacije granulocitnih prekursora bolesnika sa AML-NOS, pokazalo je prisustvo **atipične granulacije** kod tri četvrtine bolesnika oba suptipa, dok je **atipična hipogranulacija** bila prisutna sa nižom učestalošću kod oba ispitivana suptipa ($< 20\%$).

Tabela 49. Karakteristike populacije granulocitnih prekursora bolesnika dva suptipa AML-NOS sa zahvaćenom granulocitnom lozom

Karakteristika	AML sa sazrevanjem	Akutna mijelomonocitna leukemija	P
Σ Gr prek ks $\bar{x} \pm SD$ (% NČ) Me (opseg)	(n=35) 34,29 ± 20,88 27 (4 - 72)	(n=37) 25,78 ± 16,23 21 (1 - 59)	0,083
Promijelociti $\bar{x} \pm SD$ (% Gr prek) Me (opseg)	(n=29) 36,86 ± 18,73 37 (6 - 74)	(n=33) 33,91 ± 16,68 30 (8 - 81)	0,442
Mijelociti $\bar{x} \pm SD$ (% Gr prek) Me (opseg)	(n=29) 41,03 ± 15,56 42 (17 - 67)	(n=34) 42,12 ± 16,84 45 (9 - 75)	0,761
Metamijelociti $\bar{x} \pm SD$ (% Gr prek) Me (opseg)	(n=29) 14,79 ± 9,51 14 (0 - 37)	(n=34) 15,62 ± 10,29 13 (1 - 49)	0,874
Neutrofilii $\bar{x} \pm SD$ (% Gr prek) Me (opseg)	(n=29) 7,28 ± 10,44 2 (0 - 36)	(n=34) 9,53 ± 9,64 5,5 (1 - 42)	0,030
Šift u levo Gr prek. Blok u sazrevanju Gr Prek	96,6% (28/29) 72,4% (21/29)	97,1% (33/34) 58,8% (20/34)	0,909 0,259
Gran. Gr prek. Atipična hipogran. Atipična gran.	13,3% (4/30) 76,7% (23/30)	17,6% (6/34) 79,4% (27/34)	0,478
Maturaciona asinhronija CD34⁺ HLA-DR⁺ CD45^{high} CD135⁺ CD15⁺het cMPO^{p+} CD33⁻ CD13⁺high	100% (29/29) 48,3% (14/29) 65,5% (19/29) 58,6% (17/29) 33,3% (3/9) 48,3% (14/29) 60,7% (17/28) 0% (0/28) 37,9% (11/29)	97% (32/33) 30,3% (10/33) 75,8% (25/33) 66,7% (22/33) 20% (2/10) 27,3% (9/33) 37,9% (11/29) 0% (0/32) 33,3% (11/33)	0,345
Aberantna eksp. Li Ag CD56⁺ CD2⁺ CD7⁺ CD19⁺	20,7% (6/29) 6,9% (2/29) 3,4% (1/29) 6,9% (2/29) 3,4% (1/29)	11,8% (4/34) 5,9% (2/34) 0% (0/34) 2,9% (1/34) 2,9% (1/34)	0,397

Skraćenice: Ag, antigen; Gr prek., granulocitni prekursori; gran., granulacija; ks, kostna srž; Li, limfoidni; Me, medijana; SD, standardna devijacija; x, srednja vrednost; Statistički testovi - Mann-Whitney U Test i Pirsonov χ^2 test

Ispitivanje prisustva *maturacione asinhronije* u ekspresiji velike grupe hLDM na populaciji granulocitnih prekursora ks bolesnika sa AML-NOS (Tabela 49.), pokazala je prisustvo bar jednog od navedenih poremećaja kod većine bolesnika oba suptipa.

Učestalost *ektopične ekspresije* bar jednog od ispitivanih molekula limfoidne loze je skoro dvostruko viša u suptipu AML sa sazrevanjem (22%) u poređenju sa akutnom mijelomonocitnom leukemijom (12%) ($p>0,05$).

Analiza *monocitnih prekursora* ks je pokazala da u većini suptipova AML-NOS populacija monocitnih prekursora čini relativno malu populaciju u ks (<10% NĆ), a da je prosečna veličina ove populacije značajno povišena u akutnoj monocitnoj (70% NĆ) i akutnoj mijelomonocitnoj leukemiji (28% NĆ) (Tabela 50.) ($p=0.000$). Ispitivanje ćelijskog sastava populacije monocitnih prekursora, pokazalo je da u oba ispitivana suptipa dominira populacija promonocit/monocit, pri čemu u akutnoj monocitnoj leukemiji dominantnu leukemijsku populaciju čine promonociti (56%), a u akutnoj mijelomonocitnoj leukemiji to je populacija mijelo/monoblasta ($p<0,05$).

Tabela 50. Karakteristike populacije monocitnih prekursora ks dva suptipa AML-NOS sa monocitnom lozom zahvaćenom leukemijsim procesom

Karakteristika	AML monocitna	AML mijelomonocitna	P
Σ Mono prek. KS	n=18	n=36	
$\bar{x} \pm SD$ (% NĆ)	69,78 ± 19,02	27,94 ± 21,31	0,048
Me (opseg)	69 (28 - 96)	20,5 (0,39 - 78)	
Mijelo/monobl	n=17	n=26	
$\bar{x} \pm SD$ (% Mo prek.)	12,78 ± 14,23	43,77 ± 26,36	0,000
Me (opseg)	6 (0 - 42)	47 (2 - 97)	
Promonociti	n=17	n=27	
$\bar{x} \pm SD$ (% Mo prek.)	56,35 ± 22,86	32,00 ± 19,16	0,001
Me (opseg)	48 (23 - 97)	32 (2 - 76)	
Monociti	n=17	n=27	
$\bar{x} \pm SD$ (% Mo prek.)	30,88 ± 19,21	25,74 ± 22,47	0,283
Me (opseg)	31 (2 - 63)	20 (1 - 91)	

Skraćenice: Mo prek., monocitni prekursori; Me, medijana; SD, standardna devijacija; x, srednja vrednost. Statistički testov - Mann-Whitney U Test

7.5. Analiza hematopoezne loze zahvaćene leukemijskim procesom i stepena diferenciranosti leukemijskih ćelija AML-NOS

Na osnovu imunofenotipskog profila leukemijske populacije ćelija, utvrđen je tip hematopoezne loze zahvaćene leukemijskim procesom u suptipovima AML-NOS na dg (Tabela 51.). Tip hematopoezne loze zahvaćene leukemijskim procesom, značajno se razlikuje između suptipova AML-NOS ($p=0,000$). Granulocitna loza je pretežno zahvaćena leukemijskim procesom u AML sa minimalnom diferencijacijom, AML bez sazrevanja i AML sa sazrevanjem (>91%), pri čemu su granulocitna i monocitna loza istovremeno zahvaćene najčešće u akutnoj mijelomonocitnoj leukemiji (80%).

Tabela 51. Imunofenotipski definisan tip loze zahvaćene leukemijskim procesom u suptipovima AML-NOS na dijagnozi

AML-NOS	Gr L f (%)	Mono L f (%)	Gr/ Mono L f (%)	Gr/Eritro L f (%)	Gr/Bazo L f (%)
AML minim. dif.	100 (9/9)	0 (0/9)	0 (0/9)	0 (0/9)	0 (0/9)
AML bez sazrevanja	100 (15/15)	0 (0/15)	0 (0/15)	0 (0/15)	0 (0/15)
AML sa Sazrevanjem	91,9 (34/37)	2,7 (1/37)	0 (0/37)	5,4 (2/37)	0 (0/37)
AML monoblastna	0 (0/15)	86,7 (13/15)	13,3 (2/15)	0 (0/15)	0 (0/15)
AML monocitna	0 (0/19)	89,5 (17/19)	10,5 (2/19)	0 (0/19)	0 (0/19)
AML mijelomonoc.	10,5 (4/38)	7,9 (3/38)	81,6 (31/28)	0 (0/38)	0 (0/38)
AML Bazofilna	0 (0/2)	0 (0/2)	0 (0/2)	0 (0/2)	100 (2/2)

Skraćenice: Bazo, bazofilna; Eritro, eritrocitna; f, učestalost ekspresije; Gr, granulocitna; L, loza; Mono, monocitna.

Samo monocitna loza je najčešće zahvaćena u akutnoj monoblastnoj i akutnoj monocitnoj leukemiji (>86%), dok je zahvaćenost eritrocitne loze veoma retka, utvrđena samo u AML sa sazrevanjem (5,4%), kao i zahvaćenost bazofilne loze.

Analiza stepena diferencijacije leukemijske populaciji ćelija suptipova AML-NOS (Tabela 52.), pokazala je prisustvo značajnih razlika među njima ($p=0,000$). Leukemijske ćelije AML sa minimalnom diferencijacijom i AML bez sazrevanja sastoje iz populacije leukemijskih blasta bilo homogene ili sa znacima diferencijacije, pri čemu je u slučaju akutne monoblastne leukemije najučestalija populacija blasta sa znacima diferencijacije (73%), što se značajno razlikuje od većine ostalih suptipova u kojima je najučestalije istovremeno prisustvo populacija leukemijskih blasta i prekursora (>78% slučajeva).

Tabela 52. Imunofenotipski definisan stepen diferentovanosti populacije leukemijskih ćelija suptipova AML-NOS na dg

AML-NOS	Blasti bez diferencijacije	Blasti sa diferencijacijom	Leukemijski blasti i prekursori
AML minimalno dif.	55,6 (5/9)	44,4 (4/9)	0 (0/9)
AML bez sazrevanja	40 (6/15)	53,3 (8/15)	6,7 (1/15)
AML sa sazrevanjem	13,5 (5/37)	8,1 (3/37)	78,4 (29/37)
AML monoblastna	6,7 (1/15)	73,3 (11/15)	20 (3/15)
AML monocitna	0 (0/19)	15,8 (3/19)	84,2 (16/19)
AML mijelomono.	2,6 (1/38)	18,4 (7/38)	78,9 (30/38)
AML bazofilna	50 (1/2)	50 (1/2)	0 (0/2)

Skraćenice: dif., diferencijacija; Eritro, eritrocitna; f, učestalost ekspresije.

8. Ispitivanje MRB u AML primenom metodologije imunofenotipizacije i MPC

Prospektivno ispitivanje MRB metodologijom IMPC, sprovedeno je na selekcionisanom uzorku od 26 odraslih bolesnika sa dg AML, koji su postigli citomorfološku KR bolesti nakon primene indukcionog protokola. Većina bolesnika uključenih u ispitivanje, imala je <65 godina, opšte funkcionalno stanje procenjeno ECOG skalom ≤ 2 i komorbiditetni indeks <3 poena. Osnovni demografski i kliničko-hematološki podaci bolesnika na dg bolesti su prikazani u Tabeli 53.

Medijana **starosti bolesnika** je iznosila 53 godine (opseg, 19-74 god.), pri čemu je u starijoj životnoj dobi (≥ 60 god.) bilo 38,5% bolesnika. Zastupljenost muškaraca (42,3%) je bila manja u odnosu na žene (57,7%) (m/ž, 0,73).

Medijana vrednosti broja **Le** u celoj grupi AML je iznosila $13,8 \times 10^9/L$, uz visok stepen varijacija pojedinačnih vrednosti. Visoke vrednosti Le ($\geq 30 \times 10^9/l$) imalo je 26,9%, a hiperleukocitozu ($\geq 100 \times 10^9/l$) 3,8% bolesnika.

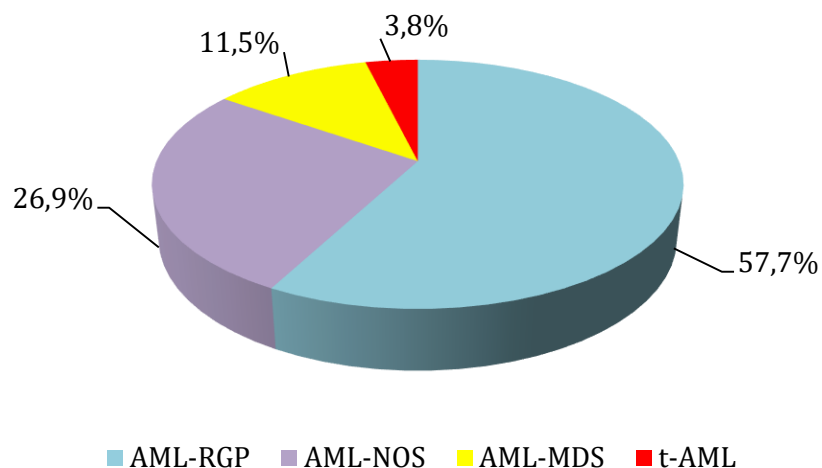
Bolesnici su na dg procenjivni prema **stepenu rizika**, pri čemu je najveći broj bolesnika svrstan u grupu *povoljna* (56%), dok je učestalost ostalih grupa rizika bila niža: *srednje povoljna II* (20%), *srednje povoljna I* (12%) i *nepovoljna* (12%).

Struktura bolesnika u odnosu na tip AML prikazana je na Grafikonu 29. Najviše bolesnika je bilo sa dg AML-RGP, zatim AML-NOS, pri čemu je učestalost bolesnika sa AML-MDS i t-AML bila niža.

Svi bolesnici su procenjivani za prisustvo MRB posle završene indukciono terapije, dok je posle konsolidacione terapije analizirano samo 18 (69%) bolesnika, pošto je u međuvremenu kod njih 8 (31%) došlo do relapsa bolesti i/ili smrtnog ishoda. Medijana praćenja bolesnika je iznosila 12 meseci (opseg, 2 – 26 mes.).

Tabela 53. Osnovne demografske i hematološke karakteristike 26 bolesnika na dg AML, kod kojih je ispitivano prisustvo MRB-MPC

AML broj	AML tip	pol	Starost (god)	Le (x10 ⁹ /l)	ELN grupa rizika
295	AML sa sazrevanjem/CD19p+CD7p+	ž	51	0.7	srednje povoljna II
296	AML sa t(8;21)/CD19p+cCD79ap+	ž	64	1.2	Povoljna
297	AML sa MDS karakteristikama	ž	62	14.1	Nepovoljna
298	AML sa t(15;17)	ž	19	42.7	Povoljna
299	AML sa t(15;17)	M	22	2.4	povoljna
300	AML sa t(15;17)/CD56p+	ž	54	0.9	Povoljna
301	AML sa MDS karakteristikama	M	64	1.9	srednje povoljna II
302	AML sa t(8;21)/CD19p+ CD56p+	M	45	29.2	Povoljna
303	AML mijelomonocitna/FLT3-ITD ^{mut}	ž	31	87.3	srednje povoljna I
304	AML sa NPM1 ^{mut} / FLT-ITD ^{neg}	ž	62	240	Povoljna
305	AML monocitna	M	62	1.8	srednje povoljna II
306	AML sa inv(16)/CD2p+	M	28	61.2	Povoljna
307	AML sa NPM1 ^{mut} /FLT-ITD ^{neg} /CD7p+	ž	65	12.8	Povoljna
308	AML sa monocitnom dif./CD56p+	ž	28	6.4	/
309	AML sa t(8;21)/CD19+CD56+	ž	56	16.3	povoljna
310	AML sa NPM1 ^{mut} /FLT3 ^{neg}	M	74	19	povoljna
311	AML sa sazrevanjem/CD7+	ž	67	21	srednje povoljna I
312	AML sa NPM1 ^{mut} /FLT-ITD ^{neg}	ž	51	2	povoljna
313	t-AML	ž	62	2.5	srednje povoljna II
314	AML sa NPM1 ^{mut} /FLT-ITD ^{neg}	M	49	32.2	povoljna
315	AML minim. diferenc./CD7+CD22+	ž	69	2.2	nepovoljna
316	AML mijelomonocitna	M	47	67	srednje povoljna I
317	AML sa MDS karakteristikama/CD56+	ž	52	55.6	nepovoljna
318	AML sa NPM1 ^{mut} /FLT-ITD ^{poz}	M	41	13.5	srednje povoljna II
319	AML sa inv(16)	M	56	20.9	povoljna
320	AML sa t(8;21)/CD19p+ CD56p+	M	49	4.5	povoljna



Grafikon 29. Zastupljenost glavnih tipova AML prema SZO klasifikaciji u grupi bolesnika u kojoj je ispitivano prisustvo MRB primenom MPC

8.1. Analiza imunofenotipski definisanih populacija ćelija bolesnika sa AML posle lečenja hemioterapijom

Populacije ćelija ks i pk bolesnika sa AML, identifikovane na osnovu specifičnih imunofenotipskih karakteristika, analizirane su tokom procesa regeneracije do koga dolazi posle primene indukciono i konsolidaciono hemioterapije. Osnovni cilj ovog dela ispitivanja bio je da analiziramo kvantitativne promene koje se dešavaju u glavnim populacijama/subpopulacijama ks (Tabela 54.) i pk (Tabela 55.) bolesnika tokom regeneracije, upoređivanjem sa vrednostima odgovarajućih populacija zdrave kontrolne ks i pk.

Analiza zdravih i regenerativnih kontrolnih uzoraka pk (Tabela 56./Prilog 1.) i zdravih i regenerativnih kontrolnih uzoraka ks (Tabela 57./Prilog 1.) je pokazala da između njih ne postoje značajne razlike u većini ispitivanih populacija i subpopulacija ćelija, te su iz tog razloga kao kontrolna grupa korišćene vrednosti dobijene u grupi zdravih kontrolnih ks/pk.

Tabela 54. Analiza imunološki definisanih populacija ćelija ks bolesnika sa AML tokom ispitivanja MRB primenom MPC

Populacije ćelija KS (CD45/SSC dif.)	AML MRB-MPC Post-IND	AML MRB-MPC Post-KON	Zdrave kontrolne	p
Σ CD34+ pop.	n=26	n=18	n=13	
$\bar{x} \pm SD$ (% NĆ)	1,52 ± 1,03	1,45 ± 0,90	0,96 ± 0,30	0,234
Me (opseg)	1,18 (0,13 - 4,25)	1,30 (0,04 - 3,72)	1 (0,38 - 1,38)	
CD34+CD117+ pop.	n=26	n=18	n=11	
$\bar{x} \pm SD$ (% NĆ)	1,00 ± 0,86	0,66 ± 0,70	0,66 ± 0,26	0,195
Me (opseg)	0,76 (0,06 - 3,40)	0,53 (0 - 3,17)	0,58 (0,32 - 1,06)	
Σ B-prek ks	n=26	n=18	n=13	* 0,016
$\bar{x} \pm SD$ (% NĆ)	0,82 ± 1,27	3,00 ± 4,24	1,42 ± 1,49	# 0,027
Me (opseg)	0,39 (0 - 6,06)	1,44 (0,01 - 16,8)	1,17 (0,09 - 5,82)	& 0,447
Granulocitni prek.	n=26	n=18	n=13	
$\bar{x} \pm SD$ (% NĆ)	76,15 ± 10,55	71,67 ± 7,57	77,38 ± 6,10	0,148
Me (opseg)	78,5 (50 - 92)	72 (56 - 83)	79 (63 - 84)	
Monocitni prek.	n=26	n=18	n=11	* 0,173
$\bar{x} \pm SD$ (% NĆ)	5,36 ± 2,05	6,14 ± 2,02	4,31 ± 0,81	# 0,212
Me (opseg)	4,8 (1,8 - 9)	5,75 (2,1 - 10)	4,2 (3,3 - 5,9)	& 0,004

Skraćenice: dif., diferencijal; ks, kostna srž; Me, medijana; NĆ, nukleirane ćelije; pop., populacija; Post-IND, post-indukcija; Post-KON, post-konsolidacija; SD, standardna devijacija; \bar{x} , prosečna vrednost; *, AML-post-IND vs AML-post-KON; #, AML-post-IND vs Kontrola; &, AML-post-KON vs Kontrola

Prosečna vrednost ukupne **populacije CD34+ ćelija ks**, koja obuhvata hematopoezne mijeloidne i B progenitore, kao i vrednost populacije **mijeloidnih progenitora (CD34+CD117+ pop.)**, nisu se značajno razlikovale u odnosu na vrednost u ks posle indukcione i konsolidacione terapije, kao i u poređenju sa zdravom kontrolnom ks. Sa druge strane, vrednost ukupnih **B-prekursora ks** značajno je snižena posle indukcione hemioterapije u poređenju sa vrednošću posle konsolidacije i u odnosu na zdravu kontrolnu ks ($p < 0,05$), pri čemu takva promena nije viđena u istoj populaciji posle konsolidacije u odnosu na zdravu kontrolnu ks.

Vrednosti populacije **granulocitnih prekursora ks** bolesnika sa AML, posle indukcione i konsolidacione terapije, nisu se međusobno značajno razlikovale, niti su potvrđene razlike u odnosu na zdravu kontrolnu ks. Analiza ćelijske strukture populacije granulocitnih prekursora (promijelociti → mijelociti → metamijelociti → neutrofili) na dg bolesti, pokazala je prisustvo

skretanja u levo ka nezreljim formama kod 87% (20/23) bolesnika, pri čemu je do normalizacije strukture granulocitnih prekursora ks došlo kod svih bolesnika posle primene indukciono terapije, odnosno kod 89% (16/18) bolesnika posle primene konsolidacije.

U pogledu populacije **monocitnih prekursora ks**, nisu utvrđene međusobne razlike u prosečnoj vrednosti ove populacije posle indukciono i konsolidaciono terapije, ali je potvrđeno značajno relativno povećanje ove populacije posle konsolidacije u odnosu na zdravu kontrolnu ks, dok takva razlika nije potvrđena posle primene indukciono terapije. Analiza ćelijske strukture populacije monocitnih prekursora (promonociti/nezreli monociti → monociti) na dg bolesti, pokazala je prisustvo skretanja u levo ka nezreljim formama kod 82% (9/11) bolesnika, pri čemu je normalna struktura monocitnih prekursora bila prisutna kod 96% (25/26) bolesnika posle primene indukciono terapije, odnosno kod svih bolesnika posle primene konsolidacije.

Analiza **pk** za prosečnu vrednost ukupne **populacije CD34⁺ ćelija** i populacije mijeloidnih progenitora bolesnika sa AML, pokazala je značajno povećanje vrednosti obe populacije posle indukciono terapije u poređenju sa istim vrednostima posle konsolidacije ($p < 0,05$), dok je u pogledu **mijeloidnih progenitora** utvrđena značajno viša vrednost i u odnosu na zdravu kontrolnu pk (Tabela 55.). Prosečna vrednost ove dve populacije u pk bolesnika posle konsolidaciono terapije, bila je na nivou koji karakteriše zdravu kontrolnu pk.

Prosečna vrednost populacije **neutrofila pk** bolesnika posle indukciono terapije nije se razlikovala u odnosu na vrednost u zdravoj kontrolnoj pk, ali je istovremeno utvrđeno da je prosečna vrednost neutrofila značajno snižena posle konsolidaciono terapije (49% Le) u odnosu indukciju (63% Le) i zdravu kontrolnu pk (64% Le) ($p < 0,05$). Analiza strukture populacije neutrofila pk, pokazala je odsustvo skretaja u levo ka nezreljim formama kod 88% (21/24) bolesnika posle primene indukcije, odnosno kod 75% (12/16) bolesnika posle primene konsolidaciono terapije.

U pogledu populacije *monocita pk*, utvrđeno je značajno povećanje prosečne vrednosti ove populacije posle indukciono (8,5% Le) i konsolidaciono (11,8%) terapije, u poređenju sa vrednošću populacije monocita u zdravoj kontrolnoj grupi (5,6% Le) ($p < 0,05$). Takođe je utvrđeno da je prosečna vrednost monocita pk značajno viša posle konsolidacione terapije u odnosu na vrednost posle indukcije ($p = 0,01$). Analiza ćelijske strukture populacije monocita posle primene hemioterapije, pokazala je odsustvo skretanja ka nezreljim formama posle indukciono terapije kod 92% (22/24) bolesnika, i kod 75% (12/16) bolesnika posle konsolidacione terapije.

Tabela 55. Analiza imunološki definisanih populacija ćelija pk bolesnika sa AML tokom ispitivanja MRB primenom MPC

Populacije ćelija PK (CD45/SSC dif.)	AML MRB-MPC Post-IND	AML MRB-MPC Post-KON	Zdrave kontrolne	p
Σ CD34+ pop.	n=26	n=18	n=12	* 0,039
$\bar{x} \pm SD$ (% Le)	0,318 \pm 0,951	0,085 \pm 0,198	0,035 \pm 0,018	# 0,060
Me (opseg)	0,05 (0 - 4,79)	0,03 (0,01 - 0,86)	0,03 (0,02 - 0,07)	& 0,846
CD34+CD117+ pop.	n=26	n=18	n=11	* 0,003
$\bar{x} \pm SD$ (% Le)	0,230 \pm 0,680	0,062 \pm 0,176	0,019 \pm 0,014	# 0,018
Me (opseg)	0,04 (0 - 3,40)	0,01 (0 - 0,75)	0,01 (0,01 - 0,05)	& 0,421
Neutrofili pk	n=26	n=18	n=13	* 0,008
$\bar{x} \pm SD$ (% Le)	62,88 \pm 10,58	49,39 \pm 18,37	63,62 \pm 12,48	# 1,000
Me (opseg)	59,5 (42 - 81)	45,5 (5 - 83)	61 (47 - 86)	& 0,020
Monociti pk	n=26	n=17	n=11	* 0,010
$\bar{x} \pm SD$ (% Le)	8,48 \pm 3,92	13,18 \pm 6,83	5,58 \pm 1,64	# 0,017
Me (opseg)	7,35 (2,1 - 17)	11,8 (5,6 - 33)	5,9 (2,8 - 8,1)	& 0,000

Skraćenice: Le, leukociti; Me, medijana; pop., populacija; Post-IND, post-indukcija; Post-KON, post-konsolidacija; SD, standardna devijacija; \bar{x} , prosečna vrednost; *, AML-post-IND vs AML-post-KON; #, AML-post-IND vs Kontrola; &, AML-post-KON vs Kontrola

Analiza različitih populacija *Li ks* bolesnika posle lečenja hemioterapijom, sprovedena je u cilju ispitivanja promena u relativnoj zastupljenosti ovih populacija u odnosu na odgovarajuće populacije u ks zdravih kontrola (Tabela 58.). Analiza je pokazala da je prosečna vrednost ukupne populacije Li u ks bolesnika značajno snižena posle indukciono terapije u poređenju sa vrednošću u zdravoj kontrolnoj ks (10,8% vs. 14,1% Li, $p = 0,012$). Prosečna vrednost populacije *B-Li ks* bolesnika značajno je snižena posle indukciono (2,04% Li) i konsolidaciono (4,6% Li) terapije, u poređenju sa

vrednošću iste populacije u ks zdravih kontrola (15,8% Li) ($p < 0,01$). Prosečna vrednost ukupne populacije **T-Li ks** značajno je povećana posle indukcijske terapije (83,9% Li) u poređenju sa vrednošću ove populacije u ks zdravih kontrola (72,4% Li) ($p = 0,018$), pri čemu razlika nije potvrđena kao značajna u odnosu na vrednost posle konsolidacione terapije.

Tabela 58. Zastupljenost različitih populacija Li u ks bolesnika sa AML, posle primene indukcijske i konsolidacione hemioterapije

Populacije ćelija (CD45/SSC dif.)	AML MRB-MPC Post-IND	AML MRB-MPC Post-KON	Zdrave kontrole	p
Li ks	n=26	n=18	n=13	* 0,065
$\bar{x} \pm SD$ (% NĆ)	10,85 \pm 9,02	12,72 \pm 5,13	14,08 \pm 5,39	# 0,012
Me (opseg)	7,5 (3 - 39)	12 (4 - 23)	12 (9 - 28)	& 0,533
B-Li ks	n=26	n=18	n=13	* 0,641
$\bar{x} \pm SD$ (% Li)	2,04 \pm 2,00	4,55 \pm 8,84	15,85 \pm 7,73	# 0,000
Me (opseg)	1 (0 - 7)	0,66 (0,11 - 36)	16 (6 - 35)	& 0,000
T-Li ks	n=26	n=18	n=13	* 0,358
$\bar{x} \pm SD$ (% Li)	83,88 \pm 7,01	79,44 \pm 10,95	72,31 \pm 12,23	# 0,018
Me (opseg)	85 (65 - 96)	79 (51 - 96)	77 (50 - 88)	& 0,281
NKT-Li ks	n=26	n=18	n=13	* 1,000
$\bar{x} \pm SD$ (% Li)	14,15 \pm 7,95	14,63 \pm 9,80	4,55 \pm 4,98	# 0,003
Me (opseg)	13 (3 - 31)	11,5 (5 - 47)	3 (1 - 17)	& 0,003
NK-Li ks	n=26	n=18	n=13	* 0,701
$\bar{x} \pm SD$ (% Li)	11,88 \pm 5,75	14,22 \pm 6,91	8,73 \pm 6,70	# 0,451
Me (opseg)	10 (2,2 - 28)	13,5 (4 - 30)	6 (3 - 25)	& 0,063

Skraćenice: dif., diferencijal; ks, kostna srž; Li, limfociti; Me, medijana; NĆ, nukleirane ćelije; SD, standardna devijacija; \bar{x} , prosečna vrednost; *, AML-post-IND vs AML-post-KON; #, AML-post-IND vs Kontrola; &, AML-post-KON vs Kontrola

Prosečna vrednost populacije **NKT-Li ks** je takođe značajno povećana posle indukcijske (14,2% Li), ali i konsolidacione (14,6% Li) terapije u poređenju sa vrednošću ove populacije u ks zdravih kontrola (4,6% Li) ($p < 0,01$). U slučaju populacije **NK-Li ks**, nisu utvrđene značajne razlike u vrednosti ove populacije između bolesnika i zdravih kontrolnih uzoraka.

Analiza različitih populacija **Li pk** bolesnika posle lečenja hemioterapijom, sprovedena je u cilju ispitivanja promena u apsolutnom broju ovih populacija u odnosu na odgovarajuće populacije pk zdravih kontrola (Tabela 59.). Naime, prosečna vrednost populacije Li pk procenjena na hematološkom brojaču krvnih elemenata, bila je značajno niža u pk bolesnika

posle indukcione (1408 \acute{c}/μ) i konsolidacione (1301 \acute{c}/μ) terapije, u poređenju sa vrednošću u pk zdrave kontrole (2395 \acute{c}/μ) ($p < 0,05$).

Tabela 59. Zastupljenost različitih populacija Li u pk bolesnika sa AML posle primene indukcione i konsolidacione hemioterapije

Pop. ćelija (CD45/SSC dif.)	AML MRB-MPC Post-IND	AML MRB-MPC Post-KON	Zdrave kontrole	p
Li pk kaunter	n=26	n=18	n=13	* 0,862
$\bar{x} \pm SD$ (\acute{c}/μ)	1407,65 \pm 502,53	1301,39 \pm 490,79	2395,31 \pm 1189,37	# 0,035
Me (opseg)	1394,5 (416 - 2553)	1313,5 (406 - 2166)	2380 (1056 - 5460)	& 0,020
B-Li pk	n=26	n=18	n=13	* 0,067
$\bar{x} \pm SD$ (\acute{c}/μ)	25,60 \pm 29,95	30,76 \pm 69,80	259,62 \pm 140,68	# 0,000
Me (opseg)	16 (0 - 120)	3 (0,2 - 260)	260 (63 - 475)	& 0,000
T-Li pk	n=26	n=18	n=13	* 0,865
$\bar{x} \pm SD$ (\acute{c}/μ)	1115,23 \pm 413,61	1026,44 \pm 420,21	1645,54 \pm 711,16	# 0,069
Me (opseg)	1125,5 (270 - 1832)	978 (37 - 1776)	1551 (864-3167)	& 0,034
NKT-Li pk	n=26	n=18	n=11	
$\bar{x} \pm SD$ (\acute{c}/μ)	145,27 \pm 96,98	133,83 \pm 95,20	99,00 \pm 120,13	0,099
Me (opseg)	128 (32 - 333)	121 (18 - 387)	47 (19 - 417)	
NK-Li pk	n=26	n=18	n=9	* 0,943
$\bar{x} \pm SD$ (\acute{c}/μ)	244,81 \pm 173,92	226,22 \pm 144,14	531,33 \pm 418,21	# 0,007
Me (opseg)	191 (14 - 715)	187 (32 - 585)	436 (214 - 1583)	& 0,004

Skraćenice: dif., diferencijal; Li, limfociti; Me, medijana; NČ, nukleirane ćelije; pop., populacije; SD, standardna devijacija; \bar{x} , prosečna vrednost; *, AML-post-IND vs AML-post-KON; #, AML-post-IND vs Kontrola; &, AML-post-KON vs Kontrola

U slučaju populacije **B-Li** i **NK-Li pk** bolesnika, utvrđeno je izrazito sniženje prosečne vrednosti ovih populacija posle indukcione i konsolidacione terapije u poređenju sa vrednostima u pk zdravih kontrola ($p < 0,01$). Prosečna vrednost populacije **T-Li** je snižena u pk bolesnika posle primene hemioterapija, ali je značajnost razlike potvrđena samo u slučaju vrednosti T-Li utvrđene posle konsolidacione terapije ($p = 0,034$). Prosečna vrednost populacije **NKT-Li** nije značajno varirala u pk bolesnika posle primene hemioterapija, u poređenju sa vrednostima pk zdravih kontrola.

8.2. Identifikacija i kvantifikacija populacije leukemijskih ćelija bolesnika sa AML posle lečenja hemioterapijom

Analiza MRB primenom MPC bazira se na identifikaciji i kvantifikaciji populacije leukemijskih ćelija na osnovu prisustva jedne ili više kombinacija IFSL, koji se definišu na osnovu imunofenotipskih karakteristika leukemijskih ćelija na dg bolesti. Kombinacije IFSL koje su korišćene u našoj grupi bolesnika su prikazane u Tabeli 60.

Na dg AML, kod 15 (57,7%) bolesnika su definisane po dve kombinacije IFSL, dok je kod 11 (42,3%) bolesnika bila definisana samo po jedna kombinacija IFSL. Kod svih ispitivanih bolesnika, analizirana je i kombinacija leukocitnih molekula koja definiše mijeloidne progenitore u zdravoj ks ($CD34^+CD117^+HLA-DR^+CD45^{low}/SSC^{low}$). Populacija LĆ sa karakteristikama mijeloidnih progenitora bila je prisutna kod 15 (57,7%) naših bolesnika sa AML na dg bolesti.

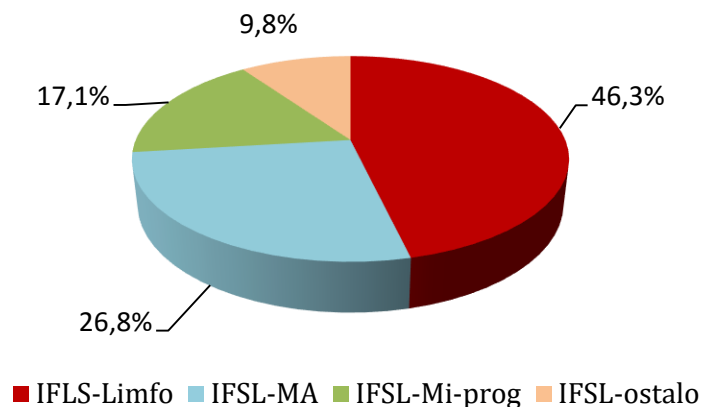
U našoj grupi od 26 bolesnika, ukupno je formulisana 41 kombinacija IFSL, pri čemu su najučestalije bile kombinacije CD34 i/ili CD117 molekula sa jedne strane i ektopično eksprimiranih molekula limfoidne loze (CD7, CD56, CD19, CD22) sa druge strane.

Deo kombinacija IFSL je takođe sadržavao CD34 i/ili CD117 uz molekule CD64 i/ili CD15, koje je karakterisala maturaciona asinhronija u ekspresiji, pri čemu je deo kombinacija baziran na aberacijama u nivou ekspresije molekula CD34/CD117/HLA-DR. Učestalost različitih tipova IFSL prikazana je na Grafikonu 30.

Prilikom analize MRB u pk bolesnika, u proseku je analizirano 229707 ± 103248 ćelija (Me 212591, opseg 37334 – 496829 ćelija) po alikvotu uzorka, dok je u ks bolesnika u proseku analizirano 251005 ± 87115 ćelija (Me 242943, opseg 114688 – 475000 ćelija) po alikvotu uzorka.

Tabela 60. Imunofenotipske karakteristike leukemijske populacije ćelija i specifični imunofenotipski profili specifični za leukemiju (IFSL) 26 bolesnika sa AML, kod kojih je ispitivano prisustvo MRB primenom MPC

broj	AML imunofenotip	IFSL 1/ IFSL 2
295	CD34-CD117+HLA-DR+/CD19p+CD7p+	CD34-CD117+CD7+ CD13+ CD7+CD19+
296	CD34+CD117+HLA-DR+/ CD64+CD19+cCD79a+	CD117+ CD64+lowCD19+ CD34+ CD64+lowCD19+
297	CD34+CD117+HLA-DR+/CD64+	CD34+CD117+CD64+
298	CD34-CD117-HLA-DR-/CD24-CD66b-CD11b-CD11c-	CD24-CD11b-CD11c- CD117-CD66b- CD33+
299	CD34-CD117+HLA-DR-/CD24-CD66b-CD11b-	CD117+CD24-CD66b- CD66b-CD16-CD10-
300	CD34-CD117+HLA-DRp+/CD56p+CD24-CD66b-CD11a-	CD66b-CD11a-CD56+ CD117+CD66b-CD24-
301	CD34+CD117+HLA-DR+	CD34+CD117+HLA-DR+
302	CD34p+CD117p+HLA-DR+/CD64-CD19p+CD56p+	CD117+CD19+CD64- CD34+ HLA-DR+ CD56+
303	CD34-CD117p+HLA-DR+/CD64+hiCD13-CD14p+	CD64+hiCD33+CD13- CD64+hiCD163-CD14-
304	CD34-CD117p+HLA-DR+/CD64+hiCD13p+CD14-	CD117+CD64+hiCD14-
305	CD34p+CD117p+HLA-DR+/CD64p+hetCD14-	CD117+CD64+hetCD14- CD34+CD64+hetCD14-
306	CD34p+CD117p+HLA-DR+/CD64+CD14p+/CD2p+	CD117+CD64+CD14- CD34+CD64+CD14-
307	CD34p+CD117+HLA-DR+/CD64-CD14-/CD7p+	CD34p+CD117+ CD7+
308	CD34-CD117+HLA-DR+/CD64p+CD14-/CD56p+	CD117+CD64+ CD14-
309	CD34+CD117+HLA-DR+/CD64-CD56+CD19p+	CD34+CD56+CD64-
310	CD34-CD117p+HLA-DR-/CD64p+CD14-	CD34-CD117+ HLA-DR-
311	CD34+CD117+HLA-DR+/CD7+	CD34+CD13+CD7+ CD34+CD117+CD7+
312	CD34+CD117+HLA-DR+/CD7p+	CD34+CD117+CD7+
313	CD34+CD117+HLA-DR+/CD7+	CD34+CD117+CD7+
314	CD34-CD117-HLA-DR+/CD64+hiCD14p+CD56+	CD64+hiCD14-CD56+hi
315	CD34+CD117+HLA-DR+/CD7+CD22+	CD34+CD117+CD7+ CD34+CD22+CD7-
316	CD34-CD117p+HLA-DR-/CD64p+CD14-	CD117+CD34-HLA-DR- CD117+CD33+hiCD64+lo
317	CD34+CD117+HLA-DR+/CD64+/-CD56+	CD34+ CD64+/- CD56+
318	CD34-CD117p+HLA-DR+/CD64+hiCD14-/CD56p+	CD64+hiCD56+CD14- CD64+hiCD117+hiCD14-
319	CD34+hiCD117+hiHLA-DR+hi/CD64p+CD15	CD34+hiCD117+hiHLA-DR+hi CD34+CD117+CD15+
320	CD34+hiCD117+brHLA-DR+br/CD64+lo/CD19p+CD56p+	CD34+hiCD117+brHLA-DR+br CD34+ CD64+lo CD56+



Grafikon 30. Učestalost različitih tipova IFSL primenjenih za praćenje MRB

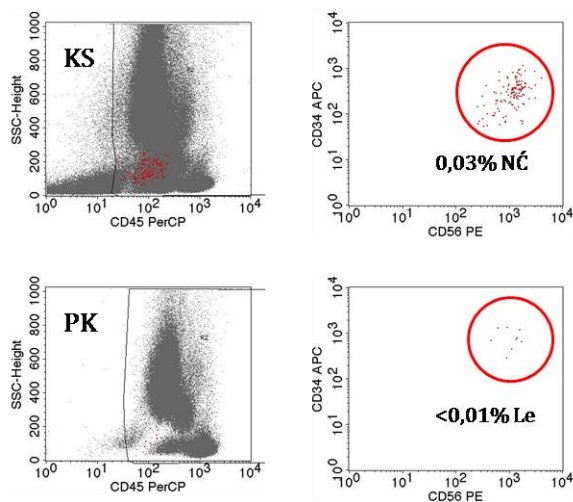
Prilikom analize populacija ćelija koje eksprimiraju kombinacije IFSL, u pk bolesnika u proseku je prikupljano 257 ± 806 ćelija sa specifičnim karakteristikama (Me 9, opseg 0 – 5300 ćelija), dok je u ks bolesnika u proseku prikupljano 1045 ± 1966 ćelija sa specifičnim karakteristikama (Me, 197, opseg 3 – 10566 ćelija).

Metodologija četvorokolorne imunofenotipizacije primenom MPC, omogućila nam je detekciju rezidualne populacije LĆ na nivou senzitivnosti od 0,01% NĆ, pri čemu je osnovni kriterijum bio da po svakoj testiranoj kombinaciji IFSL bude prikupljeno bar 50 ćelija sa specifičnim imunofenotipskim karakteristikama (Béné i Kaeda, 2009; Hokland i sar., 2012). Primeri detekcije MRB metodologijom MPC kod dva naša bolesnika sa AML, prikazani su na Slici 17.

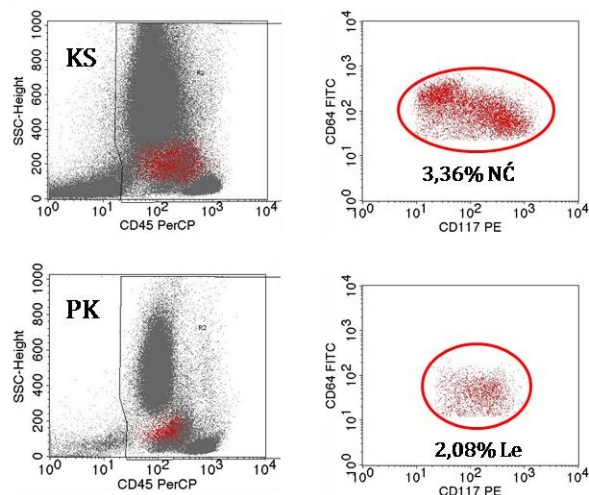
Rezultati ispitivanja bolesnika sa AML za prisustvo rezidualnih leukemijskih ćelija (MRB^{poz}) u ks i pk posle indukcione i konsolidacione hemioterapije, prikazani su u Tabelama 61. i 62.

Posle lečenja indukcionom hemioterapijom, prisustvo MRB u ks je utvrđeno kod 18 (69,2%) bolesnika, od kojih je kod pet (19,2%) bolesnika potvrđeno prisustvo MRB i u pk. Posle lečenja konsolidacionom hemioterapijom, prisustvo MRB u ks je utvrđeno kod devet (50%) bolesnika, od kojih je kod jednog (5,6%) bolesnika potvrđeno prisustvo MRB i u pk.

dg AML sa t(8;21), post-IND, IFSL - CD34⁺CD117⁺CD56⁺



dg AML, NOS, post-IND, IFSL - CD117⁺CD64⁺CD14⁻



Slika 17. Primeri detekcije MRB primenom MPC, kod bolesnika sa AML posle primene indukcionе terapije (post-IND): primer 1. AML sa t(8;21), primer 2. AML-NOS, Mijelomonocitna

Ukupno 18 bolesnika sa AML analizirano je za prisustvo MRB u oba termina, posle indukcionе i konsolidacione terapije, pri čemu su rezultati ove analize prikazani na Grafikonu 31. Posle primene konsolidacione hemioterapije, devet bolesnika je i dalje bilo MRB^{poz}, dok su samo dva bolesnika promenila status iz MRB^{poz} u MRB^{neg}. Ukupno sedam bolesnika je očuvalo status MRB^{neg} i posle konsolidacije, pri čemu ni jedan bolesnik nije prešao iz MRB^{neg} u MRB^{poz} status.

Tabela 61. Populacije mijeloidnih progenitora u ks/pk, status MRB i kliničke karakteristike 26 bolesnika kod kojih je ispitivano prisustvo MRB primenom MPC

AML broj	Mijelo-Progen Post-IND PK/KS (%NĆ)	MRB-PCM Post-IND PK/KS	Mijelo-Progen Post-KON PK/KS (%NĆ)	MRB-PCM Post-KON PK/KS	TKR (mes)	Relaps	UP	Ishod
295	0,02/0,06	Neg/Neg	0,00/0,00	Neg/Neg	26	Ne	26	živ
296	0,05/0,35	Neg/Neg	0,01/0,20	Neg/Neg	9	Da	10	mrtav
297	0,28↑/3,4↑	Neg/Poz	-	-	4	Ne	5	mrtav
298	1,07↑/1,35↑	Neg/Neg	0,01/0,37	Neg/Neg	23	Ne	24	živ
299	0,08↑/0,50	Neg/Neg	0,01/0,38	Neg/Neg	22	Ne	23	živ
300	0,04/0,90	Neg/Neg	0,01/0,86	Neg/Neg	22	Ne	23	živ
301	0,01/0,72	Neg/Neg	-	-	5	Ne	7	mrtav
302	0,03/1,96↑	Neg/Neg	0,02/0,56	Neg/Neg	21	Ne	22	živ
303	0,03/0,90	Neg/Poz	-	-	5	Da	7	mrtav
304	0,04/0,67	Neg/Poz	0,01/1,36↑	Neg/Neg	7	Da	12	mrtav
305	3,40↑/2,65↑	Poz/Poz	-	-	1	Da	2	mrtav
306	0,18↑/0,46	Poz/Poz	0,17↑/0,54	Neg/Poz	20	Ne	21	živ
307	0,26↑/0,48	Poz/Poz	0,06↑/0,18	Neg/Poz	11	Da	12	mrtav
308	0,01/0,33	Neg/Poz	-	-	3	Da	6	mrtav
309	0,01/0,95	Neg/Poz	-	-	5	Da	7	mrtav
310	0,01/0,35	Neg/Neg	0,00/0,44	Neg/Neg	17	Da	18	mrtav
311	0,00/0,09	Neg/Poz	0,01/0,60	Neg/Poz	11	Da	19	živ
312	0,04/0,89	Neg/Poz	0,02/0,77	Neg/Poz	13	Ne	14	živ
313	0,04/0,50	Neg/Poz	0,01/0,52	Neg/Poz	13	Ne	15	živ
314	0,01/0,78	Neg/Poz	0,01/0,60	Neg/Poz	13	Ne	14	živ
315	0,06↑/2,88↑	Poz/Poz	-	-	1	Refr.	10	mrtav
316	0,18↑/1,28↑	Poz/Poz	-	-	1	Refr.	6	mrtav
317	0,02/0,78	Neg/Poz	0,01/0,72	Neg/Poz	16	Ne	17	živ
318	0,03/0,48	Neg/Poz	0,00/0,20	Neg/Neg	9	Ne	10	živ
319	0,02/0,74	Neg/Poz	0,75↑/3,17↑	Poz/Poz	10	Ne	11	živ
320	0,07↑/1,64↑	Neg/Poz	0,01/0,34	Neg/Poz	8	Ne	9	živ

Skraćenice: ks, kostna srž; Mijelo, mijeloidni; pk, periferna krv; Post-IND, post-indukcija; Post-KON, post-konsolidacija; Th, terapija; TKR, trajanje kompletne remisije bolesti; UP, ukupno preživljavanje bolesnika; Mijelo-Prog pk ↑ (≥0,06% Le); Mijelo-Prog ks ↑ (≥1,1% NĆ); MRB^{poz} (≥0,01% IFLS⁺ NĆ); MRB^{neg} (<0,01% IFLS⁺ NĆ)

Tabela 62. Nivo MRB u ks/pk u grupi MRB^{poz} bolesnika sa AML, posle primene indukcione i/ili konsolidacione hemioterapije

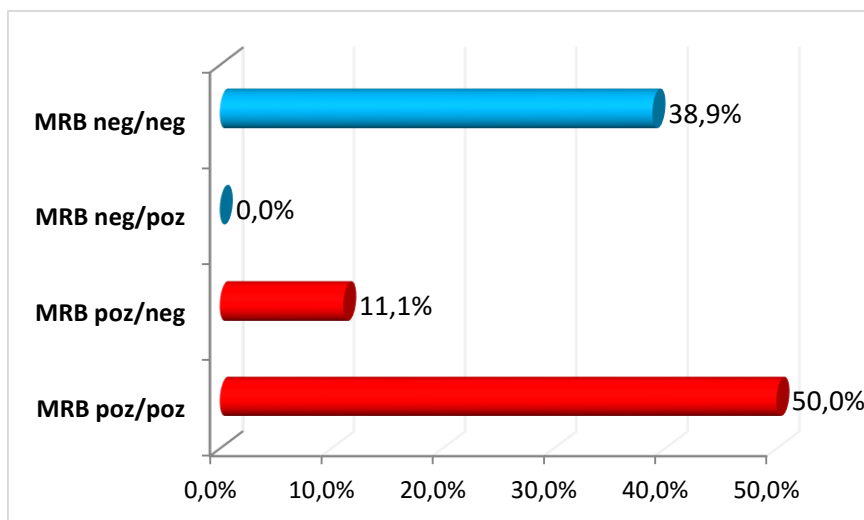
AML broj	MRB Post-IND pk (% Le)	MRB Post-IND ks (% NĆ)	MRB Post-KON pk (% Le)	MRB Post-KON ks (% NĆ)
297	<0,01%	0,15%	-	-
303*	0,03%	0,88%	-	-
304*	<0,01%	0,35%	<0,01%	<0,01%
305*	2,83%	3,98%	-	-
306	0,02%	0,39%	<0,01%	0,60%
307*	0,46%	1,60%	<0,01%	0,04%
308*	<0,01%	0,17%	-	-
309*	<0,01%	0,03%	-	-
311*	<0,01%	0,03%	<0,01%	0,02%
312	<0,01%	0,01%	<0,01%	0,12%
313	<0,01%	0,05%	<0,01%	0,05%
314	<0,01%	0,07%	<0,01%	0,04%
315*	0,02%	1,49%	-	-
316*	0,61%	3,62%	-	-
317	<0,01%	0,03%	<0,01%	0,04%
318	<0,01%	0,27%	<0,01%	<0,01%
319	<0,01%	0,27%	0,13%	1,84%
320	<0,01%	0,62%	<0,01%	0,23%

Skraćenice: IFSL, imunofenotip specifičan za leukemiju; ks, kostna srž; Post-IND, post-indukcija; Post-KON, post-konsolidacija.; *, bolesnici koji su imali relaps bolesti.

Naše ispitivanje je pokazalo da je kod 78% (7/9) bolesnika koji su tokom praćenja razvili relaps bolesti, nivo rezidualnih LĆ u ks srži bio >0,1% NĆ. (Tabela 62.).

Paralelno sa kvantifikacijom populacija ćelija koje karakteriše prisustvo IFSL, vršena je i kvantifikacija populacija ćelija sa opštim karakteristikama mijeloidnih progenitora u pk i ks bolesnika, posle primene indukcione i konsolidacione hemioterapije (Tabela 61.). Ovaj vid ispitivanja sproveden je u

cilju utvrđivanja promena u pulu mijeloidnih progenitora ks i pk, i to kao posledica prisustva rezidualnih leukemijskih ćelija sa karakteristikama mijeloidnih progenitora.



Grafikon 31. Ispitivanje statusa MRB kod bolesnika sa AML posle indukcione i konsolidacione hemioterapije; MRB status (post-IND/post-KON)

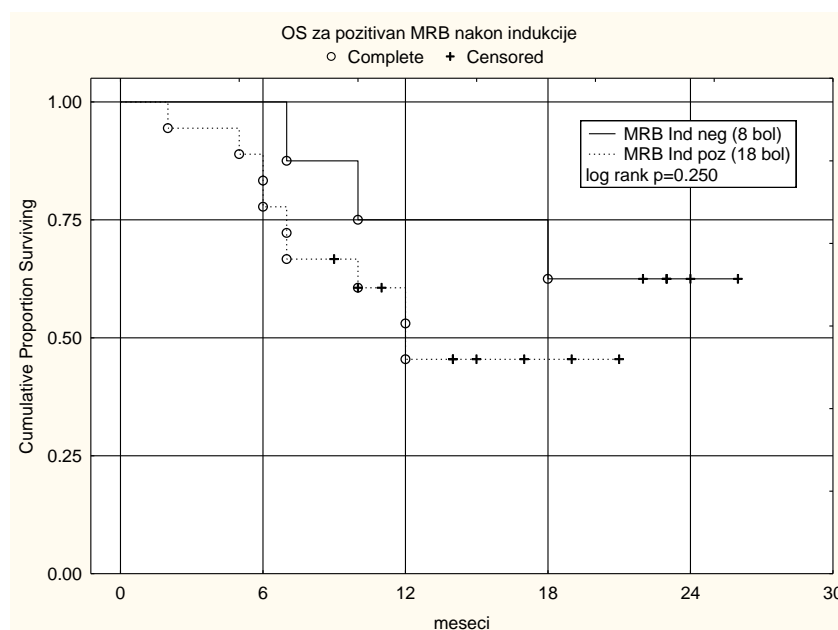
Posle lečenja **indukcionom hemioterapijom**, povećan pul mijeloidnih progenitora u ks je utvrđen kod 7 (26,9%) bolesnika, dok je istovremena analiza pk pokazala povećanje iste populacije kod 9 (34,6%) bolesnika. Prosečne vrednosti populacija mijeloidnih progenitora u grupi MRB^{neg} i MRB^{poz} bolesnika, procenjene posle lečenja indukcijom hemioterapijom, nisu se međusobno razlikovale ni u ks ($0,77 \pm 0,62$ vs. $1,11 \pm 0,94$, $p=0,404$) ni u pk ($0,16 \pm 0,37$ vs. $0,26 \pm 0,79$, $p=0,801$).

Posle lečenja **konsolidacionom hemioterapijom**, povećan pul mijeloidnih progenitora u ks je utvrđen kod 3 (16,7%) bolesnika, dok je istovremena analiza pk pokazala povećanje iste populacije kod 2 (11,1%) bolesnika. Prosečne vrednosti populacija mijeloidnih progenitora u grupi MRB^{neg} i MRB^{poz} bolesnika, procenjene posle lečenja konsolidacijom hemioterapijom, pokazale su značajne međusobne razlike u pk ($0,01 \pm 0,01$ vs.

$0,12 \pm 0,24$, $p=0,029$), dok u ks one nisu potvrđene kao značajne ($0,49 \pm 0,41$ vs. $0,836 \pm 0,90$, $p=0,801$).

U grupi bolesnika koji su tokom praćenja razvili **relaps bolesti** ili su imali refraktarnu bolest (11/26, 42%), MRB je utvrđena posle indukcione ili konsolidacione hemioterapije kod 9 (81,8%) bolesnika. Sa druge strane, u grupi bolesnika koja nije tokom praćenja razvila relaps bolesti (n=15), MRB je utvrđena posle indukcione ili konsolidacione hemioterapije kod 8 (53,3%) bolesnika.

Prosečno **preživljavanja bolesnika** koji su posle indukcione terapije imali MRB^{neg} status (Me nije dosegnuta) znatno je duže u poređenju sa bolesnicima koji su imali MRB^{poz} status (Me 12 mes.) ($p=0,250$) (Grafikon 32.)



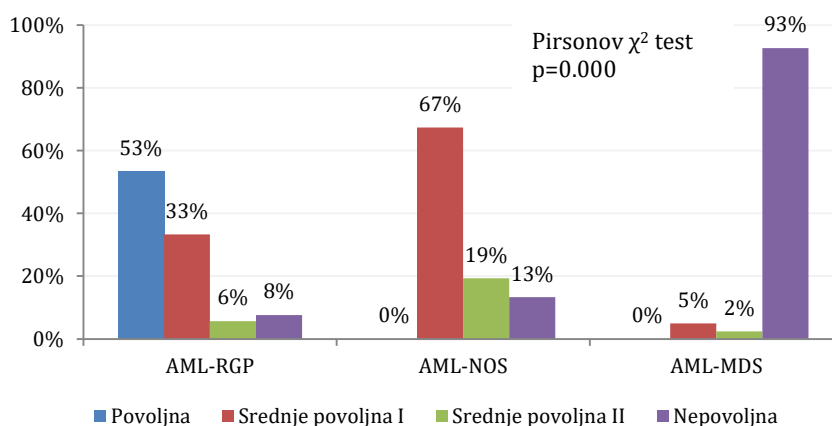
Grafikon 32. Ukupno preživljavanje MRB^{neg} i MRB^{poz} bolesnika, čiji je status bolesti procenjivan posle lečenja indukcijom terapijom

9. Lečenje i preživljavanje bolesnika sa AML

Nakon postavljanja dg AML, bolesnici su procenjivani prema **stepenu rizika** i svrstavani u jednu od ELN grupa (Sorrer i sar., 2005; Döhner i sar, 2010).

Najveći broj bolesnika svrstan je u grupu *srednje povoljna I* (45,6%, 128/281), dok je dvostruko manje bolesnika svrstano u grupe *povoljna* (19,9%, 56/281) ili *nepovoljna* (22,8%, 64/281), pri čemu je najmanje bolesnika bilo u grupi *srednje povoljna II* (11,7%, 33/281).

Analiza raspodele bolesnika prema stepenu rizika u okviru **glavnih tipova AML** prema SZO klasifikaciji, pokazala je prisustvo značajnih razlika među njima ($p=0,000$) (Grafikon 33.). Najučestalije grupe rizika u tipu AML-RGP su *povoljna* i *srednje povoljna I*, u tipu AML-NOS su *srednje povoljna I* i *srednje povoljna II*, a u tipu AML-MDS je najučestalija grupa *nepovoljna*.



Grafikon 33. Raspodela glavnih tipova AML u ELN grupe prema stepenu rizika

Na osnovu procenjenog stepena rizika bolesnika, određivana je vrsta terapije. Intenzivnom indukcionom hemioterapijom je lečeno 85,4% (234/274) bolesnika. Palijativnom terapijom je lečeno 14,6% (40/274) bolesnika. U pogledu konsolidacionog lečenja, kombinovano lečenje primenom hemioterapije i TMČH u prvoj KR primenjeno je kod 7,7% (18/234) bolesnika.

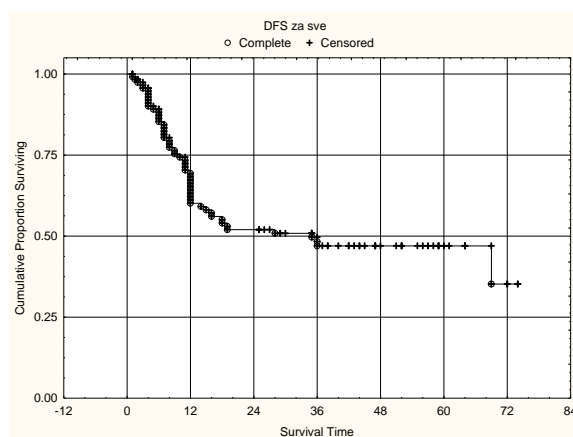
Kod trećine bolesnika je nastupila **rana smrt** (86/275, 31,3%), bilo pre početka lečenja (n=15) ili tokom rane faze lečenja (n=71), zbog čega kod njih nije bilo moguće proceniti odgovor na indukcionu hemioterapiju. Učestalost rane smrti se nije značajno razlikovala između tipova – AML-RGP (30/103, 29,1%), AML-NOS (37/123, 30,1%) i AML-MDS (15/40, 37,5%) ($p>0,05$). Upoređivanje učestalosti rane smrti između suptipova AML-NOS nije pokazalo prisustvo značajnih razlika: AML sa minimalnom diferencijacijom (28,6%), AML bez sazrevanja (40%), AML sa sazrevanjem (20%), Akutna monoblastna/monocitna leukemija (37,5%), Akutna mijelomonocitna leukemija (31,2%), Akutna bazofilna leukemija (0%) ($p>0,05$). Jedina značajna razlika u pogledu učestalosti rane smrti je utvrđene između akutne monoblastne i akutne monocitne leukemije (15,4% vs. 52,6%) ($p=0,033$). U slučaju AML-RGP, upoređivanje učestalosti rane smrti je pokazalo prisustvo signifikantnih razlika među suptipovima: APL (19,4%), AML sa t(8;21) (0%), AML sa inv16/t(16;16) (60%), AML sa t(v;11q23) (66,7%), AML sa *NPM1*^{mut} (43,2%), AML sa *CEBPA*^{mut} (0%), AML sa t(6;9) (0%) ($p=0,006$).

Odgovor na indukcionu hemioterapiju je procenjen kod 82,5% (156/189) bolesnika za koje su bili dostupni podaci. Naime, KR je postiglo 78,8% (123/156) bolesnika, dok je odsustvo terapijskog odgovora registrovano kod 21,5% (33/156) bolesnika. Tip AML-MDS je imao značajno nižu učestalost KR (7/16, 43,8%) u poređenju sa tipovima AML-RGP (59/67, 88,1%) ($p=0,000$) i AML-NOS (57/73, 78,1%) ($p=0,006$), pri čemu između dva poslednja tipa AML nije potvrđena značajnost razlika ($p=0,118$).

Upoređivanje učestalosti KR između suptipova AML-NOS je pokazalo prisustvo značajnih razlika: AML sa minimalnom diferencijacijom (100%), AML bez sazrevanja (71,4%), AML sa sazrevanjem (92%), akutna monoblastna/monocitna leukemija (75%), akutna mijelomonocitna leukemija (68,4%) i akutna bazofilna leukemija (0%) ($p=0,030$). I u slučaju tipa AML-RGP, upoređivanje učestalosti KR je pokazalo prisustvo značajnih razlika među suptipovima: APL (100%), AML sa t(8;21) (100%), AML sa inv16/t(16;16)

(100%), AML sa t(9;11) (0%), AML sa *NPM1*^{mut} (71,4%), AML sa *CEBPA*^{mut} (100%), AML sa t(6;9) (0%) ($p=0,000$).

Prosečno vreme trajanja KR u celoj grupi bolesnika sa AML ($n=120$), iznosilo je $23,82 \pm 21,30$ meseci (Me 12 meseci, opseg, 1 – 74). Medijana preživljavanja grupe bolesnika koji su postigli KR je iznosila 36 meseci, uz petogodišnje preživljavanje od 46,97% (Grafikon 34.).

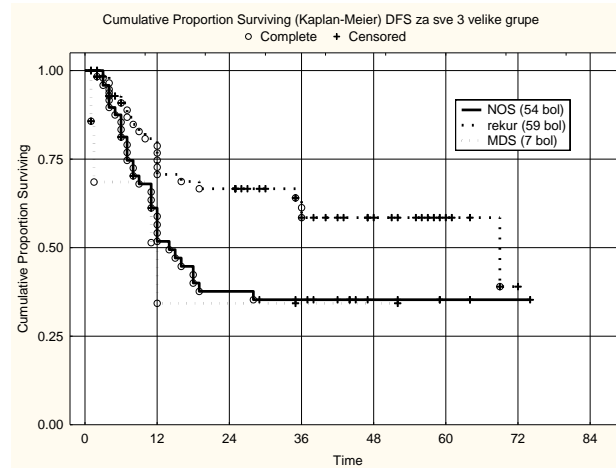


Grafikon 34. Kriva preživljavanja cele grupe bolesnika sa AML koji su postigli KR bolesti (Kaplan-Meier)

Prosečna dužina KR u grupi AML-RGP ($n=59$) ($28,41 \pm 21,95$ meseci, Me 26 meseci) je bilo duže u poređenju sa AML-NOS ($n=54$) ($19,80 \pm 19,98$ meseci, Me 11 meseci) i AML-MDS ($n=7$) ($16,21 \pm 19,82$ meseci, Me 11 meseci). Prosečno vreme trajanja KR grupe AML-RGP se značajno razlikovalo u odnosu na grupu AML-NOS (Log rank, $p=0,016$), pri čemu nije potvrđena značajnost razlike u poređenju sa AML-MDS (Log rank, $p=0,128$). Takođe nije potvrđena značajnost razlika u pogledu dužine KR između grupa AML-NOS i AML-MDS (Log rank, $p=0,658$).

Medijana petogodišnjeg preživljavanja bolesnika koji su postigli KR u grupi AML-RGP nije dostignuta, dok je za bolesnike AML-NOS iznosila 14 meseci, a za AML-MDS 12 meseci (Grafikon 35.). Preživljavanje bolesnika tipa AML-RGP tokom pet godina je iznosilo 58.5%, dok je za bolesnike tipa AML-NOS

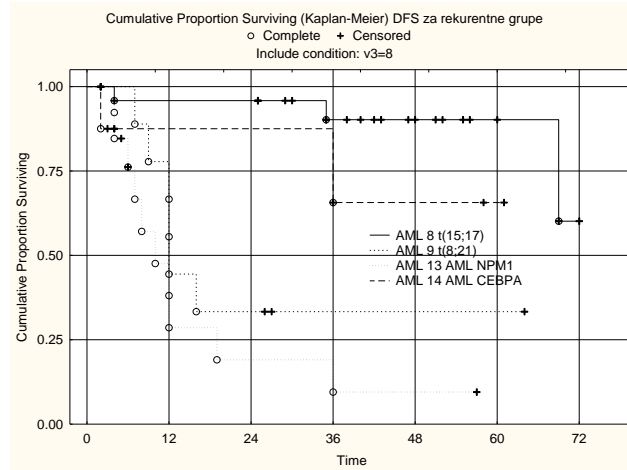
iznosilo 35.2%, a u slučaju bolesnika AML-MDS 34%, uz napomenu da je broj bolesnika u poslednjoj grupi mali za poređenje.



