

P-glikoprotein i aktivirane molekule signalnih putova PI3K/Akt i MAPK u blastima akutne mijeloične leukemije

Prijić, Sanja

Doctoral thesis / Disertacija

2014

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:585937>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-13**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)





Središnja medicinska knjižnica

Prijić, Sanja (2014) *P-glikoprotein i aktivirane molekule signalnih putova PI3K/Akt i MAPK u blastima akutne mijeloične leukemije.* Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.

<http://medlib.mef.hr/2169>

University of Zagreb Medical School Repository

<http://medlib.mef.hr/>

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

MEDICINSKI FAKULTET

Sanja Prijić

P-glikoprotein i aktivirane molekule signalnih putova
PI3K/Akt i MAPK u blastima akutne mijeloične
leukemije

DISERTACIJA



Zagreb, 2014.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

MEDICINSKI FAKULTET

Sanja Prijić

**P-glikoprotein i aktivirane molekule signalnih putova
PI3K/Akt i MAPK u blastima akutne mijeloične
leukemije**

DISERTACIJA

Zagreb, 2014.

Disertacija je izrađena u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb.

Voditelj istraživanja: prof. dr. sc. Drago Batinić, dr.med.

POPIS KRATICA

ABCB1 – ATP-vezni, pod-obitelj B (MDR/TAP), član 1 protein (*engl. ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1*)

Akt – protein-kinaza B (*engl. RAC-Alpha serine/threonine protein kinase; protein kinase B*)

AML – akutna mijeloična leukemija (*engl. acute myeloid leukemia*)

ATP – adozin-trifosfat (*engl. adenosine triphosphate*)

AUC – površina ispod krivulje (*engl. area under the curve*)

BCRP – protein otpornosti na lijekove povezan s rakom dojke (*engl. breast cancer resistance protein*)

BSA – albumin govedeg seruma (*engl. bovine serum albumin*)

CBF – unutrašnji vezni faktor (*engl. core binding factor*)

CD – sustav razlikovnih skupina (*engl. cluster of differentiation*)

CEBPA – CCAAT/pojačivač-vezajući faktor (*engl. CCAAT/enhancer-binding protein alpha*)

KR – kompletna remisija

DNA – deoksiribonukleinska kiselina (*engl. deoxyribonucleic acid*)

EDTA – etilendiamintetraoctena kiselina (*engl. ethylenediaminetetraacetic acid*)

Erc – eritrociti

ERK1/2 – izvanstaničnim signalom regulirana kinaza 1/2 (*engl. extracellular signal-regulated kinase 1/2*)

FACS – fluorescencijom pokretano razdvajanje stanica (*engl. fluorescence-activated cell sorting*)

FISH – fluorescentna *in situ* hibridizacija (*engl. fluorescent in situ hybridization*)

FLT3-ITD – tirozin kinaza 3 nalik fms-unutarnje uzastopne duplikacije (*engl. fms-like tyrosin kinase 3 - internal tandem duplication*)

FLT3-TKD – tirozin kinaza 3 nalik fms-tirozin kinazna domena (*engl. fms-like tyrosin kinase 3 – tyrosin kinase domain*)

LDH – laktat-dehidrogenaza (*engl. lactate dehydrogenase*)

Lkc - leukociti

LRP – protein otpornosti na lijekove povezan s rakom pluća (*engl. lung resistance-related protein*)

MAPK – mitogenom aktivirana protein-kinaza (*engl. mitogen-activated protein kinase*)

MDR1 – gen višestruke otpornosti na lijekove (*engl. multidrug resistance 1 gene*)

MDS – mijelodisplastični sindrom (*engl. myelodysplastic syndrome*)

MEK – mitogenom aktivirane protein-kinaze kinaze (*engl. mitogen activated protein kinase kinase*)

MLL – mješovita leukemija (*engl. mixed lineage leukemia*)

MPS – mijeloproliferativni sindrom (*engl. myeloproliferative syndrome*)

MRP1 – protein povezan s višestrukom otpornosti na lijekove (*engl. multidrug resistance related protein 1*)

NGS – normalni kozji serum (*engl. normal goat serum*)

NPM1 – nukleofosmin 1 (*engl. nucleophosmin 1*)

UP – ukupno preživljavanje

PBS – otopina fosfatnog pufera (*eng. phosphate buffered saline*)

P-gp – P-glikoprotein (*engl. P-glycoprotein*)

PI3K – fosfoinozimid 3-kinaza (*engl. phosphoinositide 3-kinase*)

PZB – preživljavanje bez znakova bolesti

Ras – protein štakorskog sarkoma (*engl. rat sarcoma*)

Raf – protein ubrzanog fibrosarkoma (*eng. rapidly accelerated fibrosarcoma*)

ROC – operativne karakteristike primatelja (*engl. reciever operating characteristic*)

RPMI – hranjivi medij instituta Roswell Park Memorial (*engl. Roswell Park Memorial Institute Medium*)

SZO – Svjetska zdravstvena organizacija (*engl. World Health Organization*)

TdT – terminalna deoksinukleotidil transferaza (*engl. terminal deoxinucleotidyl transferase*)

Trc – trombociti

SADRŽAJ

| | |
|---|-----------|
| 1. UVOD..... | 1 |
| 1.1. Akutna mijeloična leukemija | 1 |
| 1.2. P-glikoprotein..... | 3 |
| 1.3. Signalni putovi PI3K/Akt i MAPK..... | 6 |
| 1.3.1. Signalni put PI3K/Akt | 7 |
| 1.3.2. Signalni putovi mitogenom aktiviranih protein-kinaza ERK1/2 i p38..... | 9 |
| 1.4. Prognostički čimbenici u AML | 10 |
| 1.4.1. Prognostički čimbenici vezani za bolesnika..... | 12 |
| 1.4.2. Prognostički čimbenici vezani za AML | 12 |
| | |
| 2. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA | 16 |
| 2.1. Hipoteza istraživanja | 16 |
| 2.2. Specifični ciljevi istraživanja | 16 |
| 2.3. Očekivani znanstveni doprinos istraživanja..... | 16 |
| | |
| 3. ISPITANICI I METODE..... | 18 |
| 3.1. Ispitanici..... | 18 |
| 3.2. Metode..... | 19 |
| 3.2.1. Imunofenotipizacija leukemijskih blasta protočnom citometrijom..... | 19 |
| 3.2.2. Citogenetička analiza leukemijskih blasta..... | 19 |
| 3.2.3. Određivanje duplikacije u genu <i>FLT3</i> | 20 |
| 3.2.4. Analiza izražaja i aktivnosti P-glikoproteina u leukemijskim blastima | 20 |
| 3.2.5. Određivanje fosforilacijskog statusa molekula Akt, ERK1/2 i p38 u leukemijskim blastima..... | 22 |
| 3.2.6. Statistička obrada podataka | 23 |

| | |
|---|-----------|
| 4. REZULTATI | 26 |
| 4.1. Kliničko-laboratorijski pokazatelji bolesnika s AML..... | 26 |
| 4.2. Povezanost kliničkolaboratorijskih pokazatelja bolesnika s AML..... | 28 |
| 4.3. Izražaj i aktivnost P-glikoproteina i odnos prema poznatim prognostičkim pokazateljima AML..... | 33 |
| 4.4. Aktivacija molekula signalnih putova PI3K i MAPK i odnos prema poznatim prognostičkim pokazateljima AML..... | 38 |
| 4.5. Odnos između P-glikoproteina i fosforiliranosti Akt, ERK1/2 i p38 u leukemijskim blastima AML..... | 42 |
| 4.6. Analiza čimbenika koji utječu na preživljavanje bolesnika s AML..... | 42 |
| 4.6.1. Univarijatna analiza..... | 42 |
| 4.6.2. Multivarijatna analiza - Coxov regresijski model..... | 46 |
| A) <i>Ukupno preživljavanje</i> | 46 |
| B) <i>Preživljavanje bez znakova bolesti</i> | 53 |
| 5. RASPRAVA | 60 |
| 6. ZAKLJUČCI | 67 |
| 7. SAŽETAK | 69 |
| 8. SUMMARY | 71 |
| 9. LITERATURA | 73 |
| 10. ŽIVOTOPIS | 92 |

1. UVOD

1.1. Akutna mijeloična leukemija

Akutna mijeloična leukemija (AML) je heterogena skupina zloćudnih klonskih bolesti hematopoetskog sustava i hematopoetskih matičnih stanica. Kao posljedica stečenih mutacija u nezrelim progenitorskim stanicama koje uključuju onkogene, gene transkripcijskih faktora i tumorsupresorske gene, dolazi do promjena receptora za faktore rasta i poremećaja aktivacije signalnih putova u leukemijskim stanicama čime one stječu osobine koje im osiguravaju nadmoć nad drugim stanicama hematopoetskog sustava. Neograničena sposobnost proliferacije, prednost u rastu i preživljavanju, mehanizmi izbjegavanja stanične smrti te poremećaj u sazrijevanju stanica rezultiraju nakupljanjem nezrelih stanica u koštanoj srži bolesnika i potiskivanjem hematopoeze.¹ AML je najčešći oblik leukemije u odraslih osoba (80%), medijan dobi u kojoj se dijagnosticira je 65 godina, s rastućom incidencijom iznad 65. godine života.² Unatoč stalnom napretku u razumijevanju biologije leukemija, AML ima vrlo lošu prognozu s ukupnim petogodišnjim preživljavanjem od svega 20-50%.³ Stoga i nadalje postoji potreba za novim, inovativnim pristupima liječenju i ciljanim terapijskim protokolima.

Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (SZO) AML⁴ se dijeli prvenstveno prema tzv. povratnim (*engl. recurrent*) citogenetičkim ili molekularnim poremećajima leukemijskih stanica. Također, podjela prepoznaje AML s promjenama pridruženim mijelodisplastičnom sindromu (MDS), kao i terapijski uzrokovane mijeloidne neoplazme. S obzirom da se u oko 45% *de novo* dijagnosticiranih AML ne nalaze citogenetičke promjene,^{5,6} kategorija AML koje nisu drugamo uvrštene namijenjena je upravo za takve slučajeve. Tablica 1 donosi detaljan pregled kategorizacije AML prema SZO iz 2008. godine.⁴

Tablica 1. AML i pripadajuće prekursorske neoplazme i akutne bifenotipske leukemije⁴

| Kategorija |
|--|
| Akutna mijeloična leukemija s povratnim genetičkim poremećajima |
| AML s t(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i> |
| AML s inv(16)(p13.1q22) ili t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i> |
| APL s t(15;17)(q22;q12); <i>PML-RARA</i> |
| AML s t(9;11)(p22;q23); <i>MLLT3-MLL</i> |
| AML s t(6;9)(p23;q34); <i>DEK-NUP214</i> |
| AML s inv(3)(q21q26.2) ili t(3;3)(q21;q26.2); <i>RPNI-EVII</i> |
| AML (megakarioblastna) s t(1;22)(p13;q13); <i>RBM15-MKLI</i> |
| Privremeni entitet: AML s mutiranim <i>NPM1</i> |
| Privremeni entitet: AML s mutiranim <i>CEBPA</i> |
| Akutna mijeloična leukemija s promjenama pridruženim MDS-u |
| Terapijom uzrokovane mijeloidne neoplazme |
| Akutne mijeloične leukemije koje nisu drugamo uvrštene |
| AML s minimalnom diferencijacijom |
| AML bez sazrijevanja |
| AML sa sazrijevanjem |
| Akutna mijelomonocitna leukemija |
| Akutna monoblastna/monocitna leukemija |
| Akutna eritroidna leukemija |
| Čista eritroidna leukemija |
| Eritroleukemija, eritroidna/mijeloidna |
| Akutna megakarioblastna leukemija |
| Akutna bazofilna leukemija |
| Akutna panmijeloza sa mijelofibrozo |
| Mijeloidni sarkom |
| Mijeloidne proliferacije povezane sa sindromom Down |
| Prolazna abnormalana mijelopoeza |
| Mijeloidna leukemija povezana sa sindromom Down |
| Blastična neoplazma plazmacitoidne dendritične stanice |

Akutne bifenotipske leukemije

Akutna nediferencirana leukemija

Akutna leukemija mješovitog fenotipa s t(9;22)(q34;q11.2); *BCR-ABL1*

Akutna leukemija mješovitog fenotipa s t(v;11q23); rearanžman *MLL*

Akutna leukemija mješovitog fenotipa, B/mijeloidna, nesvrstana

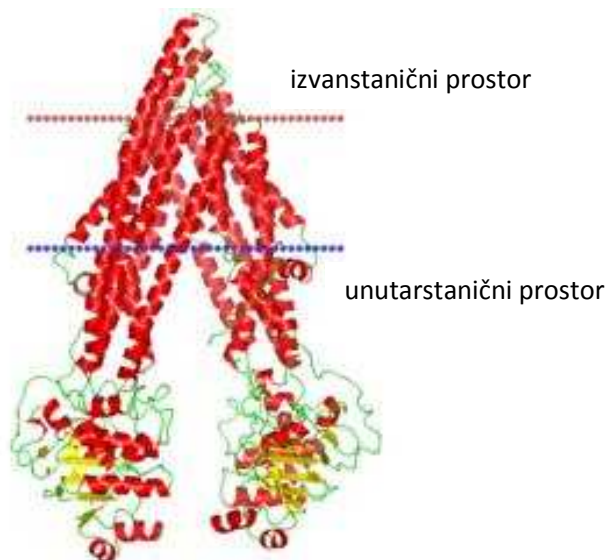
Akutna leukemija mješovitog fenotipa, T/mijeloidna, nesvrstana