Grafikon 35. Kriva preživljavanja bolesnika sa različitim tipovima AML koji su postigli KR bolesti (Kaplan-Meier)

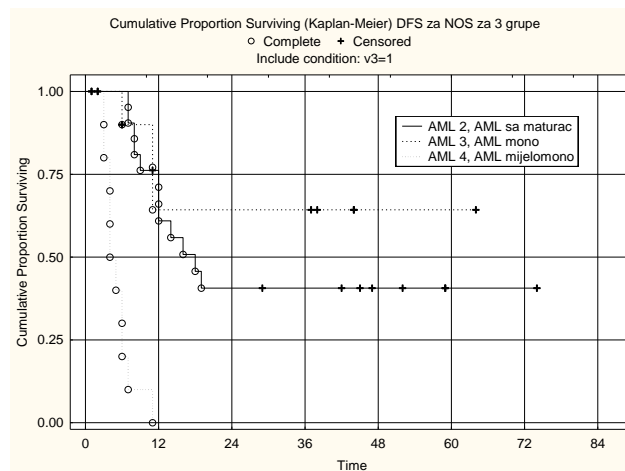
U grupi bolesnika sa AML-RGP, prosečno trajanje KR je procenjivano i upoređivano u suptipovima APL, AML sa $t(8;21)$, AML sa $NPM1^{mut}$ i AML sa $CEBPA^{mut}$ (Grafikon 36.). Medijana petogodišnjeg preživljavanja bolesnika sa APL i AML sa $CEBPA^{mut}$ nije dosegnuta, pri čemu za suptip AML sa $t(8;21)$ iznosi 12 meseci a za AML sa $NPM1^{mut}$ 10 meseci.

Prosečno vreme trajanja KR u suptipu APL je bilo značajno duže u poređenju sa AML sa $t(8;21)$ (Log rank, $p=0,000$) i AML sa $NPM1^{mut}$ (Log rank, $p=0,000$), pri čemu nije potvrđena značajnost razlike u poređenju sa AML sa $CEBPA^{mut}$ (Log rank, $p=0,215$). Procena petogodišnjeg preživljavanja je pokazala najveću učestalost živih bolesnika u suptipovima APL i AML sa $CEBPA^{mut}$ (65,6%), odnosno nižu učestalost u suptipovima AML sa $t(8;21)$ (33,3%) i AML sa $NPM1^{mut}$ (9,6%).



Grafikon 36. Kriva preživljavanja bolesnika sa različitim tipovima AML-RGP u KR bolesti (Kaplan Meier)

U grupi bolesnika sa AML-NOS, prosečna dužina KR je procenjavana i upoređivana u suptipovima AML sa sazrevanjem, akutna monoblastna/monocitna i akutna mijelomonocitna leukemija (Grafikon 37.) Medijana petogodišnjeg preživljavanja bolesnika u KR bolesti suptipa AML sa sazrevanjem nije dosegnuta, pri čemu za akutnu monoblastnu/monocitnu leukemiju iznosi 18 meseci, a za akutnu mijelomonocitnu leukemiju pet meseci.



Grafikon 37. Kriva preživljavanja bolesnika sa različitim tipovima AML-NOS u KR bolesti (Kaplan Meier)

Prosečno vreme trajanja KR u akutnoj mijelomonocitnoj leukemiji je bilo značajno kraće u poređenju sa akutnom monoblastnom/monocitnom leukemijom (Log rank, $p=0,000$) odnosno AML sa sazrevanjem (Log rank, $p=0,000$). Razlike u dužini KR nisu potvrđene kao značajne između akutne monoblastne/monocitne leukemije i AML sa sazrevanjem (Log rank, $p=0,470$).

Petogodišnje preživljavanje bolesnika različitih suptipova AML-NOS u KR iznosilo je: AML sa sazrevanjem (64,2%), akutna monoblastna/monocitna leukemija (40,6%) i akutna mijelomonocitna leukemija (0%).

Tokom praćenja i daljeg lečenja bolesnika sa AML, **relaps bolesti** je utvrđen kod 45% (54/120) bolesnika cele grupe. Učestalost relapsa bolesti je bila niža u tipu AML-RGP (21/59, 35,6%) u poređenju sa AML-NOS (29/54, 53,7%) ($p=0,053$) i AML-MDS (4/7, 57,1%) ($p=0,266$).

U tipu AML-RGP su utvrđene statistički značajne razlike u učestalosti relapsa između suptipova: APL (12%), AML sa t(8;21) (66,7%), AML sa inv16/t(16;16) (0%), AML sa *NPM1*^{mut} (66,7%) i AML sa *CEBPA*^{mut} (25%) ($p=0,007$).

U okviru tipa AML-NOS su takođe utvrđene statistički značajne razlike u pogledu učestalosti relapsa: AML sa minimalnom diferencijacijom (75%), AML bez sazrevanja (20%), AML sa sazrevanjem (57,1%), akutna monoblastna/monocitna leukemija (25%) i akutna mijelomonocitna leukemija (83,3%) ($p=0,045$).

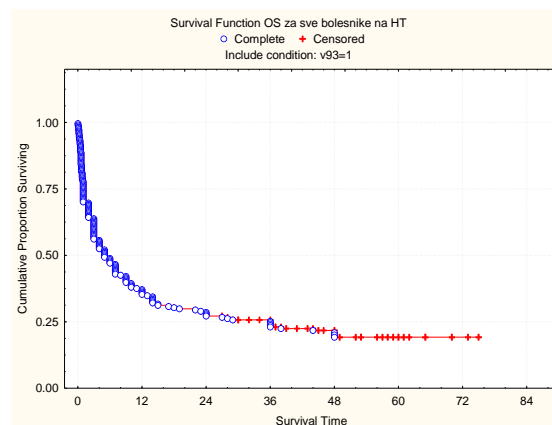
Ishod bolesti u celoj grupi AML ($n=262$) je procenjen pred statističku obradu podataka (31. decembar 2015. godine). Posle petogodišnjeg praćenja, učestalost živih bolesnika u celoj grupi AML je iznosila 17,9% (47/262). Učestalost smrtnih ishoda je bila značajno niža u tipu AML-RGP (72/102, 70,6%) u odnosu na AML-NOS (104/120, 86,7%) ($p=0,003$), odnosno između ovih tipova i AML-MDS (39/40, 97,5%) ($p=0,000$).

U grupi bolesnika sa AML-RGP utvrđene su statistički značajne razlike u pogledu učestalosti smrtnih ishoda tokom petogodišnjeg praćenja: APL (38,7%), AML sa t(8;21) (54,5%), AML sa inv16/t(16;16) (80%), AML sa t(v;11q23)

(100%), AML sa t(6;9) (100%), AML sa *NPM1^{mut}* (95,4%) i AML sa *CEBPA^{mut}* (62,5%) ($p=0,000$).

U grupi bolesnika sa AML-NOS utvrđene su razlike u pogledu učestalosti smrtnih ishoda tokom petogodišnjeg praćenja, na granici statističke značajnosti: AML sa minimalnom diferencijacijom (85,7%), AML bez sazrevanja (93,3%), AML sa sazrevanjem (73,5%), akutna monoblastna/monocitna leukemija (84,4%), akutna mijelomonocitna leukemija (100%), akutna bazofilna leukemija (100%) ($p=0,057$).

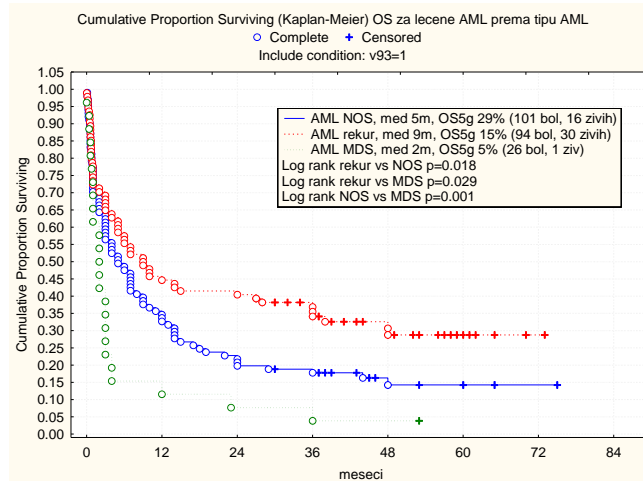
Ukupno **preživljavanje bolesnika** sa AML je procenjivano u grupi bolesnika lečenih hemioterapijom ($n=221$) (Grafikon 38.).



Grafikon 38. Kriva preživljavanja cele grupe bolesnika sa AML lečenih hemioterapijom (Kaplan- Meier)

Medijana petogodišnjeg **preživljavanje** cele grupe lečenih bolesnika sa AML je iznosila šest meseci, uz petogodišnje preživljavanje od 20% bolesnika.

Medijana petogodišnjeg preživljavanja lečenih bolesnika tipa AML-RGP je iznosila 9 meseci, za bolesnike AML-NOS pet meseci, a za AML-MDS dva meseca (Grafikon 39.). Preživljavanje bolesnika tipa AML-RGP tokom pet godina je iznosilo 32%, dok je za bolesnike tipa AML-NOS iznosilo 16%, a u slučaju bolesnika AML-MDS 4%.

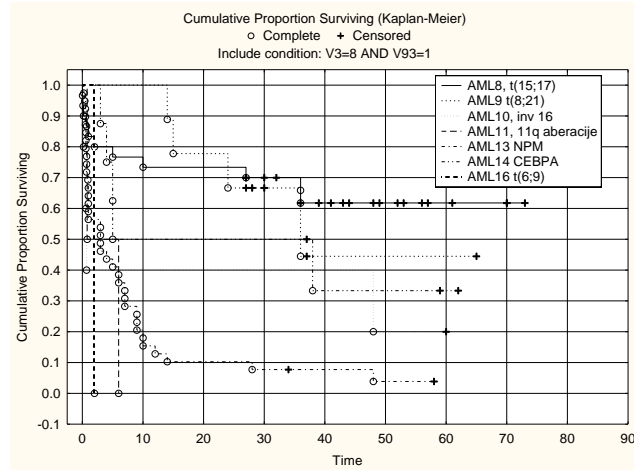


Grafikon 39. Kriva preživljavanja bolesnika sa različitim tipovima AML lečenih hemioterapijom (Kaplan- Meier)

Značajno duže prosečno preživljavanje su imali bolesnici tipa AML-RGP u poređenju sa AML-NOS (Log rank test, $p=0,018$) i AML-MDS (Log rank test, $p=0,029$). Značajno duže preživljavanje utvrđeno je i u slučaju bolesnika AML-NOS u odnosu na AML-MDS (Log rank test, $p=0,001$).

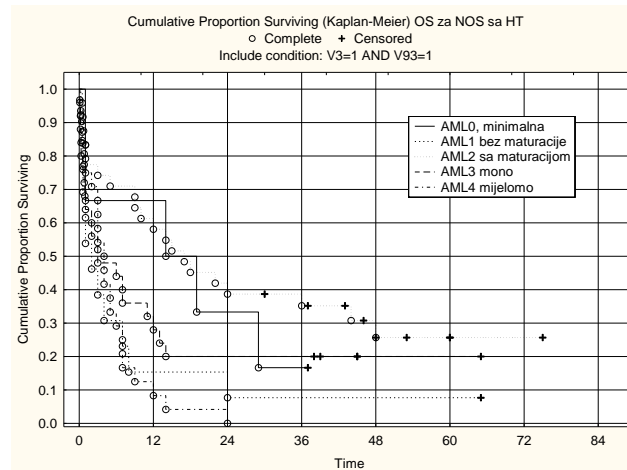
Medijane petogodišnjeg preživljavanja bolesnika različitih suptipova u okviru tipa AML-RGP ($n=94$) (Grafikon 40.) su bile različite: APL (36 m), AML sa $t(8;21)$ (28 m), AML sa $inv16/t(16;16)$ (0,7 m), AML sa $t(v;11q23)$ (3,4 m), AML sa $t(6;9)$ (0 m), AML sa $NPM1^{mut}$ (3 m) i AML sa $CEBPA^{mut}$ (21 m).

Prosečno petogodišnje preživljavanje bolesnika suptipa APL (63%) se nije značajno razlikovalo u odnosu na AML sa $t(8;21)$ (45%) (Log rank, $p=0,755$) ili AML sa $CEBPA^{mut}$ (33%) (Log rank, $p=0,287$). Prosečno petogodišnje preživljavanje bolesnika suptipa AML sa $NPM1^{mut}$ (4%) je bilo značajno kraće u odnosu na APL (Log rank, $p=0,000$), AML sa $t(8;21)$ (Log rank, $p=0,000$) i AML sa $CEBPA^{mut}$ (Log rank, $p=0,000$).



Grafikon 40. Kriva preživljavanja bolesnika sa subtipovima AML-RGP lečenih hemioterapijom (Kaplan Meier)

Medijana petogodišnjeg preživljavanja bolesnika različitih suptipova u okviru tipa AML-NOS (n=99) (Grafikon 41.) je bila različita: AML sa minimalnom diferencijacijom (16,5 m), AML bez sazrevanja (2 m), AML sa sazrevanjem (17 m), akutna monoblastna/monocitna leukemija (3 m), akutna mijelomonocitna leukemija (4 m).



Grafikon 41. Kriva preživljavanja bolesnika sa subtipovima AML-NOS lečenih hemioterapijom (Kaplan Meier)

Prosečno petogodišnje preživljavanje bolesnika suptipa AML sa sazrevanjem je bilo značajno duže u odnosu na akutnu monoblastnu/monocitnu leukemiju (Log rank, $p=0,093$), akutnu mijelomonocitnu leukemiju (Log rank,

p=0,001) i AML bez sazrevanja (Log rank, p=0,033), pri čemu u odnosu na suptip AML sa minimalnom diferencijacijom nije bilo razlika (Log rank, p=0,621).

Preživljavanje bolesnika različitih suptipova AML-NOS tokom pet godina je iznosilo: AML sa minimalnom diferencijacijom (16,7%, ali nije dosegnuto), AML bez sazrevanja (7,7%), AML sa sazrevanjem (25,7%), akutna monoblastna/monocitna leukemija (20%) i akutna mijelomonocitna leukemija (0%).

10. Ispitivanje značaja imunofenotipskih karakteristika za prognozu AML

Ispitivanje potencijalnih prognostičkih kliničko-bioloških i imunofenotipskih karakteristika za pojavu rane smrti, odgovor na indukcionu hemioterapiju, pojavu relapsa bolesti i ukupno preživljavanje bolesnika, sprovedeno je na osnovnoj grupi od 250 bolesnika sa AML koji su klasifikovani prema SZO klasifikaciji kao non-APL, lečenih istim tipom hemioterapeutskog protokola ("3+7"). U ovoj grupi bolesnika, podaci o pojedinim ispitivanim karakteristikama nisu bili dostupni, te je shodno tome deo karakteristika analiziran u manjim grupama bolesnika. Bolesnici sa APL (n=31), isključeni su iz ovog ispitivanja, pošto su lečeni drugim tipom hemioterapeutskog protokola, kao i zbog relativno povoljne prognoze.

10.1. Ispitivanje prognostičkih faktora rane smrti u AML

Ispitivanje potencijalnih prognostičkih faktora za pojavu *rane smrti* u AML (n=235), obuhvatilo je široku grupu kliničko-bioloških i imunofenotipskih karakteristika.

Univarijantna analiza kliničko-bioloških karakteristika (Tabela 63./Prilog 1.), pokazala je da je rana smrt učestalija u grupi bolesnika sa

povišenom prosečnom vrednošću Le ($p=0,000$), kao i vrednošću $Le \geq 30 \times 10^9/l$ ($p=0,003$), povišenom prosečnom vrednošću LDH u serumu ($p=0,020$), povećanom prosečnom vrednošću blasta u pk ($p=0,000$) i ks ($p=0,031$). Rana smrt je učestalija u grupi bolesnika sa genskim mutacijama u *FLT3-d835* ($p=0,023$) i *NPM1* ($p=0,039$) genu.

Univarijantna analiza imunofenotipskih karakteristika (Tabela 64./Prilog 1.) je pokazala da je rana smrt učestalija u grupi bolesnika sa manjom populacijom CD117⁺ ($p=0,023$) odnosno cMPO⁺ ($p=0,005$) leukemijskih blasta, kao i u grupi CD11a⁻ ($p=0,021$) i CD117⁻ ($p=0,032$) bolesnika. Sa druge strane, pojava rane smrti je učestalija u grupi bolesnika sa većom populacijom CD11b⁺ ($p=0,009$) i CD36⁺ ($p=0,020$) leukemijskih blasta, kao i u grupi CD11b⁺ ($p=0,013$) i CD22⁺ ($p=0,031$) bolesnika.

10.2. Ispitivanje prognostičkih faktora povoljnog odgovora na indukcionu terapiju i pojavu relapsa AML

Ispitivanje potencijalnih prognostičkih faktora za odgovor na indukcionu terapiju ($n=131$) i pojavu relapsa AML ($n=95$), osim imunofenotipskih karakteristika, obuhvatilo je i kliničko-hematološke i biološke karakteristike.

Univarijantna analiza kliničko-bioloških karakteristika (Tabela 65./Prilog 1.), pokazala je da je KR učestalija u grupi bolesnika sa nižom prosečnom vrednošću Le ($p=0,031$), kao i vrednošću $Le < 30 \times 10^9/l$ ($p=0,030$), sa višom prosečnom vrednošću Hb ($p=0,030$) i nižom prosečnom vrednošću blasta u pk ($p=0,045$). Od bioloških parametara, postizanje KR bolesti je učestalije u grupi bolesnika sa normalnim kariotipom ($p=0,027$), odsustvom mutacija u *FLT3-ITD* genu ($p=0,007$) i u povoljnoj i srednje povoljnoj grupi rizika ($p=0,002$).

Univarijantna analiza imunofenotipskih karakteristika (Tabela 66./Prilog 1.), pokazala je da je KR učestalija u grupi bolesnika sa većom populacijom CD38⁺ ($p=0,023$) i cMPO⁺ ($p=0,023$) leukemijskih blasta. Sa druge

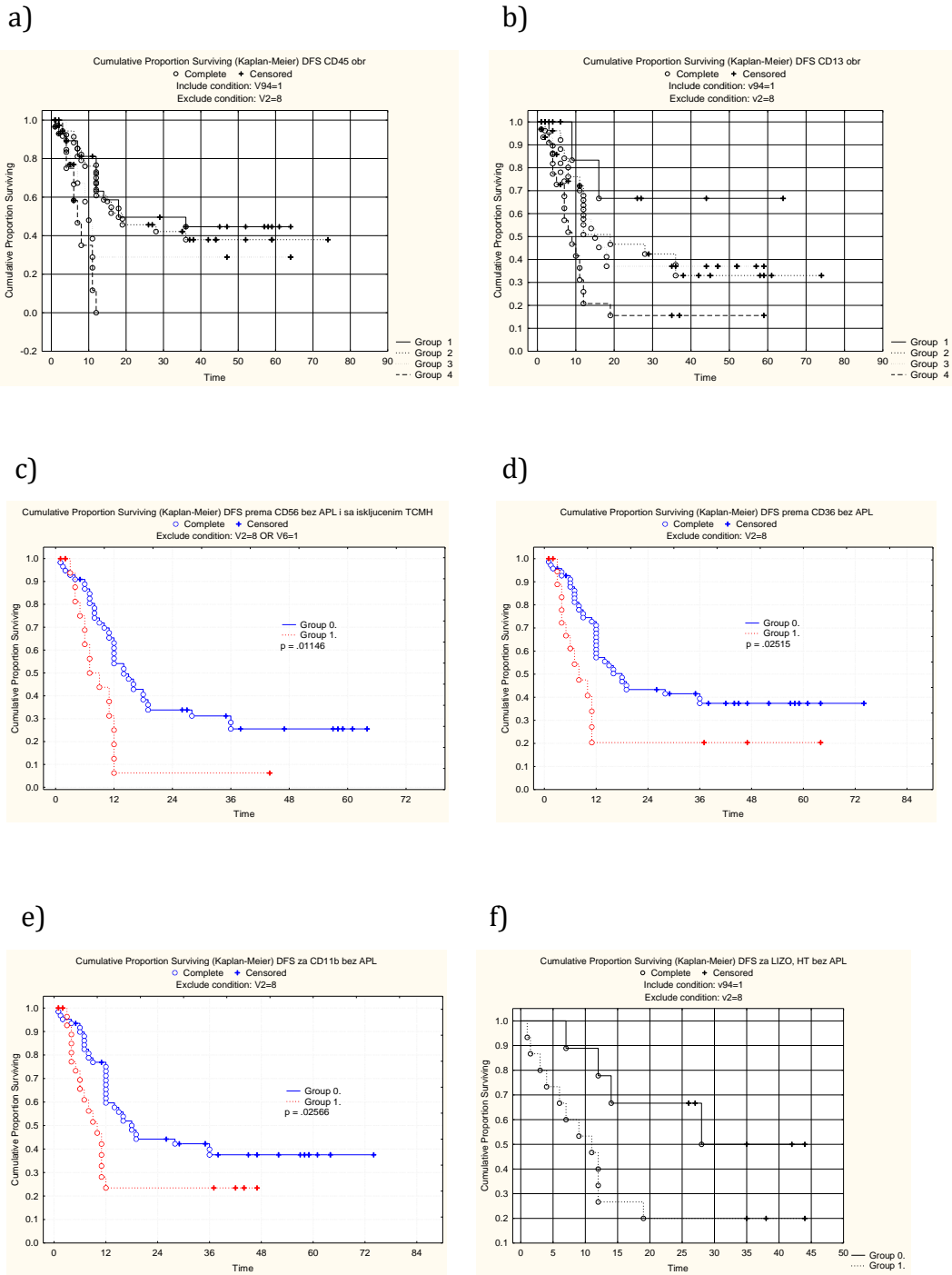
strane, učestalost KR je veća u grupi bolesnika sa manjom populacijom CD123⁺ (p=0,042), CD11b⁺ (p=0,004) i CD4⁺ (0,005) leukemijskih blasta, kao i u grupama CD22⁻ (p=0,046), CD11b⁻ (p=0,002) i CD4⁻ (p=0,028) bolesnika.

Univarijantna analiza kliničko-bioloških i imunofenotipskih karakteristika bolesnika sa AML u pogledu **relapsa bolesti** (Tabela 64./65./Prilog 1.), pokazala je da većina ispitivanih karakteristika nema uticaj na nastanak relapsa bolesti, osim veličine CD117⁺ populacije leukemijskih ćelija na dg (p=0,044) i odsustva mutacije u *CEBPA* genu (p=0,037).

10.3. Ispitivanje prognostičkih faktora koji utiču na trajanje KR bolesti i preživljavanje bolesnika sa AML

Ispitivanje potencijalnih prognostičkih faktora za dužinu KR, obuhvatilo je grupu od 95 bolesnika sa AML (non-APL). Univarijantna analiza uticaja kliničko-hematoloških i bioloških karakteristika na trajanje KR bolesti, nije potvrdila prognostički značaj ni jedne od ispitivanih karakteristika (Tabela 67./Prilog 1.).

Univarijantna analiza uticaja imunofenotipskih karakteristika leukemijskih ćelija AML na **trajanje KR**, potvrdila je prognostički značaj nekoliko karakteristika (Tabela 68./Prilog 1.). Naime, pokazano je da je medijana dužine KR bolesti, značajno veća u grupi bolesnika sa niskim ili srednjim nivoom ekspresije CD45 molekula (p=0,007) i srednjim ili visokim nivoom ekspresije CD13 molekula (p=0,030) (Grafikon 42./a,b), odnosno niskim nivoom ekspresije CD64 molekula. Sa druge strane, dužina KR je značajno kraća u grupi CD56⁺ (p=0,011), CD36⁺ (p=0,025), CD11b⁺ (p=0,026) i cLizozim⁺ (p=0,035) bolesnika (Grafikon 42./c-f).



Grafikon 42. Krive preživljavanja bolesnika koje prikazuju prognostički značajne hLDM za trajanje KR (Kaplan-Meier, Log rank metod): a) CD45 obrasci, b) CD13 obrasci, c) CD56 (+/-), d) CD36 (+/-), e) CD11b (+/-), f) cLizozim (+/-)

Grupa kliničko-hematoloških, bioloških i imunofenotipskih karakteristika, selekcionisanih u univarijantnoj analizi na osnovu nivoa statističke značajnosti ($p \leq 0,1$), uključena je u **multivarijantnu analizu** za ispitivanje nezavisnih faktora koji utiču na **dužinu KR**, prema Cox-ovom modelu proporcionalnih hazarda (Tabela 69.).

Tabela 69. Multivarijantna analiza prognostičkih varijabli za trajanje KR bolesti

Karakteristika (n=92)	Beta	Relativni rizik	95% interval poverenja	p
CD45 obrazac	0,578	1,782	1,233 - 2,575	0,002
CD13 obrazac	0,252	1,287	0,927 - 1,787	0,131
CD11b (+/-)	-0,143	0,867	0,408 - 1,840	0,710
CD56 (+/-)	-0,343	1,319	0,709 - 2,451	0,382

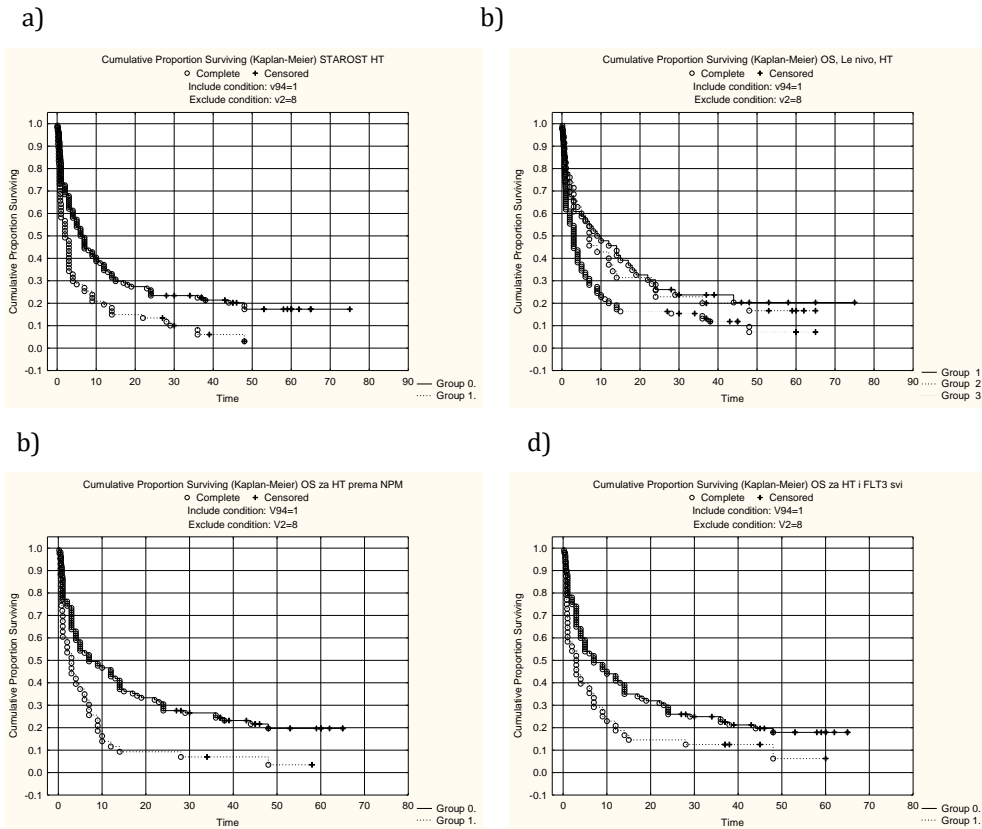
Model: $\text{Chi}^2 = 18,1795$ $\text{df} = 4$ $p = 0,00114$

Multivarijantna analiza je pokazala da je obrazac ekspresije CD45 molekula na leukemijskim ćelijama jedini nezavistan parametar koji značajno utiče na dužinu KR, pri čemu nepovoljan uticaj ima ekspresija CD45 molekula prema heterogenom ili visokom obrascu ($p=0,002$).

Ispitivanje potencijalnih prognostičkih faktora za **ukupno preživljavanje bolesnika** sa AML (n=191), obuhvatilo je osnovne kliničko-hematološke, biološke i imunofenotipske karakteristike bolesnika (Tabela 67./68./Prilog 1.).

Univarijantna analiza kliničko-bioloških karakteristika (Tabela 67./Prilog 1.), pokazala je da je medijana ukupnog preživljavanja značajno duža u grupi bolesnika <60 god. ($p=0,001$), sa prosečnom vrednošću $\text{Le} < 30 \times 10^9/\text{l}$ ($p=0,000$), posebno u slučaju prosečnih vrednosti $\text{Le} < 4 \times 10^9/\text{l}$ ($p=0,008$).

Od bioloških parametara, značajno dužu medijanu preživljavanja ima grupa bolesnika sa odsustvom genske mutacije *FLT3-ITD* ($p=0,014$) i odsustvom mutacija u *NPM1* (0,001) genu (Grafikon 43./ a-d).

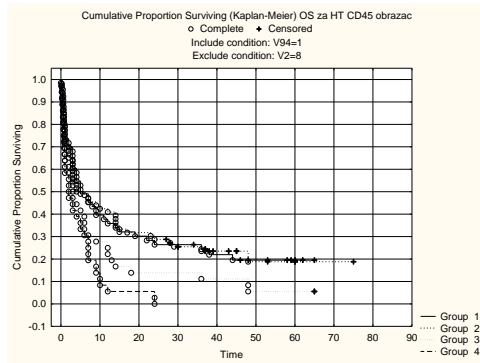


Grafikon 43. Krive preživljavanja koje prikazuju prognostički značajne kliničke i biološke parametre za ukupno preživljavanje bolesnika (Kaplan-Meier, Log rank metod): a) starost (< 60 god./ ≥ 60 god.), b) Le nivo, c) NPM1^{mut} (+/-), d) FLT3^{mut} (+/-).

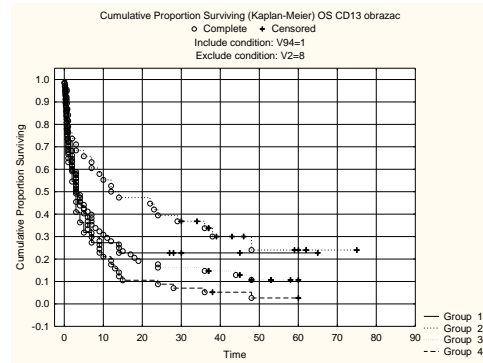
Univarijantna analiza uticaja imunofenotipskih karakteristika leukemijskih ćelija AML na dužinu ukupnog preživljavanja bolesnika, potvrdila je prognostički značaj nekoliko karakteristika (Tabela 68./Prilog 1.).

Naime, pokazano je da je medijana ukupnog preživljavanja bolesnika značajno veća u grupi CD19⁺ (p=0,000) i cCD79a⁺ (p=0,031), kao i u grupi bolesnika sa niskim ili srednjim nivoom ekspresije CD45 molekula (p=0,024), srednjim nivoom ekspresije CD13 (p=0,013) i cMPO (p=0,027), kao i niskim nivoom ekspresije CD64 molekula (p=0,039) (Grafikon 44./a-f). Sa druge strane, dužina preživljavanja je značajno kraća u grupi CD11b⁺ (p=0,000), CD36⁺ (p=0,001), CD14⁺ (p=0,035), CD7⁺ (p=0,045) i CD22⁺ (p=0,028) bolesnika (Grafikon 44./g-h).

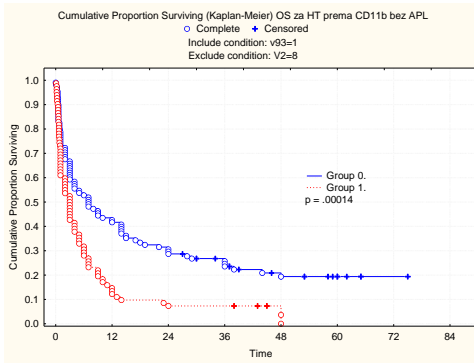
a)



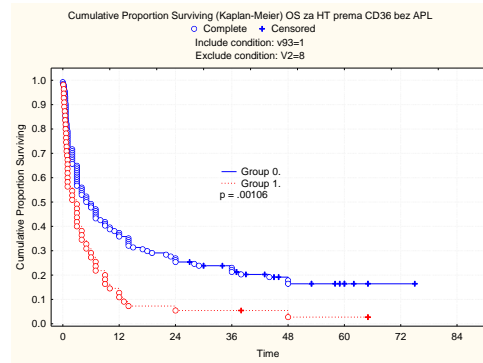
b)



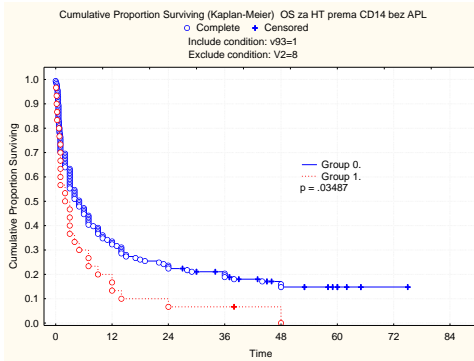
c)



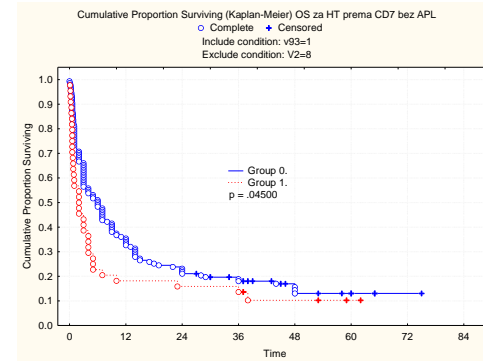
d)



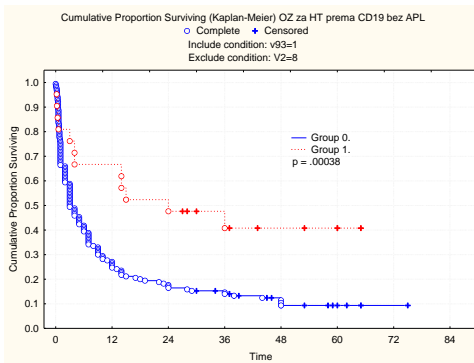
e)



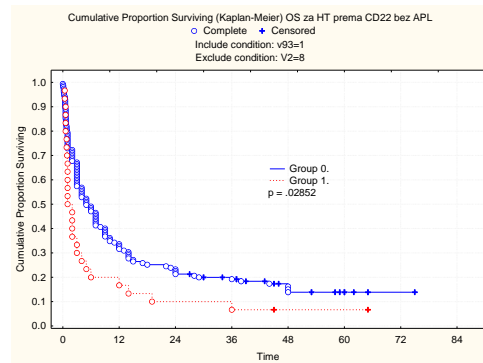
f)



g)



h)



Grafikon 44. Krive preživljavanja bolesnika koje prikazuju prognostički značajne hLDM za dužinu KR (Kaplan-Meier, Log rank metod): a) CD45 obrasci, b) CD13 obrasci, c) CD11b (+/-), d) CD36 (+/-), e) CD14 (+/-), f) CD7 (+/-), g) CD19 (+/-), h) CD22 (+/-).

Grupa kliničko-hematoloških i imunofenotipskih karakteristika, selekcionisanih u univarijantnoj analizi na osnovu nivoa statističke značajnosti ($p \leq 0,1$) i uz primenu "casewise deletion" metoda, uključena je u **multivarijantnu analizu parametara ukupnog preživljavanja** prema Cox-ovom modelu proporcionalnih hazarda (Tabela 70.).

Multivarijantna analiza je pokazala da nekoliko parametara nepovoljno utiče na dužinu ukupnog preživljavanja bolesnika sa AML: starost bolesnika ≥ 60 godina ($p=0,000$), broj $Le \geq 30 \times 10^9/l$ ($p=0,033$), i ekspresija molekula CD7 ($p=0,002$), CD22 ($p=0,006$) i CD34 ($p=0,023$) na leukemijskim ćelijama.

Tabela 70. Multivarijantna analiza prognostičkih varijabli za ukupno preživljavanje odraslih bolesnika sa *de novo* AML

Karakteristika (n=179)	Beta	Relativni rizik	95% interval poverenja	p
starost (>60 god.)	0.630	1.877	1.323 - 2.661	0.000
Le ($\geq 30 \times 10^9/l$)	0.411	1.508	1.034 - 2.201	0.033
CD45 obrazac	0.179	1.196	0.974 - 1.468	0.087
CD13 obrazac	0.112	1.119	0.926 - 1.352	0.245
CD34 (+/-)	-0.475	0.622	0.413 - 0.936	0.023
CD11b (+/-)	0.184	1.202	0.746 - 1.935	0.450
CD7 (+/-)	0.654	1.924	1.275 - 2.901	0.002
CD56 (+/-)	-0.132	0.876	0.606 - 1.266	0.481
CD22 (+/-)	0.629	1.875	1.195 - 2.943	0.006

Model: $\text{Chi}^2 = 51,4057$ df = 9 p = .00000

V DISKUSIJA

Ispitivanje ekspresionih profila hLDM na leukemijskim ćelijama AML primenom metodologije imunofenotipizacije i MPC, omogućilo je značajan pomak u oblasti bazičnih istraživanja biologije AML i razumevanja hijerarhijske ćelijske strukture ove bolesti (Roboz i Guzman, 2009). Istovremeno, precizno definisanje imunofenotipskog profila populacija i subpopulacija ćelija različitih loza zdravog humanog hematopoeznog sistema (van Lochem i sar., 2004; Arnoulet i sar., 2010; Maecker i sar., 2012), omogućilo je kliničku primenu imunofenotipizacije MPC u dijagnostici (Béné i sar., 2011; Van Dongen i sar., 2012) i praćenju bolesnika sa AML (Béné i Kaeda, 2009; Al-Mawali i sar., 2009b). Još jedan važan aspekt primene ove metodologije, predstavlja mogućnost identifikacije i kvantifikacije novih potencijalno važnih ciljnih molekula za imunoterapiju koji su eksprimirani na leukemijskim ćelijama AML (Morris, 2009; Döhner i sar., 2015).

Ciljevi ove disertacije grupisani su prema pomenutim savremenim aspektima ispitivanja ekspresionih profila hLDM na leukemijskim ćelijama AML. Jedan od postavljenih ciljeva je ispitivanje specifičnih bioloških karakteristika *de novo* AML, koje se odnose na definisanje ekspresionog profila široke grupe hLDM, definisanje stepena aberacija u njihovoj ekspresiji i utvrđivanje heterogenosti ćelijske strukture leukemijskih populacija ćelija AML. Druga grupa ciljeva ove disertacije odnosi se na ispitivanje značaja imunofenotipizacije MPC za dijagnozu AML, ali i za definisanje novih biomarkera važnih za praćenje i prognozu AML.

Opšte karakteristike grupe ispitivanih bolesnika sa AML Ispitivanje je sprovedeno na grupi od 294 odraslih bolesnika sa *de novo* AML, što je omogućilo objektivnu zastupljenost svih relevantnih tipova i suptipova AML definisanih SZO klasifikacijom (Swerdlow i sar., 2008; Hoffman i sar. 2009). Posmatrajući tri glavna tipa AML, najveću zastupljenost u našoj grupi su imali bolesnici sa dg AML-NOS (48%) i AML-RGP (37%), dok je niža zastupljenost

karakterisala tip AML-MDS (15%). Imunofenotipska karakterizacija pojedinih retkih suptipova AML nije mogla da bude realizovana, s obzirom da se oni u humanoj populaciji javljaju sa veoma niskom učestalošću (Swerdlow i sar., 2008).

Osim navedenog, naša grupa bolesnika sa AML nije bila selekcionisana ni po kom osnovu, tj. bolesnici su kontinuirano prikupljeni u četvorogodišnjem periodu, pri čemu su dijagnostikovani i lečeni na sistematski i uniforman način u jednom istraživačkom centru. Ovo je stvorilo preduslov da rezultati sprovedenog ispitivanja predstavljaju relevantne naučne činjenice, što predstavlja bitnu razliku u odnosu na rezultate kliničkih ispitivanja, koja se obično sprovode na selekcionisanim grupama bolesnika sa AML.

Naša grupa bolesnika sa AML je pokazala većinu tipičnih kliničko-hematoloških karakteristika koje se viđaju na prezentaciji bolesti (Vardiman i sar., 2008; Hoffman i sar., 2009). Medijana starosti je iznosila 58 god., pri čemu je u starijoj životnoj dobi (≥ 60 god.) bilo 42% bolesnika, što odgovara delu literaturnih podataka (Casasnovas i sar., 2003; Chang i sar., 2004), mada pojedina ispitivanja govore u prilog veće medijane starosti (65 god.) (Vardiman i sar., 2008; Hoffman i sar., 2009). Naše ispitivanje je potvrdilo značajne razlike u pogledu starosne strukture bolesnika između različitih tipova AML, gde je tip AML-RGP pokazao nižu medijanu starosti (52 god.) odnosno nižu učestalost starijih bolesnika (29%) u poređenju sa tipom AML-MDS koga karakteriše visoka medijana starosti (64 god.) i izrazito visoka učestalost starijih bolesnika (73%) ($p < 0,05$), što je u skladu sa navodima iz literature (Arber i sar., 2008a; Arber i sar., 2008b).

Zastupljenost muškaraca u našoj grupi bolesnika sa AML je neznatno veća u odnosu na zastupljenost žena (m/ž, 1.32), pri čemu je isti trend potvrđen u različitim tipovima AML, što je u skladu sa literaturnim podacima (Chang i sar., 2004; Ley i sar., 2013).

Osim toga većina naših bolesnika, nezavisno od tipa AML, ispoljila je poremećaje nastale fizičkim i funkcionalnim potiskivanjem zdravog limfo-

hematopoeznog tkiva, koji su se manifestovali kroz visoku učestalost trombocitopenije (90,5%) i anemije (91,5%) (Hoffman i sar, 2009).

Prosečna vrednost Le u celoj grupi AML je iznosila $40,7 \times 10^9/l$ (Me $14 \times 10^9/l$), uz visok stepen varijacija pojedinačnih vrednosti, što je u skladu sa literaturnim podacima (Hoffman i sar, 2009; Ley i sar., 2013). Povišenu vrednost Le ($>10 \times 10^9/l$) ima 54% bolesnika, pri čemu visoke vrednosti Le ($\geq 30 \times 10^9/l$) ima 37% a hiperleukocitozu ($\geq 100 \times 10^9/l$) 13% bolesnika naše grupe. U pogledu prosečnih vrednosti Le, različiti tipovi AML nisu pokazali značajne međusobne razlike, pri čemu je medijana vrednosti leukocita bila niža u AML-MDS ($4,7 \times 10^9/l$) u poređenju sa tipovima AML-NOS ($13,8 \times 10^9/l$) i AML-RGP ($16 \times 10^9/l$).

Prosečna vrednost serumske LDH, čija se vrednost povećava kao posledica intenzivne proliferacije leukemijskih ćelija AML (Hoffman, 2009), višestruko je povišena u našoj grupi AML na dg ($1551,25 \text{ U/l}$), uz veoma visok raspon varijacija pojedinačnih vrednosti. Povišenu vrednost LDH ($>480 \text{ IU}$) ima 69% bolesnika, sa sličnim trendom u svim tipovima AML.

Prisustvo leukemijskih blasta (blasti/ekvivalenti blasta) u pk na dg AML, utvrđena je kod većine naših bolesnika (86,5%). Prosečna vrednost populacije blasta u pk je iznosila 41% Le, uz značajno nižu vrednost u grupi bolesnika sa AML-MDS u poređenju sa AML-RGP (33% vs. 45% Le, $p=0,040$).

Kao posledica prodora blasta u cirkulaciju i infiltracije tkiva i organa, kod dela bolesnika je utvrđena limfadenopatija (12%), koja je podjednako zastupljena u svim glavnim tipovima AML. Prisustvo hepatomegalije i/ili splenomegalije je utvrđeno kod 24% bolesnika cele grupe, uz veću učestalost u tipu AML-MDS u poređenju sa AML-RGP i AML-NOS (37% vs. 21%, $p>0,05$). Niska učestalost limfadenopatije i organomegalije u našoj grupi AML, uklapa se u nalaze drugih ispitivanja (Hoffman i sar, 2009).

Svi naši bolesnici sa AML su na dijagnozi prošli standardni set procedura koji je uključivao kao polaznu citomorfološku dijagnostiku, praćenu imunofenotipizacijom primenom MPC, citogenetsku i molekularno genetsku

analizu (Döhner i sar., 2010). Citomorfološka analiza ks bolesnika sa AML na dg, pokazala je predominaciju leukemijskih ćelija (68% NĆ) u odnosu na ostale populacije ćelija ks, što predstavlja tipičan nalaz na prezentaciji bolesti (Vardiman i sar., 2008; Hoffman i sar, 2009). Kriterijum za citomorfološku dg AML na osnovu pregleda ks (blasti $\geq 20\%$ NĆ) je imalo 99,7% bolesnika. Naši rezultati su pokazali značajne varijacije u veličini populacije leukemijskih blasta u ks među različitim tipovima AML ($p < 0.05$), gde je niža prosečna vrednost blasta ks utvrđena kod bolesnika sa AML-MDS (57% NĆ), dok je vrednost ove populacije viša u AML-NOS (66% NĆ) i AML-RGP (72% NĆ).

Ispitivanje distribucije FAB citomorfoloških suptipova u našoj grupi AML, pokazalo je najveću učestalost M2 (29%), M4 (22%) i M5 (21%), pri čemu učestalost M2 i M4 odgovara literaturnim podacima, dok je učestalost M5 u našoj grupi dvostruko viša u odnosu na navode u literaturi ($\sim 10\%$) (Hoffman i sar, 2009; Ley i sar., 2013). Prisustvo znakova morfološke mijelodisplazije, koji su od izuzetne važnosti za dijagnostikovanje tipa AML-MDS (Arber i sar, 2008a) otkriveni su kod 17% bolesnika naše grupe, u sklopu različitih FAB suptipova.

Citogenetsko ispitivanje novootkrivenih bolesnika sa AML zajedno sa ispitivanjem mutacija u genima *NPM1*, *FLT3* i *CEBPA*, važno je zbog precizne klasifikacije bolesnika i definisanja homogenih biološki relevantnih entiteta prema sistemu SZO (Swerdlow i sar., 2008). U našem ispitivanju, patološki kariotip je utvrđen kod 49% bolesnika, što odgovara navodima iz literature, gde se učestalost patološkog kariotipa kreće i do 55% (Döhner i sar., 2010; Ley i sar., 2013). Citogenetska analiza u okviru našeg ispitivanja je pokazala značajno veću učestalost patološkog kariotipa u tipu AML-MDS (95%) u odnosu na AML-RGP (50%) i AML-NOS (35%) ($p = 0,000$), što je u skladu sa literaturnim podacima (Arber i sar, 2008a; Arber i sar, 2008b; Arber i sar, 2008c).

Prisustvo mutacija u *NPM1* genu u ispitivanoj grupi bolesnika sa AML, utvrđeno je sa učestalošću od 28%, što je u skladu sa literaturnim podacima koji navode učestalost od 27%-35% (Arber i sar., 2008a; Ferrara i Schiffer, 2013). Mutacija *NPM1* tip A je izrazito učestalija u odnosu na mutaciju tip D (98% vs. 2%), što je takođe u skladu sa literaturom (Arber i sar., 2008a; Ferrara i Schiffer,

2013). Udruženost AML sa *NPM1*^{mut} i *FLT3*-ITD mutacijom, pogoršava prognozu ovog entiteta, a u našem ispitivanju je otkriveno sa učestalošću od 45,5%, što odgovara navodima iz literature (Döhner i sar., 2010).

Prisustvo mutacija u *FLT3* genu, takođe je standardno ispitivano u grupi bolesnika sa AML-NK, ali i kod bolesnika sa APL. Prisustvo bar jednog od tipova ove mutacije utvrđeno je kod 31% ispitivanih bolesnika. U grupi bolesnika sa AML-NK, *FLT3*-ITD mutacija je detektovana kod 29%, a *FLT3*-d835 kod 9% bolesnika, što odgovara incidenci ovih mutacija koje navode druge slične studije (Arber i sar., 2008a; Ferrara i Schiffer, 2013). Učestalost *FLT3* mutacija je značajno viša u našoj grupi bolesnika sa AML-RGP (43,6%) u odnosu na AML-NOS (24,7%) i AML-MDS (8%) ($p=0,001$). Osim toga, u grupi AML-RGP, značajno veća učestalost *FLT3* mutacija je utvrđena u AML sa *NPM1*^{mut} (59%) u poređenju sa APL (43%) i ostalim suptipovima ($p=0,013$). Incidenca *FLT3*-ITD mutacije u našoj grupi bolesnika sa dg APL je iznosila 43%, što je u saglasnosti sa literaturnim podacima koji navode incidencu 34-45% (Arber i sar., 2008a).

Prisustvo mutacije u *CEBPA* genu kod bolesnika sa AML-NK, detektovano je sa učestalošću 13,3%, pri čemu su homozigotna i heterozigotna mutacija zastupljene sa podjednakom učestalošću (6,7%). Polimorfizam *CEBPA* gena je utvrđen kod 10% bolesnika, a udruženost sa *FLT3*-ITD mutacijom je retka u našoj grupi (12%). Rezultati drugih studija ukazuju da se incidenca mutacije *CEBPA* gena u AML-NK kreće u opsegu 8-19% (Ferrara i Schiffer, 2013), i da je udruženost sa mutacijom *FLT3*-ITD retka (Döhner i sar., 2010).

Značaj imunofenotipske karakterizacije ćelija AML za dijagnozu i razumevanje bioloških karakteristika AML Savremena dijagnostika AML zasniva se na sukcesivnoj primeni citomorfološkog, imunofenotipskog i citogenetskog ispitivanja ks bolesnika (Vardiman i sar, 2008). Uprkos činjenici da je u poslednjih deset godina došlo do značajnog napretka u razvoju dijagnostičkih procedura zasnovanih na IMPC (CLSI document H43-A2, 2007; Craig i Foon, 2008; Béné i sar, 2011), kao i na činjenici da postoji relativno visok stepen subjektivnosti i nesaglasnosti prilikom citomorfološke analize (~65%) (Bennett i sar., 1996), citomorfologija je i dalje ostala ključna za kvantitativnu

procenu populacije blasta u ks/pk bolesnika na dijagnozi AML (Vardiman i sar, 2008). Imunofenotipizacija MPC danas se koristi za pouzdanu karakterizaciju i kvantifikaciju ćelija periferne krvi (CLSI document H42-A2, 2007; Faucher i sar., 2007). Međutim u slučaju ks još uvek nije prihvaćena kao ravnopravna metoda u odnosu na citomorfologiju (Vardiman i sar, 2008). Jedan od glavnih problema u tom smislu, povezan je sa kvalitetom uzorka ks koji se koristi za imunofenotipizaciju MPC, a koji proističe iz još uvek nedovoljno standardizovanog postupka za prikupljanje ćelija aspiracionom punkcijom. Glavni problem takvih uzoraka je hemodilucija, koja nastaje najčešće kada se prikupljaju uzorci ks veće zapremine (>3ml), zbog čega dolazi do promena u relativnim odnosima populacija ćelija, kao i do promena u njihovoj koncentraciji (Brooimans i sar, 2009). U našem istraživanju, pridržavali smo se svih preanalitičkih preporuka (ELN-WP10, www.leukemia-net.org, 2005a), koje su nam omogućile da prikupljamo validne uzorke ks bolesnika i kontrolnih ispitanika. Za imunofenotipsku dijagnostiku AML koristili smo prvenstveno sveže uzorke ks (95%), ali smo u slučaju izražene fibroze ks, koristili i uzorke pk bolesnika (5%). Zapremina uzoraka ks bolesnika sa AML je u proseku iznosila 2,3 ml (0,5 - 3,5 ml), pri čemu su uzorci bili značajno celularni, uz medijanu koncentracije nukleiranih ćelija od 85×10^6 ć/ml (2 - 750×10^6 ć/ml). Potvrdili smo da bolesnici sa AML imaju značajno veću celularnost ks na dg u poređenju sa ks kontrolnih uzoraka (128 vs. 30×10^6 ć/ml, $p=0.002$). Još jedan važan aspekt koji se odnosi na kvalitet uzoraka obrađivanih primenom IMPC, predstavlja činjenica da smo u našem ispitivanju obrađivali pune native uzorke ks/pk bolesnika, što je omogućavalo preciznu kvantifikaciju imunofenotipski definisanih populacija ćelija u istim (CLSI document H43-A2, 2007; Craig i Foon, 2008).

U ovom ispitivanju, tokom IMPC ks bolesnika sa AML na prezentaciji, primenili smo novi koncept u analizi uzoraka ks, koji je podrazumevao ne samo identifikaciju, kvantifikaciju i detaljnu analizu populacije leukemijskih blasta AML (Orfao i sar., 1999; Ratei i sar., 2007; Béné i sar., 2011), već i detaljnu analizu i kvantifikaciju svih prisutnih populacija ćelija ks. Ovakav analitički

koncept, danas se standardno primenjuje prilikom analize ks bolesnika sa dg MDS (Stachurski i sar., 2008; Van de Loosdrecht i sar., 2009; Alhan i sar., 2014), kao i prilikom analize kontrolnih uzoraka ks (Van Lochem i sar., 2004; Brooimans i sar., 2009; Arnoulet i sar., 2010). Identifikacija populacije blasta i ostalih glavnih populacija ks je vršena primenom standardnog analitičkog pristupa baziranog na obrascu ekspresije CD45 molekula i stepena ćelijske granulacije (CD45/SSC diferencijal ks) (Borowitz i sar., 1993; Lacombe i sar., 1997). Leukemijske ćelije svih bolesnika naše grupe AML eksprimiraju CD45 molekul, ali prema različitim obrascima. Najučestaliji obrasci ekspresije CD45 molekula na populaciji leukemijskih ćelija AML su srednji (38%) ili nizak (28%), dok su ostala dva obrasca zastupljena sa nižom učestalošću (<20% svaki). Ovako visoka učestalost ekspresije CD45 molekula u AML u našem ispitivanju, kao i viša učestalost srednjeg i niskog obrasca ekspresije, tipičan je nalaz u AML koji se navodi u literaturi (Lacombe i sar., 1997; Ratei i sar., 2007). Najzastupljeniji tipovi ćelijske granulacije leukemijskih ćelija su niska ili srednja (~38% svaki), pri čemu je tip heterogene granulacije prisutan kod 1/4 bolesnika sa AML.

U ks naših bolesnika na prezentaciji AML, najzastupljenija je populacija leukemijskih blasta definisana na osnovu CD45/SSC obrasca, koja u proseku sačinjava 64% NĆ. Ova vrednost je u pozitivnoj linearnoj korelaciji sa prosečnom vrednošću iste populacije procenjene citomorfološkom metodom ($r=0,65$, $p=0,000$), što je saglasno sa literaturnim podacima (Lacombe i sar., 1997). Identifikacija i kvantifikacija populacije leukemijskih blasta u ks na dg AML, manje je senzitivna ukoliko se za procenu koriste samo CD34 i/ili CD117 molekul (Craig i Foon, 2008). Molekul CD34 je eksprimiran u našoj grupi AML sa učestalošću od 68%, i u proseku čini populaciju od 30% NĆ ks, dok je molekul CD117 eksprimiran sa višom učestalošću od 92%, i u proseku čini populaciju od 42% NĆ ks bolesnika sa AML. Pozitivna linearna korelacija je utvrđena između vrednosti $CD117^{+}CD45^{low-med}/SSC^{low-med}$ populacije i populacije leukemijskih ćelija definisane samo prema CD45/SSC obrascu ($r=0,355$, $p=0,000$). Prema preporukama EuroFlow Konzorcijuma, molekuli CD34 i CD117 su uvršćeni u

osmo-kolorni dijagnostički panel kao “gejting” antigeni, ali uvek u kombinaciji sa CD45 molekulom (Van Dongen i sar., 2012). S obzirom da su molekuli CD34 i CD117 eksprimirani pretežno na populaciji najnezrelijih LĆ (mijelo/monoblasti) u AML, identifikacija i kvantifikacija populacije zrelijih LĆ tj. ekvivalenata blasta kakvi su promonociti, vrši se na osnovu kombinacije CD64^{+med-high}CD14^{-/low}/CD45/SSC (van Lochem i sar., 2004; Matarraz i sar., 2015), što smo i mi primenjivali u našem ispitivanju. Populacija promijelocita, kao ekvivalenata blasta, identifikovana je i kvantifikovana u APL primenom dve četvero-kolorne kombinacije CD34-HLA-DR-CD117^{+low}CD45^{+low-med}/SSC^{med-high} i CD66b-CD16-CD10-CD45^{+low-med}/SSC^{med-high}, prema literaturnim preporukama (van Lochem i sar., 2004; Arnoulet i sar., 2010).

U našem ispitivanju, jasan kriterijum za AML na osnovu IMPC kroz procenu populacije LĆ ks na osnovu CD45/SSC obrasca ($\geq 20\%$ NĆ), imalo je 98% (275/280) bolesnika. Kod većine bolesnika kod kojih metodom IPCM nije potvrđen kvantitativni kriterijum za dg AML, dobijeni su validni hipercelularni uzorci ks (4/5 bol.). Razlike u proceni LĆ između IPCM i citomorfologije, mogu biti objašnjene fokalnom distribucijom LĆ u ks bolesnika. Svi bolesnici kod kojih je dijagnostički uzorak za IMPC bio pk (14 bol.), ispunjavali su kvantitativni kriterijum za dg AML.

Primenom CD45/SSC diferencijala u ks bolesnika sa AML na prezentaciji, analizirane su i kvantifikovane populacije ćelija ks koje su tipično prisutne u fiziološkim uslovima (Van Lochem i sar., 2004; Arnoulet i sar., 2010). Populacija B-ćelijskih prekursora – hematogona I/II detektovana je u ks bolesnika sa AML samo kod trećine bolesnika, pri čemu je prosečna vrednost ove populacije značajno snižena u odnosu na zdravu kontrolu (0,19% vs. 1,42% NĆ, $p=0,000$).

Prosečna vrednost populacije granulocitnih prekursora ks bolesnika sa AML takođe je značajno snižena u poređenju sa zdravom kontrolom (31,65% vs. 77,38% NĆ, $p=0,000$), što je slučaj i sa populacijom eozinofila (1,95% vs. 2,84% NĆ, $p=0,000$). Prosečna vrednost populacije monocitnih prekursora, višestruko je povišena u ks bolesnika sa AML u poređenju sa zdravom kontrolom ($p>0,05$), mada su varijacije u vrednosti ove populacije u ks bolesnika velike, i povezane

sa suptipovima AML. Prosečna vrednost populacije eritrocitnih prekursora ks bolesnika sa AML (9% ΣNĆ), ne razlikuje se značajno u odnosu na zdravu kontrolu.

Prosečna zastupljenost ukupne populacije limfocita u ks bolesnika sa AML na dg je značajno niža u poređenju sa zdravom kontrolom (11% vs. 14% NĆ, $p=0,005$), pri čemu su relativni odnosi populacija T-Li (67,9% Li), B-Li (16,12% Li), NK-Li (11,49% Li), NKT-Li (6,98% Li) i CD4 T-Li (35% Li) očuvani. Kod bolesnika sa AML, utvrđeno je značajno relativno povećanje populacije NKT-limfocita, i na granici značajnog, povećanje populacije NK-limfocita u odnosu na zdravu kontrolu.

Prema dostupnim literaturnim podacima, naše ispitivanje predstavlja prvo ispitivanje CD45/SSC diferencijala ks bolesnika sa AML na dg bolesti. Naši rezultati pokazuju da je u ks bolesnika na dg prisutno značajno relativno sniženje populacije granulocitnih prekursora, eozinofila i populacije ukupnih Li, a među njima je posebno snižena populacija NKT-Li i NK-Li. Detaljnija ispitivanja ovoga tipa mogla bi da budu od značaja za razumevanje mikrosredine u kojoj borave LMC u ks, kao i za razumevanje mehanizama koji regulišu njihove funkcije, od kojih su neke pod direktnim uticajem imunskih ćelija (Riether i sar., 2015).

Imunofenotipski profil AML i imunofenotipske aberacije u ekspresiji hLDM na populaciji leukemijskih ćelija

AML Ispitivanje opšteg ekspresionog profila hLDM na leukemijskim ćelijama naše grupe odraslih bolesnika sa AML, sprovedeno je sa ciljem da se definišu opšte imunobiološke karakteristike leukemijskih ćelija AML u smislu linijskog porekla i stepena njihove diferenciranosti (Béné i sar, 2011), kao i da se ispita učestalost ekspresije potencijalnih ciljnih molekula za primenu savremene imunoterapije (Morris, 2009; Döhner i sar., 2015). Ovo ispitivanje je sprovedeno primenom visokosenzitivne metodologije četvorokolorne direktne imunofluorescencije i MPC, uz primenu CD45/SSC strategije za selekcionisanje leukemijske populacije ćelija (CLSI document H43-A2, 2007; Béné i sar, 2011).

Ispitana su 44 hLDM, pri čemu su ispitivani različiti aspekti njihove ekspresije, koji su osim učestalosti ekspresije obuhvatili i prosečnu ekspresiju na populaciji leukemijskih blasta, kao i obrasce njihove ekspresije. Mada učestalost ekspresije, definisana prema određenom arbitrarnom kriterijumu, predstavlja tipičan način prikazivanja rezultata ekspresije hLDM na LĆ AML, ispitivanje prosečne ekspresije molekula na populaciji LĆ, govori da li je on eksprimiran na celoj populaciji ili samo na subpopulaciji LĆ, dok obrazac ekspresije govori o broju molekula ekspimiranih na populaciji LĆ (Wozniak i Kopec-Szlezak, 2008; Ortolani, 2011).

Kombinovana ekspresija grupe ranih linijski nespecifičnih i ranih mijelomonocitnih molekula na populaciji LĆ AML, definiše deo leukemijske populacije koji po analogiji sa zdravom hematopoezom, predstavlja odeljak leukemijskih progenitora i matičnih ćelija (Roboz i Guzman, 2009; Eppert i sar., 2011). Ekspresija panleukocitnog molekula CD45 je utvrđena na leukemijskim blastima svih naših bolesnika sa AML, pri čemu je učestalost izoforme CD45RA (42%) znatno veća u odnosu na izoformu CD45RO (9,8%) što predstavlja tipičan nalaz u AML (Ortolani, 2011). Molekul CD45RA je eksprimiran na subpopulaciji LĆ, najčešće prema obrascu niske ekspresije. Panleukocitni adhezioni molekuli CD11a i CD62L su eksprimirani na populaciji LĆ AML sa visokom učestalošću (~80%), i to na subpopulaciji blasta (~50%). Molekul CD11a najčešće karakteriše visok ili nizak obrazac ekspresije, dok su obrasci ekspresije CD62L molekula veoma varijabilni.

Među linijski nespecifičnim hLDM, koji definišu veoma rane stupnjeve diferencijacije LĆ AML (Roboz i Guzman, 2009; Ortolani, 2011; Eppert i sar., 2011), visoku učestalost ekspresije (>80%) na populaciji leukemijskih blasta su pokazali CD38, CD123, CD135, CD117, HLA-DR i CD71. Molekul CD34 je eksprimiran sa nešto nižom učestalošću (68%), dok je učestalost ekspresije CD110 veoma niska (16%). Svi navedeni leukocitni molekuli, izuzev CD110, eksprimirani su na oko 2/3 populacije leukemijskih ćelija. Visok ili heterogen obrazac ekspresije najčešće karakteriše molekule CD34, HLA-DR i CD117, nizak ili srednji obrazac karakteriše CD38, CD123 i CD135, pri čemu nizak obrazac

ekspresije karakteriše CD71 molekul. Prisustvo populacije L \acute{C} koju karakteriše imunofenotip mijeloidnih progenitora koji su prisutni u zdravoj hematopoezi (CD34⁺CD117⁺HLA-DR⁺CD45^{low}/SSC^{low}) (van Lochem i sar., 2004), utvrđena je sa učestalošću od 62% u našoj grupi bolesnika sa AML, dok je koekspresija molekula koji definišu zreliji stupanj diferencijacije (CD34⁻CD117⁺HLA-DR⁺CD45^{low}/SSC^{low}) (van Lochem i sar., 2004), utvrđena sa učestalošću od 13% bolesnika.

Molekuli koji kao grupa definišu mijelomonocitno linijsko poreklo L \acute{C} AML su rani diferencijacioni mijelomonocitni molekuli, CD13, CD33 i CD114 (Ortolani, 2011; Béné i sar., 2011), koji su eksprimirani sa visokom učestalošću (>96%) na oko 3/4 populacije L \acute{C} . Molekul CD33 karakteriše pretežno visok obrazac ekspresije, molekul CD13 visok ili heterogen obrazac, dok je CD114 eksprimiran pretežno prema niskom obrascu. Pokazali smo da molekul cCD68, koji je prema delu literaturnih podataka definisan kao kasniji diferencijacioni mijelomonocitni molekul (Swerdlow i sar., 2008; Béné i sar., 2011), pokazuje visoku učestalost ekspresije u AML (99%), i to na velikoj proporciji L \acute{C} , uz veoma heterogene obrasce ekspresije, što je u skladu sa delom literaturnih podataka (Béné i sar, 2011). Važni molekuli za definisanje mijelomonocitnog linijskog porekla L \acute{C} AML, su cMPO i cLizozim (Béné i sar, 2011), koji su eksprimirani sa učestalošću od 78% odnosno 67% u našoj grupi AML, na subpopulaciji leukemijskih blasta AML (<50% L \acute{C}). Najučestaliji obrasci ekspresije u slučaju cMPO su nizak ili heterogen, a u slučaju cLizozima heterogen ili visok. Naši rezultati, koji se odnose na učestalost ekspresije ranih linijskih mijelomonocitnih molekula, u skladu su sa literaturnim podacima (Webber i sar., 2008; Béné i sar, 2011; Ortolani, 2011).