Privremeni entitet: Limfoblastični limfom/leukemija NK-stanica

1.2. P-glikoprotein

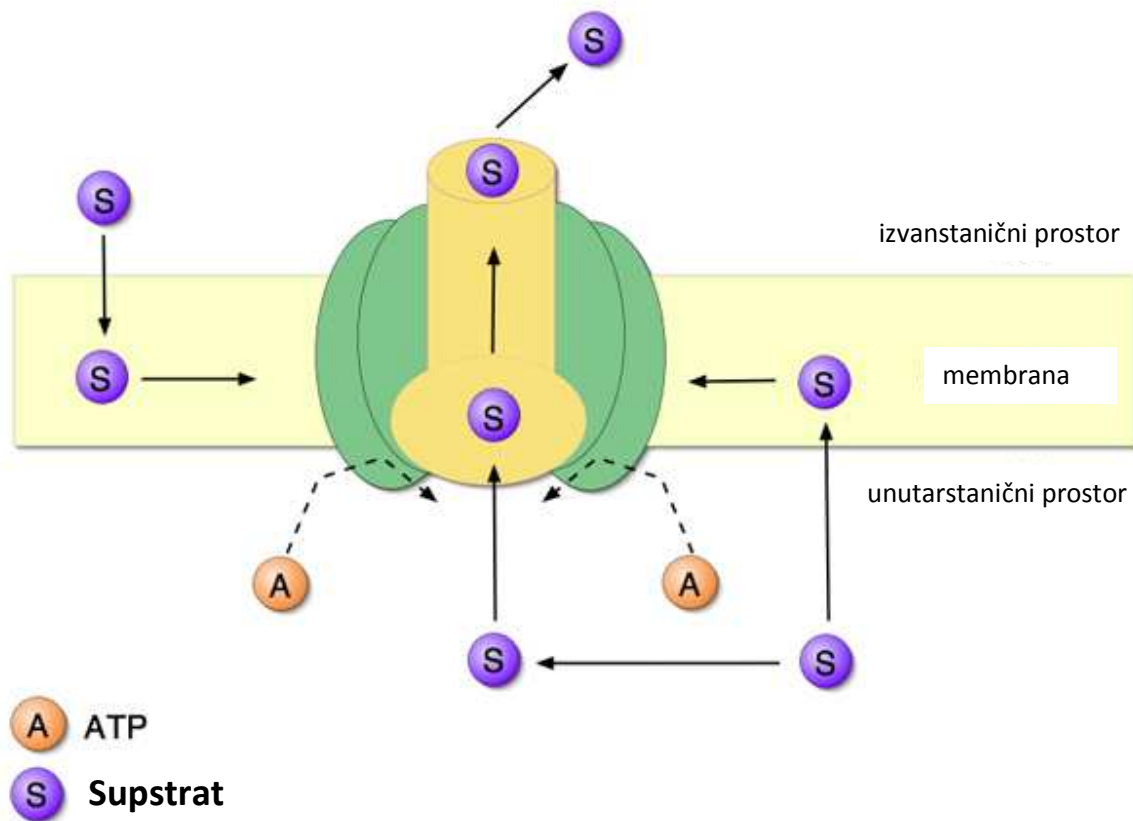
P-glikoprotein (P-gp, MDR1) kodiran je genom *MDR1* koji je lociran na dugom kraku kromosoma 7 (7q21.12). Gen je sastavljen od 209 kilobaza, sadrži 29 egzona, a pripadajuća mRNA se sastoji od 4872 nukleotida.⁷ Produkt gena *MDR1* protein je veličine 170 kDa⁸ sastavljen od 1280 aminokiselina. Proteinska struktura sastoji se od dvije podjedinice od kojih svaka ima po šest transmembranski domena i po jednu unutarcitoplazmatsku koja veže ATP. Dvije podjedinice pokazuju visok stupanj homologije. N-terminalni kraj sadržava 10-15 kDa glikoziliranog proteinskog slijeda. Pripada superobitelji *ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP) member 1 (ABCB1)* prijenosnih proteina. Ovaj transmembranski glikoprotein igra važnu ulogu u mehanizmu višestruke otpornosti na lijekove (*engl. MDR, multidrug resistance mechanism*) (Slika 1).

Protein P-gp je izražen na membranama stanica različitih organa i tkiva.⁹⁻¹³ Nalazi se na stanicama jetre, bubrega, crijeva, jejunuma, uterusa, pankreasa, kapilarnog i crijevnog endotela. Također je poznato da limfociti periferne krvi, posebice citotoksični T-limfociti (CD3+CD8+) i NK-stanice imaju jak izražaj i aktivnost MDR1 prijenosnika.¹¹ Nadalje, i hematopoetske matične stanice izražavaju aktivni P-gp.¹² Smatra se da je razlog tome iznimna važnost i ključna uloga krvotvornih matičnih stanica za razvoj svih stanica krvotvornog sustava, pa se upravo u njima razvio mehanizam zaštite od endogenih i egzogenih toksina posredovan P-gp prijenosnikom.



Slika 1. Struktura P-glikoproteina. Preuzeto i prilagođeno iz izvora: <http://opm.phar.umich.edu/protein>

Mehanizam djelovanja P-glikoproteina energetski je ovisan o ATP-u.¹⁴ Supstrat i molekula ATP-a vežu se istovremeno na odgovarajuća vezna mjesta na unutarcitoplazmatskoj domeni transportera. Hidrolizom molekule ATP-a dolazi do aktivnog izbacivanja supstrata iz unutarstaničnog u izvanstanični prostor. Molekula ADP-a se potom oslobađa s ATP-veznog mjesta te je nakon toga ATP-vezna domena na drugoj P-gp proteinskoj podjedinici spremna za vezanje nove molekule ATP-a i supstrata (Slika 2). P-gp ima veoma širok spektar supstrata. U pravilu su to hidrofobne molekule kao što su lipidi, steroidi, ksenobiotici i glukokortikoidi, ali među supstratima se nalaze i kemoterapeutici alkaloidi (npr. vinblastin i vinkristin), antraciklini (npr. doksorubicin i danorubicin), specifični peptidi (npr. ciklosporin i valinomycin), taksoli, inhibitori topoizomeraze (etoposid), itd.¹⁵⁻¹⁹ Samim time jasno je da izbacivanjem kemoterapeutika u izvanstanični prostor P-glikoprotein onemogućava djelovanje lijekova na ciljne stanice. Opisani mehanizam osnova je pojave višestruke otpornosti na lijekove (MDR) u onih tumora koji prekomjerno izražavaju P-gp ili drugi protein sličnog djelovanja (MRP1, BCRP, LRP).



Slika 2. Mehanizam djelovanja P-glikoproteina. Preuzeto i prilagođeno iz izvora: <http://www.filariajournal.com>

Akutne mijeloične leukemije često imaju izražen P-gp na membrani leukemijskih stanica. Sukladno prije navednom, aktivni P-gp smanjuje unutarstaničnu koncentraciju lijekova onemogućavajući brzu i efikasnu eradikaciju zloćudnog klon. Istraživanja pokazuju da je izražaj i funkcionalna aktivnost P-glikoproteina u AML povezana s lošijim odgovorom na kemoterapiju i smanjenim preživljavanjem bolesnika.²⁰ Također, opisana je učestalija pojava jačeg izražaja P-gp kod refraktornih AML i AML u relapsu.²¹⁻²³ Međutim, liječenje AML inhibitorima ABCB1 pumpe za sada nije polučilo većeg uspjeha. Spojevi prve generacije inhibitora P-glikoproteina (verapamil, ciklosporin A, tamoksifen) pokazali su se toksičnima u koncentracijama potrebnim za inhibiciju proteina. Međutim, u tijeku je razvoj inhibitora druge (PSC 833, deksverapamil) i treće generacije (Ly335979, OC144093 i XR9576)²⁴ koji bi trebali imati veći afinitet i specifičnost, a manje toksičnih nuspojava.

Zbog velike heterogenosti akutnih mijeloičnih leukemija do danas su provedene brojne studije koje su za cilj imale istražiti biološka svojstva AML (citomorfologiju, citogenetske i molekularne poremećaje, imunofenotip, i sl.) u odnosu na izražaj i aktivnost P-gp. Benderra i suradnici²⁵ su pokazali da je P-gp aktivnost jača u leukemijama koje izražavaju antigen CD34, dakle kod citomorfološki nezreljih oblika AML. Također, aktivni protein se učestalije nalazi u starijih bolesnika te u onim AML koje se temeljem nalaza citogenetskih poremećaja svrstavaju u skupinu s intermedijarnom ili lošom prognozom. Ista studija²⁵ je pokazala da P-gp aktivnost ima snažan prognostički utjecaj, pa takvi bolesnici teže postižu kompletnu remisiju (KR), imaju kraće vrijeme preživljavanja bez znakova bolesti (PZB) i ukupno preživljavanje (UP).

1.3. Signalni putovi PI3K/Akt i MAPK

Signalni putovi reguliraju brojne stanične procese, kao što su rast, proliferacija, apoptoza, diferencijacija i preživljavanje. Nužni su u prijenosu signala od staničnih receptora do efektorskih molekula u citoplazmi ili jezgri stanice. Prijenos signala osigurava primjeren i pravodoban odgovor stanice na niz unutarstaničnih i izvanstaničnih podražaja. Ciljne efektorske molekule najčešće su transkripcijski faktori i proteini uključeni u regulaciju staničnog ciklusa i apoptoze. Smatra se da je deregulacija i konstitutivna aktivacija kaskada signalnih putova jedan od ključnih mehanizama tumorigeneze. Na taj način tumorske stanice stječu karakteristike koji im omogućavaju nadmoć nad drugim stanicama mehanizmima nekontroliranog rasta i sposobnosti dijeljenja, izbjegavanjem programirane stanične smrti i zastojem u diferencijaciji. Kaskade signalnih putova razgranata su mreža molekula koje imaju hijerarhiju aktivacije i deaktivacije. Unatoč tome, poznato je da pojedine molekule signalnih putova mogu regulirati molekule druge kaskadne reakcije, što govori u prilog složenosti i međusobnoj kooperaciji sustava prijenosa signala. Štoviše, inhibicijom određene molekule, tumorska stanica pronalazi zaobilazni put aktivacije nizvodnih efektorskih molekula u svrhu postizanja prijenosa informacije. Načini prijenosa poruke najčešće uključuju proces fosforilacije, odnosno, defosforilacije molekula. Drugim riječima, fosforilacija određene molekule dovodi do njene aktivacije, no u drugom tipu molekula isti proces može dovesti do inaktivacije. Ono što pokreće neprimjerenu aktivaciju određenog puta su mutacije uzvodnih receptorskih tirozin kinaza, somatski poremećaji u pojedinim molekulama koje su integralni dijelovi signalne kaskade, autokrini aktivacija lučenjem faktora rasta, fuzijskim tvorbama nastalim rearanžmanima kromosoma i sl.

Signalni putovi PI3K/Akt i MAPK su važni putovi regulacije preživljavanja, apoptoze i proliferacijske sposobnosti stanica. Stoga ne iznenađuje činjenica da se u velikom broju tumora nalaze deregulirane kaskade njihovih prijenosa signala.²⁶ Sukladno tome, istraživanja pokazuju da se u AML često nalazi abnormalna aktivacija putova PI3K/Akt i MAPK.²⁷⁻²⁹ Fosforilacija MAPK-puta prisutna je u oko 40%,³⁰ a PI3K/Akt u 40-80%^{31,32} AML bolesnika. Područje koje je još uvijek poprilično neistraženo jest potencijalni prognostički značaj deregulacije signalnih putova, pri čemu postoje oprečni rezultati pojedinih studija,^{33,34} ali i pitanje potencijalnog povećanja stope uspješnosti liječenja AML inhibicijom konstitutivno aktiviranih signalnih putova.

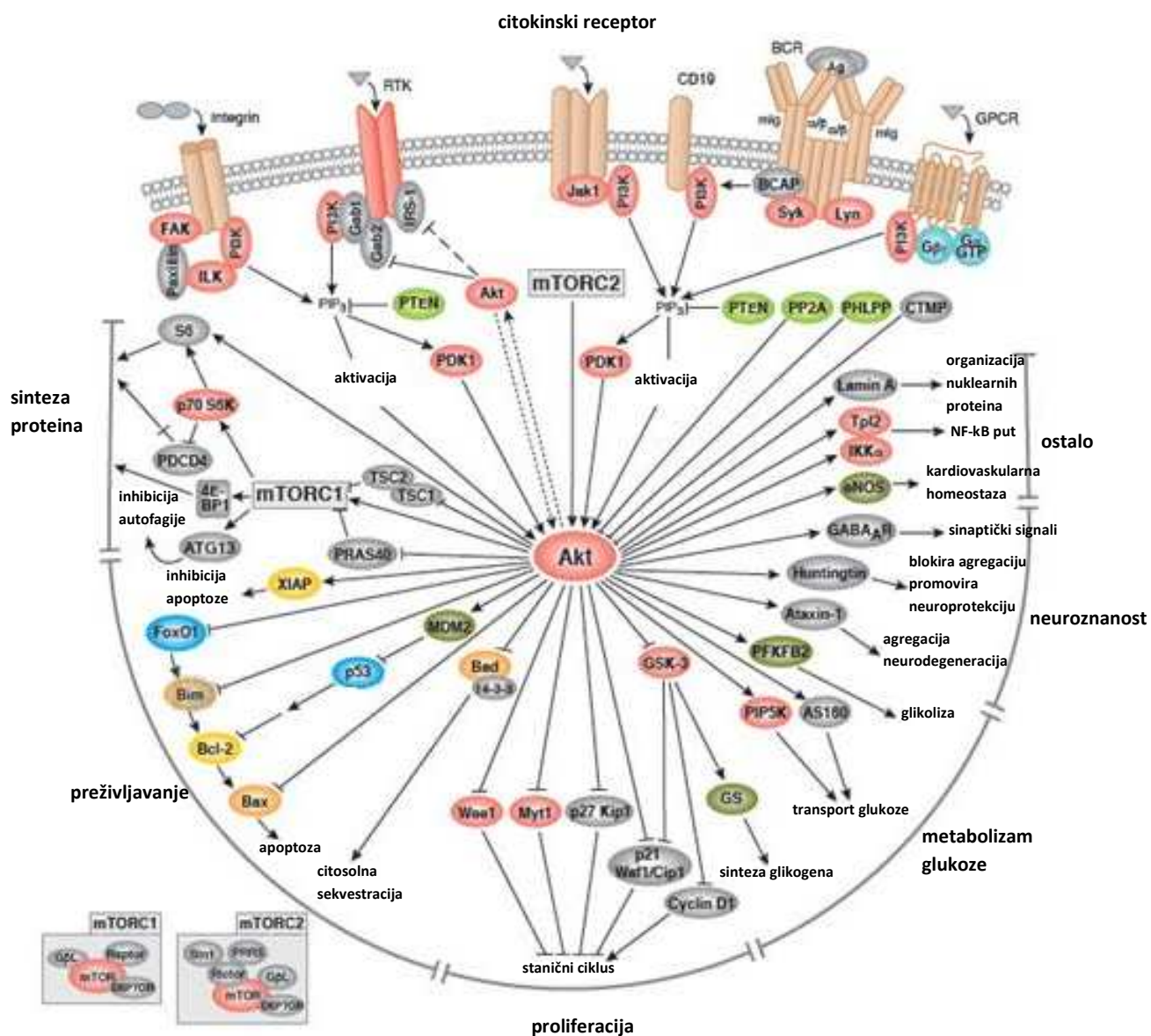
1.3.1. Signalni put PI3K/Akt

Lipid-kinaza PI3K je enzim koji se u stanicama sisavaca nalazi u nekoliko različitih izoformi koje se dijele u klasu I, II i III.^{35,36} Klasa I najčešće je proučavana, a radi se o kinazi koja reagira na izvanstanični podražaj faktorima rasta. Sastoji se od dvije podjedinice, regulatorne i katalitičke (p110- α , β i δ).³⁷ Supstrat za PI3K je fosfatidilinozitol 4,5 bifosfat (PtdIns (4,5)P₂) kojeg fosforilira u fosfatidilinozitol 3,4,5 trifosfat (PtdIns (3,4,5)P₃).^{38,39} Enzim je pomoću regulatorne podjedinice lokaliziran na unutarstaničnoj strani membrane, a produkt PtdIns (3,4,5)P₃ je lipidni drugi glasnik koji osigurava istu unutarstaničnu lokalizaciju za brojne molekule, uključujući PDK1 i Akt.

Protein-kinaza B (PKB) ili Akt (PKB) je serin/treonin protein-kinaza od 57 kDa. Poznate su tri jako konzervirane izoforme: Akt1/ α , Akt2/ β i Akt3/ γ . Nakon što se s pomoću PtdIns(3,4,5)P₃ veže za membranu stanice dolazi do njene fosforilacije na treoninu (Thr308) pomoću PDK1. Nasuprot tome, mTOR kompleks 2 (mTORC2) fosforilira serin (Ser473). Aktivirani Akt odlazi u citosol i jezgu. Do sada je prepoznat veliki broj Akt-supstrata (Bad, IKK α/β , MDM2, FOXO, GSK3 α/β , TSC2, eNOS, ASK1, p21, p27, itd.),⁴⁰ a mnogi od njih imaju ključne uloge u regulaciji preživljavanja i diobe stanica (Slika 3).

Konstitutivna fosforilacija/aktivacija signalnog puta PI3K/Akt nalazi se u velikom postotku akutnih mijeloičnih leukemija.^{31,34,41-44} Istraživanja su pokazala da takvi bolesnici imaju lošiju prognozu.^{34,45-47} Djelomično objašnjenje tome može biti kontrola izražaja proteina MRP1 uključenog u mehanizam višestruke otpornosti na lijekove putem PI3K/Akt prijenosa signala.⁴⁸

Također, istovremena aktivacija više različitih signalnih putova ima negativni prognostički značaj.⁴⁶ Unatoč tome, proturječne rezultate objavili su Tamburini i sur.³³, pri čemu bolju prognozu imaju bolesnici s AML i konstitutivno aktiviranim PI3K/Akt putem.



Slika 3. Signalni put PI3K/Akt. Preuzeto i prilagođeno iz izvora: www.cellsignal.com

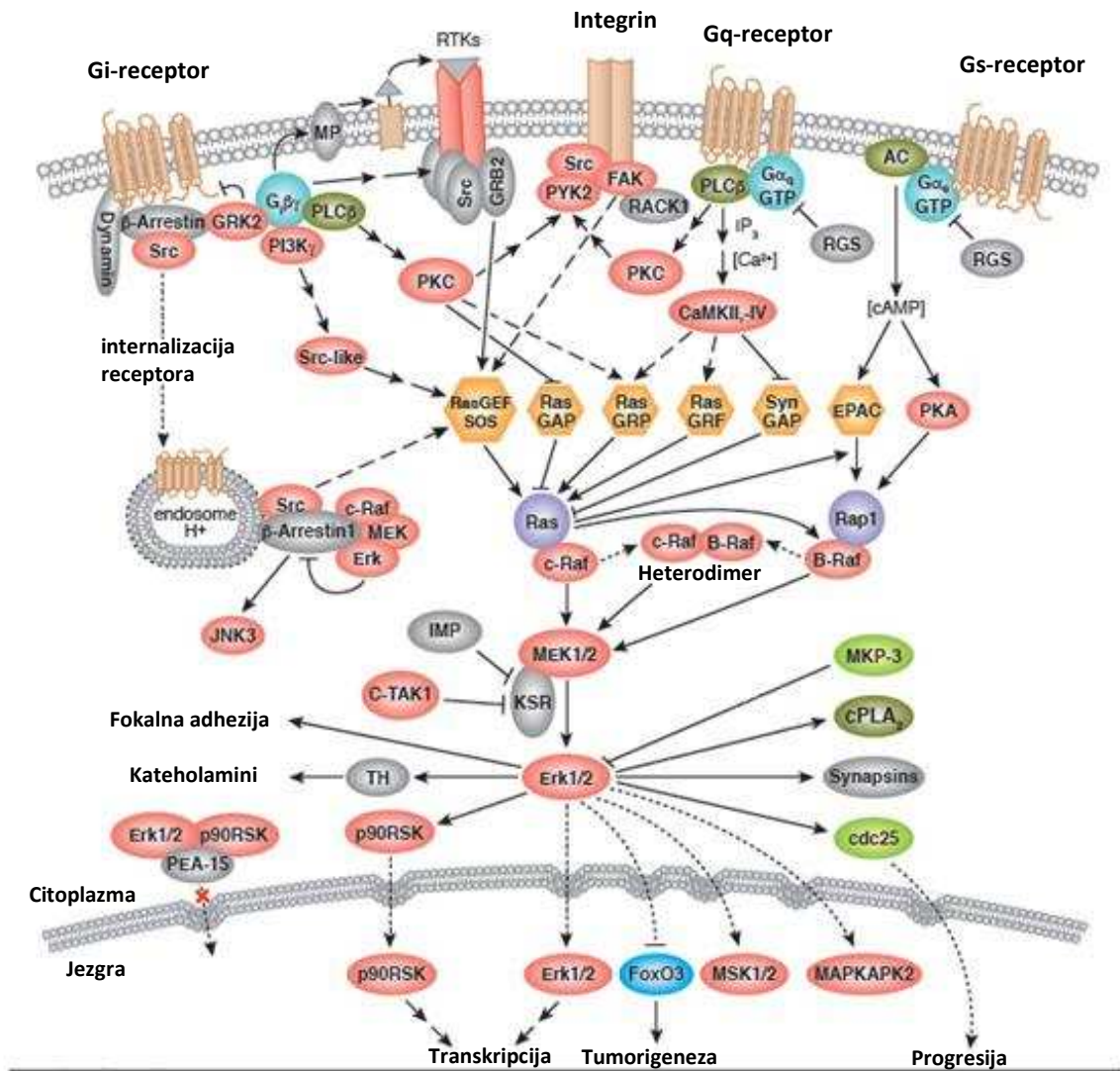
1.3.2. Signalni putovi mitogenom aktiviranih protein-kinaza ERK1/2 i p38

Mitogenom aktivirane protein-kinaze obuhvaćaju tri grupe molekula: ERK (izvanstaničnim signalom regulirane kinaze), JNK (c-Jun N-terminalne kinaze) i p38.⁴⁹

Signalna kaskada Ras/Raf/MEK/ERK prenosi proliferacijski signal od staničnih receptora do transkripcijskih faktora koji reguliraju izražaj gena. Stimulacija odgovarajućeg receptora faktorima rasta, citokinima ili mitogenima uzrokuje stvaranje proteinskog kompleksa (Shc, SOS, Grb2) vezanog za receptor.^{29,50-52} Kompleks omogućava vezanje molekule GTP za membranski Ras. RasGTP potom veže Raf za membranu gdje se fosforilacijom i aktivira.^{53,54} Raf fosforilira MEK1 koji potom aktivira serin/treonin kinazu ERK1/2.^{55,56} ERK1/2 u nastavku kaskadnog signalnog puta fosforilira brojne ciljane molekule (p90^{Rsk-1}, Elk-1, CREB i Fos)^{57,58} koje se vežu na promotore gena važnih za regulaciju rasta, proliferacije i apoptoze (Slika 4). Međutim, u tumorskim stanicama aktivacija puta zbiva se zbog mutacija ili prekomjernog izražaja molekula signalne kaskade (primjerice Ras i Raf) i uzvodnih receptora (Kit, Fms, FLT3 i EGFR), zbog kromosomskih translokacija (BCR-ABL), ali i prekomjernog autokrinog stvaranja faktora rasta. Središnja uloga MEK/ERK puta u kroničnim i akutnim mijeloidnim leukemijama jest poticanje i održavanje staničnog proliferativnog kapaciteta i preživljavanja malignog kлона.