Ekspresija grupe kasnijih mijelomonocitnih hLDM na populaciji L \acute{C} , definiše subpopulaciju L \acute{C} koja ispoljavaja diferencijacioni potencijal (Terstappen i sar., 1991; van Lochem i sar., 2004; Matarraz i sar, 2015). Među kasnijim diferencijacionim mijelomonocitnim molekulima, najveću učestalost ekspresije ispoljavaju molekuli CD15, CD11b, CD11c, CD4, CD64, CD36, CD35, CD14 i CD163 (<60% slučajeva), pri čemu je učestalost ekspresije CD24, CD66b,

CD16, CD10 i CD41a veoma niska (<10% slučajeva). Osim toga, molekuli CD15, CD11b, CD4, CD11c i CD64 su eksprimirani na 1/3 populacije leukemijskih ćelija, dok su molekuli CD14, CD163, CD24, CD16 i CD66b, eksprimirani na još manjoj subpopulaciji LĆ (<10% LĆ). Ekspresija cLaktoferina nije utvrđena na populaciji leukemijskih ćelija naše grupe AML. Naši rezultati, koji se odnose na učestalost ekspresije kasnih linijskih mijelomonocitnih molekula, u skladu su sa literaturnim podacima (Webber i sar., 2008; Béné i sar., 2011; Ortolani, 2011).

Analiza naše grupe odraslih AML bolesnika sa aspekta ekspresije ciljnih molekula za primenu savremene imunoterapije, pokazala je da su svi potencijalni molekuli ekspimirani sa visokom učestalošću u našoj grupi bolesnika sa AML. Među ovim molekulima su α CD33 (97%), koji je već odobren za kliničku upotrebu, α CD45 (100%) čije se kliničko ispitivanje nalazi u Fazi I-II, kao i α CD123 (97%) čije je ispitivanje u prekliničkoj fazi, i koje ima za cilj eliminaciju populacije ćelija koja je odgovorna za nastanak i propagaciju AML (Morris, 2009; Döhner i sar., 2015).

Aberacije u ekspresiji hLDM na leukemijskim ćelijama AML Osnovne patofiziološke karakteristike leukemijskih ćelija AML, poremećaji u rastu i programu diferencijacije, nastaju kao posledica deregulacije nekoliko klasa gena u njihovom genomu, i to kroz široku skalu genetičkih i epigenetičkih poremećaja (Ley i sar., 2013; Döhner i sar., 2015). Kao refleksija ovih poremećaja, u LĆ dolazi i do deregulacije gena koji kodiraju hLDM, što se ogleda kroz promene u nivou njihove ekspresije na ćelijskim strukturama ili u vremenskoj deregulaciji njihove ekspresije. Ovakvi poremećaji na nivou ćelijskog fenotipa, definisani su kao imunofenotipske aberacije u ekspresiji hLDM odnosno imunofenotipovi specifični za leukemiju - IFSL (Terstappen i sar., 1991; Voskova i sar., 2004; Olaru i sar., 2008; Béné i Kaeda, 2009).

Naše ispitivanje je obuhvatilo analizu različitih tipova imunofenotipskih aberacija u ekspresiji izabrane grupe hLDM na populaciji leukemijskih blasta. Osnovni cilj ovog dela ispitivanja bio je utvrđivanje učestalosti različitih tipova imunofenotipskih aberacija u ekspresiji grupe hLDM. Na osnovu ovih rezultata

kreirane su odgovarajuće kombinacije hLDM koje su korišćene kao IFSL tokom optimizacije metodologije za praćenje MRB primenom imunofenotipizacije i MPC. U slučaju **maturacione asinhronije**, koekspresije CD34 i bar jednog od kasnijih diferencijacionih mijelomonocitnih molekula (CD15, CD11b, CD11c, CD64, CD14) otkrivena je kod **26%** naših bolesnika. Najveći broj bolesnika je imao samo jedan (13,6%) ili dva (8,2%) tipa maturacione asinhronije. Atipično **povišen nivo ekspresije** bar jednog od pet ispitivanih hLDM (CD34, CD117, HLA-DR, CD13, CD33), otkriven je sa visokom učestalošću od **90%**. Atipično povišen nivo ekspresije u slučaju molekula CD34, CD117 i CD13 utvrđen je kod ~40%, odnosno u slučaju molekula CD33 i HLA-DR kod ~50% bolesnika. Najveći broj bolesnika ima povećanu ekspresiju samo jednog (23,8%), odnosno dva (29,3%) ili tri (21,8%) molekula. Atipično **snižen nivo ekspresije** bar jednog od ispitivanih hLDM (CD34, CD117, HLA-DR, CD13, CD33) utvrđen je sa učestalošću od **76%**. Snižen nivo ekspresije CD117 ili CD13 je utvrđen kod 1/3, odnosno CD33 ili CD34 kod 1/4 bolesnika, dok je u slučaju HLA-DR molekula učestalost ove aberacije niska (12%). Leukemijske ćelije najvećeg broja bolesnika sa AML, pokazuju snižen nivo ekspresije bar jednog (40,5%) ili dva (20,1%) ispitivana molekula. Atipično **odsustvo ekspresije** bar jednog od ispitivanih hLDM (CD34, CD117, HLA-DR, CD13, CD33), utvrđeno je kod **42%** bolesnika. Najučestalije odsustvo ekspresije na leukemijskim ćelijama utvrđeno je u slučaju CD34 (32,3%) i HLA-DR (15,6%), dok je u slučaju CD117, CD13 i CD33 molekula, pojedinačna učestalost ovog tipa aberacije niska (<10% slučajeva). Najveći broj bolesnika sa AML na dg pokazuje odsustvo ekspresije jednog (23,5%) ili dva (15,3%) molekula. Prema dostupnoj literaturi, naše ispitivanje predstavlja jedno od retkih sistematskih ispitivanja populacije blasta AML za učestalost različitih tipova imunofenotipskih aberacija u ekspresiji ranih linijski nespecifičnih (CD34, CD117, HLA-DR) i ranih diferencijacionih mijelomonocitnih (CD13, CD33) leukocitnih molekula, odnosno učestalosti maturacione asinhronije u ekspresiji CD34 i kasnih diferencijacionih mijelomonocitnih molekula. Prvo ispitivanje AML u tom smislu, urađeno je primenom metodologije koja nije uključivala selekcionisanje populacije

leukemijskih ćelija primenom CD45/SSC obrasca (Terstappen i sar., 1991), tako da direktno poređenje rezultata naše i navedene studije nije relevantno.

Poseban tip imunofenotipskih aberacija predstavlja **ektopična ekspresija** limfoidnih hLDM na leukemijskim ćelijama AML (Olaru i sar., 2008; Béné i Kaeda, 2009; Ortolani, 2011), gde je ekspresija bar jednog hLDM u našoj grupi bolesnika otkrivena sa učestalošću od **57%**. Najveći broj naših bolesnika sa AML eksprimira na dg samo jedan limfoidni molekul (36%), dok je učestalost koekspresije dva (16%) ili tri (5%) molekula niža. Najveća učestalost pojedinačne ekspresije utvrđena je u slučaju CD56 (29%), CD7 (20%) i CD22 (14%) molekula., dok je niža učestalost utvrđena u slučaju molekula CD2 (8%), CD19 (8%), CD5 (4%) i cCD79a (5%). Naše ispitivanje ukazuje da su svi limfoidni molekuli uglavnom ekspimirani prema niskom obrascu, i to u proseku na relativno maloj subpopulaciji leukemijskih blasta (<20% pop.), pri čemu najveća prosečna ekspresija karakteriše molekule CD56 (19% pop.) i CD7 (15% pop.). Prema rezultatima različitih ispitivanja koja su obuhvatila velike grupe bolesnika sa AML, molekul CD56 je ekspimiran sa varijabilnom učestalošću (Ortolani, 2011), koja se kreće od 15% (Chang sar., 2004), preko 20% (Webber i sar., 2008; Cruse i sar., 2005), pa sve do 33% (Venditti i sar., 1998). Naši preliminarni rezultati u pogledu učestalosti ekspresije CD56 molekula u AML (22%), dobijeni su ispitivanjem grupe od 181 bolesnika (Djunic i sar, 2012), i nešto su niži u odnosu na finalne rezultate koje smo dobili ispitivanjem cele grupe od 294 bolesnika (29%). Mada je ekspresija CD56 molekula razmatrana kao ektopična na ćelijama mijelomonocitne loze, literaturni podaci ukazuju da je ovaj molekul kod zdravih osoba ekspimiran na maloj subpopulaciji aktiviranih monocita, kao i na populaciji plazmacitoidnih dendritskih ćelija (Ortolani, 2011). Literaturni podaci ukazuju da je ektopična ekspresija CD7 molekula u AML takođe veoma varijabilna, i da se kreće u opsegu od 12-42% slučajeva (Ortolani, 2011), tako da su i naši rezultati u pogledu ekspresije CD7 molekula saglasni sa literaturnim podacima. Mada je dugo vremena CD7 klasifikovan u grupu molekula tipičnih za T-Li i NK-Li, utvrđena je njegova tranzitorna ekspresija na subpopulaciji mijeloidnih progenitora, kao i

na plazmacitoidnim dendritskim ćelijama (Ortolani, 2011). Aberantna ekspresija molekula CD2 u AML, kreće se u opsegu od 3-34% slučajeva, dok je ekspresija CD5 veoma niska (<10%) (Ortolani, 2011). Naši rezultati u slučaju oba ispitivana molekula pripadaju grupi nižih učestalosti. Prema dostupnim podacima, učestalost ekspresije CD22 molekula kreće se u opsegu od 1-10% slučajeva AML (Webber i sar., 2008; Ortolani, 2011), pri čemu su naši rezultati nešto viši u odnosu na literaturne podatke (14%). Ekspresija molekula CD22, CD13 i CD25 sugeriše bazofilnu diferencijaciju leukemijskih blasta (Ortolani, 2011), mada ekspresija CD22 može da se javi i u AML sa diferencijacijom u pravcu mastocita i dendritskih ćelija (Béné i sar, 2011).

Literaturni podaci o ekspresiji CD19 molekula u AML govore o veoma varijabilnoj učestalosti (2-22% slučajeva) (Ortolani, 2011), pri čemu se naši rezultati (8% slučajeva), uklapaju sa delom rezultata koje karakteriše niža učestalost ovog molekula. U pogledu molekula cCD79a, incidenca ovog molekula u AML je veoma niska (<10%), sa čime su saglasni i rezultati našeg ispitivanja. Mi smo pokazali da je cCD79a kod većine naših bolesnika sa AML, koeksprimiran sa molekulom CD19 (38,5%) ili CD22 (54%). Ni u jednom slučaju nije utvrđena koekspresija sva tri molekula, odnosno CD19 i CD22. Mi smo pokazali pozitivnu korelaciju u ekspresiji cCD79a i CD19 ($r=0,286$, $p=0,000$) odnosno cCD79a i CD22 ($r=0,247$, $p=0,000$), pri čemu ni u jednom slučaju nije registrovana koekspresija CD19 i CD22 molekula u našoj grupi bolesnika sa AML. Koekspresija CD19 i cCD79a molekula u AML je već opisana u literaturi (Ortolani, 2011). Molekuli CD56 i CD2 nisu pokazali međusobnu povezanost u ekspresiji.

Naše ispitivanje je pokazalo da leukemijski blasti bolesnika sa AML pokazuju izrazito visok stepen deregulacije u ekspresiji izabrane grupe ranih linijski nespecifičnih i/ili mijelomonocitnih hLDM. Analiza učestalosti različitih tipova imunofenotipskih aberacija u ekspresiji hLDM na populaciji blasta u celoj grupi AML, pokazala je prisustvo bar jednog od tipova imunofenotipskih aberacija kod svakog od ispitivanih bolesnika. Leukemijski blasti 66% bolesnika sa AML pokazuju istovremeno prisustvo četiri, pet ili šest imunofenotipskih

abracija u ekspresiji leukocitnih molekula. Naime, kod svakog od naših bolesnika sa AML na dg moguće je definisati bar jednu ili dve kombinacije hLDM kao IFSL, koji služi za kvantifikaciju leukemijske populacije blasta tokom lečenja i praćenja bolesnika (Olaru i sar., 2008; Béné i Kaeda, 2009).

U ovom ispitivanju, analiza prisustva imunofenotipskih abracija u ekspresiji hLDM je osim na populaciji leukemijskih blasta, vršena i na populacijama granulocitnih i monocitnih prekursora ks bolesnika. Prema dostupnoj literaturi, ovakav analitički pristup nije tipičan na dg AML, ali se za razliku od AML standardno primenjuje kod bolesnika sa dg MDS (Stachurski i sar., 2008; Van de Loosdrecht i sar., 2009; Alhan i sar., 2014). **Populacija granulocitnih prekursora** ks bolesnika sa AML na dg, ispitivana je u cilju utvrđivanja poremećaja u ćelijskoj granulaciji (obrazac CD45/SSC), ćelijskom sastavu (ekspresija molekula CD66b, CD16, CD10), kao i u cilju utvrđivanja prisustva imunofenotipskih abracija u ekspresiji osam hLDM (CD34, CD135, HLA-DR, CD13, CD33, CD15, cMPO, CD45) na ovoj populaciji ćelija. Prisustvo bar jednog od navedenih poremećaja u populaciji granulocitnih prekursora ks pokazano je kod 55% (153/280) naših bolesnika na dg AML. Ispitivanje promene u obrascu ćelijske granulacije granulocitnih prekursora AML ispitivano u grupi od 154 bolesnika, pokazalo je prisustvo **atipične granulacije** sa učestalošću od 67%, dok je **atipična hipogranulacija** prisutna sa učestalošću od 18% u ovoj grupi bolesnika,. U populaciji granulocitnih prekursora „šift u levo" je utvrđeno kod 95%, dok je blok u sazrevanju do stupnja metamijelocit ili neutrofil utvrđen kod 67% bolesnika ove grupe. Bar jedan od tipova **imunofenotipskih abracija u ekspresiji osam hLDM** detektovan je sa visokom učestalošću od 99% na populaciji granulocitnih prekursora ispitivane grupe od bolesnika. Prisustvo **maturacione asinhronije** u ekspresiji ranih linijski nespecifičnih hLDM na populaciji granulocitnih prekursora pokazalo je najveću učestalost u slučaju molekula HLA-DR (78%), zatim CD34(45%) i CD135 (30%). Imunofenotipske abracije po tipu promene u obrascu ekspresije CD45 i grupe diferencijacionih mijelomonocitnih molekula, otkrivene su sa najvećom učestalošću u slučaju leukocitnih molekula: CD45^{high} (67%), cMPO^{p+}

(49%), CD15^{+hetero} (42%) i CD13^{+high} (31%). **Ektopična ekspresija** bar jednog od ispitivana četiri molekula limfoidne loze (CD56, CD7, CD2, CD19) na populaciji granulocitnih prekursora, utvrđena je kod 20% naših bolesnika. Najveća učestalost ektopične ekspresije je utvrđena u slučaju CD56 (11%) i CD7 (6%) molekula, pri čemu je koekspresija CD56/CD7 odnosno CD56/CD2 veoma retka (<1,5%). Sa druge strane, učestalost ektopične ekspresije CD2 (3%) i CD19 (2%) molekula je veoma niska.

Populacija monocitnih prekursora ks bolesnika sa AML na dg, analizirana je u cilju utvrđivanja poremećaja u njenom ćelijskom sastavu (ekspresija molekula CD64 i CD14), kao i u cilju utvrđivanja prisustva imunofenotipskih aberacija u ekspresiji tri hLDM (CD56, CD2, CD24). Prisustvo bar jednog od navedenih poremećaja pokazano je kod 39% (108/280) bolesnika. Ispitivanje **ćelijskog sastava populacije monocitnih prekursora**, pokazalo je da u ks bolesnika sa AML dolazi do značajnog povećanja subpopulacija mijelo/monoblasta i promonocita, uz značajno sniženje subpopulacije monocita u poređenju sa zdravim kontrolama ($p < 0,05$). **Ektopična ekspresija** bar jednog od ispitivanih limfoidnih hLDM na populaciji monocitnih prekursora, otkrivena je sa učestalošću od 19% u celoj grupi AML. Najveća učestalost ektopične ekspresije je utvrđena u slučaju molekula CD56 (12%), dok je bila niža u slučaju CD2 (3,8%) i CD24 (2,9%) molekula.

Naše ispitivanje je pokazalo da populacije granulocitnih i monocitnih prekursora ks bolesnika sa AML pokazuju izrazito visok stepen deregulacije u ekspresiji izabrane grupe ranih linijski nespecifičnih i/ili mijelomonocitnih hLDM. Prisustvo imunofenotipskih aberacija u ekspresiji hLDM, zajedno sa pojavom šifta ka nezrelijim formama i zastoja u diferencijaciji do zrelih formi, predstavlja znake koji ukazuju da su granulocitni i monocitni prekursori deo leukemijske populacije, i da su izraz ograničenog i deregulisanog programa diferencijacije leukemijskih progenitora (Swerdlow i sar., 2008; Ayar i sar., 2014; Matarraz i sar., 2015).

Heterogenost leukemijske populacije AML Većina studija AML fokusirana je isključivo na definisanje imunofenotipskih karakteristika populacije

leukemijskih blasta u AML (Béné i sar, 2011). Međutim, veoma su retke studije koje sistematski analiziraju heterogenost leukemijske populacije ćelija (Campos i sar., 1990; de Figueiredo-Pontes i sar., 2008; Vergez i sar., 2011), ali i imunofenotipske karakteristike leukemijskih subpopulacija koje pokazuju viši stepen difrencijacije u pravcu mijeloidnih loza (Swerdlow i sar., 2008; Matarraz i sar., 2015). Pretpostavka našeg ispitivanja bila je da se na osnovu analize imunofenotipskih karakteristika AML mogu identifikovati subpopulacije L^Ć, na osnovu kojih bi bilo moguće utvrditi stepen ćelijske heterogenosti leukemijske populacije AML i njen diferencijacioni i mauracioni potencijal u pravcu jedne ili više mijeloidnih loza.

Ispitivanjem imunofenotipskih karakteristika populacije L^Ć naše grupe bolesnika sa AML, otkriven je bar jedan od ispitivanih vidova ćelijske heterogenosti kod 83% bolesnika na dg.

Naši rezultati su potvrdili da su populacije leukemijskih blasta AML, heterogene po svom ćelijskom sastavu kod >50% bolesnika na dg, odnosno da se sastoje najčešće iz dve ili tri subpopulacije ćelija. To smo pokazali na osnovu ispitivanja koekspresije dve grupe leukocitnih molekula **CD34/CD13** i **CD117/CD33**. Veoma slične rezultate dobili smo i putem ispitivanja prisustva ektopične ekspresije molekula limfoidne loze na populaciji L^Ć. Naime, pokazali smo prisustvo bar jedne subpopulacije leukemijskih ćelija sa parcijalnom ekspresijom limfoidnih molekula kod 45% bolesnika naše grupe. Pritom, najveći broj bolesnika ima jednu ili dve subpopulacije L^Ć u odnosu na ovo svojstvo.

Još jedan aspekt našeg ispitivanja heterogenosti populacije L^Ć AML na dg, odnosio se na utvrđivanje imunofenotipskih znakova **diferencijacije unutar leukemijske populacije**. Cilj ovog dela ispitivanja se donosio na utvrđivanje međusobnih razlika u populaciji L^Ć u odnosu na stepen diferenciranosti u okviru neke od hematopoeznih loza. Prisustvo samo jedne populacije leukemijskih ćelija sa homogenim imunofenotipskim karakteristikama mijeloidnih progenitora, otkriveno je sa niskom učestalošću od 11%. Prisustvo populacije L^Ć sa karakteristikama mijeloidnih progenitora i znacima diferencijacije u toj populaciji utvrđeno je kod 34% bolesnika, pri čemu je 55%

bolesnika pokazalo istovremeno prisustvo populacije koju su sačinjavali leukemijski blasti i populacije leukemijskih zrelijih granulocitnih i/ili monocitnih prekursora.

Naše ispitivanje heterogenosti leukemijske populacije AML i prisustva diferencijacije unutar iste, potvrdilo je da se kod većine bolesnika leukemijska populacija AML istovremeno sastoji iz L \acute{C} sa karakteristikama mijeloinih progenitora i zrelijih populacija L \acute{C} koje ispoljavaju ograničen diferencijacioni potencijal. Naši rezultati su u skladu sa osnovnim postulatom savremenog modela leukemogeneze, koji govori u prilog ćelijske i funkcionalne heterogenosti leukemijskih populacija AML (de Figueiredo-Pontes i sar., 2008; Roboz i Guzman, 2009; Vergez i sar., 2011). U prilog tome govore i ispitivanja sprovedena na molekularnom nivou koja ukazuju na subklonalni sastav AML (Welch, 2013; Parkin i sar., 2013).

Imunofenotipska dijagnoza AML Na osnovu specifičnih imunofenotipskih karakteristika, svaki bolesnik je klasifikovan u određen EGIL imunološki suptip AML (Béné i sar., 2011). Ispitivanje imunofenotipskih karakteristika u našoj grupi bolesnika na dg (n=294), pokazalo je da je leukemijskim procesom najčešće zahvaćena samo granulocitna loza (54%), zatim istovremeno granulocitna i monocitna loza (22%) ili samo monocitna loza (20%). Istovremena zahvaćenost granulocitne i eritrocitne loze (1,7%), granulocitne i megakariocitne loze (0,7%), ili bazofilne loze (0,7%) je veoma retka.

Imunološka klasifikacija bolesnika sa AML, odnosno jasna identifikacija loze i stepena diferencijacije populacije L \acute{C} , bila je moguća u grupi od 92% naših bolesnika. Najučestaliji imunološki suptip u našoj grupi bolesnika je AML sa granulocitnom diferencijacijom (31%), u okviru koga je učestalija varijanta sa sazrevanjem (72%) u odnosu na varijantu bez sazrevanja (28%). Sledeći po učestalosti je suptip AML sa granulocitnom i monocitnom diferencijacijom (22%) i AML sa monocitnom diferencijacijom (19%). U okviru poslednjeg suptipa, varijanta sa sazrevanjem je učestalija (58%) u odnosu na varijantu bez sazrevanja (42%). Nižu učestalost imaju imunološki suptipovi APL (13%) i AML

sa minimalnom diferencijacijom (4%). Ostali imunološki suptipovi ispoljili su izuzetno nisku učestalost. Kod malog broja naših bolesnika sa AML (8%) nije bilo moguće utvrditi precizan imunološki suptip. Među ovim bolesnicima, većina je ispoljila specifične imunofenotipske aberacije u populaciji granulocitnih prekursora koji su istovremeno bili i hipogranulirani, što predstavlja karakteristike AML nastale na bazi MDS-a.

Upoređivanjem rezultata imunološke klasifikacije i citomorfološke FAB klasifikacije u našoj grupi bolesnika sa AML, pokazana je potpuna saglasnost u identifikaciji loze zahvaćene leukemijskim procesom i potvrde procesa sazrevanja u leukemijskoj populaciji kod 66% bolesnika. Delimična saglasnost je utvrđena kod 7% bolesnika, a značila je da su obe metodologije identifikovale istu lozu zahvaćenu leukemijskim procesom, ali nije postojala saglasnost u nivou diferenciranosti LĆ. Sa druge strane, odsustvo saglasnosti u odnosu na lozu zahvaćenu leukemijskim procesom, utvrđeno je kod 27% bolesnika. Razlike između imunološke i citomorfološke klasifikacije AML u našem ispitivanju, najčešće su posledica razlika u identifikaciji monocitne loze, gde imunofenotipizacija kao metodologija pokazuje značajnu prednost u odnosu na citomorfologiju u identifikaciji monoblasta, promonocita i monocita (Arber i sar., 2008c; Béné i sar., 2011; Matarraz i sar., 2015).

U našoj grupi bolesnika sa AML utvrđen je relativno visok stepen saglasnosti između imunološke i finalne dg prema SZO sistemu (68% slučajeva), pri čemu je stepen saglasnosti u AML-NOS izrazito visok (96%), dok je znatno niža saglasnost registrovana u slučaju tipova AML-RGP (42%) i AML-MDS (44%). U grupi bolesnika sa AML-RGP, doprinos imunofenotipske klasifikacije finalnoj dg najviši je u slučaju APL (100%), AML sa t(8;21) (83%) i AML sa inv16/t(16;16) (40%) što je u saglasnosti sa literaturnim podacima (Paietta, 2010). U slučaju svih ostalih suptipova AML-RGP, imunofenotipska informacija ne omogućava njihovu preciznu finalnu dg (Arber i sar., 2008a). Naše ispitivanje je pokazalo visok doprinos imunofenotipske klasifikacije finalnoj dg bolesnika sa AML-NOS, uz stepen saglasnosti koji se kreće u opsegu od 84% do 100%. Sa druge strane, niži stepen saglasnosti je prisutan u AML sa sazrevanjem (84%) i

akutnoj monoblastnoj lukemiji (87%), pri čemu je u svim ostalim suptipovima AML-NOS stepen saglasnosti u opsegu 90-100%. U SZO sistemu za klasifikaciju AML, imunofenotipska dg ima najveći doprinos klasifikaciji suptipova AML-NOS, s obzirom da je njihova klasifikacija zasnovana na tipu hematopoezne loze zahvaćene leukemijskim procesom i na maturacionom potencijalu L \acute{C} (Arber i sar., 2008c).

Imunofenotipski profili populacije blasta suptipova AML-RGP. Iako sistem SZO za klasifikaciju AML uključuje i opis imunofenotipskih karakteristika svih glavnih tipova AML, do danas još uvek nisu opisani detaljni imunofenotipski profili koji bi osim osnovnih, uključivali i ekspresione profile šireg spektra hLDM za svaki od SZO tipova i suptipova AML (Swerdlow i sar., 2008; Hoffman i sar., 2009). U tom smislu, deo našeg ispitivanja bio je posvećen utvrđivanju ekspresionih profila 44 hLDM u različitim tipovima i suptipovima naše grupe bolesnika sa AML (n=281).

Imunofenotipska karakterizacija naše grupe bolesnika sa ***AML-RGP*** predstavlja prema dostupnoj literaturi (Arber i sar., 2008a; Hoffman i sar., 2009), originalne rezultate u ovoj oblasti. Bolesnici sa tipom AML-RGP čine 37,4% (105/281) naše grupe bolesnika sa AML. U pogledu imunofenotipskih karakteristika njihove populacije L \acute{C} , leukemijskim procesom je najčešće zahvaćena samo granulocitna loza (65%) ili granulocitna i monocitna loza istovremeno (16% slučajeva). Sa druge strane, samo monocitna loza u okviru tipa AML-RGP zahvaćena je sa nižom učestalošću (17%), što je slučaj i sa eritrocitnom lozom (2%). U našoj grupi, u svim tipovima AML-RGP leukemijska populacija je heterogena po sastavu i najčešće se sastoji iz populacije leukemijskih blasta i zrelijih leukemijskih prekursora (51%) ili isključivo iz populacije blasta koji ispoljavaju diskretan stepen diferencijacije (40%), dok je homogena populacija blasta bez znakova diferencijacije prisutna sa niskom učestalošću (9%).

AML sa t(8;21)(q22;q22); RUNX1-RUNX1T1

U našoj grupi bolesnika sa *de novo* AML, entitet AML sa t(8;21) (n=12) otkriven je sa učestalošću od 4,3%. Specifična aberacija koja karakteriše ovaj entitet, detektovana je kod svih bolesnika na citogenetskom nivou. Učestalost ovog entiteta u našoj grupi, u saglasnosti je sa literaturnim podacima, gde je učestalost procenjena na ~5% svih AML (Arber i sar., 2008a).

U odnosu na demografsko-kliničke karakteristike na prezentaciji bolesti, bolesnike karakteriše relativno mlađa starosna dob (Me 54 god.), gde je 75% bolesnika mlađe od 60 god., što je takođe objavljeno u literaturi (Hoffman i sar., 2009). Od ostalih karakteristika, posebno se izdvajaju predominacija muškog pola (83%), niska prosečna vrednost Le ($8,5 \times 10^9/l$) i niža prosečna vrednost Tr ($<40 \times 10^9/l$). Bolesnici ovog suptipa imaju nižu prosečnu vrednost populacije blasta u pk (22% Le) i ks (49% NĆ). Prema navodima iz literature, ovaj entitet AML karakteriše niža tumorska masa na prezentaciji bolesti, a u pojedinim slučajevima u ks se može videti populacija blasta $<20\%$ NĆ (Arber i sar., 2008a).

Analiza imunofenotipski definisanih populacija ks bolesnika ovog suptipa AML, pokazala je značajno manje populacije CD34⁺ (34% NĆ) i CD117⁺ (23% NĆ) ćelija ks, kao i značajno veću populaciju Li (16% NĆ) ($p < 0,05$).

Imunofenotipski profil populacije blasta u našoj grupi bolesnika sa entitetom AML sa t(8;21) (Tabela 70.), ispoljava glavne imunofenotipske karakteristike mijeloblasta, i u skladu je sa karakteristikama publikovanim u literaturi (Arber i sar., 2008a; Hoffman i sar., 2009).

Tabela 70. AML sa t(8;21) - Imunofenotipski profil populacije blasta

CD45 ^{med} /SSC ^{low}	CD45RA ^{med}	HLA-DR ^{het}	CD34 ^{high}	CD117 ^{high}	CD123 ^{med}	
CD135 ^{low}	CD38 ^{med}	CD11a ^{low}	CD62L ^{het} (60%)	CD71 ^{low}	CD33 ^{het}	CD13 ^{low}
CD114 ^{med}	cCD68 ^{het}	cMPO ^{low}	CD4 ^{low} (50%)	Lizozim ^{het} (40%)	CD15 ^{het} (36%)	
CD11c ^{low} (27%)						
CD19 ^{het} (75%)	CD56 ^{high} (50%)	cCD79a ^{low} (33%)				
(CD11b- CD64- CD36- CD163- CD35- CD2- CD7- CD22-)						

Ektopična izolovana ekspresija CD19 molekula, odnosno koekspresija molekula CD19/cCD79a na populaciji blasta, ima prediktivni značaj za prisustvo t(8;21), a samim tim i postavljanje dg AML sa t(8;21) (Hrušák i Porwit-MacDonald, 2002; Arber i sar., 2008a; Paietta, 2010). To je omogućilo da u našoj grupi bolesnika, imunofenotipska dg ima visok doprinos (83% slučajeva) u predikciji finalne dg.

Populacija granulocitnih prekursora ks u AML sa t(8;21), relativno je velika (43% NĆ) i karakteriše je visoka učestalost atipične granulacije (91%), šift u levo ka nezreljim formama (82%) i blok u sazrevanju do neutrofila (73%). Osim toga, ovu populaciju kod svih bolesnika karakteriše i prisustvo maturacione asinhronije u ekspresiji bar jednog od ispitivanih hLDM i/ili učestalost aberantne ekspresije molekula: HLA-DR⁺ (100%), CD34⁺ (46%), CD45^{high} (64%), cMPO^{p+} (46%) i CD15^{hetero} (40%). Ektopična ekspresija molekula na populaciji granulocitnih prekursora javlja se sa učestalošću od 45% u našoj grupi AML, pri čemu su najčešće eksprimirani molekuli CD56 (35%) ili CD19 (9%). Svi navedeni poremećaji u populaciji granulocitnih prekursora impliciraju da je populacija granulocitnih prekursora deo leukemijske populacije ćelija, i da se akumulira u ks kao posledica poremećenog diferencijacionog kapaciteta leukemijskih blasta (Arber i sar., 2008a; Hoffman i sar., 2009).

Analiza opštih imunofenotipskih karakteristika AML sa t(8;21), ukazuje da je leukemijskim procesom najčešće zahvaćena samo granulocitna loza (92%), dok se kod malog broja naših bolesnika, uz granulocitnu lozu javlja i umnožena eritrocitna loza (8%). Ovaj entitet karakteriše izrazita heterogenost u pogledu ćelijskog sastava, ali i očuvan diferencijacioni potencijal, gde leukemijsku populaciju ćelija sačinjavaju blasti i zreliji leukemijski prekursori kod većine (83%) bolesnika.

AML sa inv(16)(p13.1q22)/ t(16;16)(p13.1;q22); CFBF-MYH11

U našoj grupi bolesnika sa *de novo* AML, entitet AML sa inv(16)/t(16;16) otkriven je sa učestalošću od 1,8%, pri čemu je kod tri bolesnika bila prisutna inv(16)(p13.1q22), a kod dva t(16;16)(p13.1;q22), detektovane na citogenetskom nivou. Oba tipa mutacije *FLT3* gena detektovane su kod jednog (33%) bolesnika, dok mutacija *NPM1* gena nije detektovana ni u jednom slučaju. Učestalost ovog entiteta u našoj grupi AML je niža u odnosu na literaturne podatke, gde je učestalost procenjena na 5-8% svih AML (Arber i sar., 2008a).

U odnosu na demografsko-kliničke karakteristike na prezentaciji bolesti, bolesnike karakteriše relativno mlađa starosna dob (Me 56 g.), gde je 60% bolesnika mlađe od 60 god., što je takođe objavljeno u literaturi (Hoffman i sar., 2009). Od ostalih karakteristika, posebno se izdvajaju predominacija muškog pola (80%), visoka prosečna vrednost Le ($60,2 \times 10^9/l$), i viša učestalost limfadenopatije (50%) i hepato/splenomegalije (25%). Naši bolesnici ovog suptipa imaju i višu prosečnu vrednost populacije blasta u pk (44% Le) i ks (75% NĆ). Prema navodima iz literature, ovaj entitet AML karakteriše veća tumorska masa na prezentaciji bolesti, često i ekstramedularna bolest, hepatosplenomegalija i neuroleukemija, što su odlike i naše grupe bolesnika (Arber i sar., 2008a; Hoffman i sar., 2009).

Analiza imunofenotipski definisanih populacija ks bolesnika ovog suptipa AML, pokazala je značajno veću populaciju CD34⁺ (46% NĆ) i CD117⁺ (43% NĆ) ćelija ($p < 0,05$), kao i znatno veću populaciju Eo prekursora (6,6% NĆ) ($p = 0,05$).

Imunofenotipski profil populacije blasta AML sa inv(16)/t(16;16) (Tabela 71.), ispoljava glavne imunofenotipske karakteristike mijelo/monoblasta, i u skladu je sa karakteristikama publikovanim u literaturi (Arber i sar., 2008a; Hoffman i sar., 2009). Ektopična izolovana ekspresija CD2 molekula, koja je u našoj grupi prisutna sa niskom učestalošću (20%), navodi se u pojedinim publikacijama kao karakteristika ovog entiteta (Arber i sar., 2008a).

Populacija monocitnih prekursora ks bolesnika ovog entiteta je umnožena (28% NĆ) i karakteriše je šift u levo ka nezreljim formama, gde populacija mijelo/monoblasta čini dominantnu populaciju (54%), dok su populacije promonocita (23% pop.) i monocita (23% pop.) relativno manje zastupljene.

Tabela 71. AML sa inv(16)/t(16;16) - Imunofenotipski profil populacije blasta

CD45 ^{+hetero} /SSC ^{het}	CD45RA ^{+med}	HLA-DR ^{+het}	CD34 ^{+het}	CD117 ^{+het}	CD123 ^{+low}	
CD135 ^{+low}	CD38 ^{+het}	CD11a ^{+het}	CD62L ^{+med}	CD71 ^{+low}	CD33 ^{+het}	CD13 ^{+high}
CD114 ^{+low}	cCD68 ^{+het}	cMPO ^{+het}	CD15 ^{+het}	CD64 ^{+high}	CD4 ^{+het}	CD11c ^{+het}
CD11b ^{+het} (60%)	CD36 ^{+het} (60%)					
CD14 ^{+het} (40%)	CD2 ^{+low} (20%)	CD56 ^{+low} (20%)	CD7 ^{+low} (20%)			
(CD19- CD22- cCD79a-)						

Iako populacija granulocitnih prekursora nije umnožena (20% NĆ), ona pokazuje niz aberantnih karakteristika, među kojima su: visoka učestalost atipične granulacije (67%) ili hipogranulacije (33%), šift u levo ka nezreljim formama (100%) i blok u sazrevanju do neutrofila (100%). Osim toga, ovu populaciju kod svih bolesnika karakteriše i prisustvo maturacione asinhronije u ekspresiji bar jednog od ispitivanih hLDM i/ili učestalost aberantne ekspresije molekula: HLA-DR⁺ (67%), CD34⁺ (67%) i CD45^{+high} (67%). Ektopična ekspresija limfoidnih molekula na populaciji granulocitnih prekursora nije detektovana u našoj grupi AML. Svi navedeni poremećaji u populaciji granulocitnih prekursora impliciraju da su i monocitni i granulocitni prekursori deo leukemijske populacije ćelija, i da se akumuliraju u ks kao posledica poremećenog diferencijacionog kapaciteta leukemijskih blasta (Arber i sar., 2008a; Hoffman i sar., 2009; Matarraz I sar., 2015).

Analiza opštih imunofenotipskih karakteristika AML sa inv(16)/t(16;16), ukazuje da su leukemijskim procesom najčešće zahvaćene i monocitna i granulocitna loza (80%), dok je kod manjeg broja naših bolesnika zahvaćena

samo monocitna loza (20%). Ovaj entitet karakteriše izrazita heterogenost u pogledu ćelijskog sastava, ali i očuvan diferencijacioni potencijal, gde leukemijsku populaciju ćelija sačinjavaju blasti i leukemijski prekursori kod većine (80%) bolesnika.

U našoj grupi bolesnika sa entitetom AML sa $inv(16)/t(16;16)$, imunofenotipska dg ima delimičan prediktivni značaj za postavljanje finalne dg prema SZO klasifikaciji (40% slučajeva). Predikcija prisustva $inv(16)/t(16;16)$ se zasniva na prisustvu povećane proporcije Eo prekursora u ks, ektopične ekspresije CD2 molekula, uz istovremenu zahvaćenost monocitne i granulocitne loze leukemijskim procesom (Arber i sar., 2008a; Hoffman i sar., 2009).

AML sa $t(15;17)(q22;q12)$; PML-RARA

Entitet AML sa $t(15;17)$ otkriven je sa učestalošću od 11,4% , u našoj grupi bolesnika sa *de novo* AML. Specifična aberacija koja karakteriše ovaj entitet, detektovana je na citogenetskom nivou kod 81% bolesnika, dok je na molekularnom nivou detektovana 19% bolesnika koji su imali normalan kariotip. Učestalost APL u našoj grupi *de novo* AML, uglavnom odgovara literaturnim podacima, s obzirom da je u pojedinim publikacijama učestalost procenjena na 5-8% (Arber i sar., 2008a) odnosno 10-15% svih AML (Hoffman i sar., 2009). Mutacija *FLT3*-ITD je detektovana sa učestalošću od 43% u ovom entitetu, pri čemu je 24% imalo tipičnu APL, a 19% bolesnika mikrogranularnu varijantu APL. Literaturni podaci govore da je mutacija *FLT3*-ITD u APL najčešće udružena sa leukocitozom, mikrogranularnom varijantom i *bcr3* prekidom u *PML* genu (Arber i sar., 2008a).

U odnosu na demografsko-kliničke karakteristike na prezentaciji bolesti, bolesnike karakteriše mlađa starosna dob (Me 44 g.), gde je 75% bolesnika mlađe od 60 god., što je saglasno sa literaturnim podacima (Hoffman i sar., 2009). Od ostalih karakteristika, izdvajaju se niska prosečna vrednost Le ($11,8 \times 10^9/l$), pri čemu dve trećine bolesnika imaju snižene ili normalne vrednosti Le. Naše bolesnike karakteriše i niža prosečna vrednost Tr

(<45x10⁹/l), kao i relativno visoke prosečne vrednosti populacije blasta/promijelocita u pk (40% Le) i ks (80% NĆ).

Analiza imunofenotipski definisanih populacija ks bolesnika ovog suptipa AML, pokazala je značajno manje populacije CD34⁺ ćelija (34% NĆ) i granulocitnih prekursora (8% NĆ), kao i značajno veću populacija Li (14% NĆ) u odnosu na druge entitete AML-RGP (p<0,01).

Imunofenotipski profil populacije blasta AML sa t(15;17) (Tabela 72.), ispoljava glavne imunofenotipske karakteristike zrelih mijeloblasta/promijelocita, i u skladu je sa karakteristikama publikovanim u literaturi (Arber i sar., 2008a; Hoffman i sar., 2009; Paietta, 2010).

Tabela 72. AML sa t(15;17) - Imunofenotipski profil populacije blasta

CD45 ⁺ het/SSC ^{het}	CD45RA ⁺ low _(36%)	CD34 ⁺ het _(56%)	CD117 ⁺ low	CD123 ⁺ med
CD135 ⁺ low _(67%)	CD38 ⁺ med	CD11a ⁺ low _(21%)	CD62L ⁺ low _(38%)	CD71 ⁺ low
CD33 ⁺ high	CD13 ⁺ het	CD114 ⁺ het	cCD68 ⁺ het	cMPO ⁺ het
Lizozim ⁺ het	CD64 ⁺ low _(66%)	CD4 ⁺ low _(26%)	CD2 ⁺ low _(34%)	CD56 ⁺ _(19%)
(HLA-DR- CD15- CD11b- CD11c- CD36- CD14- CD163- CD35- CD7- B-Ag-)				

Molekul CD34 eksprimiran je sa višom incidencom (56%) u odnosu na CD2 (34%) u našoj grupi APL, pri čemu je koekspresija ova dva molekula utvrđena kod 28% bolesnika. Koekspresija CD34 i CD2 molekula, prema literaturnim podacima korelira sa mikrogranularnom varijantom APL, *bcr3* prekidom u *PML* genu i prisustvom *FLT3*-ITD mutacija (Albano i sar., 2006; Arber i sar., 2008a; Paietta, 2010). Ispitivanje ekspresije CD2 i CD56 molekula u APL, ima specifičnu kliničku primenu, pošto literaturni podaci ukazuju da je ekspresija CD2 molekula udružena sa leukocitozom, povezana sa pojavom leukoaglutinacije i trombotičkim događajima u ovom entitetu tokom lečenja (Breccia i sar., 2007). Sa druge strane, ekspresija CD56 molekula nosi lošu prognozu u smislu ishoda bolesti (Arber i sar., 2008a).

Analiza opštih imunofenotipskih karakteristika AML sa t(15;17), ukazuje da je leukemijskim procesom zahvaćena samo granulocitna loza. Ovaj entitet karakteriše heterogenost u pogledu ćelijskog sastava, gde leukemijsku populaciju ćelija sačinjavaju zreliji mijeloblasti i promijelociti kod 78% bolesnika. Prisustvo homogene populacije promijelocita je registrovano samo kod 16% bolesnika, dok je maturacija do zrelijih formi utvrđena sa niskom učestalošću (6%).

Savremeno shvatanje klonalne strukture APL ukazuje na prisustvo ćelijske heterogenosti, koja osim populacije promijelocita uključuje i prisustvo male subpopulacije leukemijskih mijeloidnih progenitora (1-10%) sa imunofenotipom - CD34+HLA-DR+ CD38^{+/-} (Di Noto i sar., 2007). Specifičan imunofenotip APL zajedno sa višom granulacijom ćelija, omogućio je da u našoj grupi bolesnika imunofenotipska dg ima visok doprinos (100% slučajeva) u predikciji finalne dg na osnovu SZO klasifikacije.

AML sa t(v;11q23)

U našoj grupi bolesnika sa *de novo* AML, entitet AML sa t(v;11q23) otkriven je sa učestalošću od 1,1% (n=3), pri čemu je kod sva tri bolesnika na citogenetskom nivou bila detektovana različita varijantna translokacija koja uključuje hromozom 11q23 – t(9;11), t(1;11) i t(10;11). Incidenca ovog entiteta u našoj grupi AML je niska i u skladu sa literaturnim podacima, gde je incidenca procenjena na 2% odraslih bolesnika sa AML (Arber i sar., 2008a).

U odnosu na demografsko-kliničke karakteristike na prezentaciji bolesti, naše bolesnike karakteriše mlađa starosna dob (Me 33 g.), što je takođe objavljeno u literaturi (Arber i sar., 2008a). Od ostalih karakteristika, izdvajaju se viša učestalost muškog pola (67%) i visoka prosečna vrednost Le (65,2x10⁹/l). Naši bolesnici ovog suptipa imaju visoku prosečnu vrednost populacije blasta u pk (70% Le) i ks (79% NĆ). Prema navodima iz literature, ovaj entitet AML karakteriše velika tumorska masa na prezentaciji bolesti, često i ekstramedularna bolest (Arber i sar., 2008a; Hoffman i sar., 2009).

Analiza imunofenotipski definisanih populacija ks bolesnika ovog suptipa AML, pokazala je značajno manju populaciju CD34⁺ ćelija (21% NĆ), CD117⁺ ćelija (28% NĆ) i granulocitnih prekursora (18% NĆ), kao i značajno veću populaciju monocitnih prekursora (41% NĆ) u odnosu na većinu entiteta AML-RGP (p<0,01).

Imunofenotipski profil populacije blasta AML sa t(v;11q23), (Tabela 73.), ispoljava glavne imunofenotipske karakteristike mijelo/monoblastia, i u skladu je sa karakteristikama publikovanim u literaturi (Arber i sar., 2008a; Hoffman i sar., 2009). Ektopična ekspresija CD2, CD7 i CD56 molekula je u našoj grupi prisutna kod trećine bolesnika, što je potvrđeno u literaturi (Arber i sar., 2008a; Hoffman i sar., 2009).

Sa druge strane, populacija monocitnih prekursora ks bolesnika sa ovim entitetom je umnožena (41% NĆ) i karakteriše je skretanje u levo ka nezrelim formama, gde populacija mijelo/monoblasta čini subpopulaciju (12% pop.), dok su populacije promonocita (48% pop.) i monocita (41% pop.) predominantne.

Tabela 73. AML sa t(v;11q23) - Imunofenotipski profil populacije blasta

CD45^{high}/SSC^{med} HLA-DR^{high} CD34^{het}(67%) CD117^{het}(67%) CD123^{med}
 CD11a^{high} CD71^{low} CD33^{high} CD13^{high} cCD68^{high} cMPO^{het}(33%) CD15^{high}(33%)
 CD64^{high}(67%) CD4^{het} CD11c^{het} CD11b^{high} CD36^{het}(67%) CD14^{het}(33%)
 CD2^{low}(33%) CD56^{med}(33%) CD7^{low}(33%)
 (CD19- CD22- cCD79a-)

Naši rezultati potvrđuju da je u ovom entitetu leukemijskim procesom primarno zahvaćena monocitna loza (Arber i sar., 2008a; Hoffman i sar., 2009), mada je trećina naših bolesnika imala isključivo granulocitnu lozu zahvaćenu leukemijskim procesom. Ovaj entitet karakteriše izrazita heterogenost u pogledu ćelijskog sastava, ali i očuvan diferencijacioni potencijal, gde leukemijsku populaciju u svim slučajevima sačinjavaju blasti i zreliji leukemijski prekursori.

U našoj grupi bolesnika sa AML sa t(v;11q23), imunofenotipska dg nema prediktivni značaj za postavljanje finalne dg prema SZO klasifikaciji, s obzirom da nije definisan imunofenotipski profil specifičan za ovaj entitet (Arber i sar., 2008a; Hoffman i sar., 2009).

AML sa t(6;9)(p23;q24); DEK-NUP214

U našoj grupi bolesnika sa *de novo* AML, entitet AML sa t(6;9) otkriven je sa učestalošću od 0,4% (n=1). Incidenca ovog entiteta u našoj grupi AML je niska i u skladu sa literaturnim podacima, gde je incidenca procenjena na 0,7-1,8% adultnih AML (Arber i sar., 2008a). S obzirom da se radilo samo o jednom bolesniku, nije bilo moguće definisati opšti imunofenotip ovog entiteta. Od kliničkih karakteristika izdvaja se hiperleukocitoza (Le 103 x 10⁹/l) i visoka vrednost populacije blasta u pk (50% Le) i ks (74% NĆ) bolesnika. Kod našeg bolesnika, leukemijskim procesom su istovremeno zahvaćene i granulocitna i monocitna loza, uz prisustvo dominantne populacije mijelo/monoblasta i populacije granulocitnih prekursora sa izraženim skretanjem ka nezreljim formama. Pritom, monocitna komponenta ne ispoljava diferencijacioni potencijal. Populacija blasta ispoljava glavne imunofenotipske karakteristike mijeloidnih progenitora (mijelo/monoblasti), uz prisustvo subpopulacija sa ekspresijom kasnijih mijelomonocitnih leukocitnih molekula, što je u skladu sa karakteristikama publikovanim u literaturi (Arber i sar., 2008a; Hoffman i sar., 2009).

AML sa genskim mutacijama - AML sa NPM1^{mut}

Entitet AML sa *NPM1^{mut}* otkriven je sa učestalošću od 15,7% u našoj grupi AML, i predstavlja najučestaliji entitet u grupi AML-RGP, što je u skladu sa literaturnim podacima (Arber i sar., 2008a). Većinu naših bolesnika karakteriše normalan kariotip (89%) i izrazito visoka incidenca mutacije *NPM1* Tip A (98%). Bar jedan tip mutacija u *FLT3* genu detektovan je kod 59% naših bolesnika, uz veću incidencu *FLT3*-ITD u poređenju sa *FLT3*-d835 (45% vs. 14%). Incidenca *NPM1* i *FLT3* mutacija u našoj grupi AML sa *NPM1^{mut}*, u saglasnosti je sa literaturnim podacima koji navode predominaciju *NPM1* Tip A

mutacije, kao i *FLT3*-ITD mutacije u ovom entitetu (Arber i sar., 2008a; Döhner i sar., 2010; Ferrara i Schiffer, 2013).

U odnosu na demografsko-kliničke karakteristike na prezentaciji bolesti, naše bolesnike karakteriše relativno mlađa starosna dob (Me 54 g.), kao i više prosečne vrednosti Tr ($88,6 \times 10^9/l$), što je takođe objavljeno u literaturi (Arber i sar., 2008a). Od ostalih karakteristika, posebno se izdvajaju visoke prosečne vrednost Le ($60,6 \times 10^9/l$), blasta u pk (52% Le) i ks (74% NĆ), kao i prisustvo hepato/splenomegalija kod trećine bolesnika, što je u skladu sa navodima iz literature (Arber i sar., 2008a). Ovu grupu naših bolesnika karakteriše i posebno visoka prosečna vrednost serumske LDH (1936 U/l) na prezentaciji bolesti.

Analiza imunofenotipski definisanih populacija ks bolesnika AML sa *NPM1*^{mut}, pokazala je značajno nižu prosečnu vrednost populacije CD34⁺ ćelija (8% NĆ) i granulocitnih prekursora (13% NĆ), kao i značajno veću populaciju monocitnih prekursora (29%) u odnosu na većinu entiteta AML-RGP ($p < 0,01$).

Imunofenotipski profil populacije blasta AML sa *NPM1*^{mut}, (Tabela 74.), ispoljava glavne imunofenotipske karakteristike mijelo/monoblasta, i u skladu je sa opštim karakteristikama publikovanim u literaturi (Arber i sar., 2008a; Falini i sar., 2011). Jedna od glavnih imunofenotipskih karakteristika ovog entiteta je često odsustvo ekspresije CD34, što je posledica snižene ekspresije gena koji kodira ovaj molekul (Falini i sar., 2011).

Tabela 74. AML sa *NPM1*^{mut} - Imunofenotipski profil populacije blasta

CD45 ⁺ het/SSC ^{med}	CD45RA ⁺ low _(31%)	HLA-DR ⁺ het	CD34 ⁺ het _(27%)	CD117 ⁺ het
CD123 ⁺ het	CD135 ⁺ het	CD38 ⁺ het	CD62L ⁺ low	CD11a ⁺ het
CD71 ⁺ low	CD33 ⁺ high	CD13 ⁺ het		
CD114 ⁺ low	cCD68 ⁺ het	cMPO ⁺ low	CD15 ⁺ het _(57%)	CD64 ⁺ high _(60%)
CD4 ⁺ med _(65%)	CD11c ⁺ het _(74%)	CD11b ⁺ het _(54%)	CD36 ⁺ het _(41%)	CD14 ⁺ het _(20%)
CD163 ⁺ het _(60%)	CD35 ⁺ het _(27%)			
CD56 ⁺ het _(25%)	CD7 ⁺ low _(20%)			
(CD2- CD19- CD22- cCD79a-)				

Molekul CD34 je eksprimiran kod 27% bolesnika u našoj grupi i to na relativno maloj subpopulaciji L \dot{C} (14% pop.), pri čemu je on često koeksprimiran sa molekulima CD7 (75% bol.) i HLA-DR (67% bol.). Literaturni podaci ukazuju da imunofenotipski profil $CD34^+CD7^+HLA-DR^+$ u AML sa $NPM1^{mut}$, definiše podgrupu bolesnika sa posebno lošom prognozom u pogledu kraćeg trajanja KR i kraćeg preživljavanja bolesnika, i to kao nezavistan parametar od prisustva $FLT3$ -ITD mutacije (Chen i sar., 2013).

Većina naših bolesnika sa AML sa $NPM1^{mut}$, pokazuje zahvaćenost monocitne loze leukemijskim procesom, bilo izolovano (32%) bilo istovremeno sa granulocitnom lozom (27%). Populacija monocitnih prekursora ks bolesnika sa ovim entitetom je umnožena (29% N \dot{C}) i karakteriše je šift u levo ka nezreljim formama, gde populacija mijelo/monoblasta u proseku čini trećinu populacije, dok zreliji prekursori predominiraju - promonociti (50% pop.) i monociti (20% pop.). Međutim, kod dela naših bolesnika (39%), leukemijskim procesom je zahvaćena samo granulocitna loza. Ova grupa bolesnika pokazuje takođe heterogenost u pogledu imunofenotipskog profila, gde deo bolesnika (47%) ispoljava profil veoma sličan profilu hipergranularne varijante APL ($CD34^+HLA-DR^+CD117^+$), dok ostali bolesnici ispoljavaju profil koji je registrovan u monocitnoj varijanti AML sa $NPM1^{mut}$ (Arber i sar., 2008a). Visoka sličnost između imunofenotipskig profila APL i granulocitne podvarijante AML sa $NPM1^{mut}$ je opisana u literaturi (Ferrari i sar., 2011), gde se kao specifičan navodi profil $CD34^+HLA-DR^+CD15^-$, što je viđeno i kod dela naših bolesnika.

Naši rezultati potvrđuju da su u ovom entitetu leukemijskim procesom primarno zahvaćene monocitna odnosno monocitna i granulocitna loza (Arber i sar., 2008a). Ovaj entitet karakteriše izrazita heterogenost u pogledu ćelijskog sastava, uz očuvan diferencijacioni potencijal, gde leukemijsku populaciju kod većine bolesnika sačinjavaju blasti i zreliji leukemijski prekursori (67%) ili populacija blasta sa znacima diferencijacije (26%).

Mada zahvaćenost monocitne ili granulocitne loze leukemijskim procesom, uz prisustvo imunofenotipskog profila $CD34^+HLA-DR^+CD117^+$, odnosno granulocitne loze uz prisustvo profila $CD34^+HLA^+DR^+CD117^+$, može

predstavljati potencijalni indikator sa postavljanje diferencijalne dg AML sa *NPM1*^{mut}, imunofenotipska dg ima ograničen prediktivni značaj za postavljanje finalne dg, s obzirom da navedeni imunofenotipski profili nisu visoko specifični za ovaj entitet. U tom smislu, najveći značaj ima dokazivanje prisustva citoplazmatske forme NPM proteina, koji je aberantno eksprimiran u citoplazmi ćelija umesto u nukleusu kao posledica genske mutacije, a što se pouzdano dokazuje primenom imunohistohemijskog metoda na biopsiji ks (Arber i sar., 2008a).

AML sa genskim mutacijama - AML sa *CEBPA*^{mut}

Entitet AML sa *CEBPA*^{mut} otkriven je sa učestalošću od 2,8% u našoj grupi AML. Prisustvo mutacije u *CEBPA* genu detektovano kod 13,3% testiranih bolesnika naše grupe, što je u skladu sa literaturnim podacima koji govore o incidenci od 6%-15% u *de novo* AML (Arber i sar., 2008a). Pritom su homozigotna i heterozigotna mutacija *CEBPA* gena zastupljene u našoj grupi sa podjednakom učestalošću, a prirodni polimorfizam ovog gena je utvrđen kod 10% naših bolesnika. Učestalost homozigotne mutacije je nešto veća prema navodima iz literature (~70% bolesnika sa *CEBPA*^{mut}) (Lin i sar., 2005; Somerville i Cleary, 2009), u poređenju sa našim rezultatima, što može biti posledica relativno male grupe testiranih bolesnika za prisustvo *CEBPA* mutacije u našem ispitivanju.

Svi naši bolesnici su imali normalan kariotip, i samo jedan (12,5%) je imao istovremeno i *FLT3*-ITD mutaciju. Incidenca normalog kariotipa i *FLT3*-ITD mutacija u našoj grupi AML sa *CEBPA*^{mut}, u saglasnosti je sa literaturnim podacima koji navode učestalost normalnog kariotipa kod 70% bolesnika i nešto višu incidencu *FLT3*-ITD mutacije u ovom entitetu (22-33% slučajeva) (Arber i sar., 2008a).

U odnosu na demografsko-kliničke karakteristike na prezentaciji bolesti, naše bolesnike karakteriše relativno mlađa starosna dob (Me 58 g.), kao i više prosečne vrednosti Hb (107 g/dl), što je takođe objavljeno u literaturi (Arber i sar., 2008a). Od ostalih karakteristika, posebno se izdvajaju više prosečne

vrednosti Le ($49,6 \times 10^9/l$), blasta u pk (59% Le) i ks (66% NĆ), kao i prisustvo hepato/splenomegalija kod četvrtine bolesnika, što je u skladu sa navodima iz literature (Arber i sar., 2008a). Ovu grupu naših bolesnika karakteriše i niža prosečna vrednost LDH u serumu (750 IU/l) na prezentaciji bolesti.

Analiza imunofenotipski definisanih populacija ks bolesnika AML sa *CEBPA*^{mut}, pokazala je značajno višu prosečnu vrednost populacije CD34⁺ ćelija (51% NĆ) i CD117⁺ ćelija (60% NĆ), uz značajno sniženu populaciju granulocitnih prekursora (20% NĆ) u odnosu na većinu entiteta AML-RGP ($p < 0,01$).

Imunofenotipski profil populacije blasta AML sa *CEBPA*^{mut} (Tabela 75.), ispoljava glavne imunofenotipske karakteristike mijeloblasta, i u skladu je sa opštim karakteristikama publikovanim u literaturi (Arber i sar., 2008a; Lin i sar., 2005). Ovaj entitet karakteriše ekspresija CD34 i HLA-DR molekula na glavnini populacije blasta uz visoku incidencu ektopične ekspresije CD7 molekula (50%-73% slučajeva), dok je ekspresija CD56 i drugih limfoidnih molekula veoma retka prema navodima iz literature (Arber i sar., 2008a; Lin i sar., 2005). Takođe su često prisutni i ekspresija CD15 kao i odsustvo ekspresije CD14 molekula.

Tabela 75. AML sa *CEBPA*^{mut} - Imunofenotipski profil populacije blasta

CD45 ^{low} /SSC ^{low}	HLA-DR ^{high}	CD34 ^{high}	CD117 ^{high}	CD135 ^{het}	CD38 ^{high}
CD71 ^{low}	cCD68 ^{het}	CD11a ^{het}	CD33 ^{high}	CD13 ^{med}	CD114 ^{low}
cMPO ^{high}	cLizozim ⁺	CD15 ^{low} (62%)	CD64 ^{low} (50%)	CD11c ^{low} (37%)	CD35 ^{het} (50%)
CD7 ^{low} (88%)					
(CD11b- CD4- CD36- CD14- CD2- CD56- B-Ag-)					

Populacija granulocitnih prekursora ks bolesnika sa AML sa *CEBPA*^{mut}, relativno je snižena, ali je karakteriše visoka učestalost atipične granulacije (67%) ili hipogranulacije (33%), šift u levo ka nezreljim formama (100%) i blok u sazrevanju do neutrofila (100%). Osim toga, ovu populaciju kod svih bolesnika karakteriše i prisustvo maturacione asinhronije u ekspresiji bar

jednog od ispitivanih hLDM i/ili aberantna ekspresija molekula: HLA-DR⁺ (100%), CD34⁺ (80%), CD45^{high} (40%), cMPO^{p+} (46%) i CD15^{hetero} (40%). Ektopična ekspresija molekula na populaciji granulocitnih prekursora registrovana je kod 20% naših bolesnika, i to samo ekspresija CD7 molekula. Svi navedeni poremećaji u populaciji granulocitnih prekursora, impliciraju da je populacija granulocitnih prekursora deo leukemijske populacije ćelija, i da se akumulira u ks kao posledica poremećenog diferencijacionog kapaciteta leukemijskih blasta (Arber i sar., 2008a; Hoffman i sar., 2009).

Većina naših bolesnika sa AML sa *CEBPA*^{mut}, ima samo granulocitnu (87%) ili samo monocitnu (12,5%) lozu zahvaćenu leukemijskim procesom. Naši rezultati potvrđuju da je u ovom entitetu leukemijskim procesom primarno zahvaćena granulocitna loza, dok je ređe i monocitna loza zahvaćena (Arber i sar., 2008a). Ovaj entitet karakteriše izrazita heterogenost u pogledu ćelijskog sastava, uz očuvan diferencijacioni potencijal, gde leukemijsku populaciju kod većine bolesnika sačinjavaju blasti i zreliji leukemijski prekursori (62%) ili populacija blasta sa znacina diferencijacije (25%).

Mada zahvaćenost granulocitne loze leukemijskim procesom, uz prisustvo imunofenotipskog profila *CD34⁺HLA-DR⁺CD15⁺CD7⁺*, može predstavljati potencijalni indikator sa diferencijalnu dg AML sa *CEBPA*^{mut}, imunofenotipska dg ima ograničen prediktivni značaj za postavljanje finalne dg prema SZO klasifikaciji, s obzirom da se navedeni imunofenotipski profil ispoljava i u drugim tipovima AML.

Imunofenotipski profil populacije blasta AML-MDS

Imunofenotipska karakterizacija naše grupe bolesnika sa AML-MDS predstavlja prema dostupnoj literaturi, originalne i malobrojne rezultate u ovoj oblasti (Arber i sar., 2008b; Hoffman i sar., 2009). Tip AML-MDS otkriven je sa učestalošću od 14,6% (n=41), u našoj grupi bolesnika sa *de novo* AML, što je niža incidenca u poređenju sa literaturnim podacima (24%-35%) (Arber i sar., 2008b; Weinberg i sar., 2009). Citogenetske aberacije tipične za AML-MDS imalo je 93% bolesnika, pri čemu je kod preostalih bolesnika dg postavljena na osnovu

prisustva specifičnih citomorfoloških mijelodisplastičnih promena u ks (Arber i sar., 2008b; Döhner i sar., 2010). Visoka učestalost aberantnog kariotipa (95%), kao i niska učestalost mutacija *FLT3*-ITD gena (8%) u AML-MDS, izdvaja ovaj tip u odnosu na AML-RGP i AML-NOS ($p < 0,01$). Učestalost mutacija *NPM1* gena je takođe niska (12%) i povezana je sa prisustvom *FLT3*-ITD mutacija. Prema literaturnim podacima, oba tipa *FLT3* mutacija se mogu javiti u AML-MDS, pri čemu njihovo prisustvo nosi bitnu prognostičku informaciju (Arber i sar., 2008b; Weinberg i sar., 2009).

U odnosu na demografsko-kliničke karakteristike na prezentaciji bolesti, naši bolesnici su pokazali tipične karakteristike (Arber i sar., 2008b; Weinberg i sar., 2009), starija životna dob (Me 64 god.), viša učestalost bolesnika starijih od 60 god. (73%), niska medijana vrednosti Le ($4,7 \times 10^9/l$), uz višu učestalost bolesnika sa sniženim ili normalnim vrednostima Le (58%). Naše bolesnike karakteriše i značajno niža prosečna vrednost Hb (88 g/dl), i relativno niža prosečna vrednost populacije blasta u ks (57% NĆ) u poređenju sa ostalim glavnim tipovima AML ($p < 0,01$). Osim toga, 37% bolesnika ima hepato/spelenomegaliju na prezentaciji bolesti.

Analiza imunofenotipski definisanih populacija ks bolesnika ovog tipa AML, pokazala je prisustvo znatne populacije $CD34^+/CD117^+$ ćelija (43% NĆ), uz relativno sniženu populaciju granulocitnih prekursora (24% NĆ) i blago umnoženu populaciju monocitnih prekursora (17% NĆ).

Imunofenotipski profil populacije blasta AML-MDS (Tabela 76.), veoma je heterogen i može varirati u zavisnosti od tipa citogenetskih aberacija (Arber i sar., 2008b). U našoj grupi bolesnika sa AML-MDS populacija blasta ispoljava glavne imunofenotipske karakteristike mijeloblasta, uz visoku učestalost ektoپیčne ekspresije bar jednog od limfoidnih molekula (68%), posebno CD56, CD2 i CD7, što korelira sa publikovanim podacima (Arber i sar., 2008b).

Populaciju **granulocitnih prekursora** ks bolesnika sa AML-MDS karakteriše visoka učestalost atipične hipogranulacije (50%) ili atipične granulacije (40%), šift u levo ka nezreljim formama (93%) i blok u sazrevanju do neutrofila (100%). Osim toga, ovu populaciju kod svih bolesnika karakteriše i

prisustvo maturacione asinhronije u ekspresiji bar jednog od ispitivanih hLDM, uz najveću učestalost aberantne ekspresije molekula: HLA-DR⁺ (93%), CD34⁺ (86%), CD45^{high} (79%), cMPO⁺ (62%) i CD15^{hetero} (68%).