Protein-kinaza p38/MAPK važan je posrednik odgovora stanica na izvanstanične podražaje, posebice okolišni stres. Aktivacija p38 citokinima i staničnim stresom (zračenjem, toplinom, oksidativnim stresom, oštećenjem DNA, itd.) povezuje se s inhibicijom rasta stanica i poticanjem ulaska stanica u apoptozu.⁵⁹⁻⁶¹ Signalna kaskada odvija se od membranskog staničnog receptora, adaptorskih molekula i kinaza do kinaza MAPKKK (MEKK4) i MAPKK (MKK3, MKK4, MKK6) koje u konačnici fosforilacijom treonina180 i tirozina182 aktiviraju p38 (Slika 5). Poznate su četiri izoforme molekule (p38- α , β , γ i δ) od kojih je najviše istražena p38 α . Ovisno o prirodi podražaja i vrsti tkiva, različite izoforme mogu imati funkcionalno potpuno suprotni učinak.^{62,63} Osim toga, poznato je da signalni put p38 MAPK ima veoma važnu ulogu u regulaciji hematopoetske homeostaze. Kontrola proliferacijske sposobnosti, preživljavanja i diferencijacije krvotvornih stanica podraženih citokinima i faktorima rasta odvija se ponajprije preko p38 puta prijenosa signala.⁶⁴⁻⁶⁷ Složenost uloge p38 u održavanju homeostaze odražava se i na ulogu ovog signalnog puta u hematološkim bolestima. Aberantna fosforilacija p38 u AML povezuje se s

povećanom stopom preživljavanja i pojavom neprimjerenih diferencijacijskih obrazaca leukemijskih stanica.⁶⁸

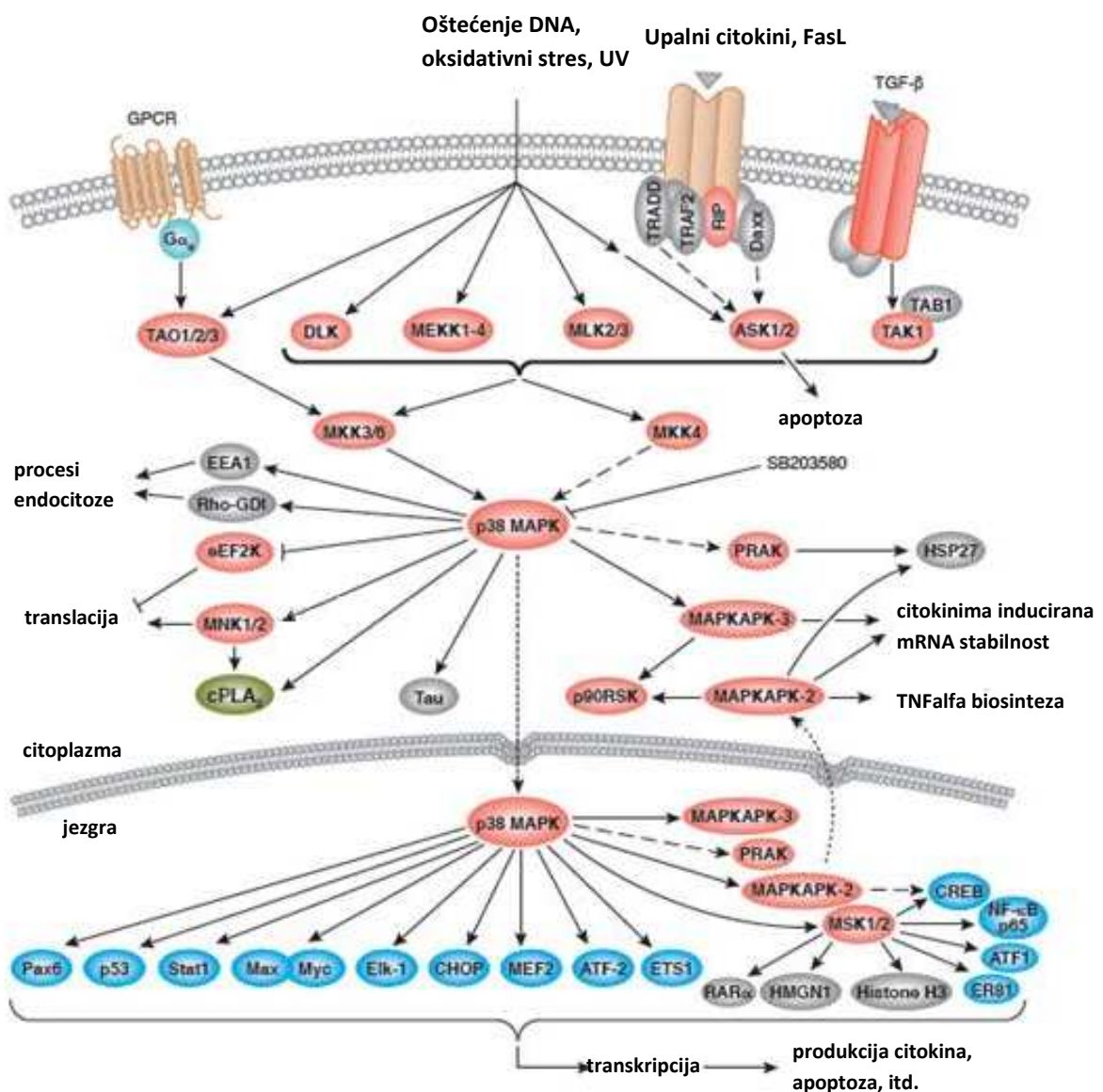


Slika 4. Signalni put MAPK-ERK1/2. Preuzeto i prilagodeno iz izvora: www.cellsignal.com

1.4. Prognostički čimbenici u AML

Temeljem dostupnosti što veće količine podataka o svojstvima pojedinog oblika AML donosi se i odluka o pristupu liječenju bolesnika. Pitanje vrste kemoterapijskog protokola kao i mogućnosti

liječenja transplantacijom krvotvornih matičnih stanica uvelike ovisi o stratifikaciji bolesnika u prognostičke grupe pri dijagnozi. Najjaču vrijednost imaju oni prognostički čimbenici koji predviđaju rizik od relapsa, smrti uzrokovane terapijom i preživljavanje bolesnika. Danas je poznat velik broj pokazatelja koji u određenoj mjeri predviđaju ishod bolesti, a može ih se podijeliti na one koje su vezane za samog bolesnika (klinički pokazatelji) i one vezane za zloćudni leukemijski klon (biološki pokazatelji blasta).



Slika 5. Signalni put MAPK-p38. Preuzeto i prilagodeno iz izvora: www.cellsignal.com

1.4.1. Prognostički čimbenici vezani za bolesnika

Odgovor na terapiju i ukupno preživljavanje bolesnika s dijagnosticiranom AML lošiji su za osobe starije životne dobi.⁶⁹⁻⁷¹ Za bolesnike koji imaju više od 60 godina petogodišnje preživljavanje iznosi svega 12%⁷², dok u mlađih odraslih bolesnika ono iznosi do 38%.⁷³ Pojava se objašnjava različitom biologijom AML u starijih osoba, učestalijim nalazima citogenetski nepovoljnih poremećaja, i izražajem i aktivnosti P-gp te razvojem bolesti na podlozi prethodno dijagnosticiranih hematoloških bolesti (mijelodisplastičnog ili mijeloproliferativnog sindroma).^{69,74} Osim toga, stariji bolesnici teže podnose kemoterapiju i komplikacije vezane uz nju pa imaju povećani rizik od smrti tijekom indukcijske faze terapijskog protokola.

1.4.2. Prognostički čimbenici vezani za AML

Pokazatelji veličine tumorske mase pokazali su se kao izrazito nepovoljni prognostički faktori u AML. To su ponajprije visoki broj leukocita u perifernoj krvi bolesnika pri dijagnozi, povećana serumska razina laktat-dehidrogenaze (LDH) i prisutnost hepatosplenomegalije.⁷⁵⁻⁷⁷

Nadalje, prognostičku vrijednost ima i zdravstveno stanje bolesnika i prethodna hematološka bolest u anamnezi, odnosno prije postavljanja dijagnoze AML. Nova podjela AML prema SZO predviđa dvije kategorije za takve slučajeve. Prva obuhvaća akutne mijeloične leukemije sa znakovima pridružene mijelodisplazije (MDS) što podrazumijeva nalaz više od 20% blasta u koštanoj srži i jedno od slijedećih karakteristika: prethodno diagnosticirane MDS/MPS, citogenetičke poremećaje povezane s MDS, višelinijsku displaziju te odsutnost prethodnog liječenja citotoksičnim lijekovima i povratnih citogenetičkih poremećaja. Druga kategorija su sekundarne AML uzrokovane terapijom. Pod terapijom se podrazumijeva primjena alkilirajućih agensa, ionizirajućeg zračenja, inhibitora topoizomeraze II, itd.⁷⁸ Jedna petina svih AML pripada prethodno spomenutim dvjema kategorijama. Loša prognoza sekundarnih AML povezana je sa smanjenom stopom postizanja kompletne remisije i kraćim ukupnim preživljavanjem.⁷⁹

Najznačajniji prognostički faktor u AML je nalaz citogenetičkih poremećaja pri dijagnozi.^{80,81} Upravo zbog toga i najnovija podjela AML prema SZO⁴ prepoznaje kategoriju AML s povratnim (rekurentnim) genetičkim poremećajima. Kariotipska analiza omogućava definiranje biološki različitih podgrupa čime se u sve većoj mjeri osigurava individualizirani pristup liječenju bolesnika obzirom na specifične karakteristike same bolesti. Nalaz koji predviđa povoljniju

prognozu i ishod obuhvaća translokaciju t(15;17) u akutnoj promijelocitnoj leukemiji te inverziju inv(16), t(16;16) i t(8;21) koje rezultiraju promjenama CBF (*engl. core binding factor*). One se javljaju u oko 25% novodijagnosticiranih AML, a takvi bolesnici postižu kompletnu remisiju u 90% slučajeva s petogodišnjim preživljavanjem do 65%. Prognostički nepovoljni citogenetički poremećaji javljaju se u 10-20% bolesnika, najčešće starije životne dobi i anamnestički opterećeni prethodnom primjenom kemoterapije ili dijagnosticiranim MDS/MPS-om. Njihova stopa postizanja kompletne remisije iznosi 60%, a petogodišnje preživljavanje svega 10%. Tipični poremećaji u ovoj skupini su monosomija kromosoma 5 i/ili 7 (-5/-7), delecija 5q (del(5q)), abnormalnosti 3q (abn(3q)) i kompleksni kariotip.^{78,82} Također smatra se da su t(6;9)(p23;q34), t(9;22)(q34;q11), delecija 17p⁸³⁻⁸⁵ i translokacije koje uključuju *MLL*-lokus na 11q23^{5,85} povezane s lošijom prognozom i ishodom. Valja naglasiti da su preuredbe *MLL* lokusa veoma heterogene, stoga se t(9;11)(p22;q23) svrstava u prognostički intermedijarnu, a preostali t(v;11)(v;q23) u prognostički lošu skupinu pri čemu „v“ označava bilo koji drugi fuzijski partner odnosno kromosom. U novije vrijeme, monosomski kariotip koji podrazumijeva autosomnu monosomiju u kombinaciji s minimalno još jednom autosomnom monosomijom ili strukturnim poremećajem povezuje se s izrazito nepovoljnom prognozom.^{87,88} Poremećaji koji se rijetko javljaju u AML teško se svrstavaju u određenu prognostičku grupu i njihova prognostička vrijednost ostaje upitna. Da bi se to istražilo potrebne su multicentrične prospektivne studije koje bi uključile relativno velik broj bolesnika, a takvih je relativno malo (Tablica 2).

Unatoč zapaženom napretku na području laboratorijske dijagnostike citogenetičkih poremećaja u AML, za oko 45% bolesnika ova pretraga nije informativna. S obzirom da se kariotipski normalne AML svrstavaju u prognostički intermedijarnu skupinu, postoji potreba za otkrivanjem dodatnih molekularnih poremećaja u malignim stanicama u svrhu točnije prognostičke i terapijske stratifikacije bolesnika s AML.⁸⁹⁻⁹¹ U zadnjem je desetljeću s pomoću ciljanog sekvencioniranja otkriven niz rekurentnih mutacija gena odgovornih za aktivaciju signalnih putova u stanici (npr. *FLT3* i *KIT*), aktivatora transkripcije gena (npr. *CEBPA*) i drugih gena uključenih u regulaciju staničnog ciklusa (npr. *NPM1*).

FLT3 (*engl. Fms-like tyrosine kinase-3*) je receptorska tirozin-kinaza izražena na hematopoetskim progenitorskim stanicama. U malignih bolesti krvotvornog sustava poznata su dva tipa mutacija ovog receptora. Duplikacija u genu *FLT3-ITD* (*engl. internal tandem*

duplication) pogađa tirozinom bogatu jukstamembransku regiju koja regulira kinaznu aktivnost molekule, a mutacija *FLT3-TKD* (engl. *tyrosine kinase domain*) pogađa tirozin-kinaznu domenu na aspartatu 835 i izoleucinu 836.⁹²⁻⁹⁴ Obje mutacije rezultiraju konstitutivnom aktivacijom receptora i posljedičnim poremećajem prijenosa signala u leukemijskim stanicama.

FLT3-ITD se javlja u svim oblicima AML, ali s nešto većom učestalošću u akutnoj promijelocitnoj leukemiji^{95,96} i zrelijim monocitno/monoblastnim oblicima AML.⁹⁷ Uočena je klinička povezanost leukocitoze u krvi ili koštanoj srži i povećanog serumskog LDH s pojavom *FLT3-ITD* mutacija.^{94,98,99} Istraživanja pokazuju negativni prognostički značaj *FLT3-ITD* mutacije na ishod i preživljavanje bolesnika s AML,^{91,98-102} dok za *FLT3-TKD* prognostički značaj još uvijek nije jednoznačno utvrđen.^{94, 103-105}

Osim mutacija *FLT3*-receptora, zadnjih je godina dobro istražena mutacija gena koji kodira protein NPM1. Posljedica poremećaja je promjena lokalizacije tog proteina iz nukleolusa u citoplazmu. Prognostički je povoljan pokazatelj i kada je *FLT3-ITD* mutacija prisutna i kada nije prisutna.^{91,102,106,107} Gen *CEBPA* kodira transkripcijski faktor važan za kontrolu mijeloidne diferencijacije. Somatska mutacija bialelnog oblika prepoznata je kao prognostički povoljna u onih AML koje nemaju *FLT3-ITD*.¹⁰⁸⁻¹¹¹ *KIT* je receptor za faktor rasta matičnih stanica (SCF). Mutacija gena *KIT* povezana je s nepovoljnom prognozom i kliničkim ishodom, a učestalija je kod AML s preuredbama *RUNX1/RUNX1T1* i *CBFB/MYH11*.¹¹²⁻¹¹⁴

Pored navedenih gena, do danas je otkriven cijeli niz mutacija gena uključenih i u druge stanične procese, kao što je npr. metilacija DNA (geni *DNMT3A* i *B*, *TET1* i *2*, *IDH1* i *2*) i mutacije tumor-supresijskih gena (*TP53*, *WT1* i *PHF6*).¹¹⁵ Postojanje baze podataka mutacija u AML omogućit će daljnja istraživanja na eksperimentalnom i kliničkom planu, a posebice za klasifikaciju AML i stratifikaciju bolesnika u rizične i terapijske skupine.

Naposlijetku, imunofenotipska obilježja blasta AML prema nekim istraživanjima nose prognostičku vrijednost.¹¹⁶ Izražaj antigena CD34 povezan je sa smanjenim postotkom postizanja kompletne remisije, a bolesnici s aberantnim izražajem antigena CD56 na membrani leukemijskih stanica imaju kraće ukupno preživljavanje.¹¹⁷ Prognostički značaj izražaja terminalne deoksinukleotidil transferaze (TdT) i biljega CD7 nije jednoznačno utvrđena.^{117,118}

Tablica 2. Prognostička stratifikacija AML prema citogenetičkim i molekularnim poremećajima⁴

| Prognostička skupina | Podskupine citogenetičkih i molekularnih poremećaja |
|----------------------|--|
| Povoljna | AML s t(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i> AML s inv(16)(p13.1q22) ili t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i> mutirani <i>NPM1</i> bez <i>FLT3</i> -ITD (normalni kariotip) mutirani <i>CEBPA</i> (normalni kariotip) |
| Intermedijarna-I | mutirani <i>NPM1</i> s <i>FLT3</i> -ITD (normalni kariotip) divlji tip <i>NPM1</i> s <i>FLT3</i> -ITD (normalni kariotip) divlji tip <i>NPM1</i> bez <i>FLT3</i> -ITD (normalni kariotip) |
| Intermedijarna-II | AML s t(9;11)(p22;q23); <i>MLLT3-MLL</i> citogenetički poremećaji nesvrstani u povoljnu i nepovoljnu skupinu |
| Nepovoljna | AML s inv(3)(q21q26.2) ili t(3;3)(q21;q26.2); <i>RPNI-EVII</i> AML s t(6;9)(p23;q34); <i>DEK-NUP214</i> t(v;11)(v;q23); <i>MLL</i> rearanžman -5, del(5), -7, abn(17p), složeni kariotip |

Fenotip višestruke otpornosti na lijekove, posebice izražaj i aktivnost P-glikoproteina povezana je sa smanjenom stopom postizanja kompletne remisije i ukupnim preživljavanjem. Mehanizam otpornosti opisan je u pododjeljku 1.2.¹¹⁹ Osim P-glikoproteina, prepoznati su i drugi proteini, MRP1, BCRP i LCR, uključeni u nastanak kemorezistencije koji su prognostički nepovoljni faktori u AML.¹²⁰⁻¹²⁵

2. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA

2.1. Hipoteza istraživanja

Pretpostavka je ovog istraživanja da su izražaj i aktivnost P-glikoproteina, medijatora višestruke otpornosti na lijekove, kao i fosforilacija molekula Akt, ERK1/2 i p38 signalnih putova PI3K/Akt i MAPK u blastima prognostički nepovoljni faktori u akutnoj mijeloičnoj leukemiji. U tom smislu navedeni čimbenici su međusobno povezani, ali koreliraju i s drugim prognostički nepovoljnim biološkim obilježjima u AML, kao što su citogenetički i molekularni poremećaji i aberantni imunofenotip, a time i manjom stopom postizanja kompletne remisije i kraćim ukupnim preživljavanjem bolesnika i preživljavanjem bez znakova bolesti.

2.2. Specifični ciljevi istraživanja

1. Odrediti razinu aktivnosti i izražaja P-gp u leukemijskim stanicama *de novo* dijagnosticiranih primarnih i sekundarnih AML;
2. Odrediti razinu fosforilacije/aktivacije molekula Akt, ERK1/2 i p38 u leukemijskim stanicama AML;
3. Ispitati korelaciju izražaja i aktivnosti P-gp s drugim prognostički nepovoljnim karakteristikama leukemijskih stanica AML;
4. Ispitati korelaciju aktivacije signalnih putova PI3K/Akt i MAPK s drugim prognostički nepovoljnim karakteristikama leukemijskih stanica AML;
5. Ispitati međusobni odnos aktivacije signalnih putova s izražajem i aktivnošću P-glikoproteina u leukemijskim stanicama AML;
6. Ispitati povezanost izražaja i aktivnosti P-gp i aktiviranih signalnih putova s ukupnim preživljavanjem, preživljavanjem bez znakova bolesti i stopom postizanja kompletne remisije bolesnika s AML.

2.3. Očekivani znanstveni doprinos istraživanja

Istraživanje izražaja i aktivnosti medijatora kemorezistencije P-gp i konstitutivne fosforilacije molekula signalnih putova PI3K i MAPK omogućit će bolji uvid u njihov odnos u specifičnim podskupinama AML definiranim na temelju poznatih bioloških i prognostičkih obilježja blasta, uključujući citomorfološka, imunofenotipska i citogenetička, kao i mutaciju FLT3-gena. Primjerice, dosadašnja istraživanja izražaja proteina kemorezistencije u akutnim leukemijama

ukazala su na ulogu signalnog puta PI3K/Akt,⁴⁸ a ovim će se radom dobiti nove činjenice o odnosu izražaja i aktivnosti P-gp i konstitutivne aktivacije/fosforilacije signalnih putova PI3K/Akt i MAPK u bolesnika s AML. Nadalje, malo je poznato o prognostičkom značaju aktivacije pojedinih signalnih putova u AML. Dostupna literatura nudi proturječne informacije, pri čemu jedni autori navode negativni^{31,34}, a drugi autori nalaze pozitivni prognostički značaj konstitutivne fosforilacije signalnog puta PI3K/Akt.³³ Zanimljivo, Gallay i sur.³⁴ su pokazali da je fosforilacija Akt na Thr308, ali ne i Ser473 povezana s citogenetičkim nalazom visokog rizika i kraćim ukupnim preživljavanjem bolesnika s AML. Ovim istraživanjem dobit će se dodatni uvid u značaj fosforilacije/aktivacije molekula Akt, ERK1/2 i p38 u odnosu na uspješnost postizanja kompletne remisije, ukupnog preživljavanja bolesnika i preživljavanja bez znakova bolesti.

Uvidom u odnos imunofenotipskih značajki, postojanja citogenetičkih i molekularnih poremećaja, konstitutivne aktivacije molekule signalnih putova i aktivnosti i izražaja P-glikoproteina u leukemijskim blastima AML dobit će se dodatni elementi za bolje razumijevanje biologije maligne bolesti. Ovaj pristup sagledava karakteristike bolesnika na individualnoj razini, ali se može sagledati i u kontekstu daljnjeg napretka *in vitro* istraživanja inhibitora P-glikoproteina i signalnih putova kao potencijalnih ciljeva novih strategija liječenja AML.

Osim toga, one AML kojima se ne dokažu specifični citogenetički i molekularni poremećaji svrstavaju se u skupinu bolesnika s intermedijarnom prognozom. Određivanje statusa fosforilacije signalnih putova može pomoći stratifikaciji te skupine bolesnika i posljedično odabiranje odgovarajućeg i prilagođenog terapijskog protokola. Ovim radom pokušat će se utvrditi doprinosi li spoznaja o aktivaciji signalnih kaskada učinkovitijim određivanjem prognostičke grupe za oboljele od AML.

3. ISPITANICI I METODE

3.1. Ispitanici

Istraživanje je odobreno od strane Etičkog povjerenstva KBC Zagreb i Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Ispitanici su upoznati s provedbom istraživanja i potpisali su obaviješteni pristanak za sudjelovanje u ispitivanju.

Istraživanje je provedeno na ukupno 118 bolesnika obaju spolova s *de novo* dijagnosticiranom primarnom ili sekundarnom AML čiji su uzorci koštane srži i/ili periferne krvi bili upućeni na dijagnostičke postupke u Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb. Eksperimentalni dio izrade ovog rada nije zahtjevao uzimanje dodatnog materijala, svi postupci su provedeni na biološkom materijalu preostalom nakon rutinskih dijagnostičkih postupaka. Period istraživanja iznosio je 35 mjeseci, od rujna 2009. godine do kolovoza 2012. godine, a uključivao je svaki uzorak AML u kojem bi nakon potrebnih dijagnostičkih postupaka preostalo dovoljno biološkog materijala (stanica) za obavljanje dodatnih eksperimentalnih protokola. Uzorci nisu bili krioprezervirani, pa su stoga svi postupci obavljani unutar 24 sata od primitka uzorka.

Bolesnici, ukupno njih 103, liječeni su primjenom različitih odobrenih kemoterapijskih protokola aktivnih u Zavodu za hematologiju KBC-a Zagreb u vrijeme sakupljanja uzoraka.^{126,127} Većina ispitanika je primila indukcijsku kemoterapiju prema protokolu AML 12,^{128,129} koja je sadržavala standardne ili visoke doze citarabina u kombinaciji s idarubicinom, daunorubicinom, etopozidom i drugim agensima. Bolesnici u kojih zbog dobi, komorbiditeta ili neke druge kontraindikacije, nije bilo moguće provesti liječenje navedenim protokolima liječeni su manje intenzivnim protokolima kao što su protokol miniMICE (mitoxantron 7mg/m² 1., 3., 5. dan, etopozid 100mg/m² od 1.-3.dana, cytosar Ara-C 100mg/m² u infuziji/24 sata od 1.-7- dana) i protokol "1+5" (cytosar Ara-C 100 mg/m², svakih 12 sati/5 dana, daunorubicin 45 mg/m² jedna doza 1.dan) i sl. Bolesnici s akutnom promijelocitnom leukemijom liječeni su protokolom HOVON-79 baziranom na ATRA (*engl. all-trans retinoic acid*).¹³⁰⁻¹³³ Bolesnici koji su postigli kompletnu remisiju primili su konsolidacijsku terapiju sukladno protokolu u kojeg su bili uključeni. Ukoliko nije bila postignuta remisija indukcijskom terapijom, odmah je primijenjen ciklus reindukcije, najčešće prema HAM shemi.^{134,135} Transplantacija krvotvornih matičnih stanica (auto- ili

alogeno) učinjena je u skladu s preporukama kad god je to bilo moguće. Preostalih 15 bolesnika primilo je samo palijativno suportivno liječenje.

Pregled obilježja ispitanika poblizje je definiran u tablici 3 i tablici 4.

3.2. Metode

3.2.1. Imunofenotipizacija leukemijskih blasta protočnom citometrijom

Imunofenotipizacija leukemijskih blasta AML rađena je prema standardiziranom protokolu Kliničke jedinice za staničnu imunodijagnostiku i postupke *in vitro*, KBC Zagreb.¹³⁶ Uzorak koštane srži ili periferne krvi sakupljen je u epruvetu s antikoagulansom K₃ EDTA. Eritrociti su lizirani hipotoničnom otopinom amonijevog-klorida na sobnoj temperaturi tijekom 10 minuta. Leukociti su resuspendirani u otopini fosfatnog pufera (PBS) i podešeni u koncentraciji od 10⁷ stanica po mililitru. 100 µL stanične suspenzije (10⁶ stanica) korišteno je za daljnje dvostruko, trostruko ili četverostruko bojanje stanica monoklonskim protutijelima u određenim specifičnim kombinacijama prilagođenima dijagnostičkom panelu za AML. Protutijela korištena od proizvođača DAKO bila su: CD14-PE (klon TÜK4), CD33-PE (klon WM-54), CD41-FITC (klon 5B12), CD42b-PE (klon AN51), CD61-FITC (klon Y2/51), CD64-PE (klon 10.1), CD235a-FITC (klon JC159), mijeloperoksidaza-PE (klon MPO-7), lizozim-FITC, TdT-FITC (klon HT-6), IgM-FITC (klon F0058), CD3-APC (klon UCHT1), CD4-PE (klon MT310), CD19-APC (klon HD37), a od proizvođača BD Biosciences CD117-PE (klon 104D2), CD11b-APC (klon D12), CD13-APC (klon WM15), HLA-DR-PerCP (klon L243), CD34-FITC (klon 8G12), CD45-PerCP (klon 2D1), CD56-FITC (klon NCAM16.2), CD2-FITC (klon RPA-2.10) i CD7-FITC (klon 449). Nakon inkubacije stanica protutijelima i uklanjanja viška nevezanih protutijela ispiranjem u puferu, obilježene stanice su analizirane protočnim citometrom BD FACSCalibur i kompjutorskim programom CellQuestPro (BD Biosciences). Dijagnostički panel za AML uključuje i otkrivanje aberantnog imunofenotipa na leukemijskim stanicama.