Tabela 76. AML-MDS - Imunofenotipski profil populacije blasta

CD45 ^{het} /SSC ^{low}	CD45RA ^{low} (44%)	HLA-DR ^{het}	CD34 ^{high}	CD117 ^{high}	CD123 ^{het}
CD135 ^{low}	CD38 ^{het}	CD11a ^{het}	CD62L ^{het}	CD71 ^{low}	CD33 ^{het}
CD13 ^{high}	CD114 ^{low}	cCD68 ^{het}	cMPO ^{het} (63%)	Lizozim ^{het} (70%)	CD15 ^{het} (29%)
CD35 ^{het} (33%)	CD11b ^{het} (46%)	CD4 ^{low} (51%)	CD64 ^{het} (28%)	CD11c ^{low} (39%)	
CD7 ^{low} (37%)	CD56 ^{het} (44%)	CD22 ^{low} (32%)			

(CD36- CD14- CD163- / CD2- CD19- cCD79a-)

Ektopična ekspresija molekula na populaciji granulocitnih prekursora javlja se sa učestalošću od 24%, pri čemu je najčešće eksprimiran molekuli CD56 (24%). Svi navedeni poremećaji u populaciji granulocitnih prekursora, impliciraju da je populacija granulocitnih prekursora deo leukemijske populacije, i da se akumulira u ks kao posledica poremećenog diferencijacionog kapaciteta leukemijskih blasta (Arber i sar., 2008b; Ayar i sar., 2014). Populacija **monocitnih prekursora** ks ispoljava skretanje ka nezreljim formama, ali uz očuvan maturacioni potencijal.

Analiza opštih imunofenotipskih karakteristika AML-MDS, ukazuje da je leukemijskim procesom najčešće zahvaćena samo granulocitna loza (58%), a ređe granulocitna i monocitna loza (27%), ili izolovano samo monocitna loza (15%). Ovaj tip AML ispoljava heterogenost u pogledu ćelijskog sastava, uz očuvan diferencijacioni potencijal, gde leukemijsku populaciju ćelija sačinjavaju blasti i zreliji leukemijski prekursori kod 56% bolesnika, dok je prisustvo blasta za znacima diferencijacije prisutno kod 37% bolesnika.

U našoj grupi bolesnika sa entitetom AML-MDS, imunofenotipska dg ima delimičan prediktivni značaj za postavljanje finalne dg prema SZO klasifikaciji (44% slučajeva), s obzirom da nije definisan imunofenotipski profil blasta specifičan za ovaj entitet, ali sa druge strane poremećaji u populaciji

granulocitnih prekursora, posebno prisustvo hipogranulacije, blok u sazrevanju do neutrofila i imunofenotipske aberacije u ekspresiji hLDM, daju značajan doprinos diferencijalnoj dg ovog tipa AML (Arber i sar., 2008a; Ayar i sar., 2014).

Imunofenotipski profili populacije blasta suptipova AML-NOS. Imunofenotipska karakterizacija naše grupe bolesnika sa *AML-NOS* predstavlja prema dostupnoj literaturi, originalne i malobrojne rezultate u ovoj oblasti (Arber i sar., 2008c). Bolesnici sa *dg AML-NOS* čine 48% (135/281) naše grupe bolesnika sa AML. Mi smo na osnovu imunofenotipskih karakteristika populacije LČ u tipu AML-NOS pokazali da je leukemijskim procesom najčešće zahvaćena samo granulocitna loza (46%) ili granulocitna i monocitna loza istovremeno (26%), dok je izolovano monocitna loza zahvaćena leukemijskim procesom kod četvrtine bolesnika. Osim toga, u svim tipovima AML-NOS leukemijska populacija je heterogena po sastavu i najčešće se sastoji iz populacije leukemijskih blasta i zrelijih leukemijskih prekursora (59%) ili samo iz populacije blasta koji ispoljavaju diskretan stepen diferencijacije (27%), dok je homogena populacija blasta bez znakova diferencijacije prisutna sa nižom učestalošću (14%) u našoj grupi.

AML sa minimalnom diferencijacijom. U našoj grupi odraslih bolesnika sa *de novo* AML, suptip AML sa minimalnom diferencijacijom otkriven je sa učestalošću od 3,2% (n=9), što se uklapa u nisku učestalost ovog suptipa prema literaturnim podacima (3-5%) (Arber i sar., 2008c; Hoffman i sar., 2009).

U odnosu na demografsko-kliničke karakteristike na prezentaciji bolesti, posebno se izdvaja viša starosna dob (Me 62 god.), gde je više od polovine bolesnika starije od 60 god., što je takođe objavljeno u literaturi (Arber i sar., 2008c). Bolesnike karakteriše i niska prosečna vrednost Le ($9 \times 10^9/l$), uz čestu leukopeniju (78%), nižu prosečnu vrednost populacije blasta u pk (25% Le), i niža prosečna vrednost serumske LDH (607 U/l).

Normalan kariotip je utvrđen kod dve trećine naših bolesnika, uz višu učestalost mutacija u *FLT3* genu (43%), što je viša učestalost u odnosu na literaturne podatke koji navode 16-22% (Arber i sar., 2008c).

Analiza imunofenotipski definisanih populacija ks bolesnika ovog suptipa AML, pokazala je značajno više populacije CD34⁺ (57% NĆ) i CD117⁺ (54% NĆ) ćelija ($p < 0,01$), kao i značajno veću populaciju Li (16% NĆ) ($p < 0,05$) u poređenju sa ostalim suptipovima AML-NOS. Populacija **granulocitnih prekursora** ks bolesnika ovog suptipa je veoma snižena (10% NĆ), što je slučaj i sa populacijom monocitnih prekursora (3% NĆ).

Imunofenotipski profil populacije blasta AML sa minimalnom diferencijacijom (Tabela 77), ispoljava glavne imunofenotipske karakteristike mijeloblasta, i u skladu je sa karakteristikama publikovanim u literaturi (Arber i sar., 2008a; Hoffman i sar., 2009). Doprinos imunofenotipske dg finalnoj dg AML sa minimalnom diferencijacijom je maksimalan, i to zbog pouzdane detekcije mijeloidnog porekla blasta ovog suptipa, za razliku od citomorfološke procene koja nije pouzdana zbog odsustva specifičnih citomorfoloških karakteristika mijeloidne loze, kao i negativne POX reakcije (Arber i sar., 2008c; Hoffman i sar., 2009; Béné i sar., 2011).

**Tabela 77. AML sa minimalnom diferencijacijom –
Imunofenotipski profil populacije blasta**

CD45 ^{low} /SSC ^{low}	HLA-DR ^{high}	CD34 ^{high}	CD117 ^{het}	CD123 ^{het}	CD135 ^{low}
CD38 ^{low}	CD11a ^{het}	CD62L ^{low}	CD71 ^{low}	CD33 ^{low}	CD13 ^{het}
CD114 ^{low}	cCD68 ^{low}	cMPO ^{low} (33%)	CD4 ^{low} (22%)	CD56 ^{het} (22%)	CD22 ^{low} (50%)
cCD79a ^{low} (33%)	(CD45RA- kasni mijelo/monocitni Ag- / CD2- CD7- CD19-)				

U našoj grupi, ektopična ekspresija bar jednog od limfoidnih molekula, javlja se kod 56% bolesnika, pri čemu su molekuli CD22 i cCD79a najučestaliji, dok ekspresija CD7 i CD56 molekula nije registrovana. Kod svih bolesnika je utvrđena koekspresija cCD79a i CD22 molekula. Naši rezultati se razlikuju u odnosu na literaturne podatke, u kojima se navodi učestalija ekspresija CD7

molekula (40%) i odsustvo ekspresije CD22 i cCD79a molekula (Arber i sar., 2008c).

Analiza opštih imunofenotipskih karakteristika AML sa minimalnom diferencijacijom, ukazuje da je leukemijskim procesom isključivo zahvaćena granulocitna loza. Ovaj suptip karakteriše niži stepen heterogenosti u pogledu ćelijskog sastava u odnosu na druge suptipove AML-NOS, pošto je homogena populacije blasta prisutna kod 56% bolesnika, dok je prisustvo diskretnih znakova diferencijacije utvrđeno kod 44% bolesnika.

AML bez sazrevanja

U našoj grupi bolesnika sa *de novo* AML, suptip AML sa minimalnom diferencijacijom otkriven je sa učestalošću od 5,3% (n=15), što se uklapa u nisku učestalost ovog suptipa prema literaturnim podacima (5-10%) (Arber i sar., 2008c).

U odnosu na demografsko-kliničke karakteristike na prezentaciji bolesti, posebno se izdvaja mlađa starosna dob (Me 56 god.), gde je dve trećine bolesnika mlađe od 60 god., što se navodi i u literaturi (Arber i sar., 2008c). Bolesnike karakteriše i niža prosečna vrednost Le ($26,6 \times 10^9/l$), visoka prosečna vrednost populacije blasta u ks (80% NĆ), kao i visoka prosečna vrednost serumske LDH (1985 U/l).

Normalan kariotip je utvrđen kod 73% naših bolesnika, uz nisku učestalost *FLT3*-ITD mutacija (10%), što se navodi i u literaturi (Hoffman i sar., 2009).

Analiza imunofenotipski definisanih populacija ks bolesnika ovog suptipa AML, pokazala je značajno veće populacije CD34⁺ (61% NĆ) i CD117⁺ (76% NĆ) ćelija ($p < 0,01$), uz veoma snižene populacije granulocitnih (8% NĆ) i monocitnih prekursora (3% NĆ) ($p < 0,01$), u poređenju sa većinom suptipova AML-NOS.

Imunofenotipski profil populacije blasta AML bez sazrevanja (Tabela 78.), ispoljava glavne imunofenotipske karakteristike mijeloblasta, i u skladu je

sa karakteristikama publikovanim u literaturi (Arber i sar., 2008a). Doprinos imunofenotipske dg finalnoj dg AML bez sazrevanja je maksimalan.

Ektopična ekspresija bar jednog od limfoidnih molekula javlja se kod 27% bolesnika ovog suptipa, pri čemu su molekuli CD7 i CD56 najučestaliji, dok ekspresija molekula B-loze nije registrovana. Učestalost ekspresije CD7 molekula je niža u poređenju sa literaturnim podacima (~30%), dok se ekspresija CD56 molekula uklapa u literaturne podatke (10-20%) (Arber i sar., 2008c).

**Tabela 78. AML bez sazrevanja -
Imunofenotipski profil populacije blasta**

CD45^{+med}/SSC^{low} CD45RA^{+het} HLA-DR^{+high} CD34^{+high} CD117^{+high} CD123^{+low}
 CD135^{+low} CD38^{+het} CD11a^{+low} CD71^{+low}(73%) CD33^{+low} CD13^{+high} CD114^{+med}(50%)
 cMPO^{+low} cCD68^{+low} CD4^{+low}(20%) CD11c^{+low}(43%) CD56^{+het}(13%) CD7^{+low}(13%)
 (kasni mijelo/monocitni Ag- CD2- B-Ag-)

Analiza opštih imunofenotipskih karakteristika AML bez sazrevanja, ukazuje da je leukemijskim procesom isključivo zahvaćena granulocitna loza. Ovaj suptip karakteriše viši stepen heterogenosti u pogledu ćelijskog sastava, pošto je prisustvo diskretnih znakova diferencijacije utvrđeno kod 53% bolesnika, dok je prisustvo homogene populacije blasta utvrđeno kod 40% bolesnika.

AML sa sazrevanjem

U našoj grupi odraslih bolesnika sa *de novo* AML, suptip AML sa sazrevanjem otkriven je sa učestalošću od 13,2% (n=37), što predstavlja visoku učestalost među suptipovima AML-NOS, i što se prema literaturnim podacima, uklapa u učestalost ovog suptipa u celoj grupi AML (~10%) (Arber i sar., 2008c). Hoffman i sar., 2009

U odnosu na demografsko-kliničke karakteristike na prezentaciji bolesti, bolesnike karakteriše relativno mlađa starosna dob (Me 57 god.), gde je 54%

bolesnika mlađe od 60 god., što je u skladu sa literaturnim podacima (Arber i sar., 2008c). Od ostalih karakteristika, posebno se izdvajaju niža prosečna vrednost Le ($27,3 \times 10^9/l$, Me $6,2 \times 10^9/l$) kao i niža prosečna vrednost populacije blasta u pk (34% Le) i ks (55% NĆ), u poređenju sa većinom suptipova AML-NOS ($p < 0,05$).

Normalan kariotip je utvrđen kod 70% naših bolesnika, što se navodi u literaturi (Hoffman i sar., 2009), uz nisku učestalost *FLT3*-ITD mutacija (12%).

Analiza imunofenotipski definisanih populacija ks bolesnika ovog suptipa AML, pokazala je značajno veće populacije CD34⁺ (34% NĆ) i CD117⁺ (38% NĆ) ćelija, u poređenju sa većinom ostalih suptipova AML-NOS ($p < 0,01$).

Imunofenotipski profil populacije blasta AML sa sazrevanjem (Tabela 79.), ispoljava glavne imunofenotipske karakteristike mijeloblasta, i u skladu je sa karakteristikama publikovanim u literaturi (Arber i sar., 2008a; Hoffman i sar., 2009). Ektopična ekspresija bar jednog od limfoidnih leukocitnih molekula registrovana je sa učestalošću od 46%, pri čemu je pojedinačna ekspresija niska. Prema literaturnim podacima, ekspresija CD7 je najučestalija (~30%) u ovom suptipu, dok je ekspresija CD19 i CD56 molekula u opsegu 10-20% (Arber i sar., 2008a).

Tabela 79. AML sa sazrevanjem –

Imunofenotipski profil populacije blasta

CD45^{het}/SSC^{low} CD45RA^{low}_(38%) HLA-DR^{high} CD34^{high} CD117^{high} CD123^{het}
 CD135^{low} CD38^{low} CD11a^{het} CD62L^{het} CD71^{low} CD33^{het} CD13^{het} CD114^{low}
 cCD68^{low} cMPO^{het} CD4^{low}_(30%) CD15^{het}_(22%) CD11c^{low}_(22%)
 CD19^{low}_(19%) CD56^{het}_(14%) CD7^{low}_(19%)
 (kasni mijelo/monocitni Ag- CD2- CD22- cCD79a-)

Populacija granulocitnih prekursora ks bolesnika suptipa AML sa sazrevanjem, čini u proseku 34% NĆ, i karakteriše je visoka učestalost atipične granulacije (77%), skretanje u levo ka nezreljim formama (97%) i blok u sazrevanju do neutrofila (72%). Osim toga, ovu populaciju kod svih bolesnika

karakteriše i prisustvo maturacione asinhronije u ekspresiji bar jednog od ispitivanih hLDM, uz najveću učestalost aberantne ekspresije molekula: HLA-DR⁺ (65%), CD34⁺ (48%), CD45^{high} (59%), cMPO^{p+} (61%) i CD15^{hetero} (48%). Ektopična ekspresija molekula na populaciji granulocitnih prekursora registrovana je kod petine naših bolesnika, pri čemu su najčešće eksprimirani molekuli CD56 (7%) ili CD7 (7%). Svi navedeni poremećaji u populaciji granulocitnih prekursora, ukazuju da je populacija granulocitnih prekursora deo leukemijske populacije ćelija, i da se akumulira u ks kao posledica poremećenog diferencijacionog kapaciteta leukemijskih blasta (Arber i sar., 2008a).

Analiza opštih imunofenotipskih karakteristika AML sa sazrevanjem, ukazuje da je leukemijskim procesom najčešće zahvaćena samo granulocitna loza (92%), dok se kod malog broja naših bolesnika, uz granulocitnu lozu javlja i umnožena eritrocitna loza (5%). Ovaj entitet karakteriše izrazita heterogenost u pogledu ćelijskog sastava i očuvan diferencijacioni potencijal, gde leukemijsku populaciju ćelija sačinjavaju blasti i zreliji leukemijski prekursori kod 78% bolesnika, odnosno blasti sa diskretnim znacima diferencijacije kod 8% bolesnika.

U našoj grupi bolesnika sa entitetom AML sa sazrevanjem, imunofenotipska dg ima relativno visok prediktivni značaj za postavljanje finalne dg prema SZO (84% bolesnika). I ako nije definisan visoko specifičan imunofenotipski profil blasta u ovom suptipu, poremećaji u populaciji granulocitnih prekursora, posebno prisustvo atipične granulacije, blok u sazrevanju do neutrofila i imunofenotipske aberacije u ekspresiji hLDM, daju značajan doprinos u diferencijalnoj dg ovog suptipa AML (Arber i sar., 2008c).

Akutna mijelomonocitna leukemija

U našoj grupi odraslih bolesnika sa *de novo* AML, suptip Akutna mijelomonocitna leukemija otkriven je sa učestalošću od 13,5% (n=38). Incidenca ovog entiteta u našoj grupi AML, najviša je u poređenju sa ostalim

suptipovima AML-NOS, i u skladu sa literaturnim podacima, gde je incidenca u celoj grupi AML procenjena na 5-10% adultnih AML (Arber i sar., 2008c).

U odnosu na demografsko-kliničke karakteristike na prezentaciji bolesti, naše bolesnike karakteriše veća učestalost žena (55%), relativno mlađa starosna dob (Me 58 g.), kao i visoka prosečna vrednost Le ($47,2 \times 10^9/l$) i populacije blasta u ks (64% NĆ). Kod dela bolesnika su prisutne limfadenopatija (21%) i/ili hepato/splenomegalija (28%). Prema navodima iz literature, ovaj suptip AML često karakteriše prisustvo ekstramedularne bolesti (Hoffman i sar., 2009).

Normalan kariotip je utvrđen kod 63% naših bolesnika, što se navodi u literaturi (Hoffman i sar., 2009), uz nižu učestalost mutacija u *FLT3* genu (24%).

Analiza imunofenotipski definisanih populacija ks bolesnika ovog suptipa AML, pokazala je značajno manju populaciju CD34⁺ ćelija (25% NĆ), CD117⁺ ćelija (29% NĆ), uz značajno veću populaciju granulocitnih (26% NĆ) i monocitnih prekursora (28% NĆ) u odnosu na većinu entiteta AML-RGP ($p < 0,01$).

Imunofenotipski profil populacije blasta Akutne mijelomonocitne leukemije, (Tabela 80.), ispoljava glavne imunofenotipske karakteristike mijelo/monoblasta, i u skladu je sa karakteristikama publikovanim u literaturi (Arber i sar., 2008c; Hoffman i sar., 2009).

Tabela 80. Akutna mijelomonocitna leukemija -

Imunofenotipski profil populacije blasta

CD45 ⁺ het/SSC ^{med}	HLA-DR ⁺ high	CD34 ⁺ het _(71%)	CD117 ⁺ het	CD123 ⁺ het	CD135 ⁺ het
CD38 ⁺ het	CD11a ⁺ het	CD71 ⁺ low	CD62L ⁺ het _(70%)	CD33 ⁺ het	CD13 ⁺ het
CD114 ⁺ low	cCD68 ⁺ het	cMPO ⁺ het	CD15 ⁺ het _(60%)	cLizozim ⁺ het	CD64 ⁺ het _(74%)
CD4 ⁺ low	CD11c ⁺ het	CD11b ⁺ het _(77%)	CD36 ⁺ het _(58%)	CD14 ⁺ het _(34%)	CD163 ⁺ low _(27%)
CD35 ⁺ het _(46%)	CD56 ⁺ het _(26%)	CD7 ⁺ low _(16%)	CD22 ⁺ low _(19%)	(CD2- CD19- cCD79a-)	

Ektopična ekspresija bar jednog od limfoidnih molekula je utvrđena sa visokom učestalošću od 63%, pri čemu je ekspresija CD56 (26%) učestalija u odnosu na CD7 (16%) molekul, iako se u literaturi navodi veća učestalost CD7 molekula (~30%) (Arber i sar., 2008c).

Populacija **granulocitnih prekursora** ks bolesnika suptipa Akutna mijelomonocitna leukemija, čini u proseku četvrtinu NĆ, i karakteriše je visoka učestalost atipične granulacije (79%), skretanje u levo ka nezreljim formama (97%) i blok u sazrevanju do neutrofila (59%). Osim toga, ovu populaciju karakteriše i prisustvo maturacione asinhronije u ekspresiji bar jednog od ispitivanih hLDM (97%), uz najveću učestalost aberantne ekspresije molekula: HLA-DR⁺ (76%), CD45^{high} (67%), cMPO^{p+} (38%) i CD34⁺ (30%). Ektopična ekspresija limfoidnih molekula na populaciji granulocitnih prekursora, registrovana je sa niskom učestalošću od 12% u našoj grupi AML, pri čemu je najčešće eksprimiran molekul CD56 (6%). Istovremeno, populacija **monocitnih prekursora** ks bolesnika ovog suptipa je umnožena (28% NĆ) i karakteriše je skretanje u levo ka nezreljim formama, gde populacija mijelo/monoblasta čini subpopulaciju (44% pop.), dok su promonociti (32% pop.) i monociti (26% pop.) zajedno čine veću populaciju.

Svi navedeni poremećaji u populaciji granulocitnih i monocitnih prekursora, ukazuju da su obe populacije prekursora deo leukemijske populacije ćelija, i da se akumuliraju u ks kao posledica poremećenog diferencijacionog kapaciteta leukemijskih blasta (Arber i sar., 2008c).

Naši rezultati potvrđuju da su u ovom entitetu kod većine bolesnika, leukemijskim procesom zahvaćene granulocitna i monocitna loza (82%) (Arber i sar., 2008c; Hoffman i sar., 2009). Ovaj suptip karakteriše izrazita heterogenost u pogledu ćelijskog sastava i očuvan diferencijacioni potencijal, gde leukemijsku populaciju uglavnom sačinjavaju blasti i zreliji leukemijski prekursori (79%) ili populacija mijelo/monoblasta sa znacima diferencijacije (18%).

U našoj grupi bolesnika sa suptipom Akutna mijelomonocitna leukemija, imunofenotipska dg ima visok prediktivni značaj za postavljanje finalne dg prema SZO klasifikaciji (92%). U tom smislu, prisustvo populacije

mijelo/monoblasta i istovremena zahvaćenost prekursora monocitne i granulocitne loze leukemijskim procesom ima presudnu ulogu (Arber i sar., 2008a; Hoffman i sar., 2009).

Akutna monoblastna leukemija i Akutna monocitna leukemija

U našoj grupi odraslih bolesnika sa *de novo* AML, incidenca suptipova akutna monoblastna leukemija (5,3%, n=15) i akutna monocitna leukemija (6,8%, n=19) relativno je niska, što je u skladu sa incidencama ovih suptipova navedenim u literaturi (<5% za svaki suptip) (Arber i sar., 2008c).

U odnosu na demografsko-kliničke karakteristike na prezentaciji bolesti, akutnu monoblastnu leukemiju karakteriše viša starosna dob (Me 58 god.), niže prosečne vrednosti Le ($37,2 \times 10^9/l$) i serumske LDH (724 U/l), odsustvo limfadenopatije i niska učestalost hepatosplenomegalije (17%). Sa druge strane, akutnu monocitnu leukemiju karakteriše niža starosna dob (Me 51 god.), izrazito visoka prosečna vrednost Le ($104,4 \times 10^9/l$), viša prosečna vrednost serumske LDH (1499 U/l), prisustvo limfadenopatije (25%) i visoka učestalost hepatosplenomegalije (50%), u odnosu na akutnu monoblastnu leukemiju ($p < 0,05$). Naši rezultati su pokazali prisustvo značajnih razlika između ova dva suptipa u pogledu kliničkih karakteristika na prezentaciji, koji govore u prilog učestale ekstramedularne bolesti, posebno u akutoj monocitnoj leukemiji, čime smo potvrdili literaturne podatke (Arber i sar., 2008c; Hoffman i sar., 2009).

Aberantan kariotip je učestaliji u akutnoj monoblastnoj leukemiji u odnosu na Akutnu monocitnu leukemiju (47% vs. 32%, $p > 0,05$), što se navodi i u literaturi (Hoffman i sar., 2009). Istovremeno, oba suptipa karakteriše visoka učestalost mutacija *FLT3* gena, posebno u slučaju akutne monocitne leukemije (50%).

Analiza imunofenotipski definisanih populacija ćelija ks je pokazala da bolesnici sa Akutnom monoblastnom leukemijom imaju značajno veću populaciju CD34⁺ ćelija (58% NĆ) i CD117⁺ ćelija (46% NĆ), odnosno manju populaciju monocitnih prekursora (9% NĆ) u poređenju sa Akutnom monocitnom leukemijom, koju karakteriše izrazito niska subpopulacija CD34⁺

ćelija (7% NĆ) i CD117⁺ ćelija (14% NĆ), uz predominantnu populaciju monocitnih prekursora (70% NĆ) ($p=0,000$). Osim toga, populacija **granulocitnih prekursora** ks je veoma snižena u slučaju oba subtipa AML (<16% NĆ). Rezultati našeg ispitivanja su u skladu sa rezultatima rada Matarraz i sar., 2015, gde je takođe pokazano da su populacije CD34⁺ i CD117⁺ LĆ znatno veće u ks bolesnika sa akutnom monoblastnom leukemijom u poređenju sa akutnom monocitnom leukemijom.

Imunofenotipski profil **populacije blasta akutne monoblastne leukemije**, (Tabela 79.), ispoljava glavne imunofenotipske karakteristike monoblasta, i u skladu je sa karakteristikama publikovanim u literaturi (Arber i sar., 2008c; Hoffman i sar., 2009). Imunofenotipski profil **populacije LĆ akutne monocitne leukemije**, (Tabela 81.), ispoljava glavne imunofenotipske karakteristike monocitnih prekursora promonocita, i takođe je u skladu sa karakteristikama publikovanim u literaturi (Arber i sar., 2008c; Hoffman i sar., 2009).

Ektopična ekspresija bar jednog od limfoidnih molekula utvrđena je sa visokom učestalošću od 73% u akutnoj monoblastnoj leukemiji, gde su osim CD56 eksprimirani CD7 i CD22 molekuli. Akutnu monocitnu leukemiju posebno karakteriše ektopična ekspresija CD56 molekula (74%). Prema literaturnim podacima, ekspresija CD7 i/ili CD56 molekula se javlja kod 25-40% bolesnika nezavisno od suptipa (Arber i sar., 2008c). Međutim, u radu Matarraz i sar., 2015, objavljena je podjednako visoka učestalost ekspresije CD56 molekula u akutnoj monocitnoj (70%) i akutnoj monoblastnoj leukemiji (80%), što nije u skladu sa našim rezultatima koji se odnose na akutnu monoblastnu leukemiju, pošto je u našoj grupi učestalost ekspresije CD56 znatno niža (27%). Pomenute razlike mogu biti posledica relativno malih brupa bolesnika koji su uključeni u ispitivanje, kako u pomenutom radu (<10 bolesnika u svakoj grupi), tako i u našem ispitivanju.

Naši rezultati potvrđuju da je i u akutnoj monoblastnoj (87%) i u Akutnoj monocitnoj leukemiji (90%) leukemijskim procesom primarno zahvaćena monocitna loza, kao i da se radi o leukemijama sa heterogenim ćelijskim

sastavom, što je u skladu sa literaturnim podacima (Arber i sar., 2008c; Hoffman i sar., 2009; Matarraz i sar., 2015).

**Tabela 81. Imunofenotipski profil populacije blasta
akutne monoblastne/monocitne leukemije**

Akutna monoblastna leukemija

CD45^{het}/SSC^{low} HLA-DR^{het} CD34^{high}(71%) CD117^{het} CD123^{het} CD135^{low}
CD38^{het} CD11a^{het} CD71^{low} CD62L^{het} CD33^{het} CD13^{het} CD114^{low}(75%)
cCD68^{het} cMPO^{low}(36%) cLizozim^{het}(67%) CD4^{low} CD11b^{low}(67%) CD11c^{low}(60%)
CD64^{het}(14%) CD36^{het}(20%) CD35^{het}(40%) CD163^{het} CD56^{het}(27%) CD7^{low}(27%)
CD22^{low}(40%)
(CD15- CD14- / CD2- CD19- cCD79a-)

Akutna monocitna leukemija

CD45^{high}/SSC^{med} HLA-DR^{het} CD34^{het}(21%) CD117^{het}(53%) CD123^{het} CD135^{het}
CD38^{med} CD11a^{high} CD71^{low} CD62L^{het}(33%) CD33^{high} CD13^{het} CD114^{low}(40%)
cCD68^{high} cMPO^{het}(68%) cLizozim^{high} CD15^{het} CD4^{het} CD11b^{het} CD11c^{het}
CD64^{high} CD36^{het} CD35^{het} CD14^{het}(68%) CD163^{low}(27%) CD56^{het}(74%)
(CD2- CD7- B-Ag-)

Akutna monoblastna leukemija je manje heterogena u odnosu na ćelijski sastav, i pretežno je čini populacija monoblasta sa znacima diferencijacije (73% pop.). Sa druge strane, akutna monocitna leukemija je veoma heterogena u odnosu na ćelijski sastav, i tipično je čini relativno mala subpopulacija monoblasta (13% pop.), i znatno veće populacije promonocita (56% pop.) i monocita (31% pop.).

U našoj grupi bolesnika sa akutnom monoblastnom/monocitnom leukemijom, imunofenotipska dg ima visok prediktivni značaj za postavljanje finalne dg prema SZO klasifikaciji (akutna monocitna leukemija, 95% vs. akutna monoblastna leukemija, 87%), gde prisustvo populacije monoblasta i zrelijih

prekursora monocitne loze, identifikovanih i kvantifikovanih na osnovu specifičnih imunofenotipskih profila, ima presudnu ulogu u tom smislu (Arber i sar., 2008c; Béné i sar., 2011; Matarraz i sar., 2015).

Akutna bazofilna leukemija. U našoj grupi bolesnika sa *de novo* AML, suptip Akutna bazofilna leukemija otkriven je sa učestalošću od 0,4%. Incidenca ovog entiteta u našoj grupi AML je niska i u skladu sa literaturnim podacima, gde je incidenca procenjena na <1% adultnih AML (Arber i sar., 2008c). S obzirom da se radi samo o dva bolesnika, nije bilo moguće definisati opšti imunofenotip ovog entiteta. Oba naša bolesnika sa ovim suptipom AML su stariji muškarci, sa medijanom starosti od 67 god. Od kliničkih karakteristika, izdvaja se prisustvo pancitopenije (Le $2,4 \times 10^9/l$) i visoka vrednost populacije blasta u ks (76% NĆ). Kod oba bolesnika je izrazito snižena populacija granulocitnih (4% NĆ) i monocitnih prekursora (2% NĆ) ks, uz predominaciju populacije CD34⁺ ćelija (65% NĆ).

Populacija blasta kod naših bolesnika ispoljava glavne imunofenotipske karakteristike mijeloblasta sa karakteristikama rane bazofilne diferencijacije (CD123^{med} CD135^{low} CD22^{het} CD25⁺ cMPO^{neg} cLizozim^{neg}), što je u skladu sa karakteristikama publikovanim u literaturi (Lichtman i Segel, 2005; Arber i sar., 2008a; Hoffman i sar., 2009). Molekul CD22 je kod naših bolesnika eksprimiran na većini ćelija leukemijske populacije (59% odnosno 95% LĆ), što je specifična karakteristika akutne bazofilne leukemije, za razliku od drugih tipova/suptipova naše grupe AML, gde je ekspresija CD22 molekula, utvrđena samo na relativno maloj subpopulaciji ćelija, koja u proseku iznosi 10-30% LĆ.

Imunofenotipska dg ima visok prediktivni značaj za postavljanje finalne dg Akutne bazofilne leukemije, s obzirom da omogućava preciznu diferencijalnu dg u odnosu na AML sa minimalnom diferencijacijom i akutnu monoblastnu leukemiju (Arber i sar., 2008c).

Ispitivanje MRB u AML primenom imunofenotipizacije i MPC

Kvantifikacija MRB u AML pruža značajnu prognostičku informaciju o bolesnicima koji su lečeni hemioterapijom, pri čemu se kao metode izbora za

procenu MRB koriste molekularno-genetske metode, kod bolesnika kod kojih postoje specifični molekularni markeri za praćenje, odnosno MPC kojom se prate populacije LĆ sa kombinacijama IFSL (Vidriales i sar., 2003; Kern i sar., 2005; Al-Mawali i sar., 2009b; Hokland i sar., 2012; Coustan-Smith i Campana, 2013; Terwijn i sar., 2013).

Jedan od glavnih ciljeva postavljenih u ovoj disertaciji odnosio se na optimizaciju metodologije četvorokolorne imunofenotipizacije i MPC u praćenju MRB kod bolesnika sa AML lečenih indukcijom/konsolidacijom hemioterapijom. Postupak optimizacije ove metodologije sprovedli smo na grupi od 26 bolesnika sa AML u citomorfološkoj KR. Naše ispitivanje smo bazirali na konceptu koji je uključivao definisanja populacija LĆ sa IFSL na dg za svakog od ispitivanih bolesnika, i njihovom praćenju i kvantifikaciji posle lečenja hemioterapijom, što predstavlja standardni pristup prema literaturnim podacima (Béné MC i Kaeda, 2009; Al-Mawali i sar., 2009a,b; Hokland i sar., 2012; Coustan-Smith i Campana, 2013). U tom smislu primarni cilj optimizacije metodologije bio je da definišemo kombinacije IFSL u našoj grupi AML bolesnika na dg, i da selekcionišemo najsenzitivnije među njima za predikciju relapsa bolesti.

U našem ispitivanju, ukupno je formulisana 41 četvorokolorna kombinacija IFSL, pri čemu su po dve kombinacije IFSL definisane kod 58% bolesnika, dok je po jedna kombinacija IFSL bila definisana kod 42% bolesnika. Najveći broj IFSL kombinacija u našoj grupi bolesnika je sadržavao CD34 i/ili CD117 molekule, koji predstavljaju osnovne molekule u detekciji MRB u AML (Olaru i sar., 2008; Al-Mawali i sar., 2009b; Buccisano i sar., , 2012). Najčešće kombinacije IFSL (46%) sastojale su se od molekula CD34 i/ili CD117 i ektopično eksprimiranih molekula limfoidne loze (CD7, CD56, CD19, CD22), odnosno molekula CD34 i/ili CD117 i asinhrono eksprimiranih kasnijih diferencijacionih molekula mijeloidne loze CD64 i/ili CD15 (27%). Kod manjeg broja bolesnika (17%), kombinacije IFSL bile su bazirane na aberantnim obrascima ekspresije molekula CD34/CD117/HLA-DR.. Mogućnost definisanja bar jedne kombinacije IFSL kod svakog našeg bolesnika sa AML, kao i učestalost

različitih tipova kombinacija IFSL u našoj grupi AML odgovara, učestalosti sličnih kombinacija koje se navode u literaturi (Vidriales i sar., 2003; Oлару i sar., 2008; Al-Mawali i sar., 2009a,b; Béné MC i Kaeda, 2009).

Ispitivanje povezanosti prisustva MRB u ks i/ili pk bolesnika i razvoja relapsa bolesti, pokazalo je da je među 11 bolesnika koji su razvili relaps bolesti, kod njih 9 (82%) bio potvrđen MRB^{poz} status metodologijom MPC, dok su dva (18%) bolesnika bila MRB^{neg} posle indukciono i konsolidaciono terapije. Pri tome su kod jednog od ovih bolesnika za procenu MRB primenjivane kombinacije CD34⁺CD19⁺CD64^{low} / CD117⁺CD19⁺CD64^{low}, dok je kod drugog primenjivana kombinacija CD117⁺CD34⁻HLA-DR⁻. Nesenzitivnost pojedinih kombinacija IFSL za procenu MRB i predikciju relapsa bolesti objašnjava se njihovom nestabilnošću tj. eliminacijom subpopulacija L^C koje eksprimiraju IFSL pod dejstvom hemioterapije, ili pojavom novih subpopulacija L^C koje eksprimiraju drugačije IFSL u odnosu na dg (Vidriales i sar, 2003; Parkin i sar, 2013; Zeijlemaker i sar, 2014). U literaturi se navodi da 76% kombinacija IFSL definisanih na dg ostaje stabilno tokom trajanja i lečenja bolesti, dok 24% gubi senzitivnost u praćenju MRB (Voskova i sar., 2004), što je slično i u slučaju naše grupe bolesnika sa AML.

Na senzitivnost detekcije MRB primenom metodologije IMPC, osim broja definisanih IFSL na dg bolesti i njihove specifičnosti kao kombinacije, u velikoj meri utiče i broj analiziranih ćelija uzoraka od interesa za prisustvo MRB (Hokland i sar., 2012; Coustan-Smith i Campana, 2013). Naime, analizom većeg broja ćelija po svakom uzorku za prisustvo ispitivane kombinacije IFSL, značajno se povećava mogućnost za detekciju retkih leukemijskih ćelija. U našem ispitivanju, mi smo raspolagali kvalitetnim i celularnim uzorcima, pri čemu smo u pk u proseku analizirali 229707 ćelija po alikvotu uzorka, a u ks u proseku 251005 ćelija po alikvotu uzorka. Prilikom analize populacija ćelija koje eksprimiraju kombinacije IFSL, u pk bolesnika u proseku je prikupljano 257 ćelija sa specifičnim karakteristikama, dok je u ks bolesnika u proseku prikupljano 1045 ćelija sa specifičnim karakteristikama. Naša metodologija četvorokolorne imunofenotipizacije primenom MPC, omogućila nam je detekciju

rezidualne populacije L \acute{C} na nivou senzitivnosti od 0,01% N \acute{C} uzorka, odnosno 1 leukemijske ćelije na 10000 analiziranih ćelija uzorka (10^{-4}). Po svakoj testiranoj kombinaciji IFSL, prikupljali smo bar 50 ćelija sa specifičnom kombinacijom molekula. Dovoljna celularnost uzoraka bolesnika koje smo ispitivali omogućila nam je da analiziramo dovoljno velike populacije ćelija za prisustvo rezidualnih leukemijskih ćelija, i da time zadovoljimo kriterijume senzitivnosti naše metodologije prema literaturnim preporukama (Craig i sar., 2008; Béné i Kaeda, 2009; Hokland i sar., 2012; Paietta, 2012; Jaso i sar., 2014).

Kod svih bolesnika kod kojih smo ispitivali prisustvo MRB, istovremeno sa praćenjem kombinacija IFSL, pratili smo i kvantifikovali populaciju ćelija sa imunofenotipskim karakteristikama mijeloidnih progenitora u ks/pk ($CD34^{+}CD117^{+}HLA-DR^{+}CD45^{low}/SSC^{low}$), u kojoj se nalazi i populacija leukemijskih mijeloidnih progenitora (Roboz, 2009; Rosen, 2009; Buccisano i sar., , 2012). Veći deo naših bolesnika (58%) je na dg imao populaciju/subpopulaciju L \acute{C} sa karakteristikama mijeloidnih progenitora. Cilj praćenja ove populacije je bio da procenimo da li se dešavaju promene u veličini populacije mijeloidnih progenitora ks/pk, posle primene indukcione i konsolidacione terapije, i da li se takve promene mogu upotrebiti za predikciju relapsa bolesti, posebno kod onih bolesnika koji su imali kombinacije IFSL, bazirane na promenama u ekspresiji molekula koji definišu imunofenotip mijeloidnih progenitora.

Posle lečenja indukcijom hemioterapijom, povećan pul mijeloidnih progenitora u ks ($\geq 1,11\%$ N \acute{C}), utvrđen je kod 27% bolesnika, dok je istovremena analiza pk pokazala povećanje iste populacije ($\geq 0,06\%$ Le), kod 35% naših bolesnika. Međutim, prosečne vrednosti populacija mijeloidnih progenitora u ks i pk u grupi MRB^{neg} i MRB^{poz} bolesnika nisu se međusobno značajno razlikovale.

Posle lečenja konsolidacionom hemioterapijom, povećan pul mijeloidnih progenitora u ks ($\geq 1,11\%$ N \acute{C}), utvrđen je kod 17%, a u pk ($\geq 0,06\%$ Le) kod 11% bolesnika. Prosečne vrednosti populacija mijeloidnih progenitora u pk MRB^{poz} bolesnika bile su značajno veće u odnosu na iste vrednosti u grupi

MRB^{neg} bolesnika (0,12% vs. 0,01%, $p=0,029$), dok u ks postojeće razlike nisu potvrđene kao značajne.

Naši rezultati ispitivanja promena u pulu mijeloidnih progenitora ks/pk bolesnika posle lečenja hemioterapijom, pokazali su da povećanje ukupnog pula mijeloidnih progenitora nije uvek specifičan indikator prisustva LĆ, već da to povećanje može biti posledica regenerativnog procesa u odeljku zdrave hematopoeze ks posle citoreduktivnog efekta hemioterapije. Mi smo pokazali da višestruko povećanje cirkulišućeg pula mijeloidnih progenitora u pk bolesnika sa AML posle primene konsolidacione terapije, može predstavljati specifičan indikator prisustva MRB kod bolesnika.

Prisustvo MRB u ks posle lečenja indukcijom hemioterapijom (praćeno je 26 bol.), utvrđeno je kod 69% naših bolesnika, dok je paralelna analiza pk pokazala prisustvo MRB kod 19% bolesnika. Posle lečenja konsolidacionom hemioterapijom (praćeno je 18 bol.), prisustvo MRB u ks, je utvrđeno kod 50% bolesnika, dok je istovremena analiza pk pokazala prisustvo MRB kod 6% bolesnika. Posle primene konsolidacione hemioterapije, 50% bolesnika je ostalo MRB^{poz}, dok je relativno manji broj bolesnika (11%) promenio status iz MRB^{poz} u MRB^{neg}. Pri tome je 39% bolesnika očuvao status MRB^{neg}. Ni jedan bolesnik posle konsolidacione terapije nije prešao iz MRB^{neg} u MRB^{poz} status. Naše ispitivanje je pokazalo da je kod 78% bolesnika koji su tokom praćenja razvili relaps bolesti, nivo rezidualnih LĆ u ks srži bio $>0,1\%$ NĆ, što je u korelaciji sa rezultatima Vidriales i sar, 2013, koji su pokazali da se AML MRB^{poz} bolesnici u KR posle indukcione terapije, mogu svrstati u tri grupe rizika na osnovu nivoa rezidualne leukemijske populacije u ks (nizak rizik $<0,01\%$ NĆ; srednji rizik 0,01-0,1% NĆ; visok rizik $\geq 0,1\%$ NĆ).

Mi smo pokazali da je ispitivanje prisustva MRB u ks AML bolesnika posle indukcione terapije primarno značajno za selekcionisanje visokorizičnih bolesnika za razvoj relapsa bolesti, s obzirom da je većina bolesnika koji su tokom praćenja razvili relaps bolesti, imala MRB^{poz} status već posle indukcione terapije (82%). Osim toga, većina MRB^{poz} bolesnika posle indukcione terapije ostaje u istom statusu i posle konsolidacione terapije, što ukazuje da MRB^{poz}

bolesnici ispoljavaju primarnu rezistenciju na standardnu hemioterapiju već posle indukcionog terapije, te ih treba lečiti intenzivnijim terapijskim protokolima. Naši rezultati su u skladu sa literaturnim podacima koji ističu značaj kvantifikacije MRB primenom MPC za stratifikaciju bolesnika sa AML posle indukcionog lečenja hemioterapijom (Vidrales i sar., 2003; Kern i sar., 2005; Al-Mawali i sar., 2009a; Buccisano i sar., 2012; Terwijn i sar., 2013).

U grupi bolesnika koja nije tokom praćenja razvila relaps bolesti (n=15), MRB je utvrđena posle indukcionog ili konsolidacionog terapije kod 53% bolesnika, što ih je selekcionisalo za dalje praćenje MRB.

U našem ispitivanju, istovremeno smo testirali uzorke pk i ks bolesnika za prisustvo MRB u AML, i pokazali da su uzorci ks senzitivniji u detekciji MRB u poređenju sa uzorcima pk, kako posle indukcionog tako i posle konsolidacionog terapije, te da predstavljaju primarne uzorke za analizu MRB. Osim toga, svi naši bolesnici koji su imali MRB^{poz} status u pk, imali su MRB^{poz} status i u ks. Literaturni podaci ukazuju da je u AML, leukemijska populacija u pk obično za 1-log manja u poređenju sa populacijom u ks bolesnika, što objašnjava nižu senzitivnost pk za detekciju MRB u odnosu na ks bolesnika (Béné i Kaeda, 2009). Praćenje MRB u pk bolesnika posle primene hemioterapije se preporučuje kao metoda izbora za učestalo praćenje MRB, zbog lake dostupnosti uzorka pk (Béné i Kaeda, 2009). Osim toga pojedini radovi su pokazali da brzina kojom se redukuje leukemijska masa u pk bolesnika tokom primene indukcionog terapije, odnosno njen nivo posle primene indukcionog terapije u fazi aplazije ks (d14), ima prediktivnu vrednost za posizanje i trajanje KR bolesti, što takođe potvrđuje značaj ispitivanja uzoraka pk bolesnika tokom lečenja (Lacombe i sar., 2009).

Mada je naša grupa AML bolesnika ispitivanih za prisustvo MRB mala, a praćenje bolesnika relativno kratko, ispitivanje ukupnog preživljavanja bolesnika posle indukcionog terapije je pokazalo da grupa MRB^{poz} bolesnika ima kraću medijanu preživljavanja (12 mes.), dok u grupi MRB^{neg} bolesnika medijana još nije dosegnuta (p>0,05).

Značaj ispitivanja statusa MRB posle indukciono terapije u AML, analiziran je u više studija, gde je pokazano da MRB^{poz} status posle indukcije ima veći prediktivni značaj za ishod bolesti u odnosu na ispitivanje posle konsolidacione terapije (Vidrales i sar., 2003; Al-Mawali i sar., 2009a,b; Vidrales i sar., 2015).

Sekundarni cilj našeg ispitivanja odnosio se na analizu kvantitativnih promena koje se dešavaju u populacijama/subpopulacijama ćelija ks i pk bolesnika tokom perioda regeneracije, posle primene indukciono i konsolidacione hemioterapije. Veoma mali broj publikovanih radova odnosi se na ovaj specifičan aspekt lečenja bolesnika sa AML, a koji se odnosi na regeneraciju hematopoeznih ćelija (Chu i sar., 2014), koje predstavljaju glavne činioce imunskog sistema bolesnika (Abbas i sar., 2015).

Populacija **granulocitnih prekursora ks** bolesnika sa AML posle indukciono i konsolidacione terapije potpuno se oporavlja kako u odnosu na relativnu zastupljenost u ks, tako i u odnosu na ćelijski sastav. U našoj grupi bolesnika sa AML, skretanje u levo ka nezreljim formama bilo je prisutno kod 87% bolesnika na dg, pri čemu je do normalizacije strukture granulocitnih prekursora ks došlo kod svih bolesnika posle primene indukciono terapije, odnosno kod 89% bolesnika posle primene konsolidacione. Oporavak u ks je praćen i normalizacijom prosečne vrednosti neutrofila u pk bolesnika posle indukciono terapije, dok je posle konsolidacione terapije utvrđena značajno snižena prosečna vrednost neutrofila pk (49% Le) u odnosu na indukciju (63% Le) i zdravu kontrolnu pk (64% Le) ($p < 0,05$). Analiza strukture populacije neutrofila pk, pokazala je odsustvo cirkulišućih neutrofilnih prekursora kod većine bolesnika posle primene indukciono (88%) i konsolidacione (75%) terapije.

Vrednost populacije **monocitnih prekursora ks** bolesnika posle indukciono terapije nalazi se na fiziološkom nivou, dok je posle konsolidacione terapije ova populacija blago povećana u odnosu na zdravu kontrolnu ks. Analiza ćelijske strukture populacije monocitnih prekursora na dg bolesti, pokazala je prisustvo skretanja u levo ka nezreljim formama kod 82%

bolesnika, pri čemu je posle primene indukcionе terapije došlo do normalizacije strukture monocitnih prekursora kod 96% bolesnika, odnosno kod svih bolesnika posle primene konsolidacije. U slučaju populacije **monocita pk**, utvrđeno je značajno relativno povećanje prosečne vrednosti ove populacije posle indukcionе (8,5% Le) i konsolidacione (11,8%) terapije, u poređenju sa vrednošću populacije monocita u zdravoj kontrolnoj grupi (5,6% Le) ($p < 0,05$). Takođe je utvrđeno da je prosečna vrednost monocita pk značajno viša posle konsolidacione terapije u odnosu na vrednost posle indukcionе ($p = 0,01$). Analiza ćelijske strukture populacije monocita posle primene hemioterapije, pokazala je odsustvo skretanja ka nezreljim formama posle indukcionе terapije kod 92% bolesnika, odnosno posle konsolidacione terapije kod 75% bolesnika.

Analiza ukupne populacije **Li ks** bolesnika posle lečenja hemioterapijom je pokazala da je prosečna vrednost ove populacije u ks bolesnika značajno snižena posle indukcionе terapije u poređenju sa vrednošću u zdravoj kontrolnoj ks (10,8% vs. 14,1% Li, $p = 0,012$), pri čemu je vrednost iste očuvana u fiziološkim granicama posle primene konsolidacije. Analiza populacije **B-prekursora ks** pokazala je značajno prosečno sniženje posle indukcionе hemioterapije u poređenju sa vrednošću posle konsolidacije i u odnosu na zdravu kontrolnu ks ($p < 0,05$), pri čemu je ista populacija očuvana u fiziološkim granicama posle primene konsolidacije. U skladu sa tim je i nalaz da je vrednost populacije B-Li u ks značajno snižena posle indukcionе (2,04% Li), ali i posle konsolidacione (4,6% Li) terapije, u poređenju sa vrednošću iste populacije u ks zdravih kontrola (15,8% Li) ($p < 0,01$). Mi smo pokazali da ovakvo sniženje vrednosti u ks, ima reperkusiju na nivou pula cirkulišućih B-Li pk bolesnika, gde je utvrđeno višestruko sniženje prosečne vrednosti ove populacije posle indukcionе, ali i posle konsolidacione terapije u poređenju sa vrednostima u pk zdravih kontrola ($p < 0,01$). U radu Chu i sar., 2014, pokazano je da brzina oporavka populacije B-prekursora ks, odnosno veća zastupljenost ove populacije u ks posle primene indukcionе terapije ($> 5\%$ NĆ), može imati povoljan prognostički značaj za trajanje KR i preživljavanje bolesnika sa AML, te bi dalja ispitivanja u ovom pravcu mogla imati važan klinički značaj.

U pogledu vrednosti ukupne populacije **T-Li** ks bolesnika, značajno relativno povećanje ove populacije otkriveno je samo posle indukciono terapije (83,9% Li) u poređenju sa zdravom kontrolnom ks (72,4% Li) ($p=0,018$). Međutim, Prosečna vrednost populacije **T-Li** pk bolesnika je snižena posle indukciono ($p>0,05$) i konsolidaciono terapije ($p<0,05$).

Prosečna vrednost populacije **NKT-Li ks** značajno je povećana posle indukciono (14,2% Li), ali i konsolidaciono (14,6% Li) terapije u poređenju sa vrednošću ove populacije u ks zdravih kontrola (4,6% Li) ($p<0,01$). Međutim, u pk bolesnika prosečne vrednosti populacije NKT-Li su na nivou vrednosti zdrave kontrole, posle primene oba hemoterapeutska protokola.

U slučaju populacije **NK-Li ks**, nisu utvrđene značajne razlike u vrednosti ove populacije između bolesnika i zdravih kontrolnih uzoraka. Međutim, vrednost populacije NK-Li pk bolesnika, je značajno snižena posle indukciono i konsolidaciono terapije u poređenju sa vrednostima u pk zdravih kontrola ($p<0,01$).

Naše ispitivanje je pokazalo da u ks bolesnika sa AML posle primene indukciono i konsolidaciono terapije, dolazi do značajnih promena u relativnoj zastupljenosti populacije B-Li i NKT-Li u ukupnoj populaciji Li ks, pri čemu je populacije B-Li značajno snižena a populacija NKT-Li značajno povišena. Sa druge strane, ispitivanje populacija Li pk bolesnika posle primene indukciono i konsolidaciono terapije, pokazalo je značajno sniženje populacija B-Li i NK-Li, pri čemu je značajno sniženje populacije T-Li utvrđeno samo posle konsolidaciono terapije. Naši rezultati ukazuju da se oporavak populacije B-Li i NK-Li posle primene hemoterapeutskih protokola odvija mnogo sporije u poređenju sa granulocitnom i monocitnom lozom, i da bolesnici sa AML u periodu regeneracije ks imaju sniženu imunokompetentnost u pogledu humoralne i urođene NK imunosti, te da zahtevaju praćenje i primenu profilakse.

Imunofenotipski prognostički markeri u de novo AML

Prognostički značaj imunofenotipskih karakteristika u AML još uvek nije jasno ustanovljen. U poslednje dve decenije pojavio se veliki broj radova, često sa kontroverznim rezultatima o prognostičkoj ulozi pojedinačnih i/ili grupa hLDM, što je posledica razlika u veličini i heterogenosti grupa analiziranih bolesnika, broju i vrsti ispitivanih hLDM, razlika u primenjenim tehnikama za obeležavanje i analizu ekspresije hLDM, kao i kriterijuma za procenu značajnosti nivoa njihove ekspresije na populaciji leukemijskih ćelija (Schabath i sar, 2003; Casasnovas i sar., 2003; Mason i sar., 2006).

Naše ispitivanje potencijalnih prognostičkih imunofenotipskih i kliničko-bioloških karakteristika za pojavu rane smrti, odgovor na indukcionu hemioterapiju, pojavu relapsa bolesti i ukupno preživljavanje bolesnika, sprovedeno je na osnovnoj grupi od 250 odraslih bolesnika sa *de novo* AML koji su klasifikovani prema SZO klasifikaciji kao non-APL, lečenih istim tipom hemioterapeutskog protokola ("3+7"), što predstavlja standardan pristup u AML (Hoffman i sar., 2009; Döhner i sar, 2010).

U ovom radu mi smo pokazali relativno visoku učestalost **rane smrti** u celoj grupi naših bolesnika sa AML (31%), pri čemu je najveći broj bolesnika egzistirao tokom rane faze lečenja (83%), a manji broj pre početka lečenja (17%). Mi nismo potvrdili značajne razlike u učestalosti rane smrti između AML-RGP (29%), AML-NOS (30%) i AML-MDS (38%) ($p > 0,05$), kao ni između suptipova AML-NOS, gde je najveća učestalost registrovana u AML bez sazrevanja (40%) i Akutnoj monoblastnoj/monocitnoj leukemiji (38%) ($p > 0,05$). Sa druge strane, pokazali smo da je rana smrt značajno učestalija u akutnoj monocitnoj leukemiji (53%) u poređenju sa akutnom monoblastnom leukemijom (15,4%) ($p = 0,033$). U slučaju AML-RGP, pokazali smo prisustvo značajnih razlika u učestalosti rane smrti između različitih entiteta, uz najveću učestalost u AML sa $inv16/t(16;16)$ (60%), AML sa $t(v;11q23)$ (66,7%) i AML sa $NPM1^{mut}$ (43,2%), i potpuno odsustvo rane smrti u AML sa $t(8;21)$ i AML sa $CEBPA^{mut}$ ($p = 0,006$).

Ispitivanje potencijalnih prognostičkih faktora za pojavu rane smrti u našoj grupi non-APL bolesnika sa AML (n=235), pokazalo je da je rana smrt učestalija u grupi bolesnika sa vrednošću $Le \geq 30 \times 10^9/l$ (p=0,003), povišenom prosečnom vrednošću LDH u serumu (>2000 U/l) (p=0,020), povećanom prosečnom vrednošću blasta u pk ($>55\%$ Le) (p=0,000) i ks ($>70\%$ NĆ)(p=0,031). Rana smrt je učestalija i u grupi bolesnika sa genskom mutacijom *FLT3-d835* (p=0,023) i mutacijom *NPM1* (p=0,039) gena.

Literaturni podaci ukazuju da je pojava rane smrti u značajnoj vezi sa hiperleukocitozom, visokim vrednostima serumske LDH i kreatinina, kao i sa pojavom pulmonalne leukostaze (Bug i sar., 2007). Bolesnike svih naših subtipova AML sa visokom incidencom rane smrti, takođe karakterišu visoke vrednosti Le ($>60 \times 10^9/L$), prisustvo ekstramedularne bolesti i više vrednosti serumske LDH, što je u skladu sa literaturnim podacima.

Analiza povezanosti **imunofenotipskih karakteristika** leukemijskih blasta i pojave rane smrti u našoj grupi u grupi non-APL bolesnika sa AML, pokazala je veću učestalost rane smrti kod bolesnika sa AML koji na prezentaciji bolesti imaju ekspresiju CD11b, CD11a, CD36 i CD22 molekula na populaciji blasta, kao i manju subpopulaciju CD117⁺ i cMPO⁺ blasta (p<0,05). Ekspresija navedenih leukocitnih molekula karakteriše imunofenotip populacije monoblasta i samim tim prisutna je kod većine AML kod kojih je leukemijskim procesom zahvaćena monocitna loza (Arber i sar., 2008c; Béné i sar., 2011). U literaturi se takođe navodi veća incidenca rane smrti kod bolesnika sa M4/M5 FAB tipovima, kao i povezanost sa ekspresijom CD11c molekula na leukemijskim blastima (Bug i sar., 2007). Osim toga, pokazano je da ekspresija integrina (CD11a, CD11b, CD11c/CD18) i CD62L na leukemijskim blastima AML, omogućava u pk njihovu interakciju sa TNF α aktiviranim ćelijama endotela, što dovodi do leukostaze i hominga blasta u različita tkiva i organe (Stucki i sar., 2001). Mi smo u našem ispitivanju pokazali da je i ekspresija adhezivnih molekula CD36 i CD22 na leukemijskim blastima (Ortolani, 2011), povezana sa većom incidencom rane smrti kod naših bolesnika sa AML, što do sada nije publikovano u dostupnoj literaturi.

U celoj grupi naših lečenih bolesnika sa AML, **KR bolesti** posle indukcione terapije postiglo je 79% (123/156) bolesnika, pri čemu smo pokazali da bolesnici AML-MDS imaju najnižu učestalost KR (44%) u poređenju sa tipovima AML-RGP (88%) ($p=0,000$) i AML-NOS (78%) ($p=0,006$), što je u skladu sa podacima iz literature (Hoffman i sar, 2009; Döhner i sar., 2010; Liersch i sar., 2014). Analiza suptipova AML-NOS je takođe pokazala prisustvo značajnih razlika u pogledu učestalosti KR, uz najvišu učestalost u AML sa minimalnom diferencijacijom (100%) i AML sa sazrevanjem (92%), dok je kod svih ostalih suptipova oko dve trećine bolesnika postizalo KR bolesti ($p=0,030$). Analiza suptipova AML-RGP pokazala je da u slučaju APL, AML sa $t(8;21)$, AML sa $inv16/t(16;16)$ i AML sa $CEBPA^{mut}$ svi bolesnici postižu KR, dok je učestalost KR niža u AML sa $NPM1^{mut}$ (71,4%) odnosno odsutna u AML sa $t(v;11q23)$ ($p=0,000$), što odgovara literaturnim podacima (Hoffman i sar, 2009; Döhner i sar., 2010; Liersch i sar., 2014).

Naše ispitivanje potencijalnih prognostičkih faktora za odgovor na indukcionu terapiju u grupi non-APL bolesnika sa AML ($n=131$), pokazalo je da je deo **kliničko-bioloških karakteristika** na prezentaciji AML značajno povezan sa većom incidencom KR, među kojima su vrednost $Le < 30 \times 10^9/l$ ($p=0,030$), viša prosečna vrednost Hb (>95 g/dl) ($p=0,030$), niža prosečna vrednost blasta u pk ($<34\%$ Le) ($p=0,045$), normalan kariotip ($p=0,027$), odsustvo mutacija $FLT3-ITD$ ($p=0,007$), kao i ELN povoljna i srednje povoljna grupa rizika ($p=0,002$). U radovima se između ostalih parametara navodi i starost bolesnika, (≥ 60 god.), kao negativan prediktor odgovora na indukcionu terapiju, pri čemu naši rezultati nisu potvrdili ovaj nalaz. Sa druge strane, mi smo potvrdili navode iz literature u pogledu prediktivne vrednosti za odgovor na terapiju u pogledu nivoa Le, nivoa blasta u pk, kariotipa i molekularno-genetskih karakteristika blasta na prezentaciji AML (Hoffman i sar, 2009; Döhner i sar., 2010; Liersch i sar., 2014).

Analiza **imunofenotipskih karakteristika** populacije leukemijskih blasta naših bolesnika sa AML, pokazala je značajno veću učestalost KR u grupi bolesnika sa relativno većom subpopulacijom $CD38^+$ i $cMPO^+$ blasta, odnosno

manjom subpopulacijom CD123⁺, CD11b⁺, CD4⁺, CD22⁺ blasta ($p < 0,05$). Ekspresija navedenih leukocitnih molekula ukazuje da bolesnici sa AML čiji blasti imaju karakteristike zrelijih mijeloblasta pokazuju bolji odgovor na indukcionu terapiju u odnosu na bolesnike čiji blasti imaju karakteristike monoblasta/CD22⁺. U odnosu na literaturne podatke, u kojima se kao loš prediktor za postizanje KR navodi ekspresija CD34, CD56 ili CD7 molekula na blastima AML, mi u našem ispitivanju nismo potvrdili njihov značaj u tom smislu (Mason i sar., 2006; Hoffman i sar., 2009). Sa druge strane, naši rezultati su saglasni sa navodim iz literature koji ukazuju da je ekspresija "panmijeloidnog fenotipa" (CD13⁺CD33⁺CD117⁺CD65⁺MPO⁺) na blastima AML značajno povezana sa većom incidencom KR u grupi non-APL AML, dok je ekspresija CD11b molekula povezana sa nižom incidencom KR u istoj grupi bolesnika (Mason i sar., 2006).

Literaturni podaci ukazuju da 60% do 70% mlađih bolesnika (<60 god.) posle primene intenzivne postindukcione terapije postiže KR bolesti, ali da 40% do 70% bolesnika relapsira unutar prvih 18 do 24 meseci (Hoffman i sar., 2009). Incidenca **relapsa bolesti** u našoj grupi bolesnika sa AML iznosi 45% (54/120), i znatno je niža u tipu AML-RGP (36%) u poređenju sa AML-NOS (54%) i AML-MDS (57%) ($p > 0,05$). U AML-RGP pojedini entiteti ispoljavaju značajno nižu učestalost relapsa bolesti - AML sa inv16/t(16;16) (0%), APL (12%), AML sa *CEBPA*^{mut} (25%), u poređenju sa entitetima AML sa t(8;21) i AML sa *NPM1*^{mut} (67% svaki) ($p = 0,007$). U AML-NOS pojedini entiteti su takođe ispoljavaju značajno nižu učestalost relapsa bolesti, među kojima AML bez sazrevanja (20%) i Akutna monoblastna/monocitna leukemija (25%) u poređenju sa suptipovima AML sa sazrevanjem (57%), AML sa minimalnom diferencijacijom (75%) i Akutna mijelomonocitna leukemija (83%) ($p = 0,045$).

Faktori koji određuju trajanje KR i pojavu relapsa bolesti u AML, još uvek su kontroverzni i zavise delom i od postindukcione hemioterapije koja je primenjivana u lečenju bolesnika (Hoffman i sar., 2009). Naše ispitivanje potencijalnih prognostičkih faktora za pojavu relapsa u grupi non-APL bolesnika (n=95), pokazalo je da većina ispitivanih kliničko-bioloških i imunoloških

karakteristika nema značajan uticaj na pojavu relapsa bolesti, izuzev veličine CD117⁺ populacije L_C u ks na dg, koja je u proseku veća u grupi bolesnika sa nižom incidencom relapsa bolesti ($p=0,044$), i mutacije *CEBPA* gena ($p=0,037$), čije je prisustvo povezano sa nižom incidencom relapsa bolesti kod naših bolesnika. Do danas je objavljeno vrlo malo radova u kojima je ispitivan prognostički značaj imunofenotipskih karakteristika AML za pojavu relapsa bolesti. U radu Webber i sar, 2008, pokazana je značajna veza između izolovane ekspresije CD34 ili HLA-DR molekula, kao i njihove koekspresije na blastima AML na dg, sa većom incidencom relapsa. U slučaju mutacija *CEBPA* gena kod bolesnika sa AML-NK, pokazano je da prisustvo bialelskih mutacija nosi posebno povoljnu prognozu (Döhner i sar., 2010; Liersch i sar., 2014).

Dužina KR bolesti kod bolesnika sa AML predstavlja jedan od glavnih pokazatelja senzitivnosti leukemijskih ćelija AML na primenjenu standardnu indukcionu terapiju (Hoffman i sar., 2009). U celoj grupi naših bolesnika sa *de novo* AML ($n=120$), medijana trajanja KR je iznosila 12 meseci, pri čemu je prosečno vreme trajanja KR značajno duže u tipu AML-RGP (Me 26 mes.) u poređenju sa AML-NOS (Me 11 mes.) (Log rank, $p=0,016$), dok razlike u pogledu trajanja KR nisu potvrđene između grupa AML-NOS i AML-MDS (Log rank, $p=0,658$).

U našoj grupi bolesnika sa AML-RGP, pokazali smo postojanje značajnih razlika u vremenu trajanja KR, pri čemu je KR trajala značajno duže u APL u poređenju sa AML sa $t(8;21)$ (Log rank, $p=0,000$) i AML sa *NPM1*^{mut} (Log rank, $p=0,000$), pri čemu nije potvrđena značajnost razlike u poređenju sa AML sa *CEBPA*^{mut} (Log rank, $p=0,215$). Procena petogodišnjeg preživljavanja je pokazala najveću učestalost živih bolesnika u APL i AML sa *CEBPA*^{mut} (65,6%), odnosno nižu učestalost u suptipovima AML sa $t(8;21)$ (33,3%) i AML sa *NPM1*^{mut} (9,6%). U grupi bolesnika sa AML-NOS, najkraće prosečno vreme trajanja KR je pokazano u akutnoj mijelomonocitnoj leukemiji u poređenju sa akutnom monoblastnom/monocitnom leukemijom (Log rank, $p=0,000$) odnosno AML sa sazrevanjem (Log rank, $p=0,000$), dok razlike u pogledu trajanja KR nisu

potvrđene kao značajne između akutne monoblastne/monocitne leukemije i AML sa sazrevanjem (Log rank, $p=0,470$).

Naše ispitivanje potencijalnih prognostičkih faktora za **trajanje KR bolesti**, obuhvatilo je grupu od 95 non-APL bolesnika sa AML. Univarijantna analiza uticaja kliničko-hematoloških i bioloških karakteristika na trajanje KR bolesti, nije potvrdila prognostički značaj ni jedne od ispitivanih kliničko-hematoloških i genetskih karakteristika. Sa druge strane, univarijantna analiza uticaja imunofenotipskih karakteristika leukemijskih ćelija AML na trajanje KR bolesti, potvrdila je prognostički značaj nekoliko karakteristika. Naime, mi smo pokazali da je dužina trajanja KR bolesti, značajno veća u grupi bolesnika sa niskim ili srednjim nivoom ekspresije CD45 molekula ($p=0,007$), srednjim ili visokim nivoom ekspresije CD13 molekula ($p=0,030$), odnosno niskim nivoom ekspresije CD64 molekula ($p=0,009$) na populaciji blasta na dg. Molekul CD13 je po svojoj funkciji N-aminopeptidaza, ektoenzim uključen u obradu Ag za prezentaciju, čiji intenzitet ekspresije značajno varira tokom diferencijacije ćelija mijelomonocitne loze, a posebno je povećan na zrelim neutrofilima koji su ušli u proces apoptoze (Ortolani, 2011). Molekul CD64 je visokoafinitetni Fc γ tip I receptor (Fc γ RI) eksprimiran na prekursorima granulocitne i monocitne loze, kao i na zrelim neutrofilima i monocitima, na kojima tokom aktivacije dolazi do njegove izrazito povećane ekspresije što omogućava efikasniju fagocitozu (Ortolani, 2011; Abbas i sar., 2015). Prema literaturnim podacima, ni u jednom radu do sada nisu prikazani rezultati koji se odnose na ispitivanje prognostičkog značaja obrazaca ekspresije molekula CD45, CD13 i CD64 u AML.

U našem radu, univarijantna analiza je pokazala da je dužina KR bolesti značajno kraća u grupi AML bolesnika koji eksprimiraju CD56⁺ ($p=0,011$), CD36⁺ ($p=0,025$), CD11b⁺ ($p=0,026$) i cLizozim⁺ ($p=0,035$) na populaciji blasta na dg. Ekspresija CD36, CD11b i cLizozima definiše monocitnu diferencijaciju leukemijskih blasta (Arber i sar., 2008c; Béné i sar., 2011), koju prema rezultatima našeg ispitivanja, istovremeno karakteriše i visok ili heterogen obrazac ekspresije CD45 molekula. Molekuli CD56, CD36 i CD11b imaju ulogu adhezivnih molekula, koji su uključeni u međućelijsku adheziju i/ili u adheziju

ćelija sa ekstracelularnim matriksom (Ortolani, 2011). Prema literaturnim podacima, ekspresija CD11b na blastima, navodi se kao negativan prognostički parametar trajanja KR u AML (Mason i sar., 2006). Sa druge strane, literaturni podaci uglavnom ne potvrđuju negativan prognostički značaj ekspresije CD56 molekula na blastima AML (Mason i sar., 2006), pri čemu smo mi u ovom ispitivanju, kao i u radu Djunić i sar, 2012, u kome smo izneli preliminarne podatke našeg ispitivanja, potvrdili njegov značaj za kraće trajanje KR u AML.

Primena multivarijantne analize u našem istraživanju, izdvojila je molekul CD45 kao jedini prognostički nezavistan imunofenotipski marker, i to obrazac njegove ekspresije na populaciji blasta. Mi smo pokazali da je ekspresija molekula CD45 prema niskom ili srednjem obrascu na populaciji blasta povezana sa dužim trajanjem KR u poređenju sa visokim ili heterogenim obrascem ekspresije CD45 molekula ($p=0,002$). Prema dostupnim literaturnim podacima, naši rezultati predstavljaju nov nalaz u AML, pri čemu je prognostički značaj obrasca ekspresije CD45 molekula već ispitivan i potvrđen u B-ALL kod dece, gde je pokazano da obrazac ekspresije CD45^{low} na limfoblastima utiče na duže trajanje KR u poređenju sa obrascem CD45^{high} (Nakamura i sar., 2001).

Molekul CD45 je marker ćelija hematopoezne loze (LCA, *engl.* leukocyte common antigen), integralni plazmamembranski glikoprotein sa enzimskom funkcijom protein tirozin fosfataze, čiji je intenzitet ekspresije visoko regulisana tokom diferencijacije ćelija hematopoeznog sistema (Ortolani, 2011). CD45 je eksprimiran kroz osam različitih izoformi koje nastaju alternativnim splajsovanjem, i tokom normalne hematopoeze, intenzitet ekspresije CD45 molekula varira zavisno od ćelijske loze i stepena ćelijske zrelosti. Intenzitet ekspresije CD45 molekula se posebno povećava na neutrofilima nakon G-CSF stimulacije, tokom aktivacije monocita i bazofila (Ortolani, 2011). Na ćelijama mijeloidne loze, molekul CD45 je uključen u supresiju JAK kinaza (*engl.* Janus activated kinases), i posledično u negativnu regulaciju signala koji potiču sa IL3 i drugih citokina i integrina koji povećavaju ćelijsku proliferaciju i aktivaciju (Irie-Sasaki i sar., 2001; Hermiston i sar., 2002). Na taj način CD45 molekul određuje prag senzitivnosti ćelija na ekstracelularne stimuluse (Hermiston i

sar., 2002). Mi pretpostavljamo da leukemijski blasti AML sa visokom ili heterogenom ekspresijom CD45 molekula imaju adaptivnu prednost bilo u smislu većeg proliferativnog potencijala i/ili rezistencije na indukcionu terapiju, što dovodi do kraćeg trajanja kompletne remisije bolesti.

Naše ispitivanje prognostičkih parametara u AML, uključilo je i ispitivanje **ukupnog preživljavanja bolesnika** sa AML koji su lečeni standardnim indukcionim i postindukcionim protokolima. Medijana petogodišnjeg preživljavanja cele grupe naših lečenih bolesnika sa AML, iznosila je šest meseci, uz petogodišnje preživljavanje od 20% bolesnika. U skladu sa literaturnim podacima, mi smo potvrdili značajno duže petogodišnje preživljavanje bolesnika sa AML-RGP u poređenju sa AML-NOS ($p=0,018$) i AML-MDS ($p=0,029$), kao i bolesnika AML-NOS u odnosu na AML-MDS ($p=0,001$) (Hoffman i sar., 2009; Döhner i sar., 2010). U okviru tipa AML-RGP, značajno duže petogodišnje preživljavanje imaju bolesnici entiteta APL, AML sa $t(8;21)$ i AML sa $CEBPA^{mut}$ (Me > 20 mes.) u poređenju sa ostalim entitetima (Me < 4 mes.) ($p<0,05$). U okviru tipa AML-NOS, značajno duže petogodišnje preživljavanje su ispoljili bolesnici subtipova AML sa sazrevanjem i AML sa minimalnom diferencijacijom (Me > 16 mes.), u poređenju sa Akutnom mijelomonocitnom i Akutnom monoblastnom/monocitnom leukemijom (Me < 5 mes.) ($p<0,05$).

Ispitivanje potencijalnih prognostičkih faktora za ukupno preživljavanje bolesnika sa AML ($n=191$), obuhvatilo je osnovne kliničko-hematološke, biološke i imunofenotipske karakteristike bolesnika. Univarijantna analiza **kliničko-bioloških karakteristika** pokazala je da je medijana ukupnog preživljavanja značajno duža u grupi bolesnika mlađih od 60 god. ($p=0,001$), sa prosečnom vrednošću $Le<30 \times 10^9/l$ ($p=0,000$), posebno u slučaju prosečnih vrednosti $Le<4 \times 10^9/l$ ($p=0,008$). Od bioloških parametara, značajno duže ukupno preživljavanje imaju bolesnici sa wt tipom $FLT3$ ($p=0,014$) i $NPM1$ ($p=0,001$) gena. Naši rezultati su u korelaciji sa literaturnim podacima koji potvrđuju visoku značajnost navedenih karakteristika za preživljavanje odraslih bolesnika sa *de novo* AML (Hoffman i sar., 2009; Döhner i sar., 2010).

Univarijantna analiza uticaja imunofenotipskih karakteristika leukemijskih ćelija AML na dužinu ukupnog preživljavanja bolesnika, potvrdila je prognostički značaj nekoliko karakteristika. U grupu povoljnih prognostičkih molekula svrstani su CD19⁺ (p=0,000) i cCD79a⁺ (p=0,031), kao i nekoliko molekula sa specifičnim obrascima ekspresije na populaciji blasta - CD45^{low/med} (p=0,024), CD13^{med} (p=0,013), cMPO^{med} (p=0,027) i CD64^{low} (p=0,039). Sa druge strane, u grupu nepovoljnih prognostičkih molekula svrstani su CD11b⁺ (p=0,000), CD36⁺ (p=0,001), CD14⁺ (p=0,035), CD7⁺ (p=0,045) i CD22⁺ (p=0,028). Mada je naše preliminarno ispitivanje prognostičkog značaja molekula CD56 u AML (Djunic i sar., 2012), pokazalo značajan nazavistan uticaj na ukupno preživljavanje bolesnika, mi u finalnom ispitivanju nismo potvrdili značajnost postojećih razlika između grupe CD56⁺ i CD56⁻ bolesnika u univarijantnoj analizi (p=0,080).

Sledeća multivarijantna analiza prognostičkog značaja grupe parametara selekcionisanih putem univarijantne analize, izdvojila je nekoliko prognostičkih parametara sa nepovoljnim uticajem na dužinu ukupnog preživljavanja odraslih bolesnika sa AML: starost bolesnika ≥ 60 godina (p=0,000), broj $Le \geq 30 \times 10^9/l$ (p=0,033), i ekspresija molekula CD7 (p=0,002), CD22 (p=0,006) i CD34 (p=0,023) na leukemijskim blastima.

Negativan prognostički značaj molekula CD7 i CD34 za ukupno preživljavanje bolesnika sa AML, koji smo pokazali u ovom radu, u korelaciji je sa do sada publikovanim radovima (Schabath i sar, 2003; Repp i sar, 2003; Mason i sar., 2006; Derolf i sar., 2008). Mada potencijalna uloga molekula CD7 u patogenezi AML još uvek nije razjašnjena, poznato je da ovaj molekul na ćelijama T-loze i NK-loze ima ulogu u aktivaciji i regulaciji produkcije citokina, kao i u vezivanju galektina, koji je neophodan za galektin-indukovanu apoptozu (Ortolani, 2011). Sa druge strane molekul CD34 je eksprimiran na MČH i progenitorima mijeloidne loze, i njegova se ekspresija povezuje sa aktiviranim statusom ovih ćelija, kao i sa ulogom u procesima adhezije ovih ćelija sa drugim ćelijama koje se nalaze u njihovoj mikrosredini (Ortolani, 2011).

Prema dostupnim literaturnim podacima, prognostički značaj ekspresije molekula CD22 u AML do sada nije ispitan, tako da naši rezultati predstavljaju originalne i nove podatke o njegovoj ulozi u prognozi kod odraslih bolesnika sa AML. Ekspresija CD22 molekula na ćelijama mijeloidne loze se povezuje sa bazofilima, mijeloidnim dendritskim ćelijama i plazmacitoidnim dendritskim ćelijama (Ortolani, 2011). Uloga CD22 molekula na ćelijama mijeloidne loze nije još uvek razjašnjena, ali je poznato da na ćelijama B-loze učestvuje u prenosu signala koji sprečavaju aktivaciju B-ćelija, vezujući se za ostatke sijalilne kiselina na različitim glikoproteinima (Ortolani, 2011).

VI ZAKLJUČCI

1. IMPC omogućava postavljanje dg AML analizom ks kod 98% bolesnika, i to kao nezavisna dijagnostička metoda. Kvantifikacija populacije leukemijskih blasta posredstvom CD45/SSC diferencijala, pokazala je visoku prosečnu vrednost populacije blasta ks na dg AML (64%), koja je u pozitivnoj linearnoj korelaciji sa vrednošću populacije blasta ks procenjene citomorfološkom metodom (68%) ($r=0,65$, $p=0,000$).

2. Kvantifikacija populacije leukemijskih blasta ks primenom IMPC, manje je precizna ukoliko se za procenu koriste samo CD34 i/ili CD117 molekul, pošto je učestalost njihove ekspresije u našoj grupi AML niža (68% vs. 92%). Pozitivna linearna korelacija u kvantitativnoj proceni je utvrđena samo između vrednosti CD117⁺ populacije ks i populacije leukemijskih blasta ks procenjene na osnovu CD45/SSC diferencijala ($r=0,355$, $p=0,000$).

3. Molekul CD45 je eksprimiran na populaciji leukemijskih blasta svih naših bolesnika sa AML, pri čemu su najučestaliji obrasci ekspresije CD45^{medium} (38%) ili CD45^{low} (28%). Najzastupljeniji tipovi ćelijske granulacije leukemijskih ćelija su SSC^{low} ili SSC^{medium} (~38% svaki), dok je tip heterogene granulacije prisutan kod četvrtine naših bolesnika sa AML.

4. Identifikacija i kvantifikacija populacija ćelija ks primenom CD45/SSC diferencijala na dg AML, pokazala je značajno sniženje populacije granulocitnih prekursora (33% vs. 77% NĆ, $p=0,000$), populacije eozinofila (1,95% vs. 2,84% NĆ, $p=0,000$), i populacije Li (11% vs. 14% NĆ, $p=0,005$) u poređenju sa vrednostima u zdravoj kontrolnoj ks. Populacija B-ćelijskih prekursora ks je detektovana kod trećine bolesnika sa AML na dg i njena vrednost je značajno niža u odnosu na zdravu kontrolnu ks (0,19% vs. 1,42% NĆ, $p=0,000$).

5. Na dg AML, u populaciji Li ks očuvani su relativni odnosi većine subpopulacija Li u poređenju sa zdravom kontrolnom ks. Značajno relativno povećanje

utvrđeno je u slučaju NKT-Li (6,98% vs. 4,55%, $p=0,047$) i NK-Li (11,49% vs. 8,73%, $p=0,051$).

6. Imunofenotipski profil populacije blasta AML na dg karakteriše visoka učestalost ekspresije grupe linijski nespecifičnih hLDM - HLA-DR⁺ CD11a⁺ CD62L⁺ CD38⁺ CD123⁺ CD135⁺ CD117⁺ CD71⁺ ($\geq 80\%$) i grupe ranih mijelomonocitnih diferencijacionih molekula - CD13⁺ CD33⁺ CD114⁺ cCD68⁺ ($\geq 93\%$). Molekuli CD34, cMPO i cLizozim eksprimirani su sa nižom učestalošću ($\sim 70\%$). Kasni mijelomonocitni hLDM, CD15, CD11b, CD11c, CD4, CD64, CD36, CD35, eksprimirani su na populaciji leukemijskih blasta AML sa nižom učestalošću, ($< 60\%$), dok je učestalost ekspresije CD14, CD163, CD24, CD66b, CD16, CD10 i CD41a veoma niska ($< 15\%$).

8. Ekspresija hLDM na populaciji leukemijskih blasta AML na dg je deregulisana, na šta ukazuje prisustvo bar jednog od različitih vidova imunofenotipskih aberacija kod svakog bolesnika. Leukemijski blasti kod 66% bolesnika sa AML pokazuju istovremeno prisustvo četiri, pet ili šest različitih imunofenotipskih aberacija u ekspresiji hLDM.

a) Ispitivanjem ekspresije pet hLDM (CD34, CD117, HLA-DR, CD13, CD33), utvrđeno je da su najučestaliji tipovi imunofenotipskih aberacija atipično povišen (90%) ili atipično snižen (76%) nivo ekspresije bar jednog Ag, dok je učestalost atipičnog odsustva ekspresije (42%) i maturacione asinhronije u ekspresiji Ag (26%) niža.

b) *Ektopična ekspresija* bar jednog od limfoidnih hLDM na populaciji blasta, prisutna je kod 57% bolesnika sa AML. Utvrđena je viša učestalost ekspresije molekula CD56 (29%), CD7 (20%) i CD22 (14%), u odnosu na molekule CD2, CD19, CD5, i cCD79a ($< 10\%$). Pokazana je pozitivna korelacija u ekspresiji molekula cCD79a i CD19 ($r=0,286$, $p=0,000$) i cCD79a i CD22 ($r=0,247$, $p=0,000$). Koekspresija CD19 i CD22 molekula nije registrovana u našoj grupi AML.

9. Populacija granulocitnih pekursora ks kod 55% bolesnika sa AML na dg, pokazuje prisustvo bar jednog od različitih poremećaja, među kojima su

imunofenotipske aberacije u ekspresiji hLDM (CD34⁺, CD135⁺, HLA-DR⁺, CD13^{high}, CD33⁻, CD15^{hetero}, cMPO^{p+}, CD45^{high}), ektopična ekspresija molekula limfoidne loze (CD56, CD7, CD2, CD19), izmenjena ćelijska granulacija i/ili promene u ćelijskom sastavu (akumulacija nezrelijih formi). Prisustvo navedenih poremećaja upućuje da granulocitni prekursori kod ovih bolesnika predstavljaju deo leukemijske populacije ćelija AML.

10. Populacija monocitnih prekursora ks kod 39% bolesnika sa AML na dg, pokazuje prisustvo bar jednog od različitih poremećaja, među kojima su, promene u ćelijskom sastavu (akumulacija nezrelijih formi) i/ili aberantna ekspresija limfoidnih molekula (CD56, CD2, CD24). Prisustvo navedenih poremećaja upućuje da monocitni prekursori kod ovih bolesnika predstavljaju deo leukemijske populacije ćelija AML.

11. Na osnovu imunofenotipskih karakteristika utvrđen je visok stepen heterogenosti populacije LĆ bolesnika na dg AML. Kod 55% bolesnika utvrđeno je istovremeno prisustvo populacije leukemijskih blasta i zrelijih leukemijskih granulocitnih i/ili monocitnih prekursora, kod 34% bolesnika je prisutna populacija leukemijskih blasta sa znacima diferencijacije u pravcu granulocitne i/ili monocitne loze, dok 11% bolesnika ima samo populaciju blasta bez znakova diferencijacije.

12. Upoređivanjem rezultata imunološke i citomorfološke FAB klasifikacije u našoj grupi bolesnika sa AML, kod 66% bolesnika pokazana je potpuna saglasnost u pogledu loze zahvaćene leukemijskim procesom i nivoa diferenciranosti leukemijske populacije, dok je delimična saglasnost utvrđena kod 7% bolesnika. Odsustvo saglasnosti u odnosu na lozu zahvaćenu leukemijskim procesom, utvrđeno je kod 27% bolesnika, pri čemu su prisutne razlike najčešće posledica manje senzitivnosti citomorfološkog metoda u identifikaciji LĆ monocitnog porekla. u poređenju sa IMPC.

13. Potpuna saglasnost između imunološke klasifikacije i finalne dg prema SZO klasifikaciji u našoj grupi bolesnika sa AML, utvrđena je kod 68% bolesnika, pri

čemu je najviši stepen saglasnosti u AML-NOS (96%). Znatno niža saglasnost je utvrđena u slučaju AML-MDS (44%) i AML-RGP (42%), zbog nepostojanja specifičnog imunofenotipskog profila leukemijskih ćelija koji bi ukazao na prisustvo specifičnih citogenetskih i/ili molekularno-genetskih aberacija u njihovom genomu.

14. Tip AML-RGP otkriven je sa učestalošću od 37,4% u našoj grupi bolesnika sa AML. Doprinos imunofenotipske klasifikacije finalnoj dg bolesnika sa AML-RGP najviši je u slučaju APL (100%), AML sa t(8;21) (83%) i AML sa inv16/t(16;16) (40%).

a) Hipergranularnu varijantu APL karakteriše prisustvo populacije zrelih mijeloblasta/promijelocita uz višu ćelijsku granulaciju, dok je hipogranularna varijanta udružena sa koekspresijom CD34 i CD2 molekula.

b) U AML sa t(8;21), populaciju mijeloblasta karakteriše izrazito visoka učestalost ekspresije CD19 molekula, odnosno koekspresija CD19 i cCD79a molekula kod dela bolesnika.

c) U AML sa inv16/t(16;16) populaciju mijelo/monoblasta karakteriše ekspresija CD2 molekula kod dela bolesnika kao i umnožena populacija Eo prekursora u ks.

d) U AML sa *NPM1*^{mut} glavna imunofenotipska karakteristika mijelo/monoblasta je profil - *CD34⁺HLA-DR⁺CD117⁺*. Kod bolesnika sa AML sa *NPM1*^{mut} i zahvaćenom granulocitnom lozom, populacija mijeloblasta ispoljava profil - *CD34⁺HLA-DR⁺CD117⁺*, koji karakteriše i hipergranularnu varijantu APL.

e) U AML sa *CEBPA*^{mut} populaciju mijeloblasta karakteriše izrazito visoka učestalost ekspresije CD7 molekula.

15. Tip AML-MDS otkriven je sa učestalošću od 14,6% u našoj grupi bolesnika sa AML. U AML-MDS populaciju mijeloblasta karakteriše visoka učestalost ektopične ekspresije limfoidnih molekula (68%), posebno CD56, CD7 i CD22. Imunofenotipska dg ima delimičan prediktivni značaj za postavljanje finalne dg AML-MDS (44% slučajeva), s obzirom da nije definisan imunofenotipski profil

blasta specifičan za ovaj entitet. Sa druge strane, visoka učestalost poremećaja u populaciji granulocitnih prekursora (prisustvo hipogranulacije, blok u sazrevanju do neutrofila i imunofenotipske aberacije u ekspresiji hLDM), daju značajan doprinos diferencijalnoj dg ovog tipa AML.

16. Tip AML-NOS je najučestaliji u našoj grupi bolesnika sa AML (48%). Doprinos imunofenotipske klasifikacije finalnoj dg bolesnika sa AML-NOS je visok (84%-100%, zavisno od suptipa).

a) U AML sa minimalnom diferencijacijom leukemijsku populaciju čine mijeloblasti/cMPO^{-/+} sa aberantnom ekspresijom CD22 molekula kod dela bolesnika, koji je često koeksprimiran sa molekulom cCD79a.

b) Akutnu bazofilnu leukemiju karakteriše populacija mijeloblasta sa specifičnim imunofenotipom (CD123^{+med} CD135^{+low} CD22^{+het} CD25⁺ cMPO^{neg} cLizozim^{neg}).

c) AML bez sazrevanja i AML sa sazrevanjem karakteriše populacija mijeloblasta sa niskom učestalošću ektopične ekspresije molekula limfoidne loze, s tim što je u AML sa sazrevanjem i populacija granulocitnih prekursora deo leukemijske populacije.

d) Akutnu mijelomonocitnu leukemiju karakteriše populacija mijelo/monoblasta sa ekspresijom molekula CD56 kod dela bolesnika.

e) U Akutnoj monoblastnoj leukemiji populaciju monoblasta karakteriše aberantna ekspresija bar jednog molekula limfoidne loze (CD22, CD57, CD7), dok u Akutnoj monocitnoj leukemiji glavninu leukemijskih ćelija čine promonociti.

17. Ispitivanje MRB primenom IMPC kod bolesnika sa AML, sprovedeno je primenom jedne (42%) ili dve (58%) kombinacije IFSL po bolesniku. Najučestalije kombinacije IFSL su zasnovane na aberantnoj ekspresiji molekula limfoidne loze (CD7, CD56, CD19, CD22) (46%), na maturacionoj asinhroniji u ekspresiji molekula (CD64, CD15) (27%), ili na aberacijama u obrascima ekspresije leukocinih molekula (CD34/CD117/HLA-DR) (17%).

18. Uzorci ks su senzitivniji u detekciji MRB u poređenju sa uzorcima pk, i posle indukcione i posle konsolidacione terapije, te predstavljaju primarne uzorke za analizu MRB metodologijom IPCM.

19. Primenom metodologije IMPC, pokazana je visoka učestalost MRB kod naših bolesnika sa AML u KR posle lečenja indukcijom (69%) odnosno konsolidacionom terapijom (50%). Ispitivanje prisustva MRB u ks AML bolesnika posle indukcione terapije od primarnog je značaja za selekcionisanje visokorizičnih bolesnika za razvoj relapsa bolesti, s obzirom da je većina bolesnika koji su tokom praćenja razvili relaps bolesti, imala MRB^{poz} status već posle indukcione terapije (82%). Osim toga, prisustvo MRB u ks na nivou $\geq 0,1\%$ NĆ, posle indukcione terapije, svrstava ove bolesnike u grupu visokog rizika za razvoj relapsa bolesti.

20. Samo povećanje pula mijeloidnih progenitora ks/pk bolesnika posle lečenja hemioterapijom, nije pouzdan indikator prisustva LĆ, već može biti posledica regenerativnog procesa u odeljku zdrave hematopoeze.

21. Kod većine bolesnika sa AML posle primene hemioterapije, dolazi do oporavka populacija granulocitnih i monocitnih prekursora kako u odnosu na ćelijski sastav, tako i u odnosu na zastupljenost ovih populacija u ks i pk. Populacija B-prekursora ks je značajno snižena posle indukcione terapije, što ima za posledicu značajno višestruko sniženje populacije B-Li u ks i pk bolesnika i posle indukcione i posle konsolidacione terapije ($p < 0,01$). Spor oporavak posle hemioterapije karakteriše i populaciju NK-Li pk bolesnika sa AML, čija je vrednost značajno snižena posle indukcione i konsolidacione terapije ($p < 0,01$). Ovo ukazuje da bolesnici sa AML u periodu regeneracije ks imaju sniženu imunokompetentnost u pogledu humoralne i urođene NK imunosti, te da zahtevaju praćenje i primenu profilakse.

22. Pojava rane smrti u našoj grupi bolesnika sa AML je visoka (31%), i povezana je sa prisustvom specifičnih kliničko-bioloških karakteristika ($Le \geq 30 \times 10^9/l$, LDH > 2000 U/l, blasti pk $> 55\%$ Le, blasti ks $> 70\%$ NĆ, FLT3-

d835^{mut}, NPM1^{mut}) ($p < 0,05$), kao i sa prisustvom specifičnih imunofenotipskih karakteristika populacije blasta - rana monocitna diferencijacija i ekspresija CD22 molekula (CD11b⁺/CD11a⁺/CD36⁺/CD117^{p+}/cMPO^{p+}/CD22⁺) ($p < 0,05$).

23. Veća incidenca KR povezana je sa prisustvom specifičnih kliničko-bioloških karakteristika ($Le < 30 \times 10^9/l$, Hb > 95 g/dl, blasti $pk < 34\%$ Le, normalan kariotip, odsustvo mutacija *FLT3*-ITD, ELN povoljna i srednje povoljna grupa rizika) ($p < 0,05$), kao i sa odsustvom imunofenotipskih karakteristika monocitne diferencijacije i niskom ekspresijom CD22 molekula na populaciji blasta (CD38⁺/cMPO⁺/CD123^{p+}/CD11b^{p+}/CD4^{p+}/CD22^{p+}) ($p < 0,05$).

24. Incidenca relapsa bolesti u našoj grupi bolesnika sa AML iznosi 45%, i ne razlikuje se značajno između različitih tipova AML. Niža učestalost relapsa bolesti značajno je povezana sa prisustvom veće populacije CD117⁺ LČ u ks na dg ($p = 0,044$) i prisustvom mutacija u *CEBPA* genu ($p = 0,037$).

25. Univarijantna analiza je kao prognostičke parametre koji utiču na duže trajanje KR, izdvojila ekspresiju grupe leukocitnih molekula prema specifičnim obrascima na leukemijskim blastima (CD45^{low/med}, CD13^{med/high} i CD64^{low}) ($p < 0,05$). Pritom su izdvojeni i parametri koji utiču na kraće trajanje KR, među kojima su ekspresija grupe monocitnih diferencijacionih molekula (CD36⁺/CD11b⁺/cLizozim⁺) ($p < 0,05$) i ekspresija CD56 molekula ($p < 0,05$) na populaciji blasta. Multivarijantna analiza je izdvojila obrazac ekspresije molekula CD45^{low/med}, kao jedini prognostički nezavistan imunofenotipski marker povezan sa dužim trajanjem KR kod bolesnika sa AML ($p = 0,002$).

26. Multivarijantna analiza je izdvojila nekoliko nezavisnih prognostičkih parametara koji utiču na kraće ukupno preživljavanje bolesnika sa AML: starost bolesnika ≥ 60 god. ($p = 0,000$), broj $Le \geq 30 \times 10^9/l$ ($p = 0,033$), ekspresija molekula CD7 ($p = 0,002$), CD22 ($p = 0,006$) i/ili CD34 ($p = 0,023$) na leukemijskim blastima.

VII LITERATURA

Abbas AK, Lichtman HA, Pillai S. Cellular and Molecular Immunology, 8th Edition (2015), Saunders/Elsevier, Philadelphia, USA

Albano F, Mestice A, Pannunzio A, Lanza F, Martino B, Pastore D *et al.* The biological characteristics of CD34⁺ CD2⁺ adult acute promyelocytic leukemia and the CD34⁻ CD2⁻ hypergranular (M3) and microgranular (M3v) phenotypes. *Haematologica* 2006;91:311-316.

Alhan C, Westers TM, Cremers EMP, Cali C, Witte BI, Ossenkoppele GJ, van de Loosdrecht. High flow cytometric scores identify adverse prognostic subgroups within the revised international prognostic subgroups within the revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *British Journal of Haematology* 2014;167:100-109.

Al-Mawali A, Gillis D, Lewis I. The Use of Receiver Operating Characteristic Analysis for Detection of Minimal Residual Disease Using Five-Color Multiparameter Flow Cytometry in Acute Myeloid Leukemia Identifies Patients with High Risk of Relapse. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)* 2009a;76B:91-101.

Al-Mawali A, Gillis D, Lewis I. The role of multiparameter flow cytometry for detection of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *American Journal of Clinical Pathology* 2009b;131: 16-26.

Arber DA, Brunning RD, Le Beau MM, Falini B, Vardiman JW, Porwit A, Thiele J, Bloomfield CD. Acute myeloid leukemia with recurrent genetic abnormalities. In: WHO classification of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues Edited by Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW. (Eds): IARC: Lyon 2008a.

Arber DA, Brunning RD, Orazi A, Bain B, Porwit A, Vardiman JW, Le Beau MM, Greenberg PL. Acute myeloid leukaemia with myelodysplasia-related changes. In: WHO classification of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues Edited by Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW. (Eds): IARC: Lyon 2008b.

Arber DA, Brunning RD, Orazi A, Porwit A, Peterson L, Thiele J, Le Beau MM. Acute myeloid leukaemia, not otherwise specified. In: WHO classification of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues Edited by Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW. (Eds): IARC: Lyon 2008c.

Arnoulet C, Bene MC, Durrieu F, Feuillard J, Fossat C, Husson B, Jouault H, Maynadie M, Lacombe F. Four- and five-color flow cytometry analysis of leukocyte differentiation pathways in normal bone marrow: A reference document based on a systematic approach by the GTLLF and GEIL. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)* 2010;78B:3-10.

Ayar SP, Ravula S, Polski JM. Granulocyte, monocyte and blast immunophenotype abnormalities in acute myeloid leukemia with myelodysplasia-related changes. *Annals of Clinical & Laboratory Science* 2014;44:3-9.

Baer MR, Stewart CC, Dodge RK, Leget G, Sulé N, Mrózek K, et al. High frequency of immunophenotype changes in acute myeloid leukemia at relapse: implications for residual disease detection (Cancer and Leukemia Group B Study 8361). *Blood* 2001;97:3574-3580.

Bain BJ, Barnett D, Linch D, Matutes E, Reilly JT. Revised guideline on immunophenotyping in acute leukaemias and chronic lymphoproliferative disorders. *Clin. Lab. Haem.* 2002;24:1-13.

Béné MC, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A, van't Veer MB. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). Proposals for the immunological classification of acute leukemias. *Leukemia* 1995;9:1783-1786.

Béné MC, Bernier M, Casasnovas RO, Castoldi G, Knapp W, Lanza F, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A, Sperling C, van't Veer MB for the European Group for the Immunological Characterization of Leukaemias (EGIL). The reliability and specificity of c-kit for the diagnosis of acute myeloid leukemias and undifferentiated leukemias. *Blood* 1998;92:596-599.

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.

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.

Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick HR, Sultan C. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia: A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med* 1985;103:620-629.

Benthaus T, Schneider F, Mellert G, Zellmeier E, Schneider S, Kakadia PM, Hiddemann W, Bohlander SK, Feuring-Buske M, Braess J, Spiekerman K and Dufour A. Rapid and sensitive screening for CEBPA mutations in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 143;230-239,2008.

Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature Medicine* 1997;3:730-737.

Borowitz MJ, Guenther KL, Shults KE, Stelzer GT. Immunophenotyping of acute leukemia by flow cytometric analysis – Use of CD45 and right-angle scatter to gate on leukemic blasts in three-color analysis. *American Journal of Clinical Pathology* 1993; 100:534-540.

Boultonwood J, Wainscoat JS. Gene silencing by DNA methylation in haematological malignancies. *British Journal of Haematology* 2007;138:3-11.

Boyum A. Separation of leucocytes from blood and bone marrow. *Scandinavian Journal of Clinical Investigation* 1968; 21:77, suppl. 97.

Breccia M, Avvisati G, Latagliata R, Carosino I, Guarini A, De Propriis MS *et al.* Occurrence of thrombotic events in acute promyelocytic leukemia correlates with consistent immunophenotypic and molecular features. *Leukemia* 2007;21:79-83.

Bromberg JEC, Breems DA, Kraan J, Bikker G, van der Holt B, Smitt PS, van den Bent MJ, van't Veer M, and Gratama JW. CSF flow cytometry greatly improves diagnostic accuracy in CNS hematologic malignancies. *Neurology* 2007; 68:1674-1679.

Brooimans RA, Kraan J, van Putten W, Cornelissen JJ, Lowenberg B, Gratama JW. Flow cytometric differential of leukocyte populations in normal bone marrow: Influence of peripheral blood contamination. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)* 2009;76B:18-26.

Buccisano F, Maurillo L, Spagnoli A, Del Principe MI, Fraboni D, Panetta P et al. Cytogenetic and molecular diagnostic characterization combined to postconsolidation minimal residual disease assessment by flow cytometry improves risk stratification in adult acute myeloid leukemia. *Blood* 2010;116:2295-2303.

Buccisano F, Maurillo L, Del Principe MI, Del Poeta G, Sconocchia G, Lo-Coco F, Arcese W, Amadori S, Venditti A. Prognostic and therapeutic implications of minimal residual disease detection in acute myeloid leukemia. *Blood* 2012;119:332-341.

Bug G, Anargyrou K, Tonn T, Biallec H, Seifried E, Hoelzer D, Ottmann OG. Impact of leukapheresis on early death rate in adult acute myeloid leukemia presenting with hyperleukocytosis. *TRANSFUSION* 2007;47:1843-1850.

Burnett AK. Treatment of acute myeloid leukemia: are we making progress? *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* 2012;120:1-6.

Buzyn A, Petit F, Ostankovitch M, Figueiredo S, Varet B, Guillet JG, Ameisen JC, Estaquier J. Membrane-Bound Fas (Apo-1/CD95) Ligand on Leukemic Cells: A Mechanism of Tumor Immune Escape in Leukemia Patients. *Blood* 1999;94:3135-3140.

Campana D, Coustan-Smith E. Detection of minimal residual disease in acute leukemia by flow cytometry. *Cytometry (Communications in Clinical Cytometry)* 1999;38:139-152.

Campos L, Ffrench M, Guyotat D. Myeloid differentiation antigens identify leukemic cell subpopulations with different cell cycle characteristics. *Leukemia* 1990;4:60-62.

Casasnovas RO, Slimane FK, Garand R, Faure GC, Campos L, Deneys V, Bernier M, Falkenrodt A, Lecalvez G, Maynadié M, Béné MC. Immunological classification of acute myeloblastic leukemias: relevance to patient outcome. *Leukemia* 2003;17:515-527.

Cerny J, Yu H, Ramanathan M, Raffel GD, Walsh WV, Fortier N, et al. Expression of CD25 independently predicts early treatment failure of acute myeloid leukaemia (AML). *British Journal of Haematology* 2013;160:255-272.

Chan WI, Huntly BJ. Leukemia stem cells in acute myeloid leukemia. *Seminars in Oncology* 2008;35:326-335.

Chang H, Salma F, Yi QL, Patterson B, Brien B, Minden MD. Prognostic relevance of immunophenotyping in 379 patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia Research* 2004;28:43-48.

Chen CY, Chou WC, Tsay W, Tang JL, Yao M, Huang SY, Tien HF. Hierarchical cluster analysis of immunophenotype classifies AML patients with *NPM1* gene mutation into two groups with distinct prognosis. *BMC Cancer* 2013;13:107-115.

Cheson BD, Bennett JM, Kopecky et al. Revised recommendations of the International Working Group for diagnosis, standardization of response criteria, treatment outcomes, and responding standards for therapeutic trials in acute myeloid leukemia. *Journal of Clinical Oncology* 2003;21:4642-4649.

Clamp M, Fry B, Kamal M, Xie X, Cuff J, Lin MF, Kellis M, Lindblad-Toh K, Lander ES. Distinguishing protein-coding and noncoding genes in the human genome. *Proceedings of National Academy of Sciences USA* 2007;104:19428-19433.

Campana D, Coustan-Smith E. Detection of minimal residual disease in acute leukemia by flow cytometry. *Cytometry (Communications in Clinical Cytometry)* 1999;38:139-152.

Chu SC, Wang TF, Su YC, Kao RH, Wu YF, Li DK, Li SC, Li CC, Wells DA, Loken MR. Prognostic significance of flow cytometric residual disease, dysregulated neutrophils/monocytes, and hematogones in adult acute myeloid leukemia in first remission. *International Journal of Hematology* 2014;99:296-304.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) document H42-A2 – Enumeration of Immunologically Defined Cell Populations by Flow Cytometry; Approved Guideline – Second Edition. CLSI document H42-A2, 2007.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Clinical flow cytometric analysis of neoplastic hematolymphoid cells; Approved Guideline – Second edition. CLSI document H43-A2, 2007.

Colmone A, Amorim M, Pontier AL, Wang S, Jablonski E, Sipkins DA. Leukemic cells create bone marrow niches that disrupt the behavior of normal progenitor cells. *Science* 2008;322:1861-1865.

Coustan-Smith E and Campana D, Should evaluation for minimal residual disease be routine in acute myeloid leukemia? *Current Opinion in Hematology* 2013;20:86-92.

Craig FE and Foon KA. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. *Blood* 2008;111:3941/3967.

Creutzig U, van den Heuvel-Eibrink MM, Gibson B, Dworzak MN, Adachi S, de Bont E *et al.* Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in children and adolescents: recommendations from an international expert panel. *Blood* 2012;120:3187-3205.

Cruse JM, Lewis RF, Pierce S, Lam J, Tadros Y. Aberrant expression of CD7, CD56, and CD79a antigens in acute myeloid leukemias. *Experimental and Molecular Pathology* 2005;79:39-41.

Čolović M, Janković G. *Maligne bolesti krvi* (1999). Izdavač Zavod za udžbenike i nastavna sredstva Beograd

Dash A, Gilliland DG. Molecular genetics of acute myeloid leukaemia. *Best Practice and Research in Clinical Haematology* 2001;14:49-64.

Davis BH, Holden JT, Béné MC, Borowitz MJ, Braylan RC, Cornfield D, Gorczyca W, Lee R, Maiese R, Orfao A, Wells D, Wood BL, and Stetler-Stevenson M. 2006 Bethesda international consensus recommendations on the flow cytometric immunophenotypic analysis of hematology neoplasia: Medical indications. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)* 2007;72B:S5-S13.

De Figueiredo-Pontes LL, Pintao MCT, Oliveira LCO, Dalmazzo LFF, Jacomo RH, Garcia AB, Falcao RP, Rego EM. Determination of P-glycoprotein, MDR-related protein 1, Breast cancer resistance protein, and Lung-resistance protein expression in leukemic stem cells of acute myeloid leukemia. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)* 2008;74B:163-168.

Dekking E, van der Velden VHJ, Böttcher S, Brüggemann M, Sonneveld E, Koning-Goedheer A *et al.* Detection of fusion genes at the protein level in leukemia patients via the flow cytometric immunobead assay. *Best Practice & Research Clinical Haematology* 2010;23:333-345.

Del Vecchio L, Brando B, Lanza F, Ortolani C, Pizzolo G, Semenzato G, Basso G. Recommended reporting format for flow cytometry diagnosis of acute leukemia. *Haematologica* 2004;89:594-598.

Derolf AR, Björklund E, Mazur J, Björkholm M, Porwit A. Expression patterns of CD33 and CD15 predict outcome in patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia & Lymphoma* 2008;49:1279-1291.

Di Noto R, Mirabelli P, Del Vecchio L. Flow cytometry analysis of acute promyelocytic leukemia: the power of surface hematology. *Leukemia* 2007;21:4-8.

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

Döhner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, Burnett K, Dombret H, Fenaux P, Grimwade D, Larson RA, Lo-Coco F, Naoe T, Niederwieser D, Ossenkoppele GJ, Sanz MA, Tallman M.S, Löwenberg B, and Bloomfield CD. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* 2010;115:453-474.

Döhner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD. Acute Myeloid Leukemia. *The New England Journal of Medicine* 2015;373:1136-1152.

Dunphy CH. Applications of flow cytometry and immunohistochemistry to diagnostic hematopathology. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2004;128:1004-1022.

Engel P, Boumsell L, Balderas R, Bensussan A, Gattei V, Horejsi V, Jin BQ, Malavasi F, Mortari F, Schwartz-Albiez R, Stockinger H, van Zelm MC, Zola H, Clark G. CD Nomenclature 2015: Human Leukocyte Differentiation Antigen Workshops as a Driving Force in Immunology. *Journal of Immunology* 2015;195:4555-4563.

Estey EH. Acute myeloid leukemia: 2012 update on diagnosis, risk stratification, and management. *American Journal of Hematology* 2012;87:90-99.

Eppert K, Takenaka K, Lechman ER, Waldron L, Nilsson B, van Galen P et al. Stem cell gene expression programs influence clinical outcome in human leukemia. *Nature Medicine* 2011;17:1086-1093.

EuroFlow a Division of European Scientific Foundation of Laboratory Hemato Oncology. Detailed EuroFlow standard operating procedures (SOPs) for sample preparation and staining. www.euroflow.org.

European Group for the Immunological Characterization of Leukaemias (EGIL): Bene MC, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A, van't Veer MB. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. *Leukemia* 1995;9:1783-1786.

European LeukemiaNet - ELN – WP10 – Consensual recommendations on preanalytical precautions for the immunophenotyping of leukemia and immunoproliferative disorders. 2005a. www.leukemia-net.org<M.BENE,WP10>

European LeukemiaNet - ELN – WP10 – Consensual European immunophenotyping panels for leukemia. 2005b. www.leukemia-net.org<M.BENE,WP10>

European LeukemiaNet – ELN – WP10 – Antibody combinations and flow cytometry. 2007. www.leukemia-net.org<M.BENE,WP10>

FACSCalibur System User's Guide 02-61760-02. BD Biosciences (1996).

Falini B, Meccuci C, Tiacci E, Alcalay M, Rosati R, Pasqualucci L, et al. Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *New England Journal of Medicine* 2005;352:254-266.

Falini B, Nicoletti I, Martelli MF, Mecucci C. Acute myeloid leukemia carrying cytoplasmic/mutated nucleophosmin (NPMc+ AML): biologic and clinical features. *Blood* 2007;109:874-885.

Falini B, Martelli MP, Bolli N, Sportoletti P, Liso A, Tiacci E, Haferlach T. Acute myeloid leukemia with mutated nucleophosmin (*NPM1*): is it a distinct entity? *Blood* 2011;117:1109-1120.

Faucher JL, Lacronique-Gazaille C, Frebét E, Trimoreau F, Donnard M, Bordessoule D, Lacombe F, Feuillard J. "6 Markers/5 Colors" Extended white blood cell differential by flow cytometry. *Cytometry Part A* 2007;71A:934-944.

Ferrara F, Schiffer CA. Acute myeloid leukaemia in adults. *Lancet* 2013;381:484-495.

Gönen M, Sun Z, Figueroa ME, Patel JP, Abdel-Wahab, Racevskis J, et al. CD25 expression status improves prognostic risk classification in AML independent of established biomarkers: ECOG phase 3 trial, E1900. *Blood* 2012;120:2297-2306.

Hawkins CJ, Vaux DL. The role of the Bcl-2 family of apoptosis regulatory proteins in the immune system. *Seminars in Immunology* 1997;9:25-33.

Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, Furie B, Silberstein LE, McGlave P, Heslop HE, photomicrograph editor, Anastasi J. *Hematology: Basic Principles and Practice*, 5th edition (2009). Churchill Livingstone, An Imprint of Elsevier Inc.

Hokland P, Ommen HB, Guldborg Nyvold, Stidsholt Roug A. Sensitivity of minimal residual disease in acute myeloid leukaemia in first remission –

methodologies in relation to their clinical situation. *British Journal of Haematology* 2012;158:569-580.

Hrušák O, Porwit-MacDonald A. Antigen expression patterns reflecting genotype of acute leukemias. *Leukemia* 2002;16:1233-1258.

<http://hcdm.org>

Huang S, Terstappen LWMM. Lymphoid and myeloid differentiation of single human CD34⁺, HLA-DR⁺, CD38⁻ hematopoietic stem cells. *Blood* 1994;83:1515-1526.

Jan M, Snyder JM, Corces-Zimmerman NR, Vys P, Weissman IL, Quake SR, Majeti R. Clonal evolution of preleukemic hematopoietic stem cells precedes human acute myeloid leukemia. *Science Translational Medicine* 2012;4:149ra118.

Jaso JM, Wang SA, Jorgensen JL, Lin P. Multi-color flow cytometric of minimal residual disease. *Bone Marrow Transplantation* 2014;49:1129-1138.

Kern W, Voskova D, Schoch C, Hiddemann W, Schnittger S, Haferlach T. Determination of relapse risk based on assessment of minimal residual disease during complete remission by multiparameter flow cytometry in unselected patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2004;104:3078-3085.

Kern W, Schoch C, Haferlach T, Schnittger S. Monitoring of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 2005;56:283-309.

Kiyoi H, Naoe T, Yokota S. Internal tandem duplication of FLT3 associated with leukocytosis in acute promyelocytic leukemia. *Leukemia* 1997;11:1447-1452.

Kraan J, Gratama JV, Haioun C, Orfao A, Plonquet A, Porwit A, Quijano S, Stetler-Stevenson M, Subira D, and Wilson W. Flow cytometric immunophenotyping of cerebrospinal fluid. *Current Protocols in Cytometry* 2008;6.25.1-6.25.16.

Krutzik PO, Irish JM, Nolan GP, Perez OD. Analysis of protein phosphorylation and cellular signaling events by flow cytometry: techniques and clinical applications. *Clinical Immunology* 2004;110:206-221.

Lacombe F, Durrieu F, Briaux A, Dumain P, Belloc F, Bascans E, Reiffers J, Boisseau MR, Bernard P. Flow cytometry CD45 gating for immunophenotyping of acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1997;11:1878-1886.

Lacombe F, Arnoulet C, Maynadié M, Lippert E, Luquet I, Pigneux A, Vey N, Casasnovas O, Witz F, Béné MC. Early clearance of peripheral blasts measured by flow cytometry during the first week of AML induction therapy as a new independent prognostic factor: a GOELAMS study. *Leukemia* 2009;23:350-357.

Lane SW, Scadden DT, Gilliland DG. The leukemic stem cell niche-current concepts and therapeutic opportunities. *Blood* 2009;114:1150-1157.

Langebrake C, Brinkmann I, Teigler-Schlegel A, Creutzig U, Griesinger F, Puhmann U, Reinhardt D. Immunophenotypic differences between diagnosis and relapse in childhood AML: Implications for MRD monitoring. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)* 2005;63B:1-9.

Lee SH, Erber WN, Porwit A, Tomonaga M, Peterson LC, for the International Council for Standardization in Hematology. ICSH guidelines for the standardization of bone marrow specimens and reports. *International Journal of Laboratory Hematology* 2008;30:349-364.

Leroy H, Roumier C, Huyghe P, Biggio V, Fenaux P, Preudhomme C. CEBPA point mutations in hematological malignancies. *Leukemia* 2005;19:329-334.

Ley TJ, Miller C, Ding L, Raphael BJ, Mungall AJ, Robertson AG *et al.* Genomic and Epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *The New England Journal of Medicine* 2013;368:2059-2074.

Lichtman MA, Segel GB. Uncommon phenotypes of acute myelogenous leukemia: Basophilic, mast cell, eosinophilic, and myeloid dendritic cell subtypes: A review. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 2005;35:370-383.

Liersch R, Müller-Tidow C, Berdel WE, Krug U. Prognostic factors for acute myeloid leukaemia in adults – biological significance and clinical use. *British Journal of Haematology* 2014;165:17-38.

Lin LI, Chen CY, Lin DT, Tsay W, Tang JL, Yeh YC, Shen HL, Su FH, Yao M, Huang SY, Tien HF. Characterization of CEBPA Mutations in Acute Myeloid Leukemia: Most patients with CEBPA mutations have biallelic mutations and show a distinct immunophenotype of the leukemic cells. *Clinical Cancer Research* 2005;11:1372-1379.

Lucas D, Chow A, Frenette PS. Neural and immune regulation of the hematopoietic stem cell niche. *Hematology Education: the education program for the annual congress of the European Hematology Association* 2011;5:140-145.

Maecker HT, McCoy JP, Nussenblatt R. Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project. *Nature Reviews Immunology* 2012;12:191-200.

Majeti R, Chao MP, Alizadeh AA, Pang WW, Jaiswal S, Gibbs KD, van Rooijen N, Weissman IL. CD47 is an adverse prognostic factor and therapeutic antibody target on human acute myeloid leukemia stem cells. *Cell* 2009;138:286–299.

Matesanz-Isabel J, Sintes J, Llinàs L, de Salort J, Lázaro A, Engel P. New B-cell CD molecules. *Immunology Letters* 2011;134:104–112.

Mason KD, Juneja SK, Szer J. The immunophenotype of acute myeloid leukemia: is there a relationship with prognosis? *Blood Reviews* 2006;20:71-82.

Matarraz S, Almeida J, Flores-Montero J, Lecomte Q, Guerri V, Lopez A, Barrena S, Van der Velden VHJ, Te Marvelde JG, Van Dongen JJM, Orfao A. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)* 2015; DOI: 10.1002/cyto.b.21219.

Mattison RJ, Luger SM, Lazarus HM. New strategies for the evaluation of the nadir bone marrow following induction in acute myeloid leukemia. *Current Opinion in Hematology* 2013;20:93-99.

Mead AJ, Linch DC, Hills RK, Wheatley K, Burnett AK, Gale RE. FLT3 tyrosine kinase domain mutations are biologically distinct from and have a significantly more favorable prognosis than FLT3 internal tandem duplications in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2007;110:1262-1270.

Metcalf D. Concise Review: Hematopoietic Stem Cells and Tissue Stem Cells: Current Concepts and Unanswered Questions. *Stem Cells* 2007;25:2390 –2395.

Montesinos P, Rayón C, Vellenga E, Brunet S, González J, González M et al. On behalf of the PETHEMA and HOVON Groups. Clinical significance of CD56 expression in patients with acute promyelocytic leukemia treated with all-*trans* retinoic acid and anthracycline-based regimens. *Blood* 2011;117:1799-1805.

Morris JC, Waldmann TA. Antibody-based therapy of leukaemia. *Expert Reviews in Molecular Medicine* 2009;11:1-25.

Mrózek K, Prior TW, Edwards C, et al. Comparison of cytogenetic and molecular genetic detection of t(8;21) and inv(16) in a prospective series of adults with de novo acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. *Journal of Clinical Oncology* 2001;19:2482-2492.

Mrózek K, Heerema NA, Bloomfield CD. Cytogenetics in acute leukemia. *Blood Rev* 2004;18:115-136.

Novak A, Kruskić M, Ludoški M, Jurukovski V. Rapid method for obtaining high-quality chromosome banding in the study of hematopoietic neoplasia. *Cancer Genet Cytogenet.* 1994;74:109-114.

Olaru D, Campos L, Flandrin P, Nadal N, Duval A, Chautard S, Guyotat D. Multiparametric analysis of normal and postchemotherapy bone marrow: Implication for the detection of leukemia-associated immunophenotypes. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)* 2008;74B:17-24.

Orfao A, Lopez A, Flores J, Almeida J, Vidriales B, Perez J, Kneba M, Macintyre E, Parreira A, Richards S, Szczepansky T, Trka J, van der Velden VHJ, van Dongen JJM. Diagnosis of hematological malignancies: new applications for flow cytometry. *Hematology (EHA Educ Program)* 2006;2:6-13.

Orfao A, Schmitz G, Brando B, Ruiz-Arguelles A, Basso G, Braylan R *et al.* Clinically useful information provided by the flow cytometric immunophenotyping of hematological malignancies: Current status and future directions. *Clinical Chemistry* 1999;45:1708-1717.

Ortolani C. Flow cytometry of hematological malignancies, eds (2011). A John Wiley & Sons, Ltd., Publication.

Oste C. Polymerase chain reaction. *Biotechniques* 1988;6:162-6.

Paietta E. How to optimize multiparameter flow cytometry for leukaemia/lymphoma diagnosis. *Best Practice & Research Clinical Haematology* 2003;16:671-683.

Paietta E. Surrogate marker profiles for genetic lesions in acute leukemias. *Best Practice & Research Clinical Haematology* 2010;23:359-368.

Paietta E. Minimal residual disease in acute myeloid leukemia: coming of age. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* 2012;120:35-42.

Parkin B, Ouilllette P, Li Y, Keller J, Lam C, Roulston D, Li C, Shedden K, Malek SN. Clonal evolution and devolution after chemotherapy in adult acute myelogenous leukemia. *Blood* 2013;121:369-377.

Pedersen-Bjergaard J, Andersen MK, Andersen MT, Christiansen DH. Genetics of therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2008;22:240-248.

Prokocimer M, Unger R, Rennert HS, Rotter V, Rennert G. Pooled analysis of p53 mutations in hematological malignancies. *Human Mutations* 1998;12:4-18.

Ratei R, Karawajew L, Lacombe F, Jagoda K, Poeta GD, Kraan J, De Santiago M, Kappelmayer J, Bjorklund E, Ludwig WD, Gratama JW, Orfao A. For the European Working Group of Clinical Cell Analysis (EWGCCA). Discriminant function analysis as decision support system for the diagnosis of acute leukemia with a minimal four color screening panel and multiparameter flow cytometry. *Leukemia* 2007;21:1204-1211.

Reff ME, Hariharan K, Braslawsky G. Future of Monoclonal Antibodies in the Treatment of Hematologic Malignancies. *Cancer Control* 2002;9:152-166.

Repp R, Schaekel U, Helm G, Thiede C, Soucek S, Pascheberg U, et al. On behalf of the AML-SHG Study Group. Immunophenotyping is an independent factor for risk stratification in AML. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)* 2003;53B:11-19.

Riether C, Schürch CM, Ochsenbein AF. Regulation of hematopoietic and leukemic stem cells by the immune system. *Cell Death and Differentiation* 2015;22:187-198.

Roboz GJ, Guzman M. Acute myeloid leukemia stem cells: Seek and destroy. *Expert Review of Hematology* 2009;2:663-672.

Rosen JM, Jordan CT. The Increasing Complexity of the Cancer Stem Cell Paradigm. *Science* 2009;324:1670-1673.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of National Academy of Sciences USA* 1977;74:5463-5467.

Sanz MA, Grimwade D, Tallman MS, Lowenberg B, Fenaux P, Estey EH, Naoe T, Lengfelder E, Büchner T, Döhner H, Burnett AK, and Lo-Coco F. Management of acute promyelocytic leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* 2009;113:1875-1891.

Schabath R, Ratei R, Ludwig WD. The prognostic significance of antigen expression in leukaemia. *Best Practice & Research Clinical Haematology* 2003;16:613-628.

Schoofs T, Müller-Tidow C. DNA methylation as a pathogenic event and as a therapeutic target in AML. *Cancer Treatment Reviews* 2011;37:S13-S18.

Schubert M, Herbert N, Taubert I, Ran D, Singh R, Eckstein V, Vitacolonna M, Ho AD, and Zoller M. Differential survival of AML subpopulations in NOD/SCID mice. *Experimental Hematology* 2011;39:250-263.

Shaffer LG, Slovak ML, Campbell LJ, editors. *ISCN (2009): An International System for Human Cytogenetics Nomenclature*. S.Karger, Basel. 2009.

Somervaille TCP, Cleary ML. Mutant CEBPA: Priming Stem Cells for Myeloid Leukemogenesis. *Cell* 2009;5:453-454.

Sorrer 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;106:2912-2919.

Stachurski D, Smith BR, Pozdnyakova O, Andersen M, Xiao Z, Raza A, Woda BA, Wang SA. Flow cytometric analysis of myelomonocytic cells by a pattern recognition approach is sensitive and specific in diagnosing myelodysplastic syndrome and related marrow diseases: Emphasis on a global evaluation and recognition of diagnostic pitfalls. *Leukemia Research* 2008;32:215-224.

Stucki A, Rivier AS, Gikic M, Monai N, Schapira M, Spertini O. Endothelial cell activation by myeloblasts: molecular mechanisms of leukostasis and leukemic cell dissemination. *Blood* 2001;97:2121-2129.

Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, and Vardiman JW, eds (2008). *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Lyon, IARC.

Szczepansky T, van der Velden VHJ, van Dongen JJM. Classification systems for acute and chronic leukaemias. *Best Practice & Research Clinical Haematology* 2003;16:561-582.

Szczepansky T, van der Velden VHJ, van Dongen JJM. Flow cytometric immunophenotyping of normal and malignant lymphocytes. *Journal of Laboratory Medicine* 2006;30:370-392.

Tenen DG. Disruption of differentiation in human cancer: AML shows the way. *Nat Rev Cancer* 2003;3:89-101.

Terstappen LWMM, Loken MR. Myeloid cell differentiation in normal bone marrow and acute myeloid leukemia assessed by multi-dimensional flow cytometry. *Analytical Cellular Pathology* 1990;2:229-240.

Terstappen LWMM, Safford M, Könemann S, Loken MR, Zurlutter K, Büchner T, Hiddemann W, and Wörman B. Flow cytometric characterization of acute myeloid leukemia, part II. Phenotypic heterogeneity at diagnosis. *Leukemia* 1991;5:757-767.

Terwijn M, van Putten LJ, Kelder A, van der Velden VHJ, Brooimans RA, Pabst T, et al. High prognostic impact of flow cytometric minimal residual disease detection in acute myeloid leukemia: Data from the HOVON/SAKK AML 42A Study. *Journal of Clinical Oncology* 2013;31:3889-3897.

Van de Loosdrecht AA, Alhan C, Béné MC, Della Porta MG, Dräger AM, Feuillard J *et al.* Standardization of flow cytometry in myelodysplastic syndromes: report from the first European LeukemiaNet working conference on flow cytometry in myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 2009;94:1124-1134.

Van Dongen JJ, Lhermitte L, Bottcher S, Almeida J, van der Velden VHJ, Flores-Montero J, *et al.* EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia* 2012;26:1908-1975.

Van Lochem EG, van der Velden VHJ, Wind HK, te Marvelde JG, Westerdssl NAC, and van Dongen JJM. Immunophenotypic differentiation patterns of normal hematopoiesis in human bone marrow: Reference patterns for age-related changes and disease-induced shifts. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)* 2004;60B:1-13.

Vardiman JW, Brunning RD, Arber DA, Le Beau MM, Porwit A, Tefferi A, Bloomfield CD, Thiele J. Introduction and overview of the classification of the myeloid neoplasms. In WHO classification of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues Edited by Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW. (Eds): IARC: Lyon 2008.

Venditi A, Del Poeta G, Buccisano F, Tamburini A, Cox-Froncillo MC, Aronica G *et al.* Prognostic relevance of the expression of Tdt and CD7 in 335 cases of acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1998;12:1056-1063.

Venditti A, Buccisano F, Del Poeta G, Maurillo L, Tamburini A, Cox C, *et al.* Level of minimal residual disease after consolidation therapy predicts outcome in acute myeloid leukemia. *Blood* 2000;96:3948-3952.

Vergez F, Green AS, Tamburini J, Sarry JE, Gaillard B, Cornillet-Lefebvre P et al. High levels of CD34⁺CD38^{low/-}CD123⁺ blasts are predictive of an adverse outcome in acute myeloid leukemia: a Groupe Ouest-Est des Leucémies Aiguës et Maladies du Sang (GOELAMS) study. *Haematologica* 2011;96:1792-1798.

Vicente C, Conchillo A, García-Sánchez MA, Odero MD. The role of the GATA2 transcription factor in normal and malignant hematopoiesis. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 2012;82:1-17.

Vidriales MB, San-Miguel JF, Orfao A, Coustan-Smith E, Campana D. Minimal residual disease monitoring by flow cytometry. *Best Practice & Research Clinical Haematology* 2003;16:599-612.

Vidriales MB, Perez-Lopez E, Pegenaute C, Castellanos M, Perez JJ, Chandia M *et al.* Minimal residual disease evaluation by flow cytometry is a complementary tool to cytogenetics for treatment decisions in acute myeloid leukaemia. *Leukemia Research* 2016;40:1-9.

Voskova D, Schoch C, Schnittger S, Hiddemann W, Haferlach T, Kern W. Stability of leukemia-associated aberrant immunophenotypes in patients with acute myeloid leukemia between diagnosis and relapse: Comparison with cytomorphologic, cytogenetic, and molecular genetic findings. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)* 2004;62B:25-38.

Webber B, Cushing MM, Li S. Prognostic significance of flow cytometric immunophenotyping in acute myeloid leukemia. *Internal Journal of Experimental Pathology* 2008;1:124-133.

Weinkauff R, Estey EH, Starostik P, Hayes K, Huh YO, Hirsch-Ginsberg C, Andreeff M, Keating M, Kantarjian HM, Freireich EJ, Albitar M. Use of periphery blood blasts vs bone marrow blasts for diagnosis of acute leukemia. *American Journal of Clinical Pathology* 1999;111:733-740.

Welch JS. Subclonal architecture in acute myeloid leukemia. *Hematology Education: the education program for the annual congress of the European Hematology Association* 2013;7:23-29.

Wells DA, Benesch M, Loken MR, Vallejo C, Myerson D, Leisenring WM, Deeg HJ. Myeloid and monocytic dyspoiesis as determined by flow cytometry scoring in myelodysplastic syndrome correlates with the IPSS and with outcome after hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2003;102:394-403.

Wood B. 9-Color and 10-color flow cytometry in the clinical laboratory. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2006;130:680-690.

Wood BL, Arroz M, Barnett D, DiGiuseppe J, Greig B, Kussick SJ, Oldaker T, Shenklin M, Stone E, and Wallace P. 2006 Bethesda international consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematolymphoid neoplasia by flow cytometry: Optimal reagents and reporting for the flow cytometric diagnosis of hematopoietic neoplasia. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)* 2007;72B:S14-S22.

World Medical Association Declaration of Helsinki: Recommendation guiding medical doctors in biomedical research involving human subjects. Adopted by 18th World medical assembly, Helsinki 1964, amended by 29th World medical assembly Tokyo 1975, 35th Assembly, Venice 1983, 41st World medical assembly Hong Kong 1989 and 48th General Assembly Somerset West, South Africa 1996. <http://www.fda.gov/oc/oha/appendg.html>.

Wozniak J, Kopec-Szlezak J. Standard immunophenotyping of leukemia cells in acute myeloid leukemia (AML). *Central European Journal of Immunology* 2008;33:24-32.

Yamamoto Y, Kiyoi H, Nakano Y. Activating mutation D835 with the activation loop of the FLT3 in human hematological malignancies. *Blood* 2001;97:2434-2439.

Yuan Y, Zhou L, Miyamoto T *et al.* AML1-ETO expression is directly involved in the development of acute myeloid leukemia in the presence of additional mutations. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2001;98:10398-10403.

Zeijlemaker W, Gratama JW, Schuurhuis GJ. Tumor Heterogeneity Makes AML a "Moving Target" for Detection of Residual Disease. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)* 2014;86B:3-14.

Zimmerlin L, Donnenberg VS, and Donnenberg AD. Rare event detection and analysis in flow cytometry: Bone marrow mesenchymal stem cells, breast cancer stem/progenitor cells in malignant effusions, and pericytes in disaggregated adipose tissue. In Hawley TS and Hawley RG (eds.), *Flow Cytometry Protocols, Methods in Molecular Biology*, vol. 699: 251-273, Springer Science+Business Media, LCC 2001.

Zola H, Swart B, Banham A, Barry S, Beare A, Bensussan A, Bousnell L, Buckley CD, Buhring HJ, Clark G, Engel P, Fox D, Jin BQ, Macardle PJ, Malavasi F, Mason D, Stockinger H, Yang X. CD molecules 2006 – Human cell differentiation molecules. *Journal of Immunology Methods* 2007;319:1-5.

PRILOG 1.