3.2.2. Citogenetička analiza leukemijskih blasta

Uzorci periferne krvi i koštane srži pri postavljanju dijagnoze bolesti uzorkovani su u epruvete s heparin-litijem. Citogenetička analiza učinjana je u Kliničkoj jedinici za citogenetiku i FISH dijagnostiku hemato-onkoloških bolesti Kliničkog bolničkog centra Zagreb. Stanične kulture uzgajane su prema protokolima korištenima za citogenetičku analizu hematoloških bolesti.¹³⁷⁻

¹³⁹ Kariotipske promjene analizirane su klasičnom metodom GTG-pruganja (Giemsa-Tripsin-Giemsa)¹⁴⁰ i metodom fluorescencijske *in situ* hibridizacije (engl. *fluorescent in situ hybridization*).¹⁴¹ Tumačenje promjena kariotipa učinjeno je prema Međunarodnom sustavu za citogenetičku klasifikaciju ISCN 2009 (prema engl. *International System for Human Cytogenetics*).¹⁴² Svjetlosno-fluorescencijski mikroskop s pripadajućim filterima (BX 50, Olympus i AXIOPLAN 2, Carl Zeiss Jena GmbH, Njemačka) korišten je za vizualizaciju GTG-pruga i FISH-a. Program Ikaros (Automatic Karyotyping System, MetaSystems, Njemačka) korišten je za analizu slike GTG-pruganja, a za analizu slike FISH-analize korišten je program Isis (FISH Imaging, MetaSystems, Njemačka).

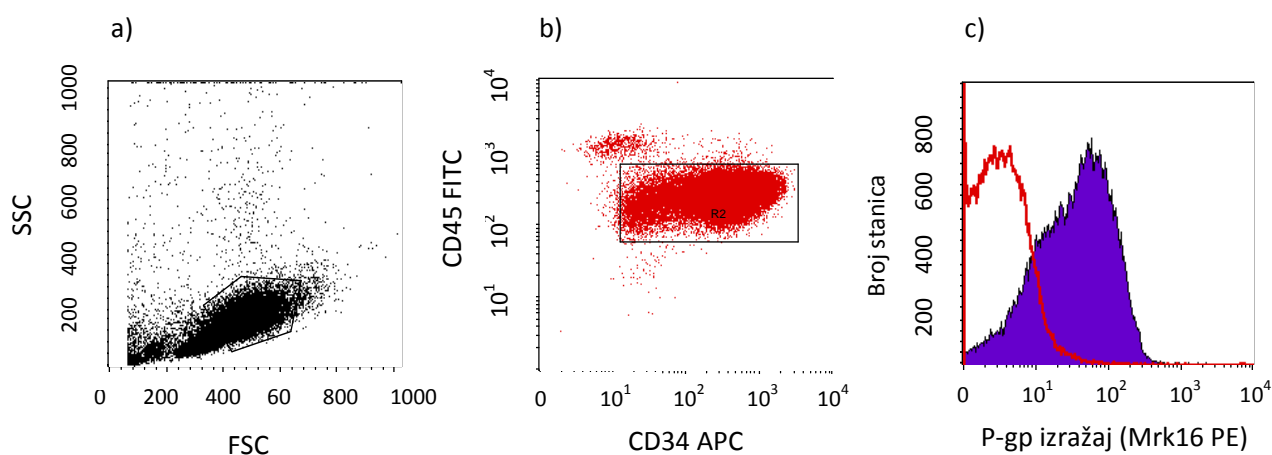
3.2.3. Određivanje duplikacije u genu *FLT3*

Dokazivanje duplikacije u genu *FLT3* (tzv. *FLT3-ITD*) izvedeno je lančanom reakcijom polimeraze nakon prijepisa izolirane RNA iz koštane srži u komplementarnu DNA (cDNA) prema metodi Nakao i sur (1996.).¹⁴³ Umnoženi produkti razdvojeni su elektroforetski na 3%-tnom gelu agaroze. Analiza je učinjena u Kliničkoj jedinici za specijalnu i molekularnu hematologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb.

3.2.4. Analiza izražaja i aktivnosti P-glikoproteina u leukemijskim blastima

Da bi se odredio izražaj P-glikoproteina na membrani, leukemijske stanice su najprije inkubirane u fosfatnom puferu PBS s dodatkom 1% BSA i 1% NGS kroz 60 minuta na sobnoj temperaturi, u mraku kako bi se blokiralo nespecifično vezanje protutijela putem Fc-receptora. Daljnji protokol obuhvaćao je obilježavanje 100 μ L stanične suspenzije (10^6 stanica) s 10 μ L (50 μ g/mL) primarnog protutijela Mrk16 (Kamiya Medical Company, Seattle, SAD) koje se specifično veže za izvanstanični epitop proteina, a u kontrolnoj suspenziji s 10 μ L (50 μ g/mL) negativne izotipske IgG2a κ -kontrola koja se ne veže ni za jedan poznati ljudski biljeg. Inkubacija je trajala 60 minuta na sobnoj temperaturi u mraku. Uz to, da bi se moglo definirati leukemijske stanice u uzorku, u obje epruvete dodana su protutijela koja se vežu za antigene CD45 i CD34. Ispiranje nevezanog protutijela vršilo se dva puta s pomoću pufera PBS + 1% BSA, nakon čega su stanice (ispitivani uzorak i negativna kontrola) obilježene s 20 μ L sekundarnog štakorskog protutijela na mišji IgG2a+b (rat-anti-mouse IgG2a+b) konjugiranog s fikoeritrinskim (PE) fluorokromom tijekom 30 minuta na 4°C u mraku. Nakon još dva ispiranja u PBS + 1% BSA, uzorci su se čuvali

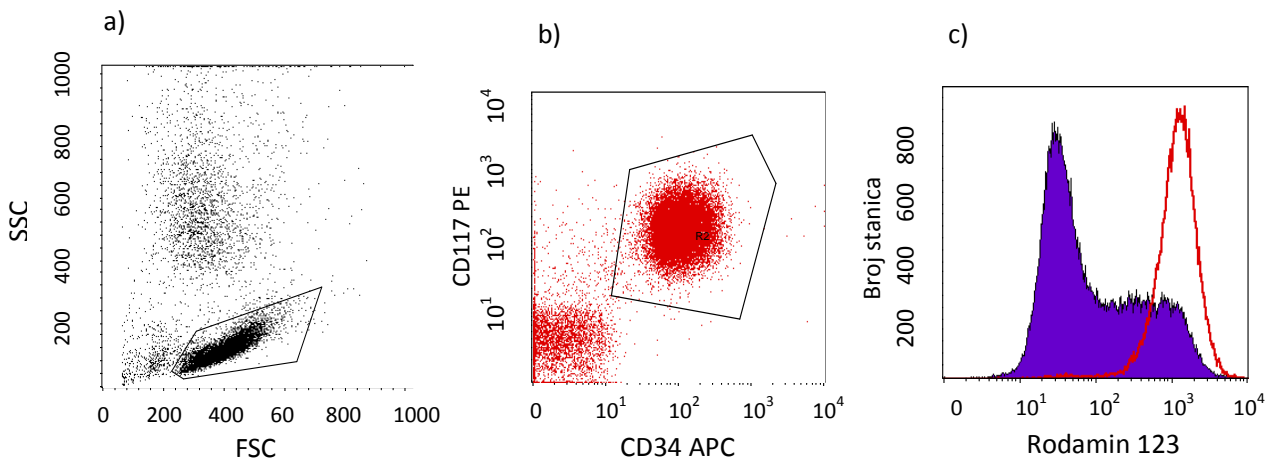
na 4°C do propuštanja na protočnom citometru (modificirano prema Huet i sur.¹⁴³). Analiza izražaja učinjena je s pomoću programa CellQuestPro i Kolmogorv-Smirnovljevog testa integriranog u program (Slika 6). U rasponu dobivenih vrijednosti koje variraju od 0 do 1, srednja vrijednost izražaja P-gp svih bolesnika iznosila je 0,17. Vrijednost izražaja P-gp jednaka ili viša od 0,17 smatrala se pozitivnim izražajem P-gp na membrani leukemijskih stanica, odnosno vrijednost niža od 0,17 podrazumijevala je smanjen izražaj odnosno odsutnost P-gp na membrani leukemijskih stanica.



Slika 6. Protočnocitometrijska analiza izražaja P-glikoproteina. a) Identifikacija stanica temeljem veličine (FSC, engl. forward scatter) i granularnosti (SSC, engl. side scatter) stanica, b) identifikacija leukemijskih stanica temeljem izražaja antigena CD45 i CD34, c) analiza izražaja P-glikoproteina na leukemijskim stanicama (ljubičasti histogram) u odnosu na negativnu kontrolu (crveni histogram)

Aktivnost P-glikoproteina određivana je s pomoću fluorescentne boje Rhodamin 123 (200 ng/mL u finalnoj koncentraciji) koja je ujedno i supstrat za P-gp. Za inhibiciju transportne aktivnosti P-gp/MDR1 korišten je verapamil u finalnoj koncentraciji 20 μM. Stanična suspenzija bila je podešena na broj 10⁶ stanica u 1 mL, a paralelno su u postupak uključene tri epruvete. Prva je služila kao negativna kontrola i mjera autofluorescencije stanica i stoga je sadržavala samo 1 mL stanične suspenzije. Druga je bila pokazatelj transportne aktivnosti P-gp i sadržavala je staničnu suspenziju (800 μL) i fluorescentni P-gp supstrat Rho123 (200 μL). Treća epruveta je sadržavala staničnu suspenziju (600 μL), Rho123 (200 μL) i verapamil (200 μL) pokazujući količinu Rho123 nakupljenog u stanici u uvjetima kada je P-gp aktivnost blokirana inhibitorom. Nakon

inkubacije kroz 30 minuta na 37°C i u atmosferi s 5% CO₂, stanice su isprane od suviška Rho123 i daljnjom inkubacijom u RPMI hranjivom mediju (10% FBS, 1% L-glutamin, 1% penicilin-streptomycin) kroz 90 minuta na 37°C i u atmosferi s 5% CO₂ omogućeno je da P-gp transportira Rho123 iz stanica. Zatim su stanice isprane PBS-om, obilježene odgovarajućom količinom protutijela koja služe definiranju leukemijskih blasta u uzorku, a nakon ispiranja, stanice su resuspendirane u puferu i držane na ledu do propuštanja i analize protočnim citometrom.^{11,144,145} Analiza aktivnosti P-gp učinjena je s pomoću CellQuestPro programa (Slika 7). Aritmetička sredina vrijednosti omjera fluorescencija između inhibirane i neinhibirane epruvete iznosila je 2,63 za sve ispitivane uzorke. Stoga su vrijednosti omjera fluorescencije Rho123 jednake ili više od 2,63 smatrane pokazateljem aktivnog P-gp na membrani leukemijskih stanica.



Slika 7. Protočnocitometrijska analiza aktivnosti P-glikoproteina. a) Identifikacija stanica temeljem veličine (FSC, engl. forward scatter) i granularnosti (SSC, engl. side scatter) stanica, b) identifikacija leukemijskih stanica temeljem izražaja antigena CD117 i CD34, c) analiza razine fluorescencije Rodamina 123 u verapamilom neinhibiranoj epruveti (ljubičasti histogram) u odnosu na verapamilom inhibiranu epruvetu (crveni histogram)

3.2.5. Određivanje fosforilacijskog statusa molekula Akt, ERK1/2 i p38 u leukemijskim blastima

Za određivanje konstitutivne aktivacije signalnih putova PI3K/Akt i MAPK u leukemijskim blastima korištena je protočnocitometrijska metoda obilježavanja i detekcije fosforiliranosti molekula koje su sastavni dio kaskade prijenosa signala. Protutijela korištena u postupku bila su slijedeća: anti-p-Akt (pT308), anti-p-ERK1/2 (pT202/pY204) i anti-p-p38 (pT180/pY182), sva

konjugirana s fikoeritrinskim (PE) fluorokromom. Sva protutijela, puferi, reagensije za fiksaciju i permeabilizaciju stanica nabavljeni su od tvrtke BD Biosciences. Korišteni protokol bio je onaj preporučeni od strane proizvođača. Ukratko, prvi korak je membransko obilježavanje stanica (10^6 u volumenu od 100 μ L) resuspendiranih u puferu za obilježavanje (*engl. stain buffer, SB*) protutijelima specifičnim za antigene CD45 i/ili CD34 u svrhu definiranja leukemijskih stanica u uzorku. Postupak je izveden kroz 15 minuta na sobnoj temperaturi u mraku. Stanice su potom fiksirane dodavanjem 100 μ L fiksatora i inkubacijom tijekom 10 minuta na 37°C u mraku. Nakon ispiranja stanica u SB-puferu, stanicama se doda 1 mL reagensa za permeabilizaciju i ostavi 30 minuta na 4°C u mraku. Nakon dva ispiranja, stanice se obilježavaju protutijelima specifičnim za fosforilirane molekule Akt, ERK1/2 i p38 tijekom 30 minuta na sobnoj temperaturi u mraku. Nakon još jednog ispiranja i resuspenzije stanica u SB-puferu, stanice se čuvaju na 4°C do propuštanja i analize protočnim citometrom (BD Biosciences).^{32,146-148} Analiza razine fosforilacije molekula signalnih putova učinjena je s pomoću programa CellQuestPro i Kolmogorov-Smirnovljevog testa integriranog u isti program (Slika 8). U rasponu dobivenih vrijednosti koje variraju od 0 do 1, one jednake ili veće od aritmetičke sredine svih mjerenih uzoraka kategorizirane su kao pozitivna razina izražaja fosforilirane molekule prijenosnika signala u leukemijskim stanicama bolesnika. Za molekulu Akt aritmetička sredina iznosila je 0,31, za molekulu ERK1/2 0,16, a za molekulu p38 vrijednost aritmetičke sredine iznosila je 0,34.