Tabela 35. Demografske i kliničko-hematološke karakteristike suptipova AML-RGP

Karakteristika	AML sa t(15;17) n=32	AML sa t(8;21) n=12	AML sa inv(16)/ t(16;16) n=5	AML sa t(v;11q23) n=3	AML sa NPM1 ^{mut} n=44	AML sa CEBPA ^{mut} n=8	P
Pol f(%)	(n=32)	(n=12)	(n=5)	(n=3)	(n=44)	(n=8)	
muški	53,1 (17/32)	83,3 (10/12)	80 (4/5)	66,7 (2/3)	50 (22/44)	62,5 (5/8)	0,330
ženski	46,9 (15/32)	16,7 (2/12)	20 (1/5)	33,3 (1/3)	50 (22/44)	37,5 (3/8)	
Starost	(n=32)	(n=12)	(n=5)	(n=3)	(n=44)	(n=8)	
$\bar{x} \pm SD$ (godine)	45,56 \pm 15,44	53,42 \pm 12,64	55,20 \pm 11,90	41,00 \pm 17,44	53,66 \pm 12,49	55,38 \pm 7,15	0,071
Me (opseg)	44 (20 - 73)	54 (35 - 77)	56 (38 - 70)	33 (29 - 61)	54 (23 - 78)	58,5 (41 - 64)	
≥ 65 god. f(%)	25 (8/32)	25 (3/12)	40 (2/5)	33,3 (1/3)	34,1 (15/44)	12,5 (1/8)	0,809
Leukociti	(n=32)	(n=12)	(n=5)	(n=3)	(n=44)	(n=8)	
$\bar{x} \pm SD$ ($\times 10^9/l$)	11,79 \pm 19,86	8,45 \pm 7,98	60,22 \pm 61,06	65,23 \pm 75,12	60,58 \pm 52,88	49,62 \pm 57,23	0,000
Me (opseg)	2,1 (0,6 - 87,7)	5,05 (1,3 - 27,4)	57,4 (5,7 - 160)	43,6 (3,3 - 148,8)	50,3 (0,8 - 195)	19,75 (5,2 - 160)	
Leukociti nivo f(%)	(n=32)	(n=12)	(n=5)	(n=3)	(n=44)	(n=8)	
sniženi	62,5 (20/32)	33,3 (4/12)	0 (0/5)	33,3 (1/3)	6,8 (3/44)	0 (0/8)	0,000
normalani	9,4 (3/32)	33,3 (4/12)	20 (1/5)	0 (0/3)	18,2 (8/44)	25 (2/8)	
povišeni	28,1 (9/32)	33,3 (4/12)	80 (4/5)	66,7 (2/3)	75 (33/44)	75 (6/8)	
Trombociti	(n=32)	(n=12)	(n=5)	(n=3)	(n=44)	(n=8)	
$\bar{x} \pm SD$ ($\times 10^9/l$)	43,44 \pm 44,95	38,42 \pm 32,48	60,60 \pm 57,62	44,00 \pm 50,47	88,70 \pm 81,32	43,25 \pm 30,47	0,011
Me (opseg)	26,5 (4 - 203)	29,5 (7 - 105)	38 (13 - 155)	26 (5 - 101)	60 (3 - 420)	32,5 (9 - 84)	
Trombociti nivo f(%)	(n=32)	(n=12)	(n=5)	(n=3)	(n=44)	(n=8)	
sniženi	93,8 (30/32)	100 (12/12)	80 (4/5)	100 (3/3)	88,6 (39/44)	100 (8/8)	0,562
Hemoglobin	(n=32)	(n=12)	(n=5)	(n=3)	(n=44)	(n=8)	
$\bar{x} \pm SD$ (g/l)	102,19 \pm 17,97	92,83 \pm 14,78	88,40 \pm 10,46	95,33 \pm 39,50	97,95 \pm 15,14	106,75 \pm 15,77	0,247
Me (opseg)	104,5 (67 - 135)	92,5 (71 - 119)	83 (78 - 102)	81 (65 - 140)	96 (70 - 131)	107 (86 - 129)	
Hemoglobin nivo f(%)	(n=32)	(n=12)	(n=5)	(n=3)	(n=44)	(n=8)	
snižen	87,5 (28/32)	100 (12/12)	100 (5/5)	66,7 (2/3)	88,6 (39/44)	75 (6/8)	0,408
Blasti pk	(n=32)	(n=12)	(n=5)	(n=3)	(n=44)	(n=7)	
$\bar{x} \pm SD$ (% Le)	40,06 \pm 35,47	21,58 \pm 21,19	44,20 \pm 30,67	69,67 \pm 11,85	51,45 \pm 32,68	59,00 \pm 21,71	0,062
Me (opseg)	35,5 (0 - 95)	15 (0 - 60)	59 (0 - 73)	76 (56 - 77)	59,5 (0 - 98)	61 (25 - 86)	
Blasti ks	(n=32)	(n=12)	(n=5)	(n=3)	(n=44)	(n=8)	
$\bar{x} \pm SD$ (% Le)	80,22 \pm 19,45	48,67 \pm 23,64	74,80 \pm 16,30	79,33 \pm 9,82	73,82 \pm 17,71	66,25 \pm 15,37	0,000
Me (opseg)	85,5 (19 - 100)	53 (3 - 76)	81 (58 - 95)	85 (68 - 85)	78,5 (30 - 96)	71 (42 - 84)	

LDH $\bar{x} \pm SD$ (U/l) Me (opseg)	(n=4) 973,00 ± 831,94 632 (417 - 2211)	(n=6) 1233,50 ± 774,26 1116 (189 - 2118)	(n=4) 1212,00 ± 226,70 1148 (1026-1526)	(n=1) samo 1 bol.	(n=35) 1936,26 ± 1579,95 1387 (531 - 7180)	(n=8) 749,50 ± 480,77 606,5 (315 - 1759)	0,066
LDH nivo f(%) povišen	(n=18) 38,9 (7/18)	(n=7) 71,4 (5/7)	(n=4) 100 (4/4)	(n=1) 100 (1/1)	(n=39) 89,7 (35/39)	(n=8) 62,5 (5/8)	0,002
Limfadenopatija f(%) prisutna	(n=11) 0 (0/11)	(n=10) 10 (1/10)	(n=4) 50 (2/4)	(n=1) 0 (0/1)	(n=44) 15,9 (7/44)	(n=8) 12,5 (1/8)	0,261
Hepato/splenomeg. f(%) prisutna	(n=11) 0 (0/11)	(n=10) 10 (1/10)	(n=4) 25 (1/4)	(n=1) 0 (0/1)	(n=44) 29,5 (13/44)	(n=8) 25 (2/8)	0,328

Skraćenice: ks, kostna srž; LDH, laktat dehidrogenaza; Me, medijana; pk, periferna krv; SD, standardna devijacija; \bar{x} , prosečna vrednost.

Tabela 36. Zastupljenost imunološki definisnih populacija ćelija u ks bolesnika sa AML-RGP

Karakteristika	AML sa t(15;17) n=32	AML sa t(8;21) n=12	AML sa inv(16)/ t(16;16) n=5	AML sa t(v;11q23) n=3	AML sa NPM1 ^{mut} n=44	AML sa CEBPA ^{mut} n=8	P
AĆ ks CD45/SSC $\bar{x} \pm SD$ (% NĆ) Me (opseg)	(n=30) 75,57 ± 20,80 85,5 (17 - 96)	(n=12) 38,25 ± 19,44 41,5 (9 - 64)	(n=4) 67,25 ± 8,69 66 (58 - 79)	(n=3) 73,67 ± 20,11 68 (57 - 96)	(n=42) 76,93 ± 20,59 83,5 (8 - 97)	(n=7) 66,71 ± 18,99 72 (44 - 93)	0,000
AĆ SSC f(%) niska srednja heterogena	(n=32) 0 (0/32) 37,5 (12/32) 62,5 (20/32)	(n=12) 58,3 (7/12) 25 (3/12) 16,7 (2/12)	(n=5) 40 (2/5) 20 (1/5) 40 (2/5)	(n=3) 0 (0/3) 100 (3/3) 0 (0/3)	(n=44) 9,1 (4/44) 68,2 (30/44) 22,7 (10/44)	(n=8) 100 (8/8) 0 (0/8) 0 (0/8)	0,000
AĆ CD45 obr f(%) nizak srednji visok heterogen	(n=32) 50 (16/32) 50 (16/32) 0 (0/32) 0 (0/32)	(n=12) 25 (3/12) 66,7 (8/12) 8,3 (1/12) 0 (0/12)	(n=5) 20 (1/5) 0 (0/5) 20 (1/5) 60 (3/5)	(n=3) 0 (0/3) 33,3 (1/3) 66,7 (2/3) 0 (0/3)	(n=44) 18,2 (8/44) 31,8 (14/44) 25 (11/44) 25 (11/44)	(n=8) 87,5 (7/8) 12,5 (1/8) 0 (0/8) 0 (0/8)	0,000
CD34* pop. ks $\bar{x} \pm SD$ (% NĆ)	(n=30) 16,35 ± 20,65	(n=12) 33,75 ± 20,21	(n=4) 45,50 ± 31,67	(n=3) 21,07 ± 25,86	(n=42) 7,92 ± 14,95	(n=7) 50,71 ± 28,11	0,000

Me (opseg)	6 (0,14 - 78)	34,5 (4 - 63)	54 (1 - 73)	13 (0,2 - 50)	0,6 (0 - 70)	43 (0 - 84)	
CD117+ pop. ks	(n=30)	(n=12)	(n=4)	(n=3)	(n=42)	(n=7)	
$\bar{x} \pm SD$ (% NĆ)	59,83 \pm 25,04	23,00 \pm 16,25	43,25 \pm 23,01	27,47 \pm 25,48	42,66 \pm 30,73	60,29 \pm 15,86	0,003
Me (opseg)	65,5 (0,34 - 91)	20,5 (3 - 53)	50 (10 - 63)	31 (0,4 - 51)	38 (0,62 - 89)	56 (42 - 84)	
Σ B-prekursora ks	(n=30)	(n=12)	(n=4)	(n=3)	(n=42)	(n=7)	
$\bar{x} \pm SD$ (% NĆ)	0,14 \pm 0,55	0,15 \pm 0,37	0,03 \pm 0,06	0,00 \pm 0,00	0,09 \pm 0,39	0,00 \pm 0,00	0,566
Me (opseg)	0 (0 - 3)	0 (0 - 1,28)	0 (0 - 0,11)		0 (0 - 2,53)		
Li ks	(n=30)	(n=12)	(n=4)	(n=3)	(n=42)	(n=7)	
$\bar{x} \pm SD$ (% NĆ)	13,97 \pm 12,97	15,92 \pm 13,28	5,75 \pm 4,11	6,33 \pm 7,51	6,71 \pm 7,46	7,29 \pm 3,35	0,007
Me (opseg)	7,5 (3 - 49)	12 (4 - 43)	5 (2 - 11)	2 (2 - 15)	4 (1 - 34)	8 (3 - 12)	
Gr prek. ks	(n=26)	(n=12)	(n=4)	(n=3)	(n=41)	(n=7)	
$\bar{x} \pm SD$ (% NĆ)	8,02 \pm 11,99	42,83 \pm 24,16	20,00 \pm 8,76	17,67 \pm 19,14	13,37 \pm 14,15	20,43 \pm 16,40	0,000
Me (opseg)	5 (0,4 - 61)	44 (6 - 82)	23,5 (7 - 26)	12 (2 - 39)	9 (1 - 61)	21 (2 - 48)	
Eo prek. ks	(n=9)	(n=7)	(n=3)	(n=2)	(n=17)	(n=6)	
$\bar{x} \pm SD$ (% NĆ)	0,77 \pm 0,91	2,24 \pm 2,30	6,63 \pm 5,12	0,94 \pm 0,09	0,79 \pm 0,63	1,62 \pm 1,53	0,050
Me (opseg)	0,35 (0,16 - 2,8)	1 (0,6 - 7)	7,9 (1 - 11)	0,9 (0,87 - 1)	0,7 (0,2 - 2,7)	1,2 (0,3 - 4)	
Mono prek. ks	(n=28)	(n=12)	(n=4)	(n=3)	(n=42)	(n=7)	
$\bar{x} \pm SD$ (% NĆ)	2,38 \pm 1,98	2,70 \pm 1,69	28,00 \pm 12,78	40,67 \pm 35,70	28,72 \pm 30,91	10,76 \pm 10,33	0,000
Me (opseg)	1,8 (0,16 - 7)	2,45 (0,9 - 7)	22,5 (20 - 47)	45 (3 - 74)	13 (0,17 - 95)	8,3 (4 - 33)	
Eritro prek. ks	(n=18)	(n=7)	(n=2)	(n=1)	(n=24)	(n=7)	
$\bar{x} \pm SD$ (% NĆ)	7,39 \pm 8,45	12,93 \pm 20,73	8,50 \pm 9,19	2,00 \pm 0,00	5,06 \pm 10,33	9,71 \pm 14,91	0,446
Me (opseg)	4 (1 - 32)	2 (1 - 57)	8,5 (2 - 15)		2 (1 - 52)	5 (1 - 43)	

Skraćenice: AĆ, atipične ćelije; Gr, granulocitni; Eritro, eritrocitni; Mono, monocitni; ks, kostna srž; Li, limfociti; Me, medijana; pk, periferna krv; pop., populacija; SD, standardna devijacija; SSC, ćelijska granulacija; \bar{x} , prosečna vrednost.

Tabela 37. Različiti aspekti ekspresije ranih linijski nespecifičnih i ranih mijelomonocitnih hLDM na populaciji blasta AML-RGP							
hLDM	AML sa t(15;17) n=32	AML sa t(8;21) n=12	AML sa inv(16)/ t(16;16) n=5	AML sa t(v;11q23) n=3	AML sa NPM1^{mut} n=44	AML sa CEBPA^{mut} n=8	P1/P2
CD11a (% LĆ) f (%)	(n=28) 21,4 (6/28)	(n=6) 100 (6/6)	(n=2) 100 (2/2)	(n=2) 100 (2/2)	(n=19) 84,2 (16/19)	(n=2) 100 (2/2)	0,000 0,000

$\bar{x} \pm SD$ (% LČ)	12,89 ± 14,86	56,33 ± 26,17	88,50 ± 2,12	98,50 ± 0,71	60,84 ± 33,34	87,50 ± 10,61	
Me (opseg)	7,5 (1 - 65)	46,5 (34 - 96)	88,5 (87 - 90)	98,5 (98 - 99)	69 (5 - 100)	87,5 (80 - 95)	
CD11a obr f (%)	(n=6)	(n=6)	(n=2)	(n=2)	(n=16)	(n=2)	0,155
nizak	100 (6/6)	50 (3/6)	0 (0/2)	0 (0/2)	37,5 (6/16)	50 (1/2)	
srednji	0 (0/6)	16,7 (1/6)	0 (0/2)	0 (0/2)	6,2 (1/16)	0 (0/2)	
visok	0 (0/6)	0 (0/6)	50 (1/2)	100 (2/2)	37,5 (6/16)	0 (0/2)	
heterogen	0 (0/6)	33,3 (2/6)	50 (1/2)	0 (0/2)	18,8 (3/16)	50 (1/2)	
CD38 (% LČ)	(n=24)	(n=8)	(n=2)	(n=1)	(n=25)	(n=3)	0,402
f (%)	87,5 (21/24)	100 (8/8)	100 (2/2)	100 (1/1)	100 (25/25)	100 (3/3)	0,000
$\bar{x} \pm SD$ (% LČ)	55,00 ± 27,21	95,88 ± 2,48	97,00 ± 2,83	98,00 ± 0,00	91,08 ± 16,66	97,67 ± 1,53	
Me (opseg)	59 (8 - 96)	96,5 (91 - 98)	97 (95 - 99)		97 (21 - 100)	98 (96 - 99)	
CD38 obr f (%)	(n=21)	(n=8)	(n=2)	(n=1)	(n=25)	(n=3)	0,001
nizak	81 (17/21)	0 (0/8)	0 (0/2)	0 (0/1)	16 (4/25)	0 (0/3)	
srednji	19 (4/21)	62,5 (5/8)	50 (1/2)	0 (0/1)	40 (10/25)	33,3 (1/3)	
visok	0 (0/21)	37,5 (3/8)	50 (1/2)	100 (1/1)	40 (10/25)	66,7 (2/3)	
heterogen	0 (0/21)	0 (0/8)	0 (0/2)	0 (0/1)	4 (1/25)	0 (0/3)	
CD123 (% LČ)	(n=17)	(n=6)	(n=2)	(n=2)	(n=20)		0,588
f (%)	100 (17/17)	100 (6/6)	100 (2/2)	100 (2/2)	90 (18/20)	/	0,228
$\bar{x} \pm SD$ (% LČ)	63,76 ± 25,37	47,00 ± 25,74	75,50 ± 21,92	87,00 ± 4,24	72,60 ± 25,89		
Me (opseg)	66 (31 - 98)	40,5 (23 - 92)	75,5 (60 - 91)	87 (84 - 90)	82 (8 - 98)		
CD123 obr f (%)	(n=17)	(n=6)	(n=2)	(n=2)	(n=18)		0,109
nizak	58,8 (10/17)	83,3 (5/6)	50 (1/2)	0 (0/2)	22,2 (4/18)	/	
srednji	17,6 (3/17)	16,7 (1/6)	0 (0/2)	100 (2/2)	50 (9/18)		
visok	23,5 (4/17)	0 (0/6)	50 (1/2)	0 (0/2)	16,7 (3/18)		
heterogen	0 (0/17)	0 (0/6)	0 (0/2)	0 (0/2)	11,1 (2/18)		
CD135 (% LČ)	(n=18)	(n=7)	(n=1)	(n=1)	(n=24)	(n=2)	0,022
f (%)	66,7 (12/18)	100 (7/7)	100 (1/1)	100 (1/1)	100 (24/24)	100 (2/2)	0,001
$\bar{x} \pm SD$ (% LČ)	46,94 ± 34,16	68,00 ± 22,72	32,00 ± 0,00	87,00 ± 0,00	86,42 ± 13,09	74,00 ± 33,94	
Me (opseg)	55 (2 - 98)	77 (36 - 91)			90,5 (49 - 99)	74 (50 - 98)	
CD135 obr f (%)	(n=12)	(n=7)	(n=1)	(n=1)	(n=24)	(n=2)	0,495
nizak	66,7 (8/12)	71,4 (5/7)	100 (1/1)	0 (0/1)	33,3 (8/24)	50 (1/2)	
srednji	33,3 (4/12)	28,6 (2/7)	0 (0/1)	100 (1/1)	29,2 (7/24)	50 (1/2)	
visok	0 (0/5)	0 (0/7)	0 (0/1)	0 (0/1)	16,7 (4/24)	0 (0/2)	
heterogen	0 (0/5)	0 (0/7)	0 (0/1)	0 (0/1)	20,8 (5/24)	0 (0/2)	
CD71 (% LČ)	(n=13)	(n=2)	(n=2)	(n=3)	(n=22)	(n=5)	0,969
f (%)	92,3 (12/13)	100 (2/2)	100 (2/2)	100 (3/3)	95,5 (21/22)	100 (5/5)	0,001
$\bar{x} \pm SD$ (% LČ)	49,85 ± 23,42	67,50 ± 2,12	32,50 ± 9,19	85,00 ± 12,12	69,36 ± 24,23	83,40 ± 16,01	
Me (opseg)	48 (8 - 82)	67,5 (66 - 69)	32,5 (26 - 39)	83 (74 - 98)	77,5 (7 - 96)	92 (61 - 97)	

CD71 obr f (%)	(n=12)	(n=2)	(n=2)	(n=3)	(n=21)	(n=5)	
nizak	91,7 (11/12)	100 (2/2)	100 (2/2)	100 (3/3)	90,5 (19/21)	80 (4/5)	0,918
srednji	8,3 (1/12)	0 (0/2)	0 (0/2)	0 (0/3)	9,5 (2/21)	20 (1/5)	
visok	0 (0/12)	0 (0/2)	0 (0/2)	0 (0/3)	0 (0/21)	0 (0/5)	
heterogen	0 (0/12)	0 (0/2)	0 (0/2)	0 (0/3)	0 (0/21)	0 (0/5)	
HLA-DR (% LČ)	(n=32)	(n=12)	(n=5)	(n=3)	(n=44)	(n=8)	
f (%)	9,4 (3/32)	100 (12/12)	100 (5/5)	100 (3/3)	79,5 (35/44)	100 (8/8)	0,000
$\bar{x} \pm SD$ (% LČ)	7,41 ± 11,42	84,42 ± 19,90	93,40 ± 3,13	90,33 ± 12,50	69,14 ± 35,55	88,50 ± 15,18	0,000
Me (opseg)	2,5 (0 - 57)	88,5 (26 - 100)	94 (88 - 96)	96 (76 - 99)	86 (1 - 100)	93 (52 - 100)	
HLA-DR obr f (%)	(n=3)	(n=12)	(n=5)	(n=3)	(n=35)	(n=8)	
nizak	0 (0/3)	0 (0/12)	0 (0/5)	0 (0/3)	2,9 (1/35)	0 (0/8)	0,544
srednji	0 (0/3)	0 (0/12)	20 (1/5)	0 (0/3)	8,6 (3/35)	12,5 (1/8)	
visok	0 (0/3)	50 (6/12)	60 (3/5)	100 (3/3)	51,4 (18/35)	75 (6/8)	
heterogen	100 (3/3)	50 (6/12)	20 (1/5)	0 (0/3)	37,1 (13/35)	12,5 (1/8)	
CD34 (% LČ)	(n=32)	(n=12)	(n=5)	(n=3)	(n=44)	(n=8)	
f (%)	56,3 (18/32)	100 (12/12)	80 (4/5)	66,7 (2/3)	27,3 (12/44)	87,5 (7/8)	0,000
$\bar{x} \pm SD$ (% LČ)	24,34 ± 26,25	80,83 ± 21,48	74,60 ± 39,40	33,33 ± 37,87	12,02 ± 19,59	80,63 ± 33,94	0,000
Me (opseg)	11,5 (1 - 86)	89,5 (35 - 97)	93 (5 - 99)	24 (1 - 75)	4 (1 - 89)	95 (1 - 99)	
CD34 obr f (%)	(n=18)	(n=12)	(n=4)	(n=2)	(n=12)	(n=7)	
nizak	0 (0/18)	0 (0/12)	0 (0/4)	0 (0/2)	8,3 (1/12)	0 (0/7)	0,000
srednji	0 (0/18)	0 (0/12)	0 (0/4)	50 (1/2)	8,3 (1/12)	0 (0/7)	
visok	5,6 (1/18)	66,7 (8/12)	50 (2/4)	0 (0/2)	16,7 (2/12)	85,7 (6/7)	
heterogen	94,4 (17/18)	33,3 (4/12)	50 (2/4)	50 (1/2)	66,7 (8/12)	14,3 (1/7)	
CD117 (% LČ)	(n=32)	(n=12)	(n=5)	(n=3)	(n=44)	(n=8)	
f (%)	96,9 (31/32)	100 (12/12)	100 (5/5)	66,7 (2/3)	81,8 (36/44)	100 (8/8)	0,079
$\bar{x} \pm SD$ (% LČ)	62,84 ± 23,39	70,08 ± 18,71	68,80 ± 30,48	43,67 ± 44,38	58,66 ± 34,80	90,88 ± 12,11	0,022
Me (opseg)	70 (1 - 90)	73 (29 - 93)	75 (17 - 98)	37 (3 - 91)	71 (2 - 97)	95 (63 - 100)	
CD117 obr f (%)	(n=31)	(n=12)	(n=5)	(n=2)	(n=36)	(n=8)	
nizak	51,6 (16/31)	8,3 (1/12)	0 (0/5)	0 (0/2)	19,4 (7/36)	0 (0/8)	0,002
srednji	19,4 (6/31)	0 (0/12)	20 (1/5)	0 (0/2)	27,8 (10/36)	25 (2/8)	
visok	19,4 (6/31)	25 (3/12)	40 (2/5)	50 (1/2)	22,2 (8/36)	62,5 (5/8)	
heterogen	9,7% (3/31)	66,7% (8/12)	40% (2/5)	50% (1/2)	30,6% (11/36)	12,5% (1/8)	
CD13 (% LČ)	(n=32)	(n=12)	(n=5)	(n=3)	(n=44)	(n=8)	
f (%)	100 (32/32)	100 (12/12)	100 (5/5)	100 (3/3)	95,5 (42/44)	100 (8/8)	0,734
$\bar{x} \pm SD$ (% LČ)	79,28 ± 17,46	63,58 ± 20,50	88,80 ± 14,69	71,67 ± 41,31	69,43 ± 27,52	84,25 ± 11,62	0,115
Me (opseg)	82 (24 - 100)	67 (36 - 92)	96 (64 - 100)	94 (24 - 97)	80,5 (3 - 99)	88 (60 - 97)	
CD13 obr f (%)	(n=32)	(n=12)	(n=5)	(n=3)	(n=42)	(n=8)	
nizak	15,6 (5/32)	58,3 (7/12)	0 (0/5)	0 (0/3)	14,3 (6/42)	25 (2/8)	

srednji	28,1 (9/32)	16,7 (2/12)	20 (1/5)	0 (0/3)	11,9 (5/42)	62,5 (5/8)	0,005
visok	28,1 (9/32)	0 (0/12)	60 (3/5)	66,7 (2/3)	38,1 (16/42)	12,5 (1/8)	
heterogen	28,1 (9/32)	25 (3/12)	20 (1/5)	33,3 (1/3)	35,7 (15/42)	0 (0/8)	
CD33 (% LĆ)	(n=31)	(n=12)	(n=5)	(n=3)	(n=43)	(n=8)	/
f (%)	100 (31/31)	100 (12/12)	100 (5/5)	100 (3/3)	100 (43/43)	100 (8/8)	
$\bar{x} \pm SD$ (% LĆ)	93,03 \pm 13,67	68,58 \pm 20,61	84,20 \pm 23,76	98,33 \pm 0,58	93,30 \pm 15,51	89,38 \pm 16,54	
Me (opseg)	97 (28 - 100)	73,5 (30 - 92)	93 (42 - 98)	98 (98 - 99)	98 (25 - 100)	95 (49 - 99)	
CD33 obr f (%)	(n=31)	(n=12)	(n=5)	(n=3)	(n=43)	(n=8)	0,000
nizak	6,5 (2/31)	41,7 (5/12)	20 (1/5)	0 (0/3)	9,3 (4/43)	12,5 (1/8)	
srednji	16,1 (5/31)	41,7 (5/12)	20 (1/5)	0 (0/3)	7 (3/43)	50 (4/8)	
visok	77,4 (24/31)	0 (0/12)	40 (2/5)	100 (3/3)	81,4 (35/43)	37,5 (3/8)	
heterogen	0 (0/31)	16,7 (2/12)	20 (1/5)	0 (0/3)	2,3 (1/43)	0 (0/8)	
cMPO (% LĆ)	(n=31)	(n=12)	(n=5)	(n=3)	(n=43)	(n=8)	0,002
f (%)	100 (31/31)	100 (12/12)	100 (5/5)	33,3 (1/3)	86 (37/43)	87,5 (7/8)	
$\bar{x} \pm SD$ (% LĆ)	89,77 \pm 12,02	66,50 \pm 29,15	65,00 \pm 32,73	10,67 \pm 14,22	40,98 \pm 29,74	81,25 \pm 33,97	
Me (opseg)	97 (56 - 100)	70,5 (13 - 98)	78 (27 - 97)	4 (1 - 27)	42 (1 - 98)	97 (1 - 98)	
cMPO obr f (%)	(n=31)	(n=12)	(n=5)	(n=1)	(n=37)	(n=7)	0,000
nizak	22,6 (7/31)	58,3 (7/12)	0 (0/5)	0 (0/1)	54,1 (20/37)	0 (0/7)	
srednji	22,6 (7/31)	25 (3/12)	40 (2/5)	0 (0/1)	8,1 (3/37)	14,3 (1/7)	
visok	48,4 (15/31)	8,3 (1/12)	0 (0/5)	0 (0/1)	5,4 (2/37)	71,4 (5/7)	
heterogen	6,5 (2/31)	8,3 (1/12)	60 (3/5)	100 (1/1)	32,4 (12/37)	14,3 (1/7)	
clizozim (% LĆ)	(n=15)	(n=5)	/	(n=1)	(n=16)	/	0,241
f (%)	80 (12/15)	40 (2/5)	/	100 (1/1)	81,2 (13/16)	/	
$\bar{x} \pm SD$ (% LĆ)	22,33 \pm 15,55	11,40 \pm 6,02	/	97,00 \pm 0,00	56,31 \pm 37,09	/	
Me (opseg)	18 (1 - 54)	9 (5 - 20)	/	/	60,5 (3 - 99)	/	
clizozim obr f (%)	(n=12)	(n=2)	/	(n=1)	(n=13)	/	0,015
nizak	0 (0/12)	0 (0/2)	/	0 (0/1)	15,4 (2/13)	/	
srednji	0 (0/12)	0 (0/2)	/	0 (0/1)	23,1 (3/13)	/	
visok	0 (0/12)	0 (0/2)	/	100 (1/1)	38,5 (5/13)	/	
heterogen	100 (12/12)	100 (2/2)	/	0 (0/1)	23,1 (3/13)	/	

Skraćenice: f, učestalost ekspresije molekula; LĆ, leukemijske ćelije; Me, medijana; obr, obrazac; SD, standardna devijacija; \bar{x} , prosečna vrednost; p1 vrednost, odnosi se na učestalost karakteristike; p2 vrednost, osnosi se na prosečnu vrednost karakteristike.

Tabela 38. Različiti aspekti ekspresije kasnih mijelomonocitnih hLDM na populaciji blasta suptipova AML-RGP

hLDM	AML sa t(15;17) n=32	AML sa t(8;21) n=12	AML sa inv(16)/ t(16;16) n=5	AML sa (v;11q23) n=3	AML sa NPM1^{mut} n=44	AML sa CEBPA^{mut} n=8	P1/P2
999cCD68 (% LĆ)	(n=12)	(n=5)	(n=2)	(n=2)	(n=18)	(n=2)	
f (%)	100 (12/12)	100 (5/5)	100 (2/2)	100 (2/2)	100 (18/18)	100 (2/2)	/
$\bar{x} \pm SD$ (% LĆ)	94,00 \pm 5,66	80,00 \pm 17,71	97,00 \pm 1,41	98,50 \pm 0,71	89,50 \pm 14,18	97,50 \pm 0,71	0,133
Me (opseg)	97 (82 - 99)	88 (49 - 92)	97 (96 - 98)	98,5 (98 - 99)	96 (53 - 100)	97,5 (97 - 98)	
cCD68 obrazac	(n=12)	(n=5)	(n=2)	(n=2)	(n=18)	(n=2)	
nizak	0 (0/12)	40 (2/5)	0 (0/2)	0 (0/2)	22,2 (4/18)	0 (0/2)	0,287
srednji	25 (3/12)	40 (2/5)	0 (0/2)	0 (0/2)	5,6 (1/18)	50 (1/2)	
visok	33,3 (4/12)	0 (0/5)	50 (1/2)	100 (2/2)	38,9 (7/18)	0 (0/2)	
heterogen	41,7 (5/12)	20 (1/5)	50 (1/2)	0 (0/2)	33,3 (6/18)	50 (1/2)	
CD15 (% LĆ)	(n=32)	(n=11)	(n=5)	(n=3)	(n=44)	(n=8)	
f (%)	18,8 (6/32)	36,4 (4/11)	100 (5/5)	33,3 (1/3)	56,8 (25/44)	62,5 (5/8)	0,002
$\bar{x} \pm SD$ (% LĆ)	10,06 \pm 11,89	26,00 \pm 20,47	45,00 \pm 17,36	33,33 \pm 38,21	36,80 \pm 33,64	29,25 \pm 25,60	0,001
Me (opseg)	5 (1 - 45)	18 (5 - 55)	45 (21 - 70)	17 (6 - 77)	23,5 (1 - 97)	25,5 (1 - 66)	
CD15 obrazac	(n=6)	(n=4)	(n=5)	(n=1)	(n=25)	(n=5)	
nizak	66,7 (4/6)	25 (1/4)	20 (1/5)	0 (0/1)	12 (3/25)	60 (3/5)	0,052
srednji	0 (0/6)	0 (0/4)	20 (1/5)	0 (0/1)	32 (8/25)	0 (0/5)	
visok	0 (0/6)	0 (0/4)	0 (0/5)	100 (1/1)	20 (5/25)	0 (0/5)	
heterogen	33,3 (2/6)	75 (3/4)	60 (3/5)	0 (0/1)	36 (9/25)	40 (2/5)	
CD11b (% LĆ)	(n=32)	(n=11)	(n=5)	(n=3)	(n=44)	(n=8)	
f (%)	9,4 (3/32)	0 (0/11)	60 (3/5)	100 (3/3)	54,5 (24/44)	12,5 (1/8)	0,000
$\bar{x} \pm SD$ (% LĆ)	9,88 \pm 16,17	7,45 \pm 4,89	29,40 \pm 30,11	60,00 \pm 34,77	40,45 \pm 35,44	9,25 \pm 12,28	0,000
Me (opseg)	5,5 (1 - 90)	6 (2 - 16)	24 (6 - 81)	55 (28 - 97)	27 (1 - 97)	6 (2 - 39)	
CD11b obrazac	(n=3)		(n=3)	(n=3)	(n=24)	(n=1)	
nizak	100 (3/3)	/	0 (0/3)	33,3 (1/3)	16,7 (4/24)	0 (0/1)	0,178
srednji	0 (0/3)		0 (0/3)	0 (0/3)	4,2 (1/24)	0 (0/1)	
visok	0 (0/3)		33,3 (1/3)	66,7 (2/3)	25 (6/24)	0 (0/1)	
heterogen	0 (0/3)		66,7 (2/3)	0 (0/3)	54,2 (13/24)	100 (1/1)	
CD11c (% LĆ)	(n=31)	(n=11)	(n=5)	(n=3)	(n=43)	(n=8)	
f (%)	3,2 (1/31)	27,3 (3/11)	80 (4/5)	100 (3/3)	74,4 (32/43)	37,5 (3/8)	0,000
$\bar{x} \pm SD$ (% LĆ)	2,97 \pm 4,44	13,00 \pm 12,39	38,20 \pm 35,08	65,67 \pm 38,89	51,05 \pm 35,56	15,25 \pm 13,38	0,000
Me (opseg)	2 (1 - 25)	6 (2 - 34)	25 (2 - 93)	84 (21 - 92)	45 (1 - 99)	10 (2 - 34)	

CD11c obrazac	(n=1)	(n=3)	(n=5)	(n=3)	(n=32)	(n=3)	
nizak	100 (1/1)	100 (3/3)	25 (1/5)	33,3 (1/3)	34,4 (11/32)	100 (3/3)	0,498
srednji	0 (0/1)	0 (0/3)	0 (0/5)	33,3 (1/3)	15,6 (5/32)	0 (0/3)	
visok	0 (0/1)	0 (0/3)	25 (1/5)	33,3 (1/3)	25 (8/32)	0 (0/3)	
heterogen	0 (0/1)	0 (0/3)	50 (2/5)	0 (0/3)	25 (8/32)	0 (0/3)	
CD4 (% LČ)	(n=27)	(n=8)	(n=5)	(n=3)	(n=43)	(n=8)	
f (%)	25,9 (7/27)	50 (4/8)	80 (4/5)	100 (3/3)	65,1 (28/43)	12,5 (1/8)	0,002
$\bar{x} \pm SD$ (% LČ)	13,96 \pm 10,70	26,75 \pm 26,45	50,60 \pm 32,42	67,67 \pm 32,75	46,72 \pm 34,70	7,25 \pm 14,13	0,000
Me (opseg)	11 (1 - 38)	19,5 (1 - 82)	45 (10 - 92)	78 (31 - 94)	46 (2 - 96)	2 (0 - 42)	
CD4 obrazac	(n=7)	(n=4)	(n=4)	(n=3)	(n=28)	(n=1)	
nizak	100 (7/7)	75 (3/4)	50 (2/4)	33,3 (1/3)	42,9 (12/28)	100 (1/1)	0,382
srednji	0 (0/7)	25 (1/4)	50 (2/4)	33,3 (1/3)	50 (14/28)	0 (0/1)	
visok	0 (0/7)	0 (0/4)	0 (0/4)	33,3 (1/3)	3,6 (1/28)	0 (0/1)	
heterogen	0 (0/7)	0 (0/4)	0 (0/4)	0 (0/3)	3,6 (1/28)	0 (0/1)	
CD64 (% LČ)	(n=29)	(n=7)	(n=5)	(n=3)	(n=43)	(n=8)	
f (%)	65,5 (19/29)	0 (0/7)	80 (4/5)	66,7 (2/3)	60,5 (26/43)	50 (4/8)	0,039
$\bar{x} \pm SD$ (% LČ)	27,93 \pm 19,33	7,71 \pm 4,07	39,60 \pm 24,24	61,33 \pm 47,50	39,42 \pm 36,08	18,88 \pm 11,76	0,087
Me (opseg)	27 (1 - 72)	8 (2 - 14)	34 (17 - 81)	82 (7 - 95)	25 (1 - 99)	20 (1 - 40)	
CD64 obrazac	(n=19)		(n=4)	(n=2)	(n=26)	(n=4)	
nizak	100 (19/19)	/	25 (1/4)	0 (0/2)	34,6 (9/26)	75 (3/4)	0,000
srednji	0 (0/19)	/	0 (0/4)	0 (0/2)	3,8 (1/26)	25 (1/4)	
visok	0 (0/19)	/	75 (3/4)	100 (2/2)	46,2 (12/26)	0 (0/4)	
heterogen	0 (0/19)	/	0 (0/4)	0 (0/2)	15,4 (4/26)	0 (0/4)	
CD36 (% LČ)	(n=31)	(n=10)	(n=5)	(n=3)	(n=44)	(n=8)	
f (%)	0 (0/31)	10 (1/10)	60 (3/5)	66,7 (2/3)	40,9 (18/44)	0 (0/8)	0,000
$\bar{x} \pm SD$ (% LČ)	2,77 \pm 2,97	6,20 \pm 7,30	28,80 \pm 25,38	48,33 \pm 39,27	29,80 \pm 31,76	8,38 \pm 5,07	0,000
Me (opseg)	2 (1 - 12)	3,5 (1 - 25)	20 (5 - 69)	43 (12 - 90)	13,5 (1 - 93)	8,5 (2 - 17)	
CD36 obrazac		(n=1)	(n=3)	(n=2)	(n=18)		
nizak	/	100 (1/1)	33,3 (1/3)	0 (0/2)	5,6 (1/18)	/	0,203
srednji	/	0 (0/1)	0 (0/3)	0 (0/2)	5,6 (1/18)	/	
visok	/	0 (0/1)	0 (0/3)	50 (1/2)	11,1 (2/18)	/	
heterogen	/	0 (0/1)	66,7 (2/3)	50 (1/2)	77,8 (14/18)	/	
CD14 (% LČ)	(n=32)	(n=12)	(n=5)	(n=3)	(n=44)	(n=8)	
f (%)	0 (0/32)	0 (0/12)	40 (2/5)	33,3 (1/3)	20,5 (9/44)	0 (0/8)	0,008
$\bar{x} \pm SD$ (% LČ)	1,41 \pm 1,34	2,42 \pm 1,08	18,80 \pm 18,35	28,00 \pm 45,90	9,68 \pm 14,33	2,75 \pm 4,56	0,000
Me (opseg)	1 (0 - 8)	2 (1 - 4)	12 (2 - 49)	2 (1 - 81)	2 (1 - 55)	1 (1 - 14)	
CD14 obrazac			(n=2)	(n=1)	(n=9)		
nizak	/	/	0 (0/2)	0 (0/1)	0 (0/9)	/	0,065

srednji visok heterogen			0 (0/2) 50 (1/2) 50 (1/2)	0 (0/1) 0 (0/1) 100 (1/1)	0 (0/9) 0 (0/9) 100 (9/9)		
CD163 (% LČ) f (%) $\bar{x} \pm SD$ (% LČ) Me (opseg)	(n=14) 0 (0/14) 1,00 ± 0,39 1 (0 - 2)	(n=1) 0 (0/1) 1,00 ± 0,00	/	(n=1) 100 (1/1) 76,00 ± 0,00	(n=16) 25 (4/16) 12,38 ± 17,12 3,5 (0 - 57)	(n=1) 0 (0/1) 1,00 ± 0,00	0,046 0,012
CD163 obrazac nizak srednji visok heterogen	/	/	/	(n=1) 0 (0/1) 100 (1/1) 0 (0/1) 0 (0/1)	(n=4) 50 (2/4) 25 (1/4) 0 (0/4) 25 (1/4)	/	0,392

Skraćenice: f, učestalost ekspresije molekula; LČ, leukemijske ćelije; Me, medijana; obr, obrazac; SD, standardna devijacija; \bar{x} , prosečna vrednost; p1 vrednost, odnosi se na učestalost karakteristike; p2 vrednost, osnosi se na prosečnu vrednost karakteristike.

Tabela 39. Različiti aspekti ektopične ekspresije limfoidnih hLDM na populaciji blasta suptipova AML-RGP

hLDM	AML sa t(15;17) n=32	AML sa t(8;21) n=12	AML sa inv(16)/ t(16;16) n=5	AML sa (v;11q23) n=3	AML sa NPM1 ^{mut} n=44	AML sa CEBPA ^{mut} n=8	P1/P2
CD2 (% LČ) f (%) $\bar{x} \pm SD$ (% LČ) Me (opseg)	(n=32) 34,4 (11/32) 19,47 ± 26,42 4 (0 - 82)	(n=12) 8,3 (1/12) 10,33 ± 26,10 2,5 (1 - 93)	(n=5) 20 (1/5) 12,00 ± 8,00 14 (2 - 22)	(n=3) 33,3 (1/3) 9,33 ± 13,58 2 (1 - 25)	(n=44) 0 (0/44) 2,73 ± 2,48 1,5 (1 - 10)	(n=8) 0 (0/8) 2,00 ± 1,69 1,5 (1 - 6)	0,001 0,017

CD2 obrazac	(n=11)	(n=1)	(n=1)	(n=1)			
nizak	90,9 (10/11)	100 (1/1)	100 (1/1)	100 (1/1)	/	/	0,961
srednji	9,1 (1/11)	0 (0/1)	0 (0/1)	0 (0/1)			
visok	0 (0/11)	0 (0/1)	0 (0/1)	0 (0/1)			
heterogen	0 (0/11)	0 (0/1)	0 (0/1)	0 (0/1)			
CD7 (% LČ)	(n=32)	(n=12)	(n=5)	(n=3)	(n=44)	(n=8)	
f (%)	0 (0/32)	8,3 (1/12)	20 (1/5)	33,3 (1/3)	20,5 (9/44)	87,5 (7/8)	0,000
$\bar{x} \pm SD$ (% LČ)	1,72 ± 1,67	6,25 ± 9,12	11,60 ± 19,84	33,33 ± 44,43	15,45 ± 23,17	64,88 ± 30,16	0,000
Me (opseg)	1 (0 - 7)	3 (1 - 33)	3 (1 - 47)	15 (1 - 84)	5 (1 - 92)	77,5 (3 - 89)	
CD7 obrazac		(n=1)	(n=1)	(n=1)	(n=9)	(n=7)	
nizak	/	100 (1/1)	100 (1/1)	100 (1/1)	88,9 (8/9)	71,4 (5/7)	0,814
srednji		0 (0/1)	0 (0/1)	0 (0/1)	11,1 (1/9)	28,6 (2/7)	
visok		0 (0/1)	0 (0/1)	0 (0/1)	0 (0/9)	0 (0/7)	
heterogen		0 (0/1)	0 (0/1)	0 (0/1)	0 (0/9)	0 (0/7)	
CD56 (% LČ)	(n=32)	(n=12)	(n=5)	(n=3)	(n=44)	(n=8)	
f (%)	18,8 (6/32)	50 (6/12)	20 (1/5)	33,3 (1/3)	25 (11/44)	0 (0/8)	0,176
$\bar{x} \pm SD$ (% LČ)	14,44 ± 26,42	38,75 ± 41,68	6,80 ± 10,26	32,67 ± 45,65	19,66 ± 29,34	4,13 ± 5,59	0,108
Me (opseg)	2 (0 - 92)	17,5 (1 - 99)	3 (1 - 25)	12 (1 - 85)	6,5 (0 - 98)	1,5 (1 - 17)	
CD56 obrazac	(n=6)	(n=6)	(n=1)	(n=1)	(n=11)		
nizak	83,3 (5/6)	0 (0/6)	100 (1/1)	0 (0/1)	36,4 (4/11)	/	0,020
srednji	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/1)	100 (1/1)	9,1 (1/11)		
visok	16,7 (1/6)	66,7 (4/6)	0 (0/1)	0 (0/1)	27,3 (3/11)		
heterogen	0 (0/6)	33,3 (2/6)	0 (0/1)	0 (0/1)	27,3 (3/11)		
CD19 (% LČ)	(n=32)	(n=12)	(n=5)	(n=3)	(n=44)	(n=8)	
f (%)	0 (0/32)	75 (9/12)	0 (0/5)	0 (0/3)	6,8 (3/44)	0 (0/8)	0,000
$\bar{x} \pm SD$ (% LČ)	3,81 ± 4,60	41,83 ± 24,44	1,20 ± 0,45	1,33 ± 0,58	5,14 ± 12,66	0,88 ± 0,35	0,000
Me (opseg)	1,5 (0 - 18)	49,5 (1 - 75)	1 (1 - 2)	1 (1 - 2)	1 (0 - 73)	1 (0 - 1)	
CD19 obrazac		(n=9)			(n=3)		
nizak	/	44,4 (4/9)	/	/	100 (3/3)	/	0,240
srednji		44,4 (4/9)			0 (0/3)		
visok		0 (0/9)			0 (0/3)		
heterogen		11,1 (1/9)			0 (0/3)		
CD22 (% LČ)	(n=32)	(n=11)	(n=5)	(n=3)	(n=42)	(n=8)	
f (%)	0 (0/32)	9,1 (1/11)	0 (0/5)	0 (0/3)	4,8 (2/42)	0 (0/8)	0,644
$\bar{x} \pm SD$ (% LČ)	1,41 ± 1,19	6,55 ± 7,05	2,60 ± 1,52	6,00 ± 3,61	5,21 ± 6,14	2,13 ± 2,10	0,000
Me (opseg)	1 (0 - 5)	4 (1 - 25)	2 (1 - 5)	5 (3 - 10)	3 (1 - 29)	1 (1 - 7)	
CD22 obrazac		(n=1)			(n=2)		
nizak	/	100 (1/1)	/	/	100 (2/2)	/	/

srednji		0 (0/1)			0 (0/2)		
visok		0 (0/1)			0 (0/2)		
heterogen		0 (0/1)			0 (0/2)		
cCD79a (% LČ)	(n=27)	(n=12)	(n=4)	(n=3)	(n=38)	(n=7)	
f (%)	0 (0/27)	33,3 (4/12)	0 (0/4)	0 (0/3)	0 (0/38)	0 (0/7)	0,000
$\bar{x} \pm SD$ (% LČ)	1,22 ± 1,01	8,08 ± 8,30	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,29 ± 1,52	2,14 ± 3,18	0,000
Me (opseg)	1 (0 - 4)	6 (1 - 30)			1 (0 - 8)	1 (0 - 9)	
cCD79a obrazac		(n=4)					
nizak		100 (4/4)					
srednji	/	0 (0/4)	/	/	/	/	/
visok		0 (0/4)					
heterogen		0 (0/4)					

Skraćenice: f, učestalost ekspresije molekula; LČ, leukemijske ćelije; Me, medijana; obr, obrazac; SD, standardna devijacija; \bar{x} , prosečna vrednost; p1 vrednost, odnosi se na učestalost karakteristike; p2 vrednost, osnosi se na prosečnu vrednost karakteristike.

Tabela 44. Demografske i kliničko-hematološke karakteristike suptipova AML-NOS

Karakteristika	AML sa minimalnom dif. n=9	AML bez sazrevanja n=15	AML sa sazrevanjem n=37	AML Monoblastna n=15	AML Monocitna n=19	AML Mijelomonocitna n=38	AML Bazofilna n=2	P
Pol f (%)	(n=9)	(n=15)	(n=37)	(n=15)	(n=19)	(n=38)	(n=2)	
muški	66,7 (6/9)	66,7 (10/15)	64,9 (24/37)	66,7 (10/15)	52,6 (10/19)	44,7 (17/38)	100 (2/2)	0,386
ženski	33,3 (3/9)	33,3 (5/15)	35,1 (13/37)	33,3 (5/15)	47,4 (9/19)	55,3 (21/38)	0 (0/2)	
Starost	(n=9)	(n=15)	(n=37)	(n=15)	(n=19)	(n=38)	(n=2)	
$\bar{x} \pm SD$ (god)	62,11 ± 8,31	57,27 ± 14,26	53,57 ± 14,88	57,87 ± 12,56	51,37 ± 12,69	54,47 ± 13,16	67,00 ± 7,07	0,317
Me (opseg)	62 (49 - 76)	56 (24 - 84)	57 (19 - 74)	60 (36 - 76)	54 (19 - 67)	58,5 (22 - 78)	67 (62 - 72)	
≥ 60 god. f (%)	55,6 (5/9)	33,3 (5/15)	45,9 (17/37)	53,3 (8/15)	31,6 (6/19)	39,5 (15/38)	100 (2/2)	0.447
Le	(n=9)	(n=15)	(n=37)	(n=15)	(n=19)	(n=38)	(n=2)	
$\bar{x} \pm SD$ ($\times 10^9/l$)	8,99 ± 14,75	26,56 ± 36,77	27,30 ± 48,15	37,25 ± 56,60	104,38 ± 72,43	47,42 ± 88,08	2,45 ± 1,20	0,000
Me (opseg)	2 (0,8 - 41,0)	4,1 (0,7 - 122,9)	6,2 (0,7 - 215,0)	8,4 (1,3 - 202,3)	104 (1,9 - 206,4)	15,9 (1,1 - 375,2)	2,45 (1,6 - 3,3)	

Le nivo f (%)	(n=9)	(n=15)	(n=37)	(n=15)	(n=19)	(n=38)	(n=2)	0,000
snižen	77,8 (7/9)	46,7 (7/15)	45,9 (17/37)	26,7 (4/15)	5,3 (1/19)	13,2 (5/38)	100 (2/2)	
povišen	22,2 (2/9)	46,7 (7/15)	45,9 (17/37)	46,7 (7/15)	89,5 (17/19)	60,5 (23/38)	0 (0/2)	
Tr	(n=9)	(n=15)	(n=37)	(n=15)	(n=19)	(n=38)	(n=2)	0,596
$\bar{x} \pm SD$ ($\times 10^9/l$)	53,00 \pm 60,05	58,60 \pm 54,65	71,57 \pm 57,85	73,40 \pm 51,72	69,63 \pm 44,03	81,00 \pm 74,63	41,00 \pm 15,56	
Me (opseg)	23 (9 - 183)	40 (1 - 157)	53 (5 - 211)	72 (4 - 162)	57 (16 - 190)	59,5 (4 - 402)	41 (30 - 52)	
Tr nivo	(n=9)	(n=15)	(n=37)	(n=15)	(n=19)	(n=38)	(n=2)	0,990
snižen f(%)	88,9 (8/9)	86,7 (13/15)	86,5 (32/37)	93,3 (14/15)	89,5 (17/19)	86,8 (33/38)	100 (2/2)	
Hb	(n=9)	(n=15)	(n=37)	(n=15)	(n=19)	(n=38)	(n=2)	0,634
$\bar{x} \pm SD$ (g/l)	96,00 \pm 10,74	90,20 \pm 19,76	93,32 \pm 17,20	94,93 \pm 22,99	99,84 \pm 19,14	90,79 \pm 15,65	99,00 \pm 4,24	
Me (opseg)	97 (78 - 108)	95 (57 - 127)	92 (65 - 138)	88 (52 - 138)	94 (71 - 137)	89,5 (46 - 122)	99 (96 - 102)	
Hb nivo	(n=9)	(n=15)	(n=37)	(n=15)	(n=19)	(n=38)	(n=2)	0,701
snižen f (%)	100 (9/9)	93,3 (14/15)	89,2 (33/37)	86,7 (13/15)	89,5 (17/19)	97,4 (37/38)	100 (2/2)	
Blasti pk	(n=8)	(n=14)	(n=37)	(n=15)	(n=19)	(n=38)	(n=2)	0,004
$\bar{x} \pm SD$ (% Le)	24,88 \pm 36,09	46,79 \pm 40,54	34,32 \pm 28,81	40,80 \pm 29,52	67,79 \pm 33,64	32,53 \pm 26,90	27,50 \pm 3,54	
Me (opseg)	4,5 (0 - 92)	40,5 (0 - 98)	37 (0 - 85)	30 (0 - 92)	88 (11 - 96)	28,5 (0 - 96)	27,5 (25 - 30)	
Blasti ks	(n=9)	(n=15)	(n=37)	(n=15)	(n=19)	(n=38)	(n=2)	0,000
$\bar{x} \pm SD$ (% NČ)	76,00 \pm 19,33	80,00 \pm 16,92	54,76 \pm 24,05	65,33 \pm 21,50	78,95 \pm 12,34	63,76 \pm 18,21	76,00 \pm 2,83	
Me (opseg)	80 (44 - 96)	86 (43 - 97)	58 (19 - 94)	62 (32 - 96)	79 (48 - 95)	68,5 (20 - 90)	76 (74 - 78)	
LDH	(n=5)	(n=11)	(n=27)	(n=9)	(n=6)	(n=25)	/	0,148
$\bar{x} \pm SD$ (U/l)	606,7 \pm 343,4	1984,6 \pm 1708,9	1345,6 \pm 1419,3	724,4 \pm 475,6	1499,0 \pm 596,4	1231,6 \pm 1808,8		
Me (opseg)	588 (273 - 959)	1718 (234 - 4950)	829 (315 - 5523)	679 (231 - 1678)	1423 (767 - 2378)	904 (150 - 9144)		
LDH nivo f(%)	(n=5)	(n=11)	(n=27)	(n=9)	(n=6)	(n=25)	(n=1)	0,559
povišen	40 (2/5)	54,5 (6/11)	66,7 (18/27)	55,6 (5/9)	83,3 (5/6)	68 (17/25)	0 (0/1)	
Limfadenopatija	(n=7)	(n=11)	(n=29)	(n=12)	(n=8)	(n=29)	(n=2)	0,154
Prisutna f(%)	0 (0/7)	0 (0/11)	6,9 (2/29)	0 (0/12)	25 (2/8)	20,7 (6/29)	0 (0/2)	
Hepatosplenome.	(n=7)	(n=11)	(n=29)	(n=12)	(n=8)	(n=29)	(n=2)	0,128
Prisutna f(%)	0 (0/7)	27,3 (3/11)	10,3 (3/29)	16,7 (2/12)	50 (4/8)	27,6 (8/29)	50 (1/2)	

Skraćenice: Hb, hemoglobin; ks, kostna srž; LDH, laktat dehidrogenaza; Le, leukociti; Me, medijana; pk, periferna krv; SD, standardna devijacija; Tr, trombociti; \bar{x} , prosečna vrednost.

Tabela 45. Zastupljenost imunološki definisanih populacija ćelija u ks bolesnika sa AML-NOS

Karakteristika	AML sa minimalnom dif. n=9	AML bez sazrevanja n=15	AML sa sazrevanjem n=37	AML Monoblastna n=15	AML Monocitna n=19	AML Mijelomonocitna n=38	AML Bazofilna n=2	P
AĆ CD45/SSC $\bar{x} \pm SD$ (%NĆ) Me (opseg)	(n=9) 62,56 ± 26,13 55 (28 - 93)	(n=15) 79,14 ± 12,42 80 (51 - 97)	(n=37) 46,36 ± 23,58 43 (17 - 93)	(n=15) 62,75 ± 21,51 59,5 (26 - 93)	(n=19) 85,78 ± 10,11 88 (55 - 97)	(n=38) 60,03 ± 21,42 61 (20 - 96)	(n=2) 70,50 ± 4,95 70,5 (67 - 74)	0,000
AĆ CD45 obr f(%) nizak srednji visok heterogen	(n=9) 66,7 (6/9) 22,2 (2/9) 0 (0/9) 11,1 (1/9)	(n=15) 40 (6/15) 53,3 (8/15) 6,7 (1/15) 0 (0/15)	(n=37) 48,6 (18/37) 40,5 (15/37) 8,1 (3/37) 2,7 (1/37)	(n=15) 13,3 (2/15) 46,7 (7/15) 20 (3/15) 20 (3/15)	(n=19) 0 (0/19) 15,8 (3/19) 68,4 (13/19) 15,8 (3/19)	(n=38) 2,6 (1/38) 34,2 (13/38) 23,7 (9/38) 39,5 (15/38)	(n=2) 0 (0/2) 0 (0/2) 50 (1/2) 50 (1/2)	0,000
AĆ SSC f(%) niska srednja heterogena	(n=9) 77,8 (7/9) 22,2 (2/9) 0 (0/9)	(n=15) 66,7 (10/15) 20 (3/15) 13,3 (2/15)	(n=37) 56,8 (21/37) 29,7 (11/37) 13,5 (5/37)	(n=15) 86,7 (13/15) 0 (0/15) 13,3 (2/15)	(n=19) 5,3 (1/19) 73,7 (14/19) 21,1 (4/19)	(n=38) 21,1 (8/38) 47,4 (18/38) 31,6 (12/38)	(n=2) 100 (2/2) 0 (0/2) 0 (0/2)	0,000
CD34⁺ pop. $\bar{x} \pm SD$ (% NĆ) Me (opseg)	(n=9) 56,89 ± 31,36 54 (1 - 93)	(n=15) 61,10 ± 30,48 70 (0 - 96)	(n=37) 34,20 ± 24,41 27,5 (0 - 91)	(n=15) 57,67 ± 18,65 54,5 (23 - 88)	(n=19) 7,24 ± 12,43 1,05 (0 - 42)	(n=38) 25,11 ± 20,01 23 (0 - 60)	(n=2) 65,50 ± 12,02 65,5 (57 - 74)	0,000
CD117⁺ pop. $\bar{x} \pm SD$ (% NĆ) Me (opseg)	(n=9) 53,67 ± 24,58 53 (17 - 85)	(n=15) 76,14 ± 11,44 76,5 (50 - 96)	(n=37) 38,33 ± 19,48 35,5 (15 - 91)	(n=15) 45,69 ± 19,59 49 (9 - 77)	(n=19) 13,78 ± 14,02 5,3 (0 - 38)	(n=38) 29,28 ± 18,03 28 (0 - 75)	(n=2) 46,50 ± 6,36 46,5 (42 - 51)	0,000
Σ B prekursori $\bar{x} \pm SD$ (% NĆ) Me (opseg)	(n=9) 0,08 ± 0,11 0 (0 - 0,32)	(n=14) 0,11 ± 0,20 0 (0 - 0,72)	(n=36) 0,17 ± 0,32 0 (0 - 1,33)	(n=12) 0,26 ± 0,53 0 (0 - 1,52)	(n=18) 0,10 ± 0,28 0 (0 - 1,16)	(n=37) 0,34 ± 1,44 0 (0 - 8,82)	/	0,656
Limfociti $\bar{x} \pm SD$ (% NĆ) Ne (opseg)	(n=9) 23,33 ± 19,31 15 (4 - 55)	(n=14) 7,79 ± 5,28 6,5 (1 - 19)	(n=36) 14,53 ± 15,83 7 (1 - 60)	(n=12) 16,08 ± 17,61 8 (3 - 59)	(n=18) 6,22 ± 5,99 3,5 (2 - 25)	(n=37) 9,11 ± 9,64 5 (1 - 41)	(n=2) 20,5 ± 2,12 20,5 (19 - 22)	0,043
Gr prekursori $\bar{x} \pm SD$ (% NĆ) Me (opseg)	(n=9) 10,11 ± 10,12 5 (2 - 32)	(n=14) 8,36 ± 7,20 7,5 (1 - 25)	(n=35) 34,29 ± 20,88 27 (4 - 72)	(n=12) 15,50 ± 13,36 10 (1 - 38)	(n=18) 6,39 ± 5,02 5 (1 - 15)	(n=37) 25,78 ± 16,23 21 (1 - 59)	(n=2) 4,50 ± 3,54 4,50 (2 - 7)	0,000
Eozinofili $\bar{x} \pm SD$ (% NĆ) Me (opseg)	(n=6) 1,15 ± 0,76 1,2 (0,12 - 2,4)	(n=8) 0,96 ± 0,74 0,8 (0,17 - 2,4)	(n=29) 1,50 ± 1,28 1,2 (0,2 - 5,5)	(n=8) 1,33 ± 0,83 1,4 (0,2 - 2,8)	(n=8) 0,70 ± 0,28 0,64 (0,4 - 1,1)	(n=16) 4,56 ± 4,82 3,2 (0,24 - 19)	/	0,006
Mono prekursori	(n=9)	(n=14)	(n=35)	(n=12)	(n=18)	(n=36)	(n=2)	

$\bar{x} \pm SD$ (% NČ)	2,54 ± 4,70	3,11 ± 3,46	5,20 ± 5,16	9,25 ± 7,77	69,78 ± 19,02	27,94 ± 21,31	1,50 ± 0,71	0,000
Me (opseg)	1 (0,2 - 15)	1 (0,3 - 11)	3 (0,2 - 22)	6,5 (1 - 26)	69 (28 - 96)	20,5 (0,39 - 78)	1,50 (1 - 2)	
Eritro prekursori	(n=9)	(n=10)	(n=29)	(n=8)	(n=7)	(n=31)		
$\bar{x} \pm SD$ (% NČ)	9,00 ± 11,54	8,35 ± 6,88	13,26 ± 13,90	5,12 ± 4,11	1,80 ± 1,64	8,44 ± 7,87	/	0,016
Me (opseg)	5 (1 - 31)	6 (0,5 - 20)	9 (1 - 63)	5,5 (0,5 - 10)	1 (0,5 - 5)	7 (1 - 30)		
Skraćenice: AČ, atipične ćelije; Gr, granulocitni; Eritro, eritrocitni; Mono, monocitni; ks, kostna srž; Li, limfociti; Me, medijana; pk, periferna krv; pop., populacija; SD, standardna devijacija; SSC, ćelijska granulacija; \bar{x} , prosečna vrednost.								

Tabela 46. Različiti aspekti ekspresije ranih linijski nespecifičnih i ranih mijelomonocitnih hLDM na populaciji blasta AML-NOS

hLDM	AML sa minimal. dif. n=9	AML bez sazrevanja n=15	AML sa sazrevanjem n=37	AML monoblastna n=15	AML monocitna n=19	AML mijelomonocitna n=38	AML bazofilna n=2	p1/p2
CD11a f(%) $\bar{x} \pm SD$ (% LČ) Me (opseg)	(n=3) 100 (3/3) 79,33 \pm 19,76 83 (58 - 97)	(n=5) 100 (5/5) 66,60 \pm 26,35 76 (21 - 85)	(n=9) 88,9 (8/9) 64,22 \pm 24,26 67 (18 - 96)	(n=6) 100 (6/6) 88,17 \pm 12,91 89,5 (66 - 100)	(n=7) 100 (7/7) 90,57 \pm 10,77 99 (77 - 99)	(n=19) 89,5 (17/19) 73,98 \pm 30,45 91 (4 - 98)	(n=19) 100 (1/1) / /	0,867 0,078
CD11a obr f (%) nizak srednji visok heterogen	(n=3) 33,3 (1/3) 33,3 (1/3) 33,3 (1/3) 0 (0/3)	(n=5) 60 (3/5) 0 (0/5) 20 (1/5) 20 (1/5)	(n=8) 50 (4/8) 12,5 (1/8) 12,5 (1/8) 25 (2/8)	(n=6) 0 (0/6) 33,3 (2/6) 50 (3/6) 16,7 (1/6)	(n=7) 0 (0/7) 0 (0/7) 85,7 (6/7) 14,3 (1/7)	(n=17) 17,6 (3/17) 11,8 (2/17) 41,2 (7/17) 29,4 (5/17)	(n=1) 0 (0/1) 0 (0/1) 100 (1/1) 0 (0/1)	0,254
CD38 f(%) $\bar{x} \pm SD$ (% LČ) Me (opseg)	(n=5) 100 (5/5) 90,60 \pm 10,55 95 (72 - 98)	(n=7) 100 (7/7) 92,57 \pm 11,91 97 (66 - 100)	(n=17) 100 (17/17) 83,82 \pm 18,28 92 (35 - 99)	(n=10) 100 (10/10) 86,70 \pm 18,86 95 (46 - 100)	(n=9) 100 (9/9) 94,78 \pm 6,42 97 (82 - 100)	(n=24) 100 (24/24) 91,38 \pm 9,56 93,5 (60 - 100)	(n=2) 100 (2/2) 86,50 \pm 13,44 86,5 (77 - 96)	/ 0,507
CD38 obr f (%) nizak srednji visok heterogen	(n=5) 60 (3/5) 20 (1/5) 20 (1/5) 0 (0/5)	(n=7) 28,6 (2/7) 42,9 (3/7) 28,6 (2/7) 0 (0/7)	(n=17) 58,8 (10/17) 23,5 (4/17) 17,6 (3/17) 0 (0/17)	(n=10) 30 (3/10) 40 (4/10) 20 (2/10) 10 (1/10)	(n=9) 11,1 (1/9) 55,6 (5/9) 22,2 (2/9) 11,1 (1/9)	(n=24) 29,2 (7/24) 25 (6/24) 45,8 (11/24) 0 (0/24)	(n=2) 100 (2/2) 0 (0/2) 0 (0/2) 0 (0/2)	0,278
CD123 f(%) $\bar{x} \pm SD$ (% LČ) Me (opseg)	(n=5) 100 (5/5) 83,80 \pm 18,70 89 (51 - 97)	(n=5) 100 (5/5) 77,00 \pm 18,12 82 (47 - 95)	(n=10) 100 (10/10) 73,60 \pm 21,60 81 (36 - 95)	(n=8) 100 (8/8) 78,00 \pm 22,77 88 (43 - 99)	(n=7) 100 (7/7) 79,00 \pm 26,18 91 (23 - 98)	(n=17) 100 (17/17) 75,53 \pm 16,31 82 (40 - 96)	(n=2) 100 (2/2) 88,00 \pm 9,90 88 (81 - 95)	/ 0,798
CD123 obr f (%) nizak srednji visok heterogen	(n=5) 40 (2/5) 40 (2/5) 20 (1/5) 0 (0/5)	(n=5) 80 (4/5) 0 (0/5) 20 (1/5) 0 (0/5)	(n=10) 50 (5/10) 30 (3/10) 0 (0/10) 20 (2/10)	(n=8) 37,5 (3/8) 37,5 (3/8) 0 (0/8) 25 (2/8)	(n=7) 0 (0/7) 28,6 (2/7) 28,6 (2/7) 42,9 (3/7)	(n=17) 41,2 (7/17) 35,3 (6/17) 0 (0/17) 23,5 (4/17)	(n=2) 0% (0/2) 100% (2/2) 0% (0/2) 0% (0/2)	0,154
CD135 f(%) $\bar{x} \pm SD$ (% LČ) Me(opseg)	(n=5) 100 (5/5) 89,20 \pm 7,10 88 (79 - 98)	(n=4) 100 (4/4) 78,50 \pm 32,68 93 (30 - 98)	(n=13) 100 (13/13) 80,31 \pm 21,25 91 (32 - 98)	(n=7) 100 (7/7) 84,86 \pm 15,25 87 (61 - 100)	(n=5) 100 (5/5) 88,80 \pm 10,96 89 (75 - 81)	(n=16) 100 (16/16) 75,69 \pm 16,43 78,5 (38 - 97)	(n=2) 100 (2/2) 84,50 \pm 4,95 84,5 (81 - 88)	/ 0,425

CD135 obr f (%)	(n=5)	(n=4)	(n=13)	(n=7)	(n=5)	(n=16)	(n=2)	
nizak	60 (3/5)	75 (3/4)	76,9 (10/13)	57,1 (4/7)	20 (1/5)	56,3 (9/16)	100 (2/2)	0,578
srednji	40 (2/5)	25 (1/4)	23,1 (3/13)	28,6 (2/7)	40 (2/5)	18,8 (3/16)	0 (0/2)	
visok	0 (0/5)	0 (0/4)	0 (0/13)	14,3 (1/7)	40 (2/5)	12,5 (2/16)	0 (0/2)	
heterogen	0 (0/5)	0 (0/4)	0 (0/13)	0 (0/7)	0 (0/5)	12,5 (2/16)	0 (0/2)	
CD71	(n=6)	(n=6)	(n=19)	(n=10)	(n=15)	(n=22)	(n=22)	
f(%)	100 (6/6)	72,7 (8/11)	100 (19/19)	100 (10/10)	93,3 (14/15)	100 (22/22)	100 (1/1)	0,018
$\bar{x} \pm SD$ (% LČ)	84,50 ± 15,96	55,27 ± 34,58	70,58 ± 20,95	62,70 ± 25,27	63,60 ± 20,26	68,32 ± 14,13	/	
Me (opseg)	91,5 (54 - 95)	58 (6 - 95)	70 (24 - 97)	69,5 (20 - 90)	65 (14 - 97)	68 (37 - 87)		
CD71 obr f (%)	(n=6)	(n=8)	(n=19)	(n=10)	(n=14)	(n=22)	(n=1)	
nizak	66,7 (4/6)	75 (6/8)	84,2 (16/19)	90 (9/10)	92,9 (13/14)	86,4 (19/22)	100 (1/1)	0,826
srednji	16,7 (1/6)	12,5 (1/8)	0 (0/19)	10 (1/10)	7,1 (1/14)	4,5 (1/22)	0 (0/1)	
visok	0 (0/6)	0 (0/8)	0 (0/19)	0 (0/10)	0 (0/14)	0 (0/22)	0 (0/1)	
heterogen	16,7 (1/6)	12,5 (1/8)	15,8 (3/19)	0 (0/10)	0 (0/14)	9,1 (2/22)	0 (0/1)	
HLA-DR	(n=9)	(n=15)	(n=37)	(n=15)	(n=19)	(n=38)	(n=2)	
f(%)	100 (9/9)	80 (12/15)	94,6 (35/37)	100 (15/15)	100 (19/19)	92,1 (35/38)	100 (2/2)	0,207
$\bar{x} \pm SD$ (% LČ)	91,67 ± 14,75	72,93 ± 39,10	83,70 ± 21,92	86,00 ± 20,30	91,21 ± 10,07	83,21 ± 26,12	98,00 ± 0,00	
Me (opseg)	98 (54 - 100)	96 (1 - 99)	91 (3 - 99)	94 (32 - 99)	95 (63 - 99)	93 (1 - 99)	98 (98 - 98)	
HLA-DR obr f(%)	(n=9)	(n=12)	(n=35)	(n=15)	(n=19)	(n=35)	(n=2)	
nizak	11,1 (1/9)	8,3 (1/12)	5,7 (2/35)	6,7 (1/15)	5,3 (1/19)	2,9 (1/35)	0 (0/2)	0,594
srednji	0 (0/9)	16,7 (2/12)	5,7 (2/35)	26,7 (4/15)	10,5 (2/19)	5,7 (2/35)	0 (0/2)	
visok	66,7 (6/9)	66,7 (8/12)	54,3 (19/35)	46,7 (7/15)	42,1 (8/19)	51,4 (18/35)	100 (2/2)	
heterogen	22,2 (2/9)	8,3 (1/12)	34,3 (12/35)	20 (3/15)	42,1 (8/19)	40 (14/35)	0 (0/2)	
CD34	(n=9)	(n=15)	(n=37)	(n=15)	(n=19)	(n=38)	(n=2)	
f(%)	88,9 (8/9)	80 (12/15)	83,8 (31/37)	100 (15/15)	21,1 (4/19)	71,1 (27/38)	100 (2/2)	0,000
$\bar{x} \pm SD$ (% LČ)	86,44 ± 30,44	73,93 ± 39,93	70,95 ± 36,12	87,80 ± 15,37	9,84 ± 15,26	46,68 ± 34,37	95,50 ± 3,54	
Me (opseg)	98 (6 - 99)	95 (1 - 100)	93 (1 - 99)	95 (47 - 100)	3 (1 - 48)	48,5 (1 - 96)	95,5 (93 - 98)	
CD34 obr f (%)	(n=8)	(n=12)	(n=31)	(n=15)	(n=4)	(n=27)	(n=2)	
nizak	0 (0/8)	0 (0/12)	0 (0/31)	0 (0/15)	0 (0/4)	3,7 (1/27)	0 (0/2)	0,002
srednji	0 (0/8)	0 (0/12)	6,5 (2/31)	0 (0/15)	0 (0/4)	0 (0/27)	0 (0/2)	
visok	100 (8/8)	91,7 (11/12)	74,2 (23/31)	60 (9/15)	0 (0/4)	29,6 (8/27)	100 (2/2)	
heterogen	0 (0/8)	8,3 (1/12)	19,4 (6/31)	40 (6/15)	100 (4/4)	66,7 (18/27)	0 (0/2)	
CD117	(n=9)	(n=15)	(n=37)	(n=15)	(n=19)	(n=38)	(n=2)	
f(%)	100 (9/9)	93,3 (14/15)	100 (37/37)	100 (15/15)	52,6 (10/19)	92,1 (35/38)	100 (2/2)	0,000
$\bar{x} \pm SD$ (% LČ)	87,89 ± 11,93	89,60 ± 22,91	85,08 ± 12,63	79,00 ± 23,68	22,47 ± 20,10	52,82 ± 28,69	69,00 ± 21,21	
Me (opseg)	91 (62 - 98)	97 (8 - 100)	89 (49 - 98)	88 (23 - 98)	12 (1 - 73)	57,5 (2 - 97)	69 (54 - 84)	
CD117 obr f (%)	(n=9)	(n=14)	(n=37)	(n=15)	(n=10)	(n=35)	(n=2)	
nizak	11,1 (1/9)	0 (0/14)	2,7 (1/37)	26,7 (4/15)	20 (2/10)	2,9 (1/35)	50 (1/2)	

srednji	44,4 (4/9)	7,1 (1/14)	27 (10/37)	13,3 (2/15)	10 (1/10)	17,1 (6/35)	50 (1/2)	0,001
visok	22,2 (2/9)	85,7 (12/14)	51,4 (19/37)	46,7 (7/15)	20 (2/10)	37,1 (13/35)	0 (0/2)	
heterogen	22,2 (2/9)	7,1 (1/14)	18,9 (7/37)	13,3 (2/15)	50 (5/10)	42,9 (15/35)	0 (0/2)	
CD13	(n=9)	(n=15)	(n=37)	(n=15)	(n=19)	(n=38)	(n=9)	0,478
f(%)	100 (9/9)	93,3 (14/15)	100 (37/37)	100 (15/15)	89,5 (17/19)	94,7 (36/38)	100 (2/2)	
$\bar{x} \pm SD$ (% LĆ)	87,44 \pm 24,53	81,47 \pm 28,33	89,27 \pm 13,44	88,00 \pm 16,00	56,53 \pm 26,22	70,24 \pm 26,26	63,00 \pm 31,11	
Me (opseg)	96 (23 - 99)	94 (7 - 100)	95 (37 - 99)	93 (83 - 99)	62 (7 - 99)	80 (5 - 99)	63 (41 - 85)	0,000
CD13 obr f (%)	(n=9)	(n=14)	(n=37)	(n=15)	(n=17)	(n=36)	(n=2)	0,000
nizak	11,1 (1/9)	14,3 (2/14)	2,7 (1/37)	13,3 (2/15)	5,9 (1/17)	2,8 (1/36)	100 (2/2)	
srednji	33,3 (3/9)	21,4 (3/14)	35,1 (13/37)	20 (3/15)	0 (0/17)	11,1 (4/36)	0 (0/2)	
visok	44,4 (4/9)	64,3 (9/14)	48,6 (18/37)	53,3 (8/15)	11,8 (2/17)	27,8 (10/36)	0 (0/2)	
heterogen	11,1 (1/9)	0 (0/14)	13,5 (5/37)	13,3 (2/15)	82,4 (14/17)	58,3 (21/36)	0 (0/2)	
CD33	(n=9)	(n=14)	(n=36)	(n=15)	(n=19)	(n=37)	(n=2)	0,060
f(%)	100 (9/9)	86,7 (13/15)	94,4 (34/36)	93,3 (14/15)	100 (19/19)	97,3 (36/37)	50 (1/2)	
$\bar{x} \pm SD$ (% LĆ)	65,89 \pm 28,31	59,80 \pm 37,70	76,03 \pm 27,96	73,13 \pm 29,64	89,47 \pm 7,80	84,92 \pm 20,68	22,00 \pm 12,73	
Me (opseg)	78 (25 - 98)	67 (3 - 100)	92 (5 - 100)	85 (6 - 100)	99 (73 - 100)	94 (17 - 100)	22 (13 - 31)	0,000
CD33 obr f (%)	(n=9)	(n=13)	(n=34)	(n=14)	(n=19)	(n=36)	(n=1)	0,004
nizak	66,7 (6/9)	53,8 (7/13)	29,4 (10/34)	14,3 (2/14)	5,3 (1/19)	11,1 (4/36)	100 (1/1)	
srednji	11,1 (1/9)	7,7 (1/13)	26,5 (9/34)	28,6 (4/14)	21,1 (4/19)	16,7 (6/36)	0 (0/1)	
visok	22,2 (2/9)	38,5 (5/13)	32,4 (11/34)	28,6 (4/14)	68,4 (13/19)	47,2 (17/36)	0 (0/1)	
heterogen	0 (0/9)	0 (0/13)	11,8 (4/34)	28,6 (4/14)	5,3 (1/19)	25 (9/36)	0 (0/1)	
cMPO	(n=9)	(n=14)	(n=37)	(n=14)	(n=19)	(n=37)	(n=2)	0,000
f(%)	33,3 (3/9)	92,9 (13/14)	83,8 (31/37)	35,7 (5/14)	68,4 (13/19)	86,5 (32/37)	0 (0/2)	
$\bar{x} \pm SD$ (% LĆ)	13,56 \pm 21,60	65,93 \pm 31,33	47,60 \pm 34,69	19,14 \pm 30,27	25,74 \pm 27,33	45,73 \pm 30,20	/	
Me (opseg)	6 (1 - 70)	77 (31 - 95)	42 (1 - 97)	6 (0 - 99)	16 (0 - 84)	38 (2 - 98)	/	0,000
cMPO obr f (%)	(n=3)	(n=13)	(n=31)	(n=5)	(n=13)	(n=32)	/	0,167
nizak	33,3 (1/3)	53,8 (7/13)	16,1 (5/31)	80 (4/5)	30,8 (4/13)	31,3 (10/32)	/	
srednji	0 (0/3)	7,7 (1/13)	22,6 (7/31)	20 (1/5)	7,7 (1/13)	9,4 (3/32)	/	
visok	0 (0/3)	15,4 (2/13)	12,9 (4/31)	0 (0/5)	0 (0/13)	6,3 (2/32)	/	
heterogen	66,7 (2/3)	23,1 (3/13)	48,4 (15/31)	0 (0/5)	61,5 (8/13)	53,1 (17/32)	/	
clizozim	(n=5)	(n=2)	(n=7)	(n=6)	(n=5)	(n=12)	(n=1)	0,000
f(%)	0 (0/5)	0 (0/2)	14,3 (1/7)	66,7 (4/6)	100 (5/5)	91,7 (11/12)	0 (0/1)	
$\bar{x} \pm SD$ (% LĆ)	1,60 \pm 0,89	2,00 \pm 1,41	5,29 \pm 4,54	19,00 \pm 21,52	89,60 \pm 16,61	53,75 \pm 28,55	/	
Me (opseg)	1 (1 - 3)	2 (1 - 3)	4 (1 - 14)	13 (3 - 62)	99 (61 - 100)	44,5 (6 - 100)	/	0,000
clizoz. obr f(%)			(n=1)	(n=4)	(n=5)	(n=11)	/	0,247
nizak	/	/	0 (0/1)	0 (0/4)	20 (1/5)	18,2 (2/11)	/	
srednji	/	/	0 (0/1)	0 (0/4)	0 (0/5)	18,2 (2/11)	/	
visok	/	/	0 (0/1)	25 (1/4)	80 (4/5)	45,5 (5/11)	/	

heterogen			100 (1/1)	75 (3/4)	0 (0/5)	18,2 (2/11)	
-----------	--	--	-----------	----------	---------	-------------	--

Skraćenice: f, učestalost ekspresije molekula; Me, medijana; obr, obrazac; SD, standardna devijacija; \bar{x} , prosečna vrednost; p1 vrednost, odnosi se na učestalost karakteristike; p2 vrednost, osnosi se na prosečnu vrednost karakteristike.

Tabela 47. Različiti aspekti ekspresije kasnih mijelomonocitnih hLDM na populaciji blasta AML-NOS								
hLDM	AML sa minimal. dif. n=9	AML bez sazrevanja n=15	AML sa sazrevanjem n=37	AML monoblastna n=15	AML monocitna n=19	AML mijelomonocitna n=38	AML bazofilna n=2	P1/P2
cCD68 f(%) $\bar{x} \pm SD$ (% LČ) Me (opseg)	(n=4) 100 (4/4) 65,00 \pm 26,99 69,5 (31 - 90)	(n=3) 100 (3/3) 86,33 \pm 17,01 93 (67 - 90)	(n=9) 100 (9/9) 63,89 \pm 27,68 70 (20 - 99)	(n=8) 100 (8/8) 67,38 \pm 19,84 72 (36 - 89)	(n=7) 100 (7/7) 95,57 \pm 5,03 97 (85 - 100)	(n=16) 100 (16/16) 85,00 \pm 12,78 91 (61 - 98)	(n=1) 100 (1/1) / /	 / 0,006
cCD68 obr f (%) nizak srednji visok heterogen	(n=4) 100 (4/4) 0 (0/4) 0 (0/4) 0 (0/4)	(n=3) 66,7 (2/3) 33,3 (1/3) 0 (0/3) 0 (0/3)	(n=9) 77,8 (7/9) 11,1 (1/9) 11,1 (1/9) 0 (0/9)	(n=8) 37,5 (3/8) 0 (0/8) 0 (0/8) 62,5 (5/8)	(n=7) 0 (0/7) 0 (0/7) 57,1 (4/7) 42,9 (3/7)	(n=16) 25 (4/16) 6,3 (1/16) 18,8 (3/16) 50 (8/16)	(n=1) 100 (1/1) 0 (0/1) 0 (0/1) 0 (0/1)	 0,010
CD15 f(%) $\bar{x} \pm SD$ (% LČ) Me (opseg)	(n=9) 11,1 (1/9) 6,56 \pm 7,04 4 (1 - 25)	(n=15) 0 (0/15) 5,13 \pm 4,21 3 (1 - 14)	(n=37) 21,6 (8/37) 13,54 \pm 13,26 8 (1 - 58)	(n=15) 0 (0/15) 6,67 \pm 4,79 5 (1 - 17)	(n=19) 100 (19/19) 71,89 \pm 21,30 81 (20 - 98)	(n=38) 60,5 (23/38) 35,18 \pm 27,17 28 (3 - 98)	(n=2) 0 (0/2) 8,506 \pm 6,36 8,5 (4 - 13)	 0,000 0,000
CD15 obr f (%) nizak srednji visok heterogen	(n=1) 100 (1/1) 0 (0/1) 0 (0/1) 0 (0/1)	 / / / /	(n=8) 0 (0/8) 0 (0/8) 0 (0/8) 100 (8/8)	 / / / /	(n=19) 10,5 (2/19) 10,5 (2/19) 26,3 (5/19) 52,6 (10/19)	(n=23) 0 (0/23) 13 (3/23) 13 (3/23) 73,9 (17/23)	 / / / /	 0,004
CD11b f(%) $\bar{x} \pm SD$ (% LČ) Me (opseg)	(n=9) 0 (0/9) 4,00 \pm 3,12 3 (1 - 11)	(n=15) 0 (0/15) 5,40 \pm 5,77 3 (1 - 18)	(n=37) 10,8 (4/37) 9,38 \pm 9,82 6 (1 - 45)	(n=15) 66,7 (10/15) 37,87 \pm 25,85 42 (4 - 95)	(n=19) 94,7 (18/19) 72,84 \pm 23,29 84 (15 - 94)	(n=38) 76,6 (29/38) 45,95 \pm 25,92 40 (4 - 98)	(n=2) 50 (1/2) 14,00 \pm 16,97 14 (2 - 26)	 0,000 0,000
CD11b obr f (%) nizak srednji visok	 / / /	 / / /	(n=4) 25 (0/1) 0 (0/0) 0 (0/0)	(n=10) 70 (7/10) 0 (0/10) 0 (0/10)	(n=18) 11,1 (2/18) 5,6 (1/18) 38,9 (7/18)	(n=29) 6,9 (2/29) 0 (0/29) 13,8 (4/29)	(n=1) 100 (1/1) 0 (0/1) 0 (0/1)	 0,001

heterogen			75 (8/3)	30 (3/10)	44,4 (8/18)	79,3 (23/29)	0 (0/1)	
CD11c	(n=9)	(n=14)	(n=32)	(n=15)	(n=18)	(n=37)	(n=2)	
f(%)	11,1 (1/9)	42,9 (6/14)	21,9 (7/32)	60 (9/15)	94,4 (17/18)	91,9 (34/37)	0 (0/2)	0,000
$\bar{x} \pm SD$ (% LČ)	8,00 \pm 11,29	21,50 \pm 23,24	13,22 \pm 15,76	34,67 \pm 27,62	77,72 \pm 24,92	48,24 \pm 25,79	3,50 \pm 0,71	0,000
Me (opseg)	4 (2 - 37)	11 (1 - 71)	6,5 (1 - 68)	22 (5 - 100)	86,5 (18 - 99)	45 (4 - 99)	3,5 (3 - 4)	
CD11c obr f (%)	(n=1)	(n=6)	(n=7)	(n=9)	(n=17)	(n=34)		
nizak	100 (1/1)	100 (6/6)	100 (7/7)	55,6 (5/9)	11,8 (2/17)	32,4 (11/34)		
srednji	0 (0/1)	0 (0/6)	0 (0/7)	0 (0/9)	11,8 (2/17)	5,9 (2/34)	/	0,010
visok	0 (0/1)	0 (0/6)	0 (0/7)	11,1 (1/9)	41,2 (7/17)	20,6 (7/34)		
heterogen	0 (0/1)	0 (0/6)	0 (0/7)	33,3 (3/9)	35,3 (6/17)	41,2 (14/34)		
CD4	(n=9)	(n=14)	(n=33)	(n=15)	(n=18)	(n=38)	(n=1)	
f(%)	22,2 (2/9)	21,4 (3/14)	30,3 (10/33)	86,7 (13/15)	94,4 (17/18)	88,6 (31/35)	0% (0/1)	0,000
$\bar{x} \pm SD$ (% LČ)	19,89 \pm 25,62	14,14 \pm 17,99	18,36 \pm 21,27	42,27 \pm 24,92	66,67 \pm 25,54	48,31 \pm 26,17	/	0,000
Me (opseg)	10 (1 - 69)	6,5 (1 - 63)	10 (0 - 78)	35 (7 - 90)	69 (8 - 100)	43(3 - 95)		
CD4 obr f (%)	(n=2)	(n=3)	n=10)	(n=13)	(n=17)	(n=31)		
nizak	100 (2/2)	100 (3/3)	90 (9/10)	76,9 (10/13)	41,2 (7/17)	58,1 (18/31)		
srednji	0 (0/2)	0 (0/3)	10 (1/10)	23,1 (3/13)	35,3 (6/17)	22,6 (7/31)	/	0,064
visok	0 (0/2)	0 (0/3)	0 (0/10)	0 (0/13)	23,5 (4/17)	3,2 (1/31)		
heterogen	0 (0/2)	0 (0/3)	0 (0/10)	0 (0/13)	0 (0/17)	16,1 (5/31)		
CD64	(n=9)	(n=15)	(n=36)	(n=14)	(n=17)	(n=35)	(n=1)	
f(%)	0 (0/9)	0 (0/15)	8,3 (3/36)	14,3 (2/14)	100 (17/17)	74,3 (26/35)	0 (0/1)	0,000
$\bar{x} \pm SD$ (% LČ)	2,67 \pm 1,12	5,33 \pm 4,15	10,67 \pm 16,19	9,50 \pm 7,19	86,18 \pm 14,57	43,34 \pm 28,88		0,000
Me (opseg)	2 (1 - 4)	5 (1 - 13)	5,50 (1 - 73)	6,5 (3 - 28)	93 (58 - 100)	44 (3 - 98)		
CD64 obr f (%)			(n=3)	(n=2)	(n=17)	(n=26)		
nizak			100 (3/3)	50 (1/2)	5,9 (1/17)	7,7 (2/26)		
srednji	/	/	0 (0/3)	50 (1/2)	5,9 (1/17)	23,1 (6/26)	/	0,001
visok			0 (0/3)	0 (0/2)	76,5 (13/17)	46,2 (12/26)		
heterogen			0 (0/3)	0 (0/2)	11,8 (2/17)	23,1 (6/26)		
CD36	(n=9)	(n=15)	(n=37)	(n=15)	(n=19)	(n=38)	(n=2)	
f(%)	0 (0/9)	0 (0/15)	0 (0/37)	20 (3/15)	89,5 (17/19)	57,9 (22/38)	0 (0/2)	0,000
$\bar{x} \pm SD$ (% LČ)	7,33 \pm 2,92	4,13 \pm 3,80	5,43 \pm 3,46	14,33 \pm 15,89	62,21 \pm 27,15	32,92 \pm 27,19	3,00 \pm 1,41	0,000
Me (opseg)	8 (3 - 11)	3 (1 - 15)	5 (1 - 16)	9 (2 - 51)	66 (4 - 89)	26 (1 - 93)	3 (2 - 4)	
CD36 obr f (%)				(n=3)	(n=17)	(n=22)		
nizak				0 (0/3)	11,8 (2/17)	4,5 (1/22)		
srednji	/	/	/	33,3 (1/3)	11,8 (2/17)	13,6 (3/22)	/	0,896
visok				0 (0/3)	11,8 (2/17)	9,1 (2/22)		
heterogen				66,7 (2/3)	64,7 (11/17)	72,7 (16/22)		
CD14	(n=9)	(n=15)	(n=37)	(n=15)	(n=19)	(n=38)	(n=2)	

f(%)	0 (0/9)	0 (0/15)	0 (0/37)	0 (0/15)	68,4 (13/19)	34,2 (13/38)	0 (0/2)	0,000
$\bar{x} \pm SD$ (% LČ)	1,78 \pm 1,20	1,80 \pm 2,08	2,22 \pm 2,08	4,47 \pm 4,07	30,89 \pm 19,96	16,687 \pm 15,51	1,00 \pm 0,00	0,000
Me (opseg)	2 (0 - 4)	1 (1 - 9)	1 (1 - 11)	3 (1 - 14)	31 (2 - 63)	14 (1 - 57)	1 (1 - 1)	
CD14 obr f (%)					(n=13)	(n=13)		
nizak					0 (0/13)	0 (0/13)		0,480
srednji	/	/	/	/	0 (0/13)	0 (0/13)	/	
visok					0 (0/13)	15,4 (2/13)		
heterogen					100 (13/13)	84,6 (11/13)		
CD163	(n=4)	(n=3)	(n=9)	(n=5)	(n=4)	(n=11)		
f(%)	0 (0/4)	0 (0/3)	0 (0/9)	0 (0/5)	100 (4/4)	27,3 (3/11)	/	0,001
$\bar{x} \pm SD$ (% LČ)	1,75 \pm 0,96	2,00 \pm 1,73	1,11 \pm 0,33	2,40 \pm 3,36	46,25 \pm 15,92	13,27 \pm 9,42		0,000
Me (opseg)	1,5 (1 - 3)	1 (1 - 4)	1 (1 - 2)	1 (0 - 8)	45,5 (30 - 64)	11 (2 - 30)		
CD163 obr f (%)					(n=4)	(n=3)		
nizak					50 (2/4)	66,7 (2/3)		0,405
srednji	/	/	/	/	0 (0/4)	33,3 (1/3)	/	
visok					25 (1/4)	0 (0/3)		
heterogen					25 (1/4)	0 (0/3)		

Skraćenice: f, učestalost ekspresije molekula; Me, medijana; obr, obrazac; SD, standardna devijacija; \bar{x} , prosečna vrednost; p1 vrednost, odnosi se na učestalost karakteristike; p2 vrednost, osnosi se na prosečnu vrednost karakteristike.

Tabela 48. Različiti aspekti ektopične ekspresije limfoidnih hLDM na populaciji blasta AML-NOS

hLDM	AML sa minim. dif. n=9	AML bez sazr. n=15	AML sa sazr. n=37	AML monoblastna n=15	AML monocitna n=19	AML mijelomonocitna n=38	AML bazofilna n=2	P1/P2
CD2	(n=9)	(n=15)	(n=37)	(n=15)	(n=19)	(n=38)	(n=2)	
f(%)	0 (0/9)	0 (0/15)	5,4 (2/37)	0 (0/15)	10,5 (2/19)	10,5 (4/38)	0 (0/2)	0,574
$\bar{x} \pm SD$ (% LČ)	2,44 \pm 1,33	1,20 \pm 0,68	3,51 \pm 4,99	5,13 \pm 4,70	6,16 \pm 7,43	7,97 \pm 10,08	2,50 \pm 0,71	0,001
Me (opseg)	2 (1 - 5)	1 (0 - 2)	1 (0 - 23)	3 (1 - 18)	3 (1 - 27)	3,5 (1 - 40)	2,5 (2 - 3)	

CD2 obr f (%) nizak srednji visok heterogen	/	/	(n=2) 100 (2/2) 0 (0/2) 0 (0/2) 0 (0/2)	/	(n=2) 100 (2/2) 0 (0/2) 0 (0/2) 0 (0/2)	(n=4) 100 (4/4) 0 (0/4) 0 (0/4) 0 (0/4)	/	/
CD7 f(%) $\bar{x} \pm SD$ (% LČ) Me (opseg)	(n=9) 0 (0/9) 4,22 ± 3,87 2 (1 - 12)	(n=15) 13,3 (2/15) 11,73 ± 24,50 1 (1 - 89)	(n=37) 18,9 (7/37) 14,43 ± 24,44 3 (1 - 92)	(n=15) 26,7 (4/15) 15,53 ± 20,32 8 (2 - 70)	(n=19) 10,5 (2/19) 6,00 ± 9,67 2 (1 - 39)	(n=38) 15,8 (6/38) 11,74 ± 15,63 7 (1 - 85)	(n=2) 50 (1/2) 54,00 ± 62,22 54 (10 - 98)	0,499 0,010
CD7 obr f (%) nizak srednji visok heterogen	/	(n=2) 100 (2/2) 0 (0/2) 0 (0/2) 0 (0/2)	(n=7) 71,4 (5/7) 28,6 (2/7) 0 (0/7) 0 (0/7)	(n=4) 100 (4/4) 0 (0/4) 0 (0/4) 0 (0/4)	(n=2) 100 (2/2) 0 (0/2) 0 (0/2) 0 (0/2)	(n=6) 66,7 (4/6) 16,7 (1/6) 0 (0/6) 16,7 (1/6)	(n=1) 0 (0/1) 0 (0/1) 100 (1/1) 0 (0/1)	0,025
CD56 f(%) $\bar{x} \pm SD$ (% LČ) Me (opseg)	(n=9) 22,2 (2/9) 14,56 ± 19,37 5 (1 - 53)	(n=15) 13,3 (2/15) 10,40 ± 23,41 2 (1 - 92)	(n=37) 13,5 (5/37) 11,97 ± 23,69 2 (0 - 94)	(n=15) 26,7 (4/15) 15,80 ± 24,19 4 (1 - 88)	(n=19) 73,7 (14/19) 43,74 ± 34,08 36 (0 - 100)	(n=38) 26,3 (10/38) 14,66 ± 22,21 5,5 (1 - 94)	(n=2) 50 (1/2) 13,50 ± 17,68 13,5 (1 - 26)	0,000 0,001
CD56 obr f (%) nizak srednji visok heterogen	(n=2) 50 (1/2) 0 (0/2) 0 (0/2) 50 (1/2)	(n=2) 50 (1/2) 0 (0/2) 0 (0/2) 50 (1/2)	(n=5) 40 (2/5) 20 (1/5) 40 (2/5) 0 (0/5)	(n=4) 50 (2/4) 25 (1/4) 25 (1/4) 0 (0/4)	(n=14) 50 (7/14) 0 (0/14) 28,6 (4/14) 21,4 (3/14)	(n=10) 30 (3/10) 10 (1/10) 10 (1/10) 50 (5/10)	(n=1) 100 (1/1) 0 (0/1) 0 (0/1) 0 (0/1)	0,734
CD19 f(%) $\bar{x} \pm SD$ (% LČ) Me (opseg)	(n=9) 0 (0/9) 3,67 ± 4,87 1 (1 - 16)	(n=15) 0 (0/15) 2,80 ± 4,13 1 (0 - 15)	(n=37) 18,9 (7/37) 9,65 ± 18,68 1 (1 - 81)	(n=15) 0 (0/15) 1,93 ± 1,87 1 (0 - 8)	(n=19) 0 (0/19) 2,47 ± 3,82 1 (0 - 15)	(n=38) 5,3 (2/38) 3,66 ± 5,97 2 (0 - 33)	(n=2) 0 (0/2) 2,00 ± 1,41 2 (1 - 3)	0,038 0,527
CD19 obr f (%) nizak srednji visok heterogen	/	/	(n=7) 71,4 (5/7) 0 (0/7) 0 (0/7) 28,6 (2/7)	/	/	(n=2) 50 (1/2) 50 (1/2) 0 (0/2) 0 (0/2)	/	0,124
CD22 f(%) $\bar{x} \pm SD$ (% LČ) Me (opseg)	(n=8) 50 (4/8) 18,50 ± 17,50 14 (3 - 53)	(n=14) 0 (0/14) 1,93 ± 1,681 1 (1 - 7)	(n=36) 5,6 (2/36) 4,68 ± 8,95 1,5 (0 - 49)	(n=15) 40 (6/15) 19,00 ± 23,40 15 (1 - 85)	(n=17) 11,8 (2/17) 10,29 ± 13,23 6 (1 - 64)	(n=36) 19,4 (7/36) 13,86 ± 16,25 8 (1 - 68)	(n=2) 100 (2/2) 77,00 ± 25,46 77 (59 - 95)	0,000 0,000
CD22 obr f (%) nizak	(n=4) 75 (3/4)	/	(n=2) 100 (2/2)	(n=6) 50 (3/6)	(n=2) 50 (1/2)	(n=7) 71,4 (5/7)	(n=2) 50 (1/2)	

srednji visok heterogen	0 (0/4) 0 (0/4) 25 (1/4)		100 (0/2) 0 (0/2) 0 (0/2)	16,7 (1/6) 0 (0/6) 33,3 (2/6)	0 (0/2) 0 (0/2) 50 (1/2)	0 (0/7) 0 (0/7) 28,6 (2/7)	50 (1/2) 0 (0/2) 0 (0/2)	0,618
cCD79a f (%) $\bar{x} \pm SD$ (% LC) Me (opseg)	(n=9) 33,3 (3/9) 9,22 ± 13,87 4 (1 - 43)	(n=14) 0 (0/14) 1,07 ± 0,92 1 (0 - 3)	(n=30) 10 (3/30) 2,73 ± 5,01 1 (0 - 20)	(n=13) 0 (0/13) 1,77 ± 2,20 1 (0 - 8)	(n=18) 0 (0/18) 0,94 ± 0,64 1 (0 - 3)	(n=34) 2,9 (1/34) 2,53 ± 3,27 1 (0 - 16)	(n=2) 0 (0/2) 1,50 ± 0,71 1,5 (1 - 2)	0,010 0,012
cCD79a obr f (%) nizak srednji visok heterogen	(n=3) 66,7 (2/3) 0 (0/3) 0 (0/3) 33,3 (1/3)	/	(n=3) 66,7 (2/3) 0 (0/3) 0 (0/3) 33,3 (1/3)	/	/	(n=1) 100 (1/1) 0 (0/1) 0 (0/1) 0 (0/1)	/	0,792

Skraćenice: f, učestalost ekspresije molekula; Me, medijana; obr, obrazac; SD, standardna devijacija; \bar{x} , prosečna vrednost; p1 vrednost, odnosi se na učestalost karakteristike; p2 vrednost, osnosi se na prosečnu vrednost karakteristike.

Tabela 56. Uporedne karakteristike zdravih i regenerativnih kontrolnih uzoraka periferne krvi

Karakteristika pk	Zdrave kontrolne pk	Regenerativne kontrolne pk	P
Pol f(%) muški ženski	n=13 61,5% (8/13) 38,5 % (5/13)	n=10 50% (5/10) 50 % (5/10)	0,685
Starost $\bar{x} \pm SD$ (godine) Me (opseg)	n=13 34,85 \pm 18,39 31 (9 - 68)	n=10 58,20 \pm 5,75 58,5 (50 - 66)	*0,001
Leukociti $\bar{x} \pm SD$ ($\times 10^9/l$) Me (opseg)	n=13 8,85 \pm 4,03 8,2 (3 - 19,2)	n=10 5,62 \pm 1,86 5,6 (3,3 - 8,6)	*0,020
Trombociti $\bar{x} \pm SD$ ($\times 10^9/l$) Me (opseg)	n=13 228,77 \pm 49,83 234 (173 - 368)	n=10 227,20 \pm 92,42 207 (143 - 449)	*0,962
Hemoglobin $\bar{x} \pm SD$ (g/l) Me (opseg)	n=13 130,15 \pm 18,80 129 (100 - 160)	n=10 131,60 \pm 12,47 133,5 (110 - 151)	*0,827
Limfociti Hem. kaunter $\bar{x} \pm SD$ (% Le) Me (opseg)	n=13 29,23 \pm 11,17 31 (11 - 44)	n=10 21,60 \pm 7,41 22,5 (10 - 30)	*0,063
Limfociti MPC $\bar{x} \pm SD$ (ć/ μ l) Me (opseg)	n=13 2395,31 \pm 1189,37 2380 (1056 - 5460)	n=10 1264,90 \pm 711,63 1029 (370 - 2580)	*0,010
Limfociti MPC $\bar{x} \pm SD$ (% Le) Me (opseg)	n=13 28,23 \pm 11,13 29 (10 - 44)	n=10 20,50 \pm 8,33 20,5 (9 - 32)	*0,071
B-Limfociti $\bar{x} \pm SD$ (% Li) Me (opseg)	n=13 10,85 \pm 4,41 10 (6 - 22)	n=10 1,30 \pm 4,11 0 (0 - 13)	0,000
B- Limfociti $\bar{x} \pm SD$ (ć/ μ l) Me (opseg)	n=13 259,62 \pm 140,68 260 (63 - 475)	n=10 8,40 \pm 26,56 0 (0 - 84)	0,000
T- Limfociti $\bar{x} \pm SD$ (% Li) Me (opseg)	n=13 70,77 \pm 10,42 70 (52 - 85)	n=10 65,90 \pm 22,97 69,5 (18 - 93)	*0,545
T- Limfociti $\bar{x} \pm SD$ (ć/ μ l) Me (opseg)	n=13 1645,54 \pm 711,16 1551 (864 - 3167)	n=10 887,80 \pm 563,62 783,5 (67 - 1628)	*0,010
CD4+ T- Limfociti $\bar{x} \pm SD$ (% Li) Me (opseg)	n=11 41,27 \pm 8,24 40 (31 - 56)	n=10 33,60 \pm 13,97 35 (13 - 58)	0,158
CD4+ T- Limfociti $\bar{x} \pm SD$ (ć/ μ l) Me (opseg)	n=9 1122,22 \pm 294,87 1109 (735 - 1693)	n=10 464,40 \pm 328,50 385,5 (48 - 925)	*0,000
NKT- Limfociti $\bar{x} \pm SD$ (% Li) Me (opseg)	n=11 4,42 \pm 4,74 2,2 (1 - 16)	n=10 3,27 \pm 3,11 2 (0,2 - 9)	0,697

NKT- Limfociti $\bar{x} \pm SD$ (ć/ μ l) Me (opseg)	n=11 99,00 \pm 120,13 47 (19 - 417)	n=10 50,60 \pm 56,77 25,5 (1 - 177)	0,159
NK- Limfociti $\bar{x} \pm SD$ (% Li) Me (opseg)	n=10 17,70 \pm 6,98 20,5 (8 - 29)	n=10 23,40 \pm 18,69 16,5 (6 - 69)	*0,385
NK- Limfociti $\bar{x} \pm SD$ (ć/ μ l) Me (opseg)	n=9 531,33 \pm 418,21 436 (214 - 1583)	n=10 255,10 \pm 201,61 262 (79 - 748)	0,050
Eozinofili PCM $\bar{x} \pm SD$ (% NĆ) Me (opseg)	n=12 2,83 \pm 1,92 2,35 (0,2 - 7,8)	n=10 2,88 \pm 1,48 3,3 (0,3 - 5)	*0,949
Bazofili PCM $\bar{x} \pm SD$ (% NĆ) Me (opseg)	n=13 0,55 \pm 0,25 0,6 (0,2 - 1)	n=10 0,52 \pm 0,30 0,5 (0,1 - 0,9)	*0,826
Granulociti PCM $\bar{x} \pm SD$ (% NĆ) Me (opseg)	n=13 63,62 \pm 12,48 61 (47 - 86)	n=10 68,90 \pm 8,12 70,5 (58 - 79)	*0,234
Promijelociti PCM $\bar{x} \pm SD$ (% Gr) Me (opseg)	n=13 0,08 \pm 0,28 0 (0 - 1)	n=10 1,10 \pm 1,85 0,5 (0 - 6)	0,022
Mijelociti PCM $\bar{x} \pm SD$ (% Gr) Me (opseg)	n=13 1,15 \pm 1,07 1 (0 - 4)	n=10 3,60 \pm 5,40 2 (0 - 18)	0,317
Metamijelociti PCM $\bar{x} \pm SD$ (% Gr) Me (opseg)	n=13 1,54 \pm 2,70 0 (0 - 8)	n=10 0,00 \pm 0,00	0,032
Neutrofilni PCM $\bar{x} \pm SD$ (% Gr) Me (opseg)	n=13 97,23 \pm 2,86 98 (91 - 100)	n=10 95,20 \pm 5,55 97,5 (82 - 100)	0,300
Monociti PCM $\bar{x} \pm SD$ (% NĆ) Me (opseg)	n=11 5,58 \pm 1,64 5,9 (2,8 - 8,1)	n=10 7,37 \pm 2,64 6,7 (4,4 - 13,3)	*0,085
Promonociti PCM $\bar{x} \pm SD$ (% Mono) Me (opseg)	n=13 1,08 \pm 0,95 1 (0 - 3)	n=10 1,50 \pm 1,08 1,5 (0 - 3)	*0,340
Monociti PCM $\bar{x} \pm SD$ (% Mono) Me (opseg)	n=13 98,92 \pm 0,95 99 (97 - 100)	n=10 98,50 \pm 1,08 98,5 (97 - 100)	*0,340
CD34+ populacija $\bar{x} \pm SD$ (% Le) Me (opseg)	n=12 0,035 \pm 0,018 0,03 (0,02 - 0,07)	n=10 0,021 \pm 0,019 0,01 (0,01 - 0,06)	0,015
CD34+ populacija $\bar{x} \pm SD$ (x10 ⁶ /l) Me (opseg)	n=12 3,235 \pm 1,921 2,865 (0,98 - 7,21)	n=10 1,286 \pm 1,436 0,72 (0,33 - 4,30)	0,004
CD117+ populacija $\bar{x} \pm SD$ (% Le) Me (opseg)	n=12 0,027 \pm 0,024 0,01 (0,01 - 0,07)	n=10 0,021 \pm 0,017 0,01 (0,00 - 0,05)	0,613
CD34+CD117+ populacija $\bar{x} \pm SD$ (% Le) Me (opseg)	n=11 0,019 \pm 0,014 0,01 (0,01 - 0,05)	n=10 0,013 \pm 0,016 0,01 (0,00 - 0,05)	0,148

CD34+CD117+ populacija $\bar{x} \pm SD$ ($\times 10^6/l$) Me (opseg)	n=11 1,791 \pm 1,367 0,99 (0,49 - 4,12)	n=10 0,840 \pm 1,083 0,465 (0 - 3,05)	0,020
---	---	---	--------------

Tabela 57. Uporedne karakteristike zdravih i regenerativnih kontrolnih uzoraka kostne srži

Karakteristika ks	Zdrave Kontrolne ks	Regenerativne kontrolene ks	p
Koncentracija ćelija uzorka $\bar{x} \pm SD$ ($\times 10^6$ ćel/ml) Me (opseg)	n=12 30,12 \pm 27,61 22,5 (12 - 115)	n=8 32,32 \pm 39,22 20 (7,6 - 125)	0,487
CD34+ populacija $\bar{x} \pm SD$ (% NĆ) Me (opseg)	n=13 0,96 \pm 0,30 1 (0,38 - 1,38)	n=10 1,47 \pm 0,56 1,475 (0,53 - 2,48)	0,022
CD117+ populacija $\bar{x} \pm SD$ (% NĆ) Me (opseg)	n=13 0,87 \pm 0,34 0,78 (0,5 - 1,74)	n=10 0,99 \pm 0,40 0,91 (0,44 - 1,71)	0,452
CD34+CD117+ populacija $\bar{x} \pm SD$ (% NĆ) Me (opseg)	n=11 0,66 \pm 0,26 0,58 (0,32 - 1,06)	n=10 0,57 \pm 0,32 0,45 (0,28 - 1,12)	0,495
CD34+CD13+ populacija $\bar{x} \pm SD$ (% NĆ) Me (opseg)	n=13 0,61 \pm 0,26 0,58 (0,25 - 1,05)	n=10 0,66 \pm 0,30 0,6 (0,25 - 1,13)	0,691
CD34+CD33+ populacija $\bar{x} \pm SD$ (% NĆ) Me (opseg)	n=11 0,61 \pm 0,22 0,69 (0,2 - 0,89)	n=10 0,55 \pm 0,30 0,48 (0,21 - 1,03)	0,598
CD117+CD33+ populacija $\bar{x} \pm SD$ (% NĆ) Me (opseg)	n=13 0,55 \pm 0,22 0,62 (0,14 - 0,92)	n=10 0,42 \pm 0,24 0,38 (0,18 - 0,85)	0,208
CD34+CD13^{low}CD7^{low} pop. $\bar{x} \pm SD$ (% NĆ) Me (opseg)	n=13 0,026 \pm 0,016 0,02 (0 - 0,05)	n=10 0,024 \pm 0,012 0,02 (0,01 - 0,05)	0,709
CD34+CD33+CD2+ pop. $\bar{x} \pm SD$ (% NĆ) Me (opseg)	n=12 0,042 \pm 0,024 0,04 (0,02 - 0,1)	n=10 0,032 \pm 0,020 0,025 (0,01 - 0,08)	0,220
Σ Hematogoni I/II $\bar{x} \pm SD$ (% NĆ) Me (opseg)	n=13 1,42 \pm 1,49 1,17 (0,09 - 5,82)	n=10 3,06 \pm 4,12 1,36 (0,05 - 13,88)	0,239
Hematogoni I $\bar{x} \pm SD$ (% NĆ) Me (opseg)	n=13 0,17 \pm 0,13 0,14 (0,01 - 0,43)	n=10 0,49 \pm 0,35 0,485 (0,01 - 0,91)	0,021
Mi prog. (CD34+CD19- pop.) $\bar{x} \pm SD$ (%/CD34+) Me (opseg)	n=13 82,00 \pm 16,27 88 (36 - 97)	n=10 68,00 \pm 18,65 76 (39 - 97)	0,067
B prog. (CD34+CD19+ pop.) $\bar{x} \pm SD$ (%/CD34+)	n=13 18,00 \pm 16,27	n=10 33,00 \pm 18,97	0,067

Me (opseg)	12 (3 - 64)	24 (3 - 61)	
Odnos Mi/B progenitora	n=13	n=10	
$\bar{x} \pm SD$	9,13 \pm 8,57	5,32 \pm 9,57	0,067
Me (opseg)	7,33 (0,56 - 32,33)	3,17 (0,64 - 32,33)	
Granulocitni prekursori PCM	n=13	n=10	
$\bar{x} \pm SD$ (% NĆ)	77,38 \pm 6,10	72,90 \pm 7,46	0,141
Me (opseg)	79 (63 - 84)	74 (61 - 85)	
Promijelociti PCM	n=13	n=10	
$\bar{x} \pm SD$ (% Gr prek)	1,62 \pm 0,77	3,50 \pm 2,72	0,023
Me (opseg)	1 (1 - 3)	3 (1 - 10)	
Mijelociti PCM	n=13	n=10	
$\bar{x} \pm SD$ (% Gr prek)	37,54 \pm 10,71	40,10 \pm 13,54	0,629
Me (opseg)	38 (23 - 60)	37,5 (19 - 64)	
Metamijelociti PCM	n=13	n=10	
$\bar{x} \pm SD$ (% Gr prek)	24,00 \pm 5,02	25,60 \pm 7,86	0,583
Me (opseg)	25 (16 - 31)	25 (13 - 38)	
Neutrofili PCM	n=13	n=10	
$\bar{x} \pm SD$ (% Gr prek)	36,85 \pm 10,88	31,10 \pm 14,63	0,314
Me (opseg)	40 (20 - 60)	29 (12 - 56)	
Eozinofili PCM	n=12	n=10	
$\bar{x} \pm SD$ (% NĆ)	2,84 \pm 1,23	4,08 \pm 1,73	0,076
Me (opseg)	2,75 (1,4 - 5,8)	3,8 (2 - 8,2)	
Bazofili PCM	n=12	n=10	
$\bar{x} \pm SD$ (% NĆ)	0,51 \pm 0,17	0,48 \pm 0,25	0,772
Me (opseg)	0,45 (0,26 - 0,80)	0,4 (0,2 - 0,9)	
Mono prekursori PCM	n=11	n=10	
$\bar{x} \pm SD$ (% NĆ)	4,31 \pm 0,81	5,43 \pm 1,68	0,078
Me (opseg)	4,2 (3,3 - 5,9)	5,25 (2,9 - 8,4)	
Promonociti PCM	n=13	n=10	
$\bar{x} \pm SD$ (% Mo)	21,69 \pm 9,38	20,10 \pm 9,08	0,925
Me (opseg)	20 (11 - 47)	20,5 (7 - 34)	
Monociti PCM	n=13	n=10	
$\bar{x} \pm SD$ (% Mo)	78,31 \pm 9,38	79,90 \pm 9,08	0,925
Me (opseg)	80 (53 - 89)	79,5 (66 - 93)	
Eritrocitni prekursori PCM	n=13	n=10	
$\bar{x} \pm SD$ (% NĆ)	6,15 \pm 3,08	11,80 \pm 2,25	0,000
Me (opseg)	6 (1 - 12)	12,5 (7 - 14)	
Limfociti PCM	n=13	n=10	
$\bar{x} \pm SD$ (% NĆ)	14,08 \pm 5,39	13,10 \pm 6,33	0,513
Me (opseg)	12 (9 - 28)	12,5 (6 - 26)	
B-Limfociti	n=13	n=10	
$\bar{x} \pm SD$ (% Li)	15,85 \pm 7,73	2,24 \pm 5,55	0,001
Me (opseg)	16 (6 - 35)	0,55 (0 - 18)	
T- Limfociti	n=13	n=10	
$\bar{x} \pm SD$ (% Li)	72,31 \pm 12,23	71,90 \pm 20,54	0,901
Me (opseg)	77 (50 - 88)	75,5 (26 - 97)	
CD4+ T- Limfociti	n=12	n=10	
$\bar{x} \pm SD$ (% Li)	38,67 \pm 6,17	32,90 \pm 13,57	0,238
Me (opseg)	37,5 (30 - 49)	33,5 (13 - 56)	
NKT- Limfociti	n=13	n=10	
$\bar{x} \pm SD$ (% Li)	4,55 \pm 4,98	4,03 \pm 2,48	0,455

Me (opseg)	3 (1 - 17)	3,5 (1,3 - 9)	
NK- Limfociti	n=13	n=10	
$\bar{x} \pm SD$ (% Li)	8,73 \pm 6,70	19,15 \pm 16,10	0,058
Me (opseg)	6 (3 - 25)	16,5 (2,5 - 58)	

Tabela 63. Kliničko-hematološke i biološke karakteristike kao potencijalni prognostički faktori za pojavu rane smrti kod bolesnika sa AML

Karakteristika	Rana smrt (n=235)		
	NE (n=159)	DA (n=76)	P
Pol f(%)			
muški	n=159 59,7% (95/159)	n=76 57,9% (44/76)	0.447
ženski	40,2% (64/159)	42,1% (32/76)	
Starost			
$\bar{x} \pm SD$ (god)	n=159 54,66 \pm 14,10	n=76 57,08 \pm 11,32	0.283
≥ 60 god. f (%)	40,2 (64/159)	48,7 (37/76)	
Leukociti			
$\bar{x} \pm SD$ ($\times 10^9/l$)	n=159 35,72 \pm 57,73	n=76 61,77 \pm 65,89	0.000
povišeni f (%)	50,3 (80/159)	69,7 (53/76)	
$\geq 30 \times 10^9/l$ f (%)	32,7 (52/159)	52,6 (40/76)	
Trombociti			
$\bar{x} \pm SD$ ($\times 10^9/l$)	n=159 73,37 \pm 68,62	n=76 66,51 \pm 53,99	0.727
sniženi f (%)	89,9 (143/159)	93,4 (71/76)	
Hemoglobin			
$\bar{x} \pm SD$ (g/l)	n=159 92,87 \pm 16,74	n=76 94,76 \pm 18,02	0.625
snižen f (%)	92,5 (147/159)	92,1 (70/76)	
LDH			
$\bar{x} \pm SD$ (U/l)	n=98 1364,11 \pm 1461,48	n=41 2005,02 \pm 2394,46	0.020
povišena f (%)	69,6 (80/115)	80,0 (40/50)	
Blasti pk			
$\bar{x} \pm SD$ (% Le)	n=157 34,29 \pm 29,90	n=76 55,90 \pm 31,13	0.000
Blasti ks			
$\bar{x} \pm SD$ (% NĆ)	n=159 64,06 \pm 22,30	n=76 70,87 \pm 19,73	0.031
Limfadenopatija prisutna f (%)	14,2 (19/134)	12,3 (7/57)	0,726
Hepato/splenomegalija prisutna f (%)	25,4 (34/134)	22,8 (13/57)	0,706
Aberantan kariotip prisutan f (%)	45,3 (72/159)	42,1 (32/76)	0,646
Σ FLT3^{mut} prisutna f (%)	23,8 (29/122)	43,8 (21/48)	0,010

FLT3-ITD^{mut} prisutna f (%)	18,0 (22/122)	29,2 (14/48)	0,110
FLT3-d835^{mut} prisutna f (%)	5,7 (7/122)	16,7 (8/48)	0,023
NPM1^{mut} prisutna f (%)	23,8 (29/122)	39,6 (19/48)	0,039
CEBPA^{mut} prisutna f (%)	17,0 (8/47)	0,0 (0/13)	0,182
Grupe rizika f (%) srednje povoljan 1 srednje povoljan 2 povoljan nepovoljan	49,1 (78/159) 13,2 (21/159) 13,2 (21/159) 24,5 (39/159)	50,0 (38/76) 9,2 (7/76) 13,2 (10/76) 27,6 (21/76)	0,827

Tabela 64. Imunofenotipske karakteristike kao potencijalni prognostički parametri za pojavu rane smrti kod bolesnika sa AML na dg

Imunofenotipska karakteristika	Rana smrt (n=235)		
	NE (n=159)	DA (n=76)	p
CD34+ pop. ks $\bar{x} \pm SD$ (% NĆ)	n=159 31,84 ± 27,15	n=76 32,65 ± 30,17	0,783
CD117+ pop. ks $\bar{x} \pm SD$ (% NĆ)	n=159 38,56 ± 23,27	n=76 43,74 ± 28,17	0,194
HLA-DR+ f (%) $\bar{x} \pm SD$ (% NĆ)	n=159 93,1 (148/159) 81,70 ± 25,59	n=76 88,2 (67/76) 79,51 ± 29,68	0,154 0,854
CD34+ f (%) $\bar{x} \pm SD$ (% NĆ)	n=159 71,7 (114/159) 57,83 ± 40,65	n=76 65,8 (50/76) 50,18 ± 40,78	0,356 0,266
CD117+ f (%) $\bar{x} \pm SD$ (% NĆ)	n=159 93,1 (148/159) 71,18 ± 29,08	n=76 84,2 (64/76) 61,50 ± 33,90	0,032 0,023
CD38+	n=80	n=43	

f (%) $\bar{x} \pm SD$ (% NĆ)	100 (80/80) 89,10 \pm 16,73	100 (43/43) 85,81 \pm 19,30	/ 0,094
CD123+ f (%) $\bar{x} \pm SD$ (% NĆ)	n=61 100 (61/61) 77,80 \pm 18,22	n=35 94,3 (33/35) 70,89 \pm 26,01	0,130 0,447
CD135+ f (%) $\bar{x} \pm SD$ (% NĆ)	n=64 100 (64/64) 80,95 \pm 17,67	n=33 100 (33/33) 79,09 \pm 19,89	/ 0,664
CD71+ f (%) $\bar{x} \pm SD$ (% NĆ)	n=95 95,8 (91/95) 68,75 \pm 21,95	n=44 95,5 (42/44) 69,02 \pm 24,22	1,000 0,736
cMPO+ f (%) $\bar{x} \pm SD$ (% NĆ)	n=153 77,8 (119/153) 46,18 \pm 34,27	n=75 70,7 (53/75) 31,80 \pm 30,58	0,241 0,005
CD13+ f (%) $\bar{x} \pm SD$ (% NĆ)	n=159 97,5 (155/159) 78,59 \pm 24,45	n=76 94,7 (72/76) 74,51 \pm 27,62	0,277 0,278
CD33+ f (%) $\bar{x} \pm SD$ (% NĆ)	n=156 96,2 (150/156) 79,58 \pm 25,69	n=76 98,7 (75/76) 81,68 \pm 25,83	0,431 0,093
CD15+ f (%) $\bar{x} \pm SD$ (% NĆ)	n=158 40,5 (64/158) 26,27 \pm 27,83	n=76 43,4 (33/76) 27,97 \pm 29,22	0,672 0,756
CD11a+ f (%) $\bar{x} \pm SD$ (% NĆ)	n=63 98,4 (62/63) 77,11 \pm 23,75	n=35 85,7 (30/35) 68,14 \pm 30,69	0,021 0,159
CD11b+ f (%) $\bar{x} \pm SD$ (% NĆ)	n=158 39,2 (62/158) 26,15 \pm 27,78	n=76 56,6 (43/76) 37,14 \pm 31,74	0,013 0,009
CD11c+ f (%) $\bar{x} \pm SD$ (% NĆ)	n=154 54,5 (84/154) 31,15 \pm 29,14	n=73 60,3 (44/73) 39,11 \pm 35,19	0,416 0,232
CD4+ f (%) $\bar{x} \pm SD$ (% NĆ)	n=147 61,2 (90/147) 36,87 \pm 30,50	n=73 61,6 (45/73) 39,19 \pm 31,28	0,952 0,592
CD64+ f (%) $\bar{x} \pm SD$ (% NĆ)	n=149 37,6 (56/149) 25,54 \pm 29,67	n=70 47,1 (33/70) 35,66 \pm 35,70	0,179 0,101
CD36+ f (%) $\bar{x} \pm SD$ (% NĆ)	n=157 23,6 (37/157) 17,46 \pm 23,48	n=76 35,5 (27/76) 26,38 \pm 29,39	0,055 0,020
CD14+ f (%) $\bar{x} \pm SD$ (% NĆ)	n=159 13,8 (22/159) 7,98 \pm 12,70	n=76 21,1 (16/76) 11,51 \pm 16,39	0,160 0,099
CD163+ f (%) $\bar{x} \pm SD$ (% NĆ)	n=43 9,3 (4/43) 7,16 \pm 14,01	n=21 28,6 (6/21) 14,48 \pm 20,80	0,068 0,157
CD2+ f (%)	n=159 4,4 (7/159) 4,46 \pm 9,04	n=76 6,6 (5/76) 5,72 \pm 8,10	0,478 0,095

$\bar{x} \pm SD$ (% NĆ)			
CD7+ f (%) $\bar{x} \pm SD$ (% NĆ)	n=159 19,5 (31/159) 14,28 ± 23,24	n=76 30,3 (23/76) 20,43 ± 27,81	0,066 0,106
CD56+ f (%) $\bar{x} \pm SD$ (% NĆ)	n=159 28,9 (46/159) 19,35 ± 28,30	n=76 32,9 (25/76) 20,78 ± 28,71	0,536 0,477
CD19+ f (%) $\bar{x} \pm SD$ (% NĆ)	n=159 11,3 (18/159) 6,77 ± 14,95	n=76 6,6 (5/76) 4,74 ± 11,10	0,252 0,900
CD22+ f (%) $\bar{x} \pm SD$ (% NĆ)	n=156 12,8 (20/156) 10,16 ± 16,39	n=70 24,3 (17/70) 13,99 ± 20,47	0,031 0,238
cCD79+ f (%) $\bar{x} \pm SD$ (% NĆ)	n=135 5,2 (7/135) 2,43 ± 4,07	n=70 4,3 (3/70) 2,63 ± 5,65	1,000 0,870
CD35+ f (%) $\bar{x} \pm SD$ (% NĆ)	n=46 32,6 (15/46) 16,49 ± 21,33	n=25 28,0 (7/25) 16,40 ± 17,49	0,688 0,675
CD62L+ f (%) $\bar{x} \pm SD$ (% NĆ)	n=34 82,4 (28/34) 53,85 ± 28,57	n=19 68,4 (13/19) 45,21 ± 28,45	0,245 0,349
CD114+ f (%) $\bar{x} \pm SD$ (% NĆ)	n=44 86,4% (38/44) 61,52 ± 27,13	n=17 76,5% (13/17) 47,82 ± 29,89	0,444 0,076
CD45RA+ f (%) $\bar{x} \pm SD$ (% NĆ)	n=44 38,6% (17/44) 21,32 ± 26,32	n=22 45,5% (10/22) 28,77 ± 32,31	0,595 0,527

Tabela 65. Kliničko-hematološke i biološke karakteristike kao potencijalni prognostički faktori za postizanje KR i nastanak relapsa bolesti u AML

Karakteristike	Kompletna remisija (n=131)			Relaps bolesti (n=95)		
	NE (n=33)	DA (n=98)	P	NE (n=44)	DA (n=51)	P
Pol f(%)						
muški	60,6 (20/33)	59,2 (58/98)	0,791	65,9 (29/44)	54,9 (28/51)	0,189
ženski	39,4 (13/33)	40,8 (40/98)		34,1 (15/44)	45,1 (23/51)	
Starost	n=33	n=98		n=44	n=51	
$\bar{x} \pm SD$ (god)	54,00 ± 12,72	50,66 ± 13,12	0,182	49,16 ± 13,37	51,76 ± 13,26	0,414
≥60 god. f (%)	42,4 (14/33)	25,5 (25/98)	0,066	22,7 (10/44)	29,4 (15/51)	0,461
Leukociti	n=33	n=98		n=44	n=51	
$\bar{x} \pm SD$ ($\times 10^9/l$)	54,58 ± 76,83	34,32 ± 54,2	0.031	32,58 ± 45,29	35,41 ± 61,70	0,902
>10$\times 10^9/l$ f (%)	69,7 (23/33)	48 (47/98)	0,083	45,4 (20/44)	49,0 (25/51)	0,886

$\geq 30 \times 10^9/l$ f (%)	51,5 (17/33)	30,6 (30/98)	0,030	29,5 (13/44)	31,4 (16/51)	0,847
Trombociti $\bar{x} \pm SD$ ($\times 10^9/l$) sniženi f (%)	n=33 76,88 \pm 64,34 90,9 (30/33)	n=98 72,91 \pm 71,01 89,8 (88/98)	0,511 0,853	n=44 56,25 \pm 45,43 93,2 (41/44)	n=51 88,49 \pm 86,54 86,3 (44/51)	0,078 0,331
Hemoglobin $\bar{x} \pm SD$ (g/l) sniženi f (%)	n=33 87,52 \pm 13,80 97 (32/33)	n=98 95,20 \pm 16,30 91,8 (90/98)	0,030 0,448	n=44 93,61 \pm 17,84 90,9 (40/44)	n=51 97,22 \pm 15,04 92,2 (47/51)	0,202 0,827
LDH $\bar{x} \pm SD$ (U/l) povišena f (%)	n=19 1806,16 \pm 1940,15 81 (17/21)	n=66 1264,89 \pm 1303,28 71,6 (53/74)	0,460 0,575	n=32 1093,78 \pm 766,47 81,8 (27/33)	n=32 1465,62 \pm 1697,02 64,1 (25/39)	0,643 0,094
Blasti pk $\bar{x} \pm SD$ (% Le)	n=33 44,33 \pm 27,66	n=97 34,27 \pm 30,36	0,045	n=43 39,00 \pm 31,85	n=51 30,14 \pm 28,74	0,159
Blasti ks $\bar{x} \pm SD$ (% NĆ)	n=33 69,88 \pm 21,06	n=98 64,04 \pm 21,83	0,149	n=44 64,75 \pm 22,36	n=51 63,53 \pm 21,04	0,726
Limfadenopatija prisutna f (%)	n=28 10,7 (3/28)	n=83 18,1 (15/83)	0,554	n=34 11,8 (4/34)	n=46 21,7 (10/46)	0,373
Hepatosplenom. prisutna f (%)	n=28 32,1 (9/28)	n=83 24,1 (20/83)	0,402	n=34 20,6 (7/34)	n=46 28,3 (13/46)	0,433
Aberantan kariot. prisutan f (%)	n=33 57,6 (19/33)	n=98 35,7 (35/98)	0,027	n=44 40,1 (18/44)	n=51 33,3 (17/51)	0,445
Σ <i>FLT3</i> ^{mut} prisutna f (%)	40 (10/25)	22,2 (18/81)	0,078	20,6 (7/34)	23,9 (11/46)	0,725
<i>FLT3-ITD</i> ^{mut} Prisutna f (%)	40 (10/25)	14,8 (12/81)	0,007	14,7 (5/34)	15,2 (7/46)	0,950
<i>NPM1</i> ^{mut} prisutna f (%)	28 (7/25)	22,2 (18/81)	0,552	20,6 (7/34)	23,9 (11/46)	0,725
<i>CEBPA</i> ^{mut} prisutna f (%)	0 (0/8)	20,5 (8/39)	0,318	40 (6/15)	8,3 (2/24)	0,037
Grupe rizika f (%) Sred. povoljan 1 Sred. povoljan 2 povoljan nepovoljan	n=33 39,4 (13/33) 24,2 (8/33) 3 (1/33) 33,3 (11/33)	n=98 59,2 (58/98) 9,2 (9/98) 17,4 (17/98) 14,3 (14/98)	0,002	n=44 52,3 (23/44) 11,4 (5/44) 18,2 (8/44) 18,2 (8/44)	n=51 62,7 (32/51) 7,8 (4/51) 17,6 (9/51) 11,8 (6/51)	0,701

Tabela 66. Imunofenotipske karakteristike kao potencijalni prognozni parametri za postizanje KR i nastanak relapsa bolesti u AML