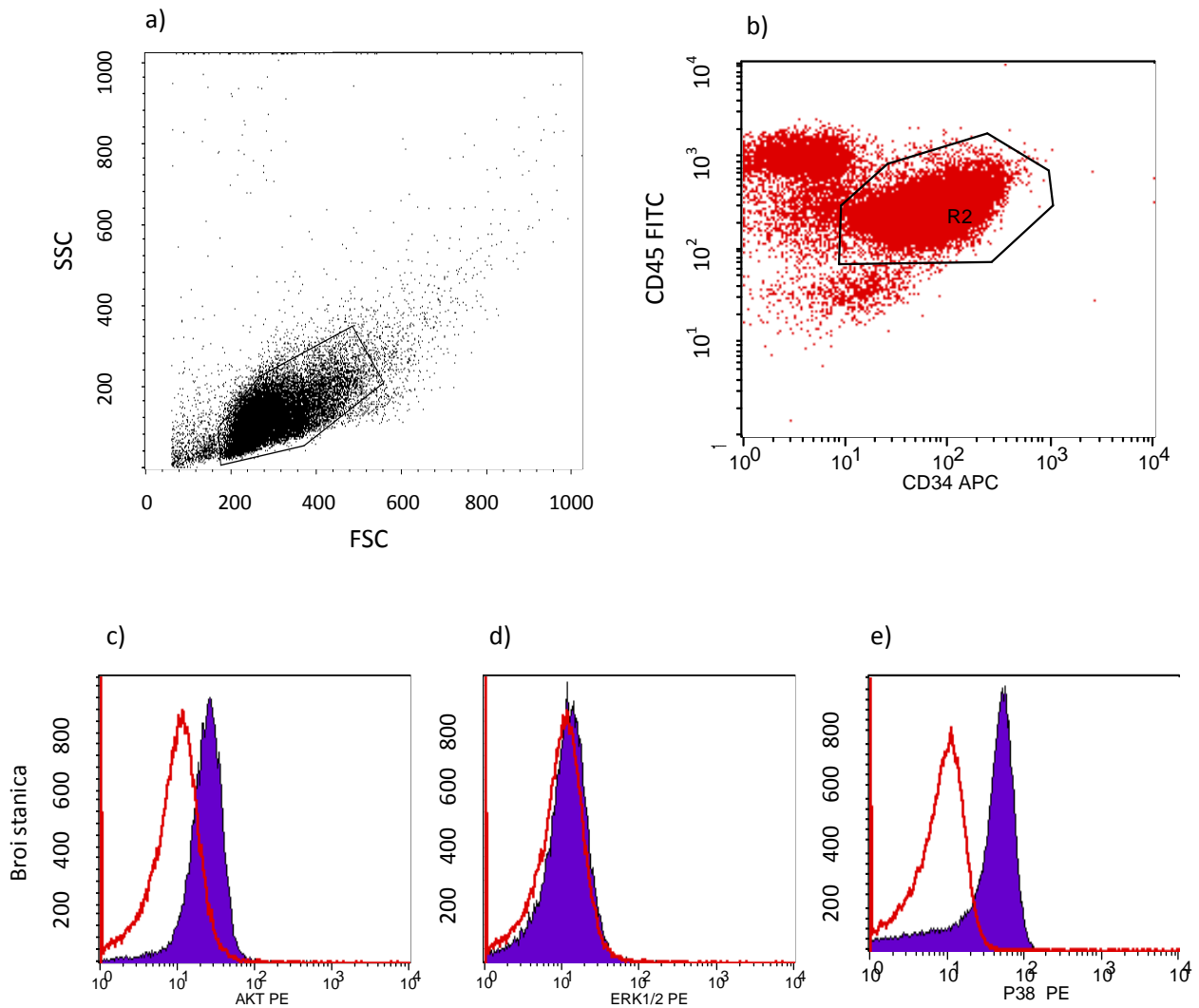
3.2.6. Statistička obrada podataka

U statističkoj obradi dobivenih rezultata korištene su prikladne metode deskriptivne statistike: medijan, aritmetička sredina, standardna devijacija, raspon, najveća i najmanja vrijednost, prikladna grafička obilježja, standardni prikazi u koordinatnoj ravnini i koeficijente korelacije između odgovarajućih varijabli.^{149,150}

Za regresijske multivarijatne analize upotrebljen je Coxov regresijski model. U procjeni preživljavanja korištena je metoda Kaplan-Meier.¹⁵¹ Bolesnici koji su primili samo suportivnu palijativnu skrb nisu uključeni u statistički analizu preživljavanja metodom Kaplan-Meier i metodom Coxove regresije.

Testiranje hipoteza provedeno je neparametrijskim metodama: Kruskal-Wallisovim testom, Mann-Whitney-Wilcoxonovim testom, χ^2 testom te Fisherovim testom razlike proporcija.^{149,150}

Prediktivna kvaliteta pojedinačnih varijabli proučavana je ROC krivuljama (engl. *ROC - Receiver Operating Characteristic*).^{152,153}



Slika 8. Protočnometrijska analiza aktivacije signalnih putova. a) Identifikacija stanica temeljem veličine (FSC, engl. *forward scatter*) i granuliranosti (SSC, engl. *side scatter*) stanica, b) identifikacija leukemijskih stanica temeljem izražaja antigena CD45 i CD34, c) analiza razine izražaja fosforiliranog oblika molekule Akt (ljubičasti histogram) u odnosu na negativnu kontrolu (crveni histogram), d) analiza razine izražaja fosforiliranog oblika molekule ERK1/2 (ljubičasti histogram) u odnosu na negativnu kontrolu (crveni histogram), e) analiza razine izražaja fosforiliranog oblika molekule p38 (ljubičasti histogram) u odnosu na negativnu kontrolu (crveni histogram)

Problematika višestrukog testiranja modernoj je znanosti jako poznata. Povećanjem računalne moći višestruka testiranja na istim podacima postala su jednostavnija, a time i češća u praksi. Da bi se rezultati takvih testiranja tumačili u skladu s kontroliranjem pogreške prve vrste, predložene su razne metode poput Bonferroni, Holm-Bonferroni ili metode FDR (*engl. False Discovery Rate*). Iako korištenjem prilagodbe analize za višestruka testiranja smanjujemo pogrešku prve vrste, često se gube vrijedne informacije. Stoga su u ovoj disertaciji prezentirani rezultati univarijatne analize bez i s korištenjem prilagodbe za višestruka testiranja koristeći Holm-Bonferroni metodu.¹⁵⁵

Pripadna P vrijednost manja od 0,05 smatrana je statistički značajnom.

4. REZULTATI

4.1. Kliničko-laboratorijski pokazatelji bolesnika s AML

Istraživanje je sprovedeno tijekom 35 mjeseci, sa srednjim vremenom praćenja bolesnika od 271,79 dana. U istraživanje je bilo uključeno 118 bolesnika s novootkrivenom i dijagnosticiranom akutnom mijeloičnom leukemijom (AML). Medijan dobi bolesnika iznosio je 59 godina (raspon 18-87 godina), s nešto većim udjelom muškaraca (60%). Od ukupnog broja uzoraka, analiza je provedena na 108 uzoraka koštane srži i 10 uzoraka periferne krvi. Nakon prve indukcijske kemoterapije kompletnu remisiju (KR) je postiglo 50% bolesnika, dok je do zaključenja studije umrlo ukupno 48% bolesnika.

Tablica 3. Kliničko-laboratorijski pokazatelji bolesnika s AML: numeričke varijable

| Varijabla | N | Aritmetička sredina | Medijan | Min. | Maks. | Donja kvartila | Gornja kvartila | Standardna devijacija | Koeficijent varijacije |
|-----------------------------------|-----|---------------------|---------|------|--------|----------------|-----------------|-----------------------|------------------------|
| Dob (godine) | 118 | 55,1 | 59 | 18 | 87 | 43 | 71 | 19,49 | 35,37 |
| Leukociti (x10 ⁹ /L) | 108 | 51 | 21,55 | 0,3 | 778,24 | 4,1 | 49,75 | 98,31 | 192,79 |
| Trombociti (x10 ⁹ /L) | 75 | 74,85 | 50 | 7 | 405 | 25 | 96 | 78,29 | 104,6 |
| Eritrociti (x10 ¹² /L) | 75 | 2,88 | 2,81 | 0,31 | 5,18 | 2,46 | 3,31 | 0,75 | 25,9 |
| LDH (U/L) | 104 | 672,54 | 400 | 86 | 6711 | 226,5 | 713,5 | 894,21 | 132,96 |
| P-gp aktivnost (omjer FL) | 118 | 2,63 | 1,72 | 0,68 | 25,2 | 1,16 | 2,71 | 3,07 | 116,57 |
| P-gp izražaj (D-vrijednost) | 53 | 0,17 | 0,12 | 0,00 | 0,82 | 0,04 | 0,2 | 0,19 | 112,13 |
| Akt (D-vrijednost) | 97 | 0,31 | 0,29 | 0,00 | 0,86 | 0,13 | 0,49 | 0,23 | 75,67 |
| ERK1/2 (D-vrijednost) | 90 | 0,16 | 0,00 | 0,00 | 0,86 | 0,00 | 0,32 | 0,21 | 131,22 |
| p38 (D-vrijednost) | 97 | 0,34 | 0,3 | 0,00 | 0,95 | 0,00 | 0,59 | 0,31 | 92,89 |
| UP (dani) | 118 | 271,79 | 200,5 | 1 | 976 | 45 | 402 | 251,62 | 92,58 |
| PZB(dani) | 78 | 179,8 | 85 | 0 | 946 | 0 | 334 | 233,24 | 129 |

LDH, laktat-dehidrogenaza; UP, ukupno preživljavanje; PZB, preživljavanje bez znakova bolesti

Citološka analiza pokazala je da je najveći broj AML bio mijelomonocitnog tipa (32%), slijede AML sa sazrijevanjem (26%), AML monoblastne/monocitne morfologije (16%), AML bez

sazrijevanja (8%), akutna promijelocitna leukemija (APL) (8%), minimalno diferencirana AML (7%) te akutna eritroleukemija (1%) i akutna megakarioblastna leukemija (1%) (Tablica 3).

Prema nalazu citogenetičke analize, najveći udio AML u ovoj studiji (64%) stratificiran je u prognostički intermedijarnu skupinu, potom u prognostički nepovoljnu skupina (24%), dok je svega 12% bolesnika bilo stratificirano u prognostički povoljnu skupinu. Konačno, prema kriterijima za klasifikaciju hematoloških neoplazmi od strane Svjetske zdravstvene organizacije (SZO) (*engl. World Health Organization - WHO*), najveći broj AML bio je u skupini koja nije specificirana na drugi način, tj. u skupini NOS (prema *engl. not otherwise specified*) AML (61%), slijede AML s promjenama pridruženim mijelodisplaziji (MDS) (20%), AML s povratnim ili rekurentnim citogenetskim promjenama (13%) i AML povezane s prethodnom terapijom (6%). Promjena *FLT3*-ITD nađena je u 19% *de novo* dijagnosticiranih AML (Tablica 3 i Tablica 4).