Imunofenotipske karakteristike	Kompletna remisija (n=131)			Relaps bolesti (n=95)		
	NE (n=33)	DA (n=98)	P	NE (n=44)	DA (n=51)	P
CD34+ pop. ks $\bar{x} \pm SD$ (% NĆ)	n=33 37,36 ± 29,57	n=98 28,87 ± 25,78	0,072	n=33 29,43 ± 28,07	n=98 27,52 ± 24,27	0,899
CD117+ pop. ks $\bar{x} \pm SD$ (% NĆ)	n=33 44,08 ± 23,79	n=98 36,54 ± 22,86	0,122	n=44 41,46 ± 24,10	n=51 32,01 ± 21,22	0,044
HLA-DR+ f (%) $\bar{x} \pm SD$ (% NĆ)	n=33 97 (32/33) 84,06 ± 19,91	n=98 91,8 (90/98) 81,09 ± 27,23	0,448 0,979	n=44 88,6 (39/44) 78,41 ± 31,04	n=51 96,1 (49/51) 85,51 ± 20,72	0,244 0,474
CD34+ f (%) $\bar{x} \pm SD$ (% NĆ)	n=33 75,8 (25/33) 58,09 ± 39,03	n=98 67,4 (66/98) 53,92 ± 41,84	0,364 0,675	n=44 65,9 (29/44) 52,96 ± 42,90	n=51 68,6 (35/51) 55,57 ± 41,25	0,778 0,754
CD117+ f (%) $\bar{x} \pm SD$ (% NĆ)	n=33 93,9 (31/33) 68,09 ± 29,05	n=98 91,8 (90/98) 71,19 ± 29,84	1,000 0,714	n=44 90,9 (40/44) 74,64 ± 29,41	n=51 92,2 (47/51) 67,80 ± 30,86	1,000 0,076
CD38+ f (%) $\bar{x} \pm SD$ (% NĆ)	n=18 100 (18/18) 79,50 ± 24,11	n=49 100 (49/49) 92,22 ± 12,31	1,000 0,023	n=22 100 (22/22) 89,91 ± 16,13	n=26 100 (26/26) 94,08 ± 7,98	1,000 0,495
CD123+ f (%) $\bar{x} \pm SD$ (% NĆ)	n=15 100 (18/18) 86,27 ± 10,62	n=37 100 (37/37) 73,24 ± 19,97	1,000 0,042	n=16 100 (16/16) 78,12 ± 15,50	n=20 100 (20/20) 70,55 ± 22,51	1,000 0,435
CD135+ f (%) $\bar{x} \pm SD$ (% NĆ)	n=15 100 (15/15) 84,87 ± 17,90	n=37 100 (37/37) 79,70 ± 18,46	1,000 0,237	n=14 100 (14/14) 83,14 ± 17,47	n=22 100 (22/22) 77,14 ± 19,42	1,000 0,277
CD71+ f (%) $\bar{x} \pm SD$ (% NĆ)	n=20 100 (20/20) 71,85 ± 21,45	n=62 93,6 (58/62) 65,84 ± 22,52	0,568 0,156	n=30 93,3 (28/30) 63,33 ± 22,61	n=31 93,6 (29/31) 67,42 ± 22,48	1,000 0,440
cMPO+ f (%) $\bar{x} \pm SD$ (% NĆ)	n=30 70 (21/30) 35,40 ± 30,24	n=97 81,4 (79/97) 51,64 ± 35,32	0,181 0,023	n=43 79,1 (34/43) 53,56 ± 35,52	n=51 82,4 (42/51) 48,65 ± 35,44	0,687 0,577
CD13+ f (%) $\bar{x} \pm SD$ (% NĆ)	n=33 97 (32/33) 79,46 ± 24,49	n=98 98 (96/98) 77,42 ± 24,53	1,000 0,589	n=44 95,5 (42/44) 74,48 ± 27,20	n=51 100 (51/51) 80,16 ± 21,78	0,212 0,481
CD33+ f (%) $\bar{x} \pm SD$ (% NĆ)	n=33 97 (32/33) 80,21 ± 25,91	n=95 96,8 (92/95) 81,93 ± 24,71	1,000 0,785	n=43 97,7 (42/43) 79,86 ± 26,23	n=49 95,9 (47/49) 82,96 ± 24,00	1,000 0,787
CD15+ f (%) $\bar{x} \pm SD$ (% NĆ)	n=33 48,5 (16/33) 29,21 ± 28,05	n=97 38,1 (37/97) 27,50 ± 29,93	0,296 0,636	n=43 34,9 (15/43) 23,72 ± 28,12	n=51 43,1 (22/51) 31,53 ± 31,84	0,414 0,551
CD11a+ f (%) $\bar{x} \pm SD$ (% NĆ)	n=13 100 (13/13) 85,00 ± 18,33	n=38 97,4 (37/38) 74,53 ± 23,71	1,000 0,230	n=19 100 (19/19) 75,47 ± 21,90	n=18 94,4 (17/18) 73,94 ± 26,67	0,486 0,867
CD11b+ f (%) $\bar{x} \pm SD$ (% NĆ)	n=33 60,6 (20/33) 35,52 ± 26,60	n=97 30,9 (30/97) 22,90 ± 27,75	0,002 0,004	n=43 27,9 (12/43) 20,40 ± 25,04	n=51 35,3 (18/51) 25,80 ± 30,44	0,444 0,770
CD11c+ f (%) $\bar{x} \pm SD$ (% NĆ)	n=33 60,6 (20/33) 34,58 ± 27,04	n=93 54,8 (51/93) 32,06 ± 30,87	0,566 0,520	n=44 59,1 (26/44) 31,73 ± 29,51	n=47 51,1 (24/47) 32,60 ± 32,86	0,442 0,965

CD4+ f (%) $\bar{x} \pm SD$ (% NĆ)	n=31 77,4 (24/31) 51,23 ± 29,89	n=89 55,1 (49/89) 31,63 ± 29,64	0,028 0,005	n=42 54,8 (23/42) 30,40 ± 29,91	n=45 55,6 (25/45) 33,16 ± 30,17	0,941 0,555
CD64+ f (%) $\bar{x} \pm SD$ (% NĆ)	n=31 48,4 (15/31) 27,84 ± 26,58	n=93 37,6 (35/93) 25,94 ± 31,13	0,291 0,300	n=42 33,3 (14/42) 23,88 ± 30,40	n=48 43,8 (21/48) 28,71 ± 32,61	0,312 0,790
CD36+ f (%) $\bar{x} \pm SD$ (% NĆ)	n=33 33,3 (11/33) 20,36 ± 21,85	n=96 20,8 (20/96) 17,79 ± 25,72	0,147 0,168	n=43 16,3 (7/43) 15,21 ± 23,53	n=50 26 (13/50) 20,70 ± 28,02	0,255 0,304
CD14+ f (%) $\bar{x} \pm SD$ (% NĆ)	n=33 12,1 (4/33) 6,82 ± 7,86	n=98 13,3 (13/98) 7,88 ± 13,31	1,000 0,399	n=44 11,4 (5/44) 6,84 ± 12,31	n=51 15,7 (8/51) 9,16 ± 14,43	0,541 0,254
CD163+ f (%) $\bar{x} \pm SD$ (% NĆ)	n=12 16,7 (2/12) 11,25 ± 17,65	n=22 9,1 (2/22) 6,46 ± 14,34	0,602 0,242	n=9 22,2 (2/9) 11,67 ± 21,81	n=13 0 (0/13) 2,85 ± 2,94	0,156 0,947
CD2+ f (%) $\bar{x} \pm SD$ (% NĆ)	n=33 6,1 (2/33) 4,82 ± 7,51	n=98 4,1 (4/98) 4,70 ± 10,44	0,641 0,487	n=44 2,3 (1/44) 3,68 ± 4,66	n=51 5,9 (3/51) 5,76 ± 13,79	0,621 0,485
CD7+ f (%) $\bar{x} \pm SD$ (% NĆ)	n=33 21,2 (7/33) 17,06 ± 24,97	n=98 19,4 (19/98) 14,67 ± 24,56	0,820 0,203	n=44 25 (11/44) 18,00 ± 28,56	n=51 13,7 (7/51) 11,76 ± 21,04	0,162 0,829
CD56+ f (%) $\bar{x} \pm SD$ (% NĆ)	n=33 30,3 (10/33) 16,58 ± 23,73	n=97 27,6 (27/98) 19,35 ± 29,13	0,761 0,891	n=44 25 (11/44) 19,98 ± 30,43	n=50 31,4 (16/51) 19,88 ± 28,81	0,492 0,820
CD19+ f (%) $\bar{x} \pm SD$ (% NĆ)	n=33 6,1 (2/33) 3,54 ± 4,90	n=98 15,3 (15/98) 8,86 ± 18,09	0,237 0,830	n=44 18,2 (8/44) 9,48 ± 18,36	n=51 13,7 (7/51) 8,69 ± 18,50	0,552 0,837
CD22+ f (%) $\bar{x} \pm SD$ (% NĆ)	n=33 21,2 (7/33) 15,97 ± 24,07	n=96 8,3 (8/96) 7,77 ± 12,26	0,046 0,398	n=43 9,3 (4/43) 8,26 ± 14,46	n=50 8 (4/50) 7,40 ± 10,46	1,000 0,641
cCD79+ f (%) $\bar{x} \pm SD$ (% NĆ)	n=29 0 (0/29) 1,83 ± 1,96	n=86 7 (6/86) 2,77 ± 4,75	0,335 0,898	n=38 5,3 (2/38) 2,45 ± 4,35	n=45 8,9 (4/45) 3,11 ± 5,22	0,683 0,356
CD35+ f (%) $\bar{x} \pm SD$ (% NĆ)	n=9 22,2 (2/9) 9,44 ± 12,34	n=29 35,7 (10/28) 18,45 ± 23,72	0,687 0,410	n=13 38,5 (5/13) 21,85 ± 26,50	n=15 35,7 (5/14) 16,60 ± 22,14	0,883 0,205
CD62L+ f (%) $\bar{x} \pm SD$ (% NĆ)	n=7 71,4 (5/7) 43,86 ± 34,92	n=21 81 (17/21) 54,24 ± 29,48	0,622 0,396	n=8 75 (6/8) 51,00 ± 37,98	n=12 83,3(10/12) 56,50 ± 25,48	1,000 0,847
CD114+ f (%) $\bar{x} \pm SD$ (% NĆ)	n=9 88,9% (8/9) 65,33 ± 28,90	n=27 81,5% (22/27) 57,82 ± 28,35	1,000 0,547	n=16 75% (12/16) 53,19 ± 30,88	n=11 90,9%(10/11) 64,54 ± 23,99	0,618 0,236
CD45RA+ f (%) $\bar{x} \pm SD$ (% NĆ)	n=9 44,4% (4/9) 15,11 ± 9,71	n=25 40% (10/25) 24,36 ± 30,34	1,000 0,861	n=11 36,4% (4/11) 22,91 ± 29,25	n=13 38,5% (5/13) 25,31 ± 33,54	1,000 0,622

Tabela 67. Univarijantna analiza uticaja kliničko-hematoloških i bioloških karakteristika na trajanje KR bolesti i preživljavanje bolesnika sa AML

Karakteristika	Trajanje kompletne remisije (n=95)				Ukupno preživljavanje (n=191)			
	N	Relaps bolesti (%)	Vreme do relapsa Me (mes)	p	N	Umrli (%)	Dužina života Me (mes)	p
Pol f(%)								
Muški	57	50	3	0,155	115	83,3	3	0,479
Ženski	38	60,5	4		76	88,2	4	
Starost f(%)								
<60 god.	70	51,4	15	0,243	124	80,6	6	0,001
≥60 god.	25	60	12		67	94	2	
Le - nivo f(%)								
Sniženi	30	50	13,5	0,139	46	78,3	9,5	0,008
Normalni	20	55	11,5		35	82,9	7	
Povišeni	45	55,6	7		110	89,1	3	
<30x10 ⁹ /l	66	53	7	0,116	114	80,7	7	0,000
≥30x10 ⁹ /l	29	55,2	3		77	92,2	3	
Tr - sniženi f(%)								
da	85	51,8	4	0,178	175	85,7	4	0,602
ne	10	70	4		16	81,2	4	
Hb - snižen f(%)								
da	87	54	4	0,632	175	85,8	4	0,524
ne	8	50	4		15	80	4	
LDH-povišena f(%)								
da	52	48	4	0,115	105	79	6	0,647
ne	20	70	5		34	91,2	4	
Limfadenopat. f(%)								
da	14	71,4	6	0,126	23	87	6	0,756
ne	66	54,6	4		136	82,4	4	
Hepsplenmeg. f(%)								
da	20	65	5	0,327	40	90	5	0,360
ne	60	55	4		119	80,7	4	
Aber. kariotip f(%)								
da	35	48,6	3	0,450	77	84,4	3	0,830
ne	60	56,7	5		114	86	5	
Σ FLT3 ^{mut} f(%)								
da	18	61,1	3	0,664	48	89,6	3	0,014
ne	62	56,4	7		123	80	7	
FLT3-ITD ^{mut} f(%)								
da	12	58,3	3	0,383	35	91,4	3	0,014
ne	68	57,4	7		113	80,5	7	
NPM1 ^{mut} f(%)								
da	18	61,1	10	0,078	43	95,4	3	0,001
ne	62	65,5	15		105	78,1	8	
CEBPA ^{mut} f(%)								
da	8	25	Nije dost.	0,097	8	62,5	5	0,159

ne	31	71	12		51	86,3	9	
ELN grupe rizika								
Sred. povoljan 1	55	58,2	11	0,745	101	86,1	6	0,176
Sred. povoljan 2	9	44,4	12		22	86,4	4	
povoljan	17	52,9	12		28	71,4	8	
nepovoljan	14	42,9	9,5		40	92,5	2	

Tabela 68. Univarijantna analiza uticaja imunofenotipskih karakteristika na trajanje kompletne remisije bolesti i preživljavanje bolesnika sa AML

Imunofenotipska karakteristika	N	Relaps Bolesti (%)	Vreme do relapsa Me (mes)	P	N	Umrli (%)	Dužina života Me (mes)	P
CD45-obrazac								
nizak	29	44,8	12	0,007	53	79,2	5	0,024
srednji	39	51,3	15		66	77,3	5	
visok	14	57,1	8		36	94,4	3	
heterogen	13	76,9	6		36	0	2	
HLA-DR-poz	88	55,7	12	0,887	177	84,7	4	0,275
HLA-DR-neg	7	28,6	36	0,277	14	92,9	2	0,342
HLA-DR-obrazac	-	-	-		-	-	-	
CD34-poz	64	54,7	16	0,234	130	83,1	5	0,096
CD34-neg	31	51,6	11	0,456	61	90,1	3	0,408
CD34-obrazac	-	-	-		-	-	-	
CD117-poz	87	54	12	0,786	172	84,9	4	0,239
CD117-neg	8	50	11	0,233	19	89,5	4	0,122
CD117-obrazac	-	-	-		-	-	-	
Kombincije (n=8) CD34/CD117/HLA-DR	-	-	-	0,295	-	-	-	0,415
CD38-obrazac	-	-	-	0,686	-	-	-	0,664
CD123-obrazac	-	-	-	0,148	-	-	-	0,760
CD135-obrazac	-	-	-	0,367	-	-	-	0,153
CD71-poz	57	50,9	12	0,928	111	84,7	4	0,773
CD71-neg	4	50	15		6	83,3	3	
cMPO-poz	76	55,3	12	0,447	140	85	5	0,382
cMPO-neg	18	50	16		45	86,7	3	
cMPO-obrazac	-	-	-	0,242				
nizak				0,027	48	89,6	4	0,027
srednji					20	60	23	
visok					16	87,5	4	
heterogen					49	87,8	4	
cLizozim-poz	15	80	11	0,035	35	94,4	3	0,118
cLizozim-neg	9	44,4	29	0,415	19	73,7	3	0,274
cLizozim-obrazac	-	-	-		-	-	-	
CD13-poz	-	-	-	-	185	86	4	0,478
CD13-neg	-	-	-	0,030	6	66,7	1	0,013
CD13-obrazac								
nizak	13	15,4	6		22	77,3	3	
srednji	26	61,5	12		38	71	13	
visok	31	51,6	12	68	88,2	3,5		
	93	18,3	7					

heterogen					57	96,5	4	
CD33-poz	89	52,8	12	0,764	183	85,8	4	0,342
CD33-neg	3	66,7	15		5	80	22	
CD33-obrazac	-	-	-	0,580	-	-	-	0,223
CD15-poz	37	59,5	10	0,129	80	88,8	3	0,267
CD15-neg	57	50,9	17		110	83,6	4	
CD15-obrazac	-	-	-	0,287	-	-	-	0,413
CD11a-poz	-	-	-	-	75	85,3	3	0,209
CD11a-neg	-	-	-		4	100	0,5	
CD11a-obrazac	-	-	-	0,120	-	-	-	0,245
CD11b-poz	30	60	7	0,026	82	95,1	3	0,000
CD11b-neg	64	51,6	18		108	78,7	7	
CD11b-obrazac	-	-	-	0,437	-	-	-	0,098
CD11c-poz	50	48	12	0,576	107	87,8	3	0,057
CD11c-neg	41	56,1	16		76	80,3	5	
CD11c-obrazac	-	-	-	0,184	-	-	-	0,640
CD4-poz	48	52,1	11	0,168	104	90,4	4	0,093
CD4-neg	39	51,3	18		73	78,1	3	
CD4-obrazac	-	-	-	0,088	-	-	-	0,148
CD64-poz	35	60	11	0,136	76	89,5	4	0,192
CD64-neg	55	49,1	18		104	83,6	4	
CD64-obrazac								
Nizak	23	34,8	36	0,009	20	75	12	0,039
Srednji	7	57,1	6		11	90,9	4	
Visok	15	60	6		35	94,3	3	
Heterogen	2	20	9		10	100	1	
CD36-poz	20	65	8	0,025	55	96,4	2	0,001
CD36-neg	73	50,7	18		134	81,3	6	
CD36-obrazac	-	-	-	0,437	-	-	-	0,516
CD14-poz	13	61,5	10	0,118	30	96,7	2	0,035
CD14-neg	82	52,4	16		161	83,2	5	
CD163-poz	2	0	Nije dost.	0,095	10	80	1	0,404
CD163-neg	20	65	12		44	84,1	3	
CD2-poz	4	75	6	0,289	10	90	4	0,647
CD2-neg	91	52,8	14		181	85,1	4	
CD7-poz	18	38,9	36	0,740	44	88,6	2	0,045
CD7-neg	77	57,1	12		147	84,4	6	
CD56-poz (sa TMČH)	27	59,3	11	0,296	57	85,9	3	0,344
CD56-neg	68	51,5	16		140	85,7	4	
CD56 obrazac	-	-	-	0,156	-	-	-	0,403
CD56-poz (bez TMČH)	19	79	8	0,011	49	95,9	3	0,080
CD56-neg	59	57,6	15		130	89,2	3	
CD56 obrazac	-	-	-	0,156	-	-	-	0,291
CD19-poz	15	46,7	12		21	57,1	24	0,000
CD19-neg	80	55	16	0,149	170	88,8	3	
CD22-poz	8	50	12	0,660	30	93,3	2	0,028
CD22-neg	85	54,1	18		155	83,9	9	
cCD79a-poz	6	66,7	12	0,657	9	66,7	24	0,031
cCD79a-neg	77	53,2	12		161	87	3	
CD35-poz	10	50	11	0,731	18	77,8	4	0,854
CD35-neg	17	52,9	16		37	78,4	3	
CD62L-poz	16	62,5	12	0,884	31	80,6	4	0,901
CD62L-neg	4	50	9		8	75	3	
CD62L obrazac	-	-	-	0,279	-	-	-	0,392
CD114-poz	22	45,4	19	0,942	43	81,4	3	0,430
CD114-neg	5	20	12		9	88,9	6	

CD45RA-poz	9	55,6	12	0,800	20	80	3	0,674
CD45RA-neg	15	53,3	14		31	80,7	4	
Broj Ly hLDMA na blastima (n=5)	-	-	-	0,720	-	-	-	0,186
Nivo dif. blasta (n=3)	-	-	-	0,467	-	-	-	0,129

PRILOG 2.

INFORMACIJA ZA ISPITANIKU

Poštovani Gospodine/Gospođo,

Želimo da Vas obavestimo o razlozima i načinu uzimanja uzoraka, 2-3 ml kostne srži i 3 ml periferne krvi, tokom Vašeg ispitivanja kao potencijalnog davaoca kostne srži za alogenu transplantaciju matičnih ćelija hematopoeze. Ovo ispitivanje se sprovodi u cilju isključivanja hematološke bolesti kod Vas.

Pre nego što date svoj pristanak, veoma je važno da razumete zašto se ova intervencija radi i u čemu se ona sastoji. Pažljivo pročitajte ovu informaciju, a ukoliko želite, o njenom sadržaju možete razgovarati i sa drugim osobama. Za sve što Vam se učini nejasnim ili ukoliko želite dodatne informacije, molimo Vas da nam se obratite.

Neposredno posle Vašeg izbora za potencijalnog davaoca kostne srži, u sklopu hematološkog ispitivanja kojim se isključuje da bolujete od neke hematološke bolesti, standardno se radi ispitivanje kostne srži aspiracionom punkcijom.

U okviru ovog predloženog ispitivanja, bile bi urađene sledeće analize, koje su deo protokola za obradu davaoca a to su: krvna slika sa formulom, biohemijske analize, citomorfološka analiza razmaza kostne srži, internistički pregled, aspiracija kostne srži. Aspiracija kostne srži radi se iz bedrene kosti. Bilo bi Vam uzeto 2-3 ml kostne srži, zajedno sa jednim uzorkom od 3ml periferne krvi, za imunofenotipsko ispitivanje protočnom citometrijom.

Rezultati ovih ispitivanja pomoći će da se sa većom preciznošću isključi postojanje bolesti krvi kod Vas, što je i osnovni preduslov za doniranje ćelija u svrhu transplantacije. Ovi rezultati će biti korišćeni u naučne svrhe, što podrazumeva njihovo objavljivanje u medicinskim časopisima i prikazivanje na medicinskim sastancima. U tim publikacijama Vaš identitet će biti u potpunosti zaštićen u skladu sa zakonom. Svi vaši podaci će biti tretirani u skladu sa lekarskom tajnom kao poverljivi.

Odustajanje od ove saglasnosti neće imati nikakve posledice na dalji tok lečenja osobe za koju dajete kostnu srž.

Hvala što ste pročitali ovo obrazloženje.

Doc. dr Dragana Vujić

Izjava saglasnosti za imunofenotipsko ispitivanje ćelija kostne srži i periferne krvi tokom ispitivanja donora za alogenu transplantaciju matičnih ćelija hematopoeze

Dr _____ informisao me je o razlogu dodatnog ispitivanja uzorka kostne srži u Laboratoriji za imunofenotipizaciju i protočnu citometriju Klinike za hematologiju KCS u Beogradu, i objasnio mi je svrhu i značenje tih ispitivanja.

- Nakon razmatranja informacije o ispitivanju saglasan/a sam sa davanjem mog biološkog materijala. Saglasan/a sam da se rezultati ovih ispitivanja koriste u naučne svrhe, i da budu objavljeni u medicinskim časopisima i prikazani na medicinskim sastancima. Uručena mi je kopija informacije za bolesnike i primerak izjave saglasnosti. Pročitao/la sam ih i nemam dodatnih pitanja.
- Nisam saglasan/a sa gore navedenim ispitivanjima.

mesto i datum

Ime i prezime bolesnika
(štampanim slovima)

potpis

Informisao sam bolesnika/cu o razlozima za uzimanja i slanje njegovog biološkog materijala na imunofenotipizaciju protočnom citometrijom i objasnio mu/joj svrhu i značenje planiranih ispitivanja.

mesto i datum
lekara

Ime i prezime odgovornog
(štampanim slovima)

potpis



Klinički centar Srbije, Beograd
Klinika za hematologiju KCS
Dr Koste Todorovića 2, Beograd

INFORMACIJA ZA BOLESNIKA

Poštovani Gospodine/Gospođo,

Želimo da Vas obavestimo o razlozima i načinu uzimanja uzorka od 2-3 ml kostne srži tokom Vašeg lečenja citostatskom terapijom. Uzorak se uzima u cilju imunofenotipizacije protočnom citometrijom ćelija kostne srži i to u fazi oporavka posle primene citostatika. Pre nego što date svoj pristanak, veoma je važno da razumete zašto se ova intervencija radi i u čemu se ona sastoji.

Pažljivo pročitajte ovu informaciju, a ukoliko želite, o njenom sadržaju možete razgovarati i sa drugim osobama. Za sve što Vam se učini nejasnim ili ukoliko želite dodatne informacije, molimo Vas da nam se obratite.

Neposredno posle postavljanja dijagnoze limfoma kod Vas, u sklopu procene raširenosti bolesti, standardno se radi ispitivanje kostne srži biopsijom.

U okviru ovog predloženog ispitivanja, u cilju procene efikasnosti citostatske terapije, posle 2. ili 3. primljenog ciklusa, osim rutinskih analiza (krvna slika, biohemijske analize, rendgen pluća, ultrazvučni pregled trbuha i/ili skener trbuha i grudnog koša) bila bi Vam jednom urađena aspiracija kostne srži iz bedrene kosti uz prethodnu primenu lokalnog anestetika. Bilo bi Vam uzeto 2-3 ml kostne srži za imunofenotipsko ispitivanje protočnom citometrijom.

Rezultati ovih ispitivanja pomoći će da se sa većom preciznošću proceni oporavak Vaše kostne srži posle citostatskog lečenja i biće korišćeni u naučne svrhe, što podrazumeva njihovo objavljivanje u medicinskim časopisima i prikazivanje na medicinskim sastancima. U tim publikacijama Vaš identitet će biti u potpunosti zaštićen u skladu sa zakonom. Svi vaši podaci će biti tretirani u skladu sa lekarskom tajnom kao poverljivi.

Odustajanje od ove saglasnosti neće imati nikakve posledice na dalji tok dijagnostike i lečenja.

Hvala što ste pročitali ovo obrazloženje.

Prof dr Nada Suvajdžić Vuković



Klinički centar Srbije, Beograd
Klinika za hematologiju KCS
Dr Koste Todorovića 2, Beograd

Izjava saglasnosti za imunofenotipsko ispitivanje ćelija kostne srži tokom lečenja bolesnika sa limfomima

Dr _____ informisao me je o razlogu dodatnog ispitivanja uzorka kostne srži u Laboratoriji za imunofenotipizaciju i protočnu citometriju Klinike za hematologiju KCS u Beogradu, i objasnio mi je svrhu i značenje tih ispitivanja.

- Nakon razmatranja informacije o ispitivanju saglasan/a sam sa davanjem mog biološkog materijala. Saglasan/a sam da se rezultati ovih ispitivanja koriste u naučne svrhe, i da budu objavljeni u medicinskim časopisima i prikazani na medicinskim sastancima. Uručena mi je kopija informacije za bolesnike i primerak izjave saglasnosti. Pročitao/la sam ih i nemam dodatnih pitanja.

- Nisam saglasan/a sa gore navedenim ispitivanjima.

mesto i datum

Ime i prezime bolesnika
(štampanim slovima)

potpis

Informisao sam bolesnika/cu o razlozima za uzimanja i slanje njegovog biološkog materijala na imunofenotipizaciju protočnom citometrijom i objasnio mu/joj svrhu i značenje planiranih ispitivanja.

mesto i datum

Ime i prezime odgovornog lekara
(štampanim slovima)

potpis

Terapija AML: bolesnici ≤ 60 g

ECOG ≤ 2, HCT-CI <3	ECOG >2, HCT-CI ≥3
ECOG i HCT-CI procenjeni na dan početka HT	
Indukcija "3+7"	
<p>Daunorubicin (DA) 60mg/m² IV, d1-3 ili d1, 3, 5; 1h IV inf</p> <p>ara-C 200 mg/m² kont IV d1-d7</p>	<p>DA 45mg/m² IV, d1-3 ili d1, 3, 5; 1h IV inf</p> <p>ara-C 100 mg/m² kont IV d1-d7</p>
Postremisiona terapija: povoljan rizik	
<ul style="list-style-type: none"> ▪ HiDAC (3 ciklusa) <p>ara-C 3g/m²/ na 12h/d1, 3, 5 (6 doza),</p> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-top: 10px;"> <p>Bolesnici sa CBF AML i CD56+, FLT3+, c-kit, Le >20x10⁹/L, +4 u t(8;21) se leče kao bolesnici srednjeg/visokog rizika</p> </div>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ IDAC/HiDAC (3 ciklusa) <p>ara-C 1 g; 1.5 g; 2g/m²/ na 12h/ d1, 3, 5 (6 doza) Ili 1.5 g/m² kont IV d1-3</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ "3+7" light <p>DA 30-45 mg/m² IV bolus d1,d3, d5 ara-C 100 mg/m² kont IV d1-7</p> <p style="text-align: center;">+</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ "2+5" (2 ciklusa) <p>DA 30-45 mg/m² IV bolus d1,d3 ara-C 100 mg/m² kont IV d1-5</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Palijacija: Hidroksiurea (Hy), Etopozid (VP-16), 6-tioguanin (6-TG)
Postremisiona terapija: srednji / visok rizik	
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Alo-TMČH < 45 god standardno kondicioniranje ▪ Nema donora Lečenje: kao povoljan rizik 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Alo-TMČH >45 god RIC kondicioniranje ▪ Nema donora Lečenje: kao povoljan rizik

Prema; Vodič za dijagnostiku i lečenje akutnih leukemija, Klinika za hematologiju KCS, 2015.

Terapija AML: bolesnici >60 g.

Indukcija

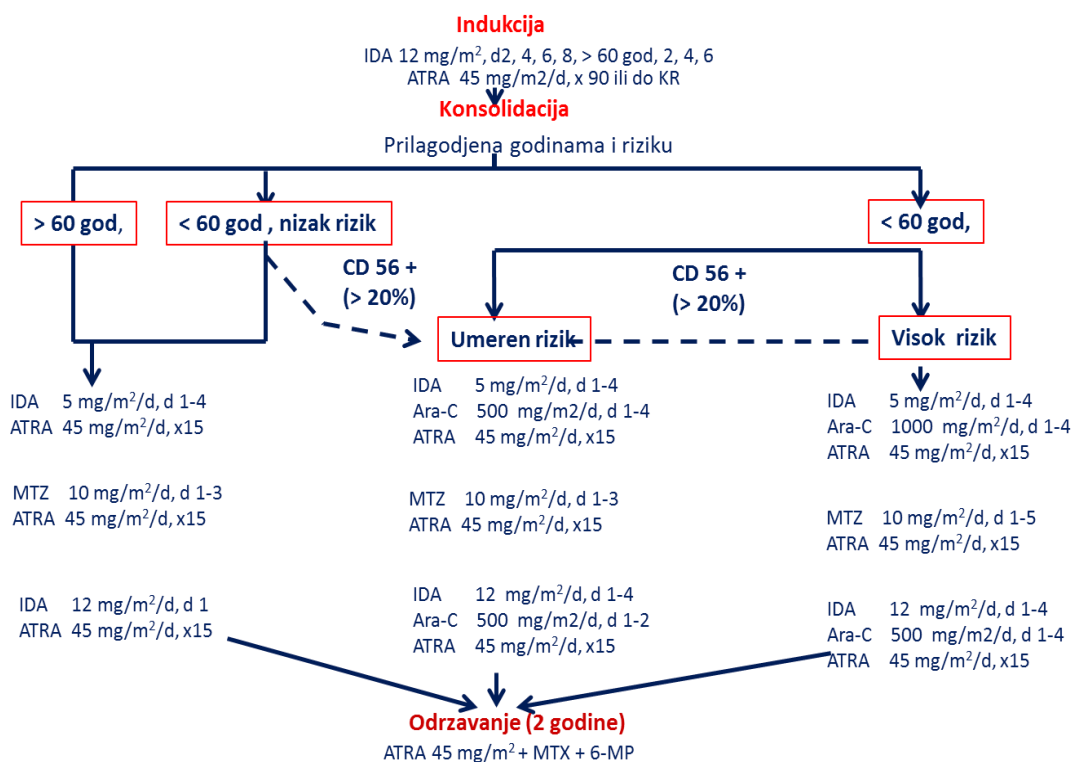
ECOG ≤ 2, HCT-CI <3	ECOG >2, HCT-CI ≥3
Povoljan/ srednji rizik	
<ul style="list-style-type: none">▪ "3+7" light DA 45 mg/m² IV d1-3 ili 1, 3, 5 1h IV inf Cytosar 100 mg/m² kont IV d1-d7	<ul style="list-style-type: none">▪ "2+5" DA 30 mg/m² IV d1, 3 Cytosar 100 mg/m² kont IV d1-d5▪ Male doze ara-C (NK)* 20 mg sc/na12h u toku 10; 14; 21 dana▪ Palijacija (Hy, VP-16, 6-TG)▪ Klinička studija <p style="text-align: right;">* NK- normalan kariotip</p>
Visok rizik: Kliničke studije	

Postremisiona terapija

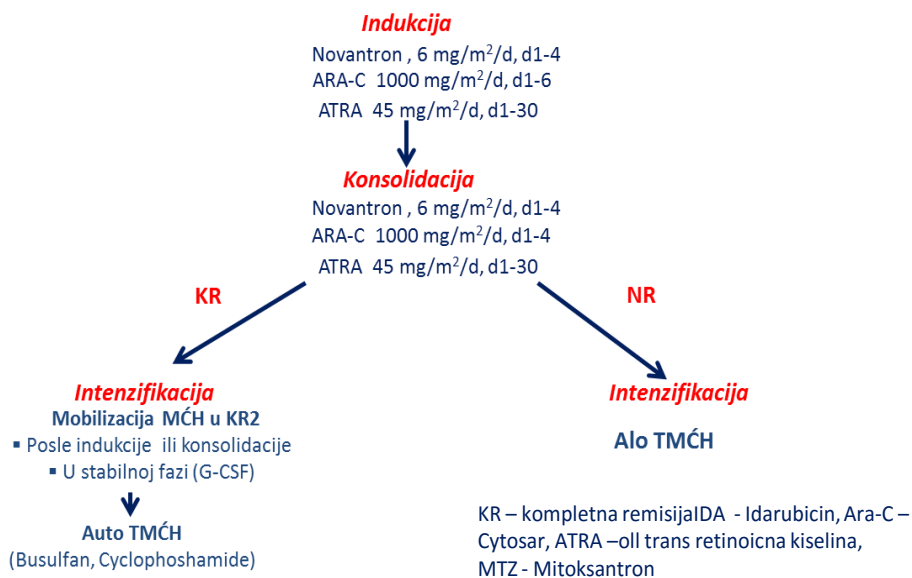
- **"2+5" 2 ciklusa**
- **ara-C 2-3 ciklusa** 0.5-1.5 g/m², 1-2 h inf, d1, 3, 5 ili 1.5 g/m² kont IV d1-3;
- **Male doze ara-C, 6-8 ciklusa ili do progresije bolesti**
- **Palijacija (Hy, VP-16, 6-TG)**
- **Klinička studija**

Prema; Vodič za dijagnostiku i lečenje akutnih leukemija, Klinika za hematologiju KCS, 2015.

Terapija APL- PETHEMA 2012



PETHEMA LPA-99 rescue protocol



Prema; Vodič za dijagnostiku i lečenje akutnih leukemija, Klinika za hematologiju KCS, 2015.

Prognostic significance of CD56 antigen expression in patients with acute myeloid leukemia

Irena Djunic · Marijana Virijevec · Vladislava Djurasinovic · Aleksandra Novkovic · Natasa Colovic · Nada Kraguljac-Kurtovic · Ana Vidovic · Nada Suvajdzic-Vukovic · Dragica Tomin

Received: 10 October 2011 / Accepted: 28 October 2011 / Published online: 12 November 2011
© Springer Science+Business Media, LLC 2011

Abstract The aims of this study were to investigate the frequency and prognostic relevance of CD56 expression in patients with acute myeloid leukemia (AML) and to compare the importance of CD56 expression with standard prognostic factors, such as age, leukocytosis, cytogenetic abnormalities and performance status. We analyzed the data of 184 newly diagnosed patients with non-promyelocytic AML and a follow-up of 36 months. The median patient age was 58 years, with a range of 18–79. CD56+ antigen was recorded in 40 patients (21.7%). CD56 + was the most significant risk factor for OS: $P = 0.05$. The most significant factor for a poor rate of CR was age ≥ 55 years ($P = 0.001$). CD56 positivity had no significant influence on CR rate, but it was the most significant risk factor for disease-free survival ($P = 0.005$). The CD56 antigen is an independent prognostic risk factor, and its presence should be measured regularly for a better prognostic assessment of patients with AML.

Keywords Prognostic factors · CD56 antigen · Acute myeloid leukemia

Introduction

Acute myeloid leukemias (AML) belong to a heterogeneous group of disorders that often present with different morphological, immunophenotypic and cytogenetic patterns. Identification of these characteristics may be useful for a better prognostic evaluation and for a more appropriate therapeutic approach [1, 2].

A variety of clinical and biological parameters, including immunophenotype, have an impact on patient outcome in AML. Nevertheless, the prognostic value of immunophenotyping in AML remains controversial. Some studies have failed to show a significant association between immunophenotype and treatment response and survival, while others report an adverse prognosis with expression of the following antigens on leukemic cells: deoxynucleotidyl transferase (TdT), CD7, CD9, CD11b, CD13, CD14, CD33, CD34, and more recently, CD56 [1].

CD56 antigen, a 200–220-kDa cell surface glycoprotein, belongs to the immunoglobulin supergene family and has been identified as an isoform of the neural cell adhesion molecule (NCAM) [3]. This antigen mediates cell-to-cell interactions and is possibly involved in cell-mediated cytotoxicity [4, 5]. The CD56 antigen was first described as a marker of natural killer cells but was subsequently found to be expressed in several lympho-hematopoietic neoplasms, including AML [3, 6, 7]. Moreover, it has been reported that in patients with AML, the presence of CD56 antigen on leukemic cells may have an influence on the duration of complete remission (CR) and survival, suggesting that CD56 expression could be useful in stratifying risk groups and therapeutic approaches for this subtype of AML [3].

To clarify the prognostic role of CD56 antigen expression in leukemic cells, in the present study, we evaluated

I. Djunic (✉) · M. Virijevec · V. Djurasinovic · N. Colovic · N. Kraguljac-Kurtovic · A. Vidovic · N. Suvajdzic-Vukovic · D. Tomin
Clinic for Hematology, Clinical Center of Serbia,
Koste Todorovica 2, 11000 Belgrade, Serbia
e-mail: irenadju@eunet.rs

A. Novkovic
Clinical Hospital Center “Zemun”, Belgrade, Serbia

N. Colovic · A. Vidovic · N. Suvajdzic-Vukovic · D. Tomin
Faculty of Medicine, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

the frequency of expression in patients with AML and the impact on overall survival (OS), disease-free survival (DFS) and CR rate. We compared the importance of CD56 expression with standard prognostic factors, such as age, leukocytosis, cytogenetic abnormalities and performance status (PS).

Materials and methods

Patients

This single-center study included 184 patients with previously untreated non-promyelocytic AML, who were monitored for 36 months. The response criteria for complete remission (CR) were as recommended by the International Working Group [8]. OS was defined as the time from diagnosis to the death or date of last follow-up. DFS was defined as the time from achievement of CR until relapse or death. The following parameters were recorded: age, sex, expression of CD56 antigen on leukemic blasts, AML subtype classification by the French-American-British (FAB) Cooperative Group [9], karyotype risk group as determined using the European Leukemia Net (ELN) recommendations [10] and PS as determined using the Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) scale.

Treatment

Patients were treated with the Medical Research Council (MRC) 12 regimen. Induction chemotherapy consisted of daunorubicin at a daily dosage of 45 mg/m² on days 1–3, in combination with cytarabine at 200 mg/m² daily as a continuous intravenous infusion for 7 days (3 + 7 regimen). Patients who achieved CR after 1 or 2 cycles of induction chemotherapy received two cycles of consolidation chemotherapy: mitoxantrone at a daily dosage of 10 mg/m² for 5 days with cytarabine 1,000 mg/m² for 3 days (MiDAC regimen). All patients received prophylactic antibiotic therapy with ciprofloxacin (500 mg twice a day) and fluconazole (150 mg) or itraconazole (200 mg) daily *per os*.

Methods

A leukocyte count $\geq 30 \times 10^9/L$ was considered as leukocytosis. A cutoff $\geq 20\%$ was used for CD34 antigen expression as detected by flow cytometry. The cytogenetic risk-group categories were stratified by ELN classification as follows: favorable, intermediate I, intermediate II and adverse. ECOG PS ranged from 0 to 4, and scores < 2 versus ≥ 2 were compared.

Statistical analysis

Survival rates were estimated by the Kaplan–Meier method, and the log-rank test was employed for the comparison of survival curves among the different groups of patients. Univariate and multivariate COX proportional regression models were employed for the identification of risk factors. Hazard ratios were calculated with a 95% confidence interval (CI). Parameters that were statistically significant in the univariate analyses were included in the multivariate regression procedure. All statistical analyses were performed with SPSS, version 18 (SPSS).

Results

The main characteristics of the patients are shown in Table 1. Their mean age was 58 years (range of 18–79 years). There were 88 (48%) women and 96 (52%) men. A total of 119 (65%) patients had ECOG PS ≥ 2 , and most of them belonged to the intermediate I cytogenetic risk group (113/61.4%). CD56 antigen positivity was detected in 40 (21.7%) patients. We found no significant correlation between CD56 positivity and any cytogenetic risk group. According to the FAB classification, CD56 antigen positivity most frequently occurred in the M5 subtype (Table 2).

The probability of OS in months, as evaluated by the Kaplan–Meier method, correlated positively with the

Table 1 Patient characteristics

Patient characteristics	No. of patients	%
Total	184	
Sex		
Male	96	52
Female	88	48
Age (years)		
Median	58	
Range	18–79	
Leukocyte count $\geq 30 \times 10^9/L$	75	41
ECOG PS		
< 2	65	35
≥ 2	119	119
CD56 antigen expression		
Positive	40	21.7
Negative	144	78.3
Karyotype (ELN classification)		
Favorable	21	11.4
Intermediate I	113	61.4
Intermediate II	10	5.4
Adverse	40	21.8

Table 2 Incidence of CD56 antigen expression according FAB types, *N* (%)

	M0	M1	M2	M4	M5	M6	M7
CD56							
Total	14	23	75	21	50	0	1
Negative	12 (85.7)	21 (91.3)	63 (84)	16 (76.2)	32 (64)		0
Positive	2 (14.3)	2 (8.7)	12 (16)	5 (23.8)	18 (36)		1

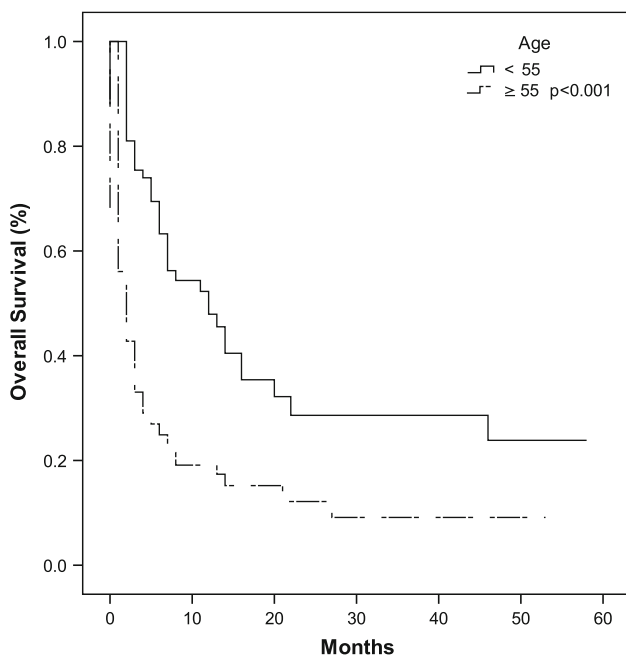


Fig. 1 Impact of age ≥ 55 years on overall survival ($P < 0.001$ by Kaplan–Meier method)

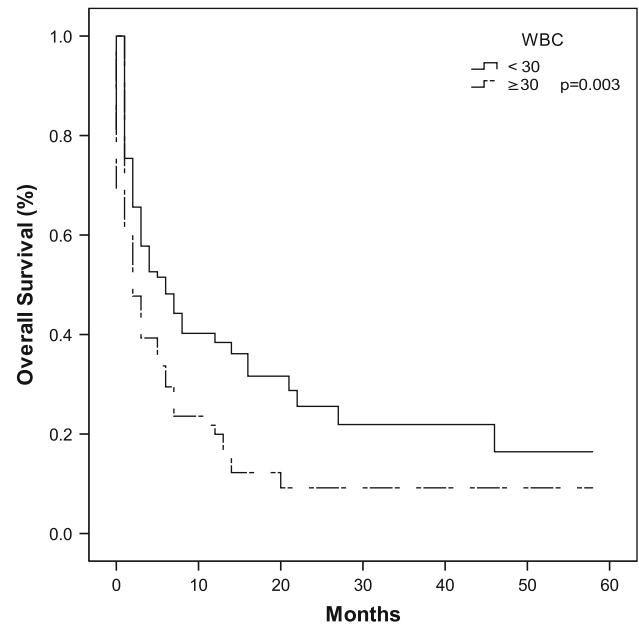


Fig. 2 Impact of leukocytosis $\geq 30 \times 10^9/L$ on overall survival ($P = 0.003$ by Kaplan–Meier method)

following parameters: age ≥ 55 years ($P = 0.002$), leukocytosis ($P = 0.003$), ECOG PS ≥ 2 ($P = 0.001$), adverse cytogenetics ($P = 0.019$) and CD56 antigen positivity ($P = 0.003$). The impact of age, leukocytosis, ECOG PS, cytogenetics and CD56 antigen expression on OS is shown in Figs. 1, 2, 3, 4, and 5.

The probability of DFS in months was also significantly correlated with adverse cytogenetics ($P = 0.05$) and CD56 antigen positivity ($P = 0.005$). The Kaplan–Meier curves of adverse cytogenetics and CD56 antigen expression impact on DFS are shown in Figs. 6 and 7.

Univariate COX proportional regression analysis indicated that the following tested features were significant predictors for poor OS: age ≥ 55 years ($P < 0.001$), leukocytosis ($P = 0.003$), adverse karyotype ($P = 0.019$), ECOG PS ≥ 2 ($P = 0.001$) and CD56 antigen positivity ($P = 0.003$). The multivariate COX proportional regression method pointed to CD56 antigen positivity ($P = 0.05$, RR = 1.598, 95% CI 0.984–2.595) as the most significant predictor for poor OS.

Univariate analysis showed that significant factors for poor DFS were adverse karyotype ($P = 0.009$) and CD56 antigen positivity ($P = 0.001$). The most significant risk factor for DFS using the multivariate method was CD56 antigen positivity ($P = 0.005$, RR = 0.443, 95% CI 0.253–0.779).

In the univariate analysis, age ≥ 55 years ($P < 0.001$), leukocytosis ($P = 0.024$), ECOG PS ≥ 2 ($P < 0.001$) and adverse cytogenetics ($P = 0.049$) were found to be significantly correlated with a poor rate of CR. The most important factor associated with poor CR rate in the multivariate analysis was age ≥ 55 years ($P = 0.001$, RR = 0.274, 95% CI 0.125–0.597). CD56 antigen positivity had no significant influence on CR rate.

Discussion

The aim of the present study was to determine the prognostic value of CD56 antigen expression on AML patient outcome. The prognostic impact of surface antigen

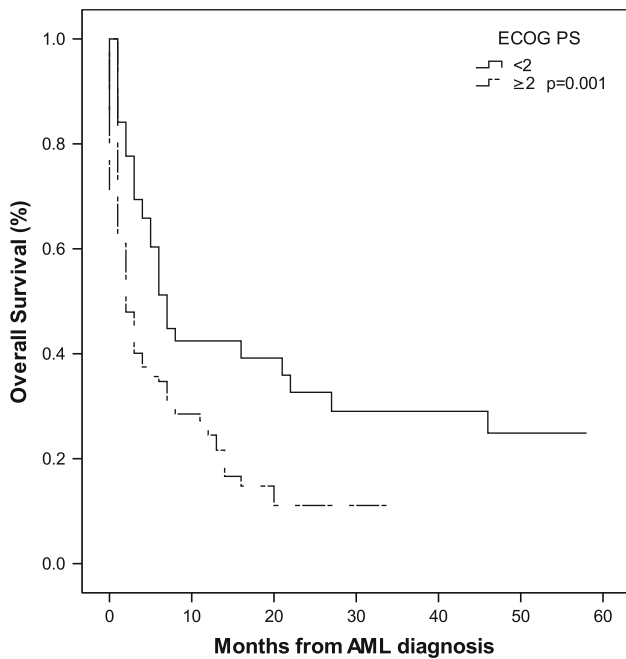


Fig. 3 Impact of ECOG PS ≥ 2 on overall survival ($P = 0.001$ by Kaplan–Meier method)

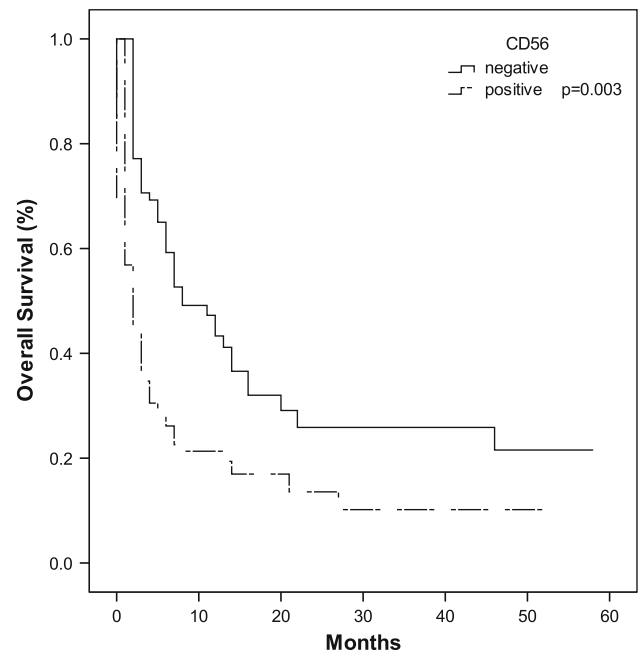


Fig. 5 Impact of CD56 antigen expression on overall survival ($P = 0.003$ by Kaplan–Meier method)

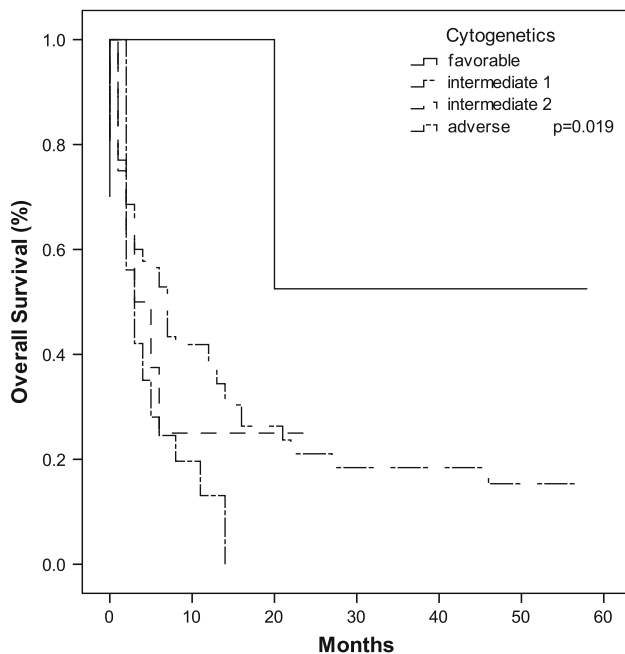


Fig. 4 Impact of adverse cytogenetics on overall survival ($P = 0.019$ by Kaplan–Meier method)

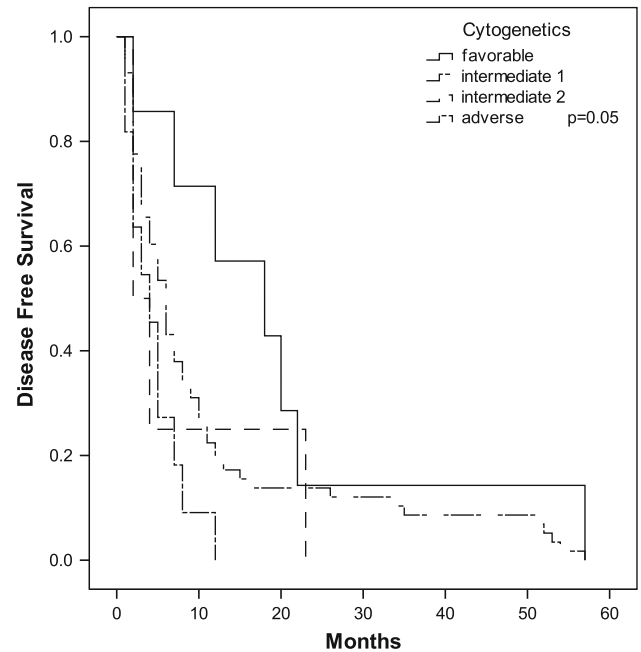


Fig. 6 Impact of adverse cytogenetics on disease-free survival ($P = 0.05$ by Kaplan–Meier method)

expression in AML is controversial. Various confounding factors, such as age, cytogenetics and treatment protocols, may contribute [1]. We analyzed the importance of CD56 antigen positivity in addition to some biological and clinical parameters (leukocytosis, cytogenetics and PS) in 184 patients with AML.

In our group of patients, 40 (21.7%) were positive for CD56 antigen. In other studies, CD56 positivity was observed in 10–24% of the patients with AML [1, 3, 5, 11]. No significant correlation between CD56 antigen expression and the cytogenetic risk groups was found in our research, but the results reported by others differ. Thus,

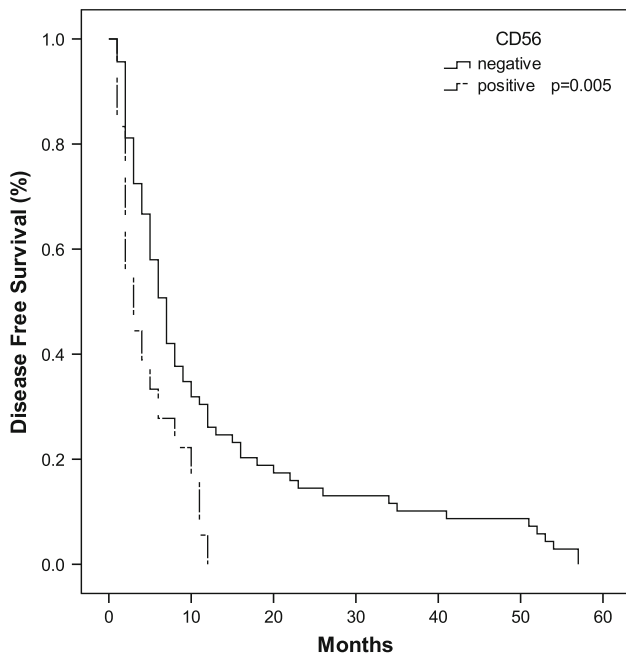


Fig. 7 Impact of CD56 antigen expression on disease-free survival ($P = 0.005$ by Kaplan–Meier method)

Chang et al. showed a significant association between CD56 antigen expression and the favorable cytogenetic translocation 8:21, while Raspadori et al. reported a positive correlation between CD56 positivity and unfavorable cytogenetic abnormalities [1, 3]. Our results are in accordance with the findings of Di Bona et al., who observed no difference in CD56 positivity in cytogenetic risk groups [5]. Moreover, we have confirmed published data that CD56 antigen expression is most frequently associated with the M5 FAB subtype of AML [1, 3]. This could be attributed to the fact that CD56 antigen is constitutively expressed in normal monocytes and monocyte-derived cells, while monoblastic leukemia is generally associated with a poorer prognosis [12].

In addition, we have shown that significant risk factors for poor OS in patients with AML include age, leukocytosis, adverse karyotype, poor PS and CD56 antigen positivity. In our group of subjects, the cutoff for the age of patients with significantly shorter OS was 55 years. Ages ranging from 60 to 75 years for cutoff for poor OS were found in other studies [1, 13, 14]. The significant influences of leukocytosis, adverse karyotype, ECOG PS ≥ 2 and CD56 antigen expression on OS are in accordance with published findings [1, 3, 5, 15–17]. The most significant independent predictor for poor OS in our investigation was CD56 antigen positivity. Other authors also highlighted the negative prognostic role of CD56 antigen positivity on OS [1, 3, 5, 11, 12, 17]. Moreover, two studies demonstrated the significance of CD56 positivity as a risk factor for poor

OS in univariate analysis, but this trend was not significant in a multivariate analysis [1, 3].

Significant risk factors for poor DFS in our investigation were adverse karyotype and particularly CD56 antigen expression. Others also found a significant influence of CD56 antigen positivity on poor DFS [5, 11, 12], but Chang et al. detected no impact of CD56 antigen expression on DFS [1].

Our research demonstrated significant correlations between the rate of CR and leukocytosis, ECOG PS ≥ 2 , adverse cytogenetics and age ≥ 55 years. The last factor was the most significant factor for a poor rate of CR in the multivariate analysis. This result confirms the recent findings of others [1, 18–21]. In our study, CD56 antigen positivity had no significant effect on the CR rate. This result is similar to data published by Chang et al., where age, leukocytosis and unfavorable cytogenetics had significant impacts on CR rate, but CD56 antigen expression had no effect. Nevertheless, Raspadori et al. reported that CD56 antigen positivity was the most significant independent factor for the achievement of CR [3]. Although the mechanisms of CD56-mediated adverse outcomes in AML are not clearly understood, CD56 was shown to be associated with overexpression of P-glycoprotein (PGP), so the reduced response to chemotherapy may be due to increased PGP-mediated drug efflux [11, 12].

Conclusion

Our data suggest that CD56 antigen expression has an important influence on poor OS and DFS of patients with AML. CD56 antigen expression on leukemic cells should be regularly assessed in patients with AML at diagnosis and should be taken into consideration in the stratification of these patients into risk groups and design of future therapeutic strategies.

Acknowledgments This study was supported by the Ministry of Science and Technological Development of Republic of Serbia, NO 41004.

Conflict of interest The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

References

1. Chang H, Salma F, Yi Q, Patterson B, Brien B, Minden MD. Prognostic relevance of immunophenotyping in 379 patients with acute myeloid leukemia. *Leuk Res.* 2004;28:43–8.
2. McCulloch EA, Kellecher CA, Miauchi J, Wang C, Cheng GYN, et al. Heterogeneity in acute myeloblastic leukemia. *Leukemia.* 1988;2(Suppl 12):36s–49s.

3. Raspadori D, Damiani D, Lenoci M, Rondeli D, Testoni N, et al. CD56 antigen expression in acute myeloid leukemia identifies patients with poor prognosis. *Leukemia*. 2001;15:1161–4.
4. Ciolli S, Leoni F, Nozzoli C, Longo G, Gianfaldoni G, et al. Prognostic impact of CD56 in 141 cases of acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2001;86(Suppl 10): a17 (abstract).
5. Di Bona E, Sartori R, Zambello R, Guercini N, Madeo D, Rodighiero F. Prognostic significance of CD56 antigen expression in acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2002;87:250–6.
6. Reuss-Borst MA, Steinke B, Waller HD, Buhring HJ, Muller CA. Phenotypic and clinical heterogeneity of CD56-positive acute nonlymphoblastic leukemia. *Ann Haematol*. 1992;64:78–82.
7. Dunphy CH, Gregowicz AJ, Rodriguez G. Natural killer cell acute leukemia with myeloid antigen expression. A previously undescribed form of acute leukemia. *Hematopathology*. 1995;104:212–5.
8. Cheson BD, Bennet JM, Kopecky KJ, Buchner T, Willman CL, et al. International Working Group for diagnosis, standardization of response criteria, treatment outcomes, and reporting standards for therapeutic trials in acute myeloid leukemia. Revised recommendations of the international working group for diagnosis, standardization of response criteria, treatment outcome, and reporting standards for therapeutic trials in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 2003;21:4642–9.
9. Bennet JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French–American–British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol*. 1976;33:219–28.
10. Donner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*. 2010;115:454–74.
11. Jiang A, Jiang H, Branddwein J, Kamel-Reid S, Chang H. Prognostic factors in normal karyotype acute myeloid leukemia in absence of the FLT3-ITD mutation. *Leuk Res*. 2010. doi: [10.1016/j.leukres.2010.07.021](https://doi.org/10.1016/j.leukres.2010.07.021).
12. Raspadori D, Damiani D, Micheli M, Stocchi R, Gentili S, et al. CD56 and PGP expression in acute myeloid leukemia: impact on clinical outcome. *Haematologica*. 2002;87:1135–40.
13. Breccia M, Frustaci AM, Cannella L, Stefanizzi C, Latagliata R, et al. Comorbidities and FLT3-ITD abnormalities as independent prognostic indicators of survival in elderly acute myeloid leukemia patients. *Haem Oncol*. 2009;27:148–53.
14. Klepin HD, Baldalucci L. Acute myelogenous leukemia in older adults. *Oncologist*. 2009;14:222–32.
15. Fernandez HF. New trends in the standard of care for initial therapy of acute myeloid leukemia. *ASH Education Book*. 2010;2010:56–61.
16. Lowenberg B. Acute myeloid leukemia: the challenge of capturing disease variety. *ASH Education Book*. 2008;2008(1):1–11.
17. Bear MR, Stewart CC, Lawrence D, Arthur DC, Byrd JC, et al. Expression of the neural cell adhesion molecule 56 is associated with short remission duration and survival in acute myeloid leukemia with t(8:21) (q22;q22). *Blood*. 1997;90:1643–8.
18. Erba HP. Prognostic factors in elderly patients with AML and the implications for treatment. *ASH Education Book*. 2007;2007(1):420–8.
19. Kantarjian H, O'Brien S, Cortes J, Giles F, Faderl S, et al. Results of intensive chemotherapy in 998 patients age 65 years or older with acute myeloid leukemia or high risk myelodysplastic syndrome: predictive prognostic models for outcome. *Cancer*. 2006;106:1090–8.
20. Giles FJ, Borthakur G, Ravandi F, Faderl S, Verstovsek S, et al. The haematopoietic cell transplantation comorbidity index score predictive of early death and survival in patients over 60 years of age receiving induction therapy for acute myeloid leukemia. *Br J Haematol*. 2007;136:624–7.
21. Etienne A, Esterni B, Charbonnier A, Mozziconacci MJ, Arnoulet C, et al. Comorbidity is an independent predictor of complete remission in elderly patients receiving induction chemotherapy for acute myeloid leukemia. *Cancer*. 2007;109:1376–83.

BIOGRAFIJA

Mr. sci. biol. Nada Kraguljac Kurtović rođena je 1. marta 1964. godine u Skoplju. Osnovnu školu i gimnaziju završila je u Beogradu.

Na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, odsek molekularna biologija i fiziologija, diplomirala je 1989. godine sa prosečnom ocenom 9,27.

Od 1990. godine je zaposlena na Klinici za hematologiju Kliničkog centra Srbije, u Laboratoriji za imunofenotipizaciju i protočnu citometriju, Polikliničko-dijagnostičkog odeljenja. Na poziciji rukovodioca Laboratorije nalazi se od 1996. godine do danas.

Poslediplomske specijalističke studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer Imunobiologija, završila je 1996. godine. Odbranila je specijalistički rad pod nazivom: "Ekspresija CD34 antigena na ćelijama akutne limfoblastne leukemije".

Poslediplomske magistarske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer molekularna biologija i biohemija, završila je 2005. godine. Odbranila je magistarski rad pod nazivom: "Ispitivanje prisustva aberantne (*de novo*) metilacije promotorskog regiona reparacionog gena za *O⁶-metilguanin-DNK metiltransferazu* i tumor supresor gena *p15^{INK4B}* u humanim akutnim leukemijama i limfomima".

Posebnu edukaciju u oblasti imunofenotipizacije i protočne citometrije imala je tokom tromesečnog studijskog boravka u univerzitetskoj bolnici "Haut-Léveque" Université Victor Segalen, Bordeaux 2, CHU de Bordeaux, Bordeaux, po pozivu - Prof. Vincent Praloran i Dr Francis Lacombe.

Kao istraživač saradnik, učesnik je Podprojekta 4 pod nazivom „Molekularnogenetički i imunofenotipski markeri klonskog preobražaja matičnih ćelija hematopoeze“ - 41004, kojim rukovodi Prof. Dr Nada Suvajdžić-Vuković. Podprojekat 4 je deo šireg istraživačkog Projekta Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije, pod nazivom „Retke bolesti: molekularna patofiziologija, dijagnostički i terapijski modaliteti i socijalni, etički i pravni aspekti“ - III 41 004, pod rukovodstvom Dr Sonje Pavlović, naučnog savetnika Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo Univerziteta u Beogradu (oblast Biomedicina, projektni period 2011-2014).

Član je Hematološke sekcije Srpskog lekarskog društva i Evropskog društva za kliničku ćelijsku analizu - European Society for Clinical Cell Analysis (ESCCA)

Bila je stipendista Ministarstva za nauku i tehnologiju tokom poslediplomskih magistarskih studija. Nosilac je godišnje nagrade Fondacije Goran Ljubijankić za jedan od pet najboljih magistarskih radova iz oblasti molekularne biologije odbranih u 2005. godini.

Kao autor/koautor je objavila 45 stručnih radova štampanih u celini u inostranim i domaćim časopisima indeksiranim u CC/SCI, i učestvovala je sa saopštenjima na velikom broju međunarodnih i domaćih kongresa.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani-a _____ Nada Kraguljac Kurtović _____

broj indeksa _____ doktorske studije po starom programu _____

Izjavljujem

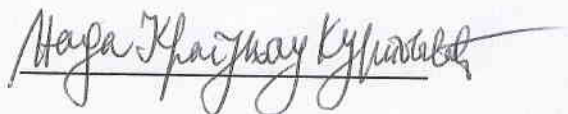
da je doktorska disertacija pod naslovom

„Imunofenotipska karakterizacija ćelija akutne mijeloidne leukemije kod odraslih i njena uloga u dijagnozi, praćenju i prognozi bolesti“

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

Potpis doktoranda

U Beogradu, _____ 04.08.2016. _____



Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Nada Kraguljac Kurtović

Broj indeksa _____ doktorske studije po starom programu

Studijski program Biologija: Imunobiologija

Naslov rada „Imunofenotipska karakterizacija ćelija akutne mijeloidne leukemije kod odraslih i njena uloga u dijagnozi, praćenju i prognozi bolesti”

Mentor dr Biljana Božić Nedeljković i dr Nada Suvajdžić Vuković

Potpisani/a Nada Kraguljac Kurtović


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

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

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

Potpis doktoranda

U Beogradu, 04.08.2016.



Prilog 3.

Izjava o korišćenju

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

„Imunofenotipska karakterizacija ćelija akutne mijeloidne leukemije kod odraslih i njena uloga u dijagnozi, praćenju i prognozi bolesti“

koja je moje autorsko delo.

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

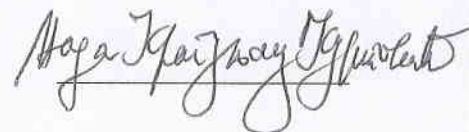
Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

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

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

Potpis doktoranda

U Beogradu, 04.08.2016.



1. Autorstvo - Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.

2. Autorstvo – nekomercijalno. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

3. Autorstvo - nekomercijalno – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.

4. Autorstvo - nekomercijalno – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.

5. Autorstvo – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

6. Autorstvo - deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.