Tablica 4. Kliničko-laboratorijski pokazatelji bolesnika s AML: kategoričke varijable

| Varijabla | N | Granična vrijednost* | Pozitivni N (%) | Negativni N (%) |
|---|----------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Dob (>60 godina) | 118 | 60 godina | 58 (49) | 60 (51) |
| Spol (muškarci) | 118 | — | 71 (60) | 47 (40) |
| Leukociti ($\times 10^9/L$) | 108 | $30 \times 10^9/L$ | 47 (43) | 61 (57) |
| Trombociti (sniženo) ($\times 10^9/L$) | 75 | $158 \times 10^9/L$ | 68 (91) | 7 (9) |
| Eritrociti (sniženo) ($\times 10^{12}/L$) | 75 | $4,34 \times 10^{12}/L$ | 71 (95) | 4 (5) |
| LDH (povišeno) (U/L) | 104 | 241 U/L | 74 (71) | 30 (29) |
| P-gp aktivnost (omjer FL) | 118 | 2,63 | 30 (25) | 88 (75) |
| P-gp izražaj (D-vrijednost) | 53 | 0,17 | 18 (34) | 35 (66) |
| Akt (D-vrijednost) | 97 | 0,31 | 47 (49) | 50 (51) |
| ERK1/2 (D-vrijednost) | 90 | 0,16 | 35 (39) | 55 (61) |
| p38 (D-vrijednost) | 97 | 0,34 | 43 (44) | 54 (56) |
| CD7 (%) | 113 | 20% | 17 (15) | 96 (85) |
| CD19 (%) | 115 | 20% | 11 (10) | 104 (90) |
| CD56 (%) | 112 | 20% | 29 (26) | 83 (74) |
| TdT (%) | 107 | 20% | 15 (14) | 92 (86) |
| CD34 (%) | 117 | 20% | 67 (57) | 50 (43) |

| Varijabla | N | Granična vrijednost* | Pozitivni N (%) | Negativni N (%) |
|---------------------------------|-----|----------------------|--------------------|--------------------|
| Mutacija <i>FLT3</i> -ITD | 58 | — | 11 (19) | 47 (81) |
| Kompletna remisija (KR) | 86 | — | 43 (50) | 43 (50) |
| Živi | 118 | — | 61 (52) | 57 (48) |
| Dijagnoza prema WHO: | 118 | | | |
| - AML s genetskim promjenama | | — | 15 (13) | — |
| - AML povezana s terapijom | | — | 7 (6) | — |
| - AML iz MDS-a | | — | 24 (20) | — |
| - AML NOS | | — | 72 (61) | — |
| Citološka klasifikacija AML: | 96 | | | |
| - s minimalnom diferencijacijom | | — | 7 (7) | — |
| - bez sazrijevanja | | — | 8 (8) | — |
| - sa sazrijevanjem | | — | 25 (26) | — |
| - promijelocitna | | — | 8 (8) | — |
| - mijelomonocitna | | — | 31 (32) | — |
| - monoblastna/monocitna | | — | 15 (16) | — |
| - eritroidna | | — | 1 (1) | — |
| - megakarioblastna | | — | 1 (1) | — |
| Citogenetička stratifikacija: | 100 | | | |
| - povoljna | | — | 12 (12) | — |
| - intermedijarna | | — | 64 (64) | — |
| - nepovoljna | | — | 24 (24) | — |

*Granične vrijednosti varijabli određene su prema literaturnim navodima (dob i leukociti), vlastitim referentnim vrijednostima laboratorija (Trc, Erc, LDH), odnosno prema aritmetičkim sredinama (P-gp i signalni putovi).

4.2. Povezanost kliničkolaboratorijskih pokazatelja bolesnika s AML

Analizom utjecaja kategoričkih varijabli na numeričke varijable Mann-Whitney-Wilcoxonovim statističkim testom bez prilagodbe analize za višestruka testiranja (Tablica 5) pokazana je statistički značajna razlika u dobi bolesnika između citogenetičkih prognostičkih skupina pri čemu su bolesnici intermedijarnog rizika pri dijagnozi bili statistički značajno stariji (X=59,4 godina) od bolesnika iz prognostički povoljne (X=49,6 godina) i bolesnika nepovoljne skupine

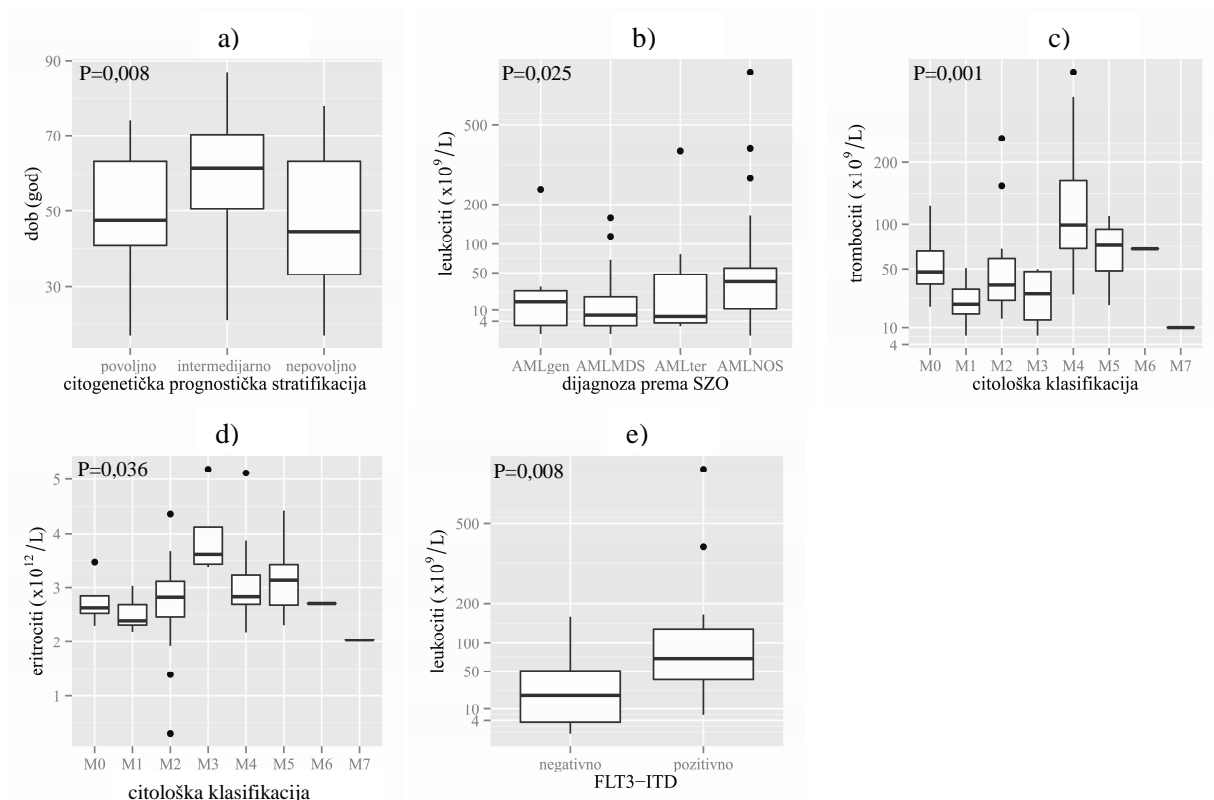
($X=47,3$ godine) ($P=0,008$). Statistički značajna razlika nađena je i u broju leukocita u krvi bolesnika pri dijagnozi između kategorija AML prema WHO. Najveći prosječni broj leukocita u krvi imali su bolesnici s AML nastalom zbog prethodne terapije ($X=72,2 \times 10^9/L$), potom bolesnici s nespecificiranom AML (NOS) ($X=61,4 \times 10^9/L$), dok su značajno niže vrijednosti leukocita nađene u bolesnika s rekurentnim genetskim aberacijama ($X=31,4 \times 10^9/L$) i AML nastalom iz prethodne mijelodisplazije ($25,9 \times 10^9/L$) ($P=0,025$). Pored leukocita, nađena je i statistički značajna razlika unutar kategorija AML prema citološkoj klasifikaciji u broju trombocita u krvi ($P=0,001$) i broju eritrocita u krvi pri dijagnozi ($P=0,036$). Statistički značajno veći broj leukocita pri dijagnozi imali su bolesnici s dokazanom mutacijom *FLT3*-ITD ($X=159,0$ vs. $37,6 \times 10^9/L$ u nemutiranih AML) ($P=0,008$). Primjenom Mann-Whitney-Wilcoxonovog testa s prilagodbom analize za višestruka testiranja niti jedna od navedenih razlika nije dosegla statističku značajnost (Tablica 5) (Slika 9).

Tablica 5. Mann-Whitney-Wilcoxonov test bez prilagodbe analize za višestruka testiranja. Utjecaj kategoričkih na numeričke varijable. Crnom bojom prikazane su P-vrijednosti Mann-Whitney-Wilcoxonovog testa bez prilagodbe analize za višestruka testiranja, a crvenom bojom P-vrijednosti testa s prilagodbom analize za višestruka testiranja (X-aritmetička sredina, # nije statistički značajno)

| | Dob (godine) | P-gp aktivnost (omjer FL) | P-gp izražaj (D-vrij.) | Akt (D-vrij.) | ERK1/2 (D-vrij.) | p38 (D-vrij.) | Lkc $\times 10^9/L$ | LDH U/L | Trc $\times 10^9/L$ | Erc $\times 10^{12}/L$ | UP (dani) | PZB (dani) |
|-----------|-----------------|---------------------------------|------------------------------|------------------|---------------------|------------------|------------------------|------------|------------------------|---------------------------|--------------|---------------|
| Spol | # | # | # | # | # | P=0,04 | # | # | # | # | # | # |
| muškarci | X=53,5 | X=2,9 | X=0,2 | X=0,29 | X=0,14 | X=0,28 | X=44,9 | X=715 | X=69,1 | X=2,98 | X=298 | X=181 |
| žene | X=57,6 | X=2,25 | X=0,13 | X=0,35 | X=0,2 | X=0,41 | X=59,5 | X=613 | X=83,1 | X=2,74 | X=232 | X=179 |
| CD7 | # | # | # | # | # | # | # | # | # | # | # | # |
| negativno | X=53,8 | X=2,36 | X=0,16 | X=0,3 | X=0,18 | X=0,33 | X=44,6 | X=642 | X=79,4 | X=2,89 | X=278 | X=181 |
| pozitivno | X=58,6 | X=2,86 | X=0,23 | X=0,35 | X=0,08 | X=0,3 | X=93 | X=774 | X=53,3 | X=2,85 | X=277 | X=188 |
| CD19 | # | P=0,017 | # | # | # | # | # | # | # | # | # | # |
| negativno | X=55,6 | X=2,18 | X=0,14 | X=0,31 | X=0,17 | X=0,32 | X=49 | X=679 | X=74,7 | X=2,9 | X=275 | X=180 |
| pozitivno | X=52,4 | X=4,43 | X=0,32 | X=0,27 | X=0,13 | X=0,42 | X=79,5 | X=649 | X=50,6 | X=2,62 | X=198 | X=104 |
| CD56 | # | # | # | # | # | # | # | # | # | # | # | # |
| negativno | X=54,1 | X=2,45 | X=0,17 | X=0,3 | X=0,16 | X=0,29 | X=51,7 | X=663 | X=71,1 | X=2,84 | X=284 | X=194 |
| pozitivno | X=57,4 | X=1,91 | X=0,14 | X=0,32 | X=0,18 | X=0,43 | X=55,1 | X=769 | X=76,4 | X=3,03 | X=224 | X=140 |
| TdT | # | P=0,004 | # | # | # | # | # | # | # | # | # | # |
| negativno | X=55,2 | X=2,25 | X=0,19 | X=0,28 | X=0,17 | X=0,32 | X=56,7 | X=726 | X=69,4 | X=2,85 | X=260 | X=171 |
| pozitivno | X=53,1 | X=3,02 | X=0,12 | X=0,36 | X=0,16 | X=0,33 | X=41,8 | X=421 | X=52,9 | X=2,74 | X=332 | X=190 |
| CD34 | # | P<0,001 | P<0,001 | # | # | # | # | # | # | # | # | # |
| negativno | X=55,4 | X=1,31 | X=0,07 | X=0,27 | X=0,15 | X=0,39 | X=61,8 | X=857 | X=77,2 | X=3,0 | X=268 | X=201 |
| pozitivno | X=54,5 | X=3,24 | X=0,23 | X=0,33 | X=0,18 | X=0,28 | X=42,6 | X=526 | X=73,1 | X=2,79 | X=278 | X=164 |

| | Dob (godine) | P-gp aktivnost (omjer FL) | P-gp izražaj (D-vrij.) | Akt (D-vrij.) | ERK1/2 (D-vrij.) | p38 (D-vrij.) | Lkc x10 ⁹ /L | LDH U/L | Trc x10 ⁹ /L | Erc x10 ¹² /L | UP (dani) | PZB (dani) |
|------------------|-----------------|---------------------------------|------------------------------|------------------|---------------------|------------------|----------------------------|---------------|----------------------------|-----------------------------|-------------------|-------------------|
| <i>FLT3</i> -ITD | # | # | # | # | # | # | P=0,008 | # | # | # | # | # |
| negativno | X=50,3 | X=2,37 | X=0,13 | X=0,30 | X=0,24 | X=0,33 | X=37,6 | X=563 | X=83,4 | X=2,93 | X=296 | X=231 |
| pozitivno | X=49,2 | X=2,78 | X=0,23 | X=0,36 | X=0,12 | X=0,39 | X=159 | X=1069 | X=46,5 | X=2,69 | X=409 | X=277 |
| KR | # | # | # | # | # | # | # | # | # | # | P<0,001 | P<0,001 |
| | # | # | # | # | # | # | # | # | # | # | P<0,001 | P<0,001 |
| Ne | X=55,8 | X=2,75 | X=0,19 | X=0,37 | X=0,17 | X=0,38 | X=70,3 | X=889 | X=72,7 | X=2,87 | X=135 | X=26 |
| Da | X=49,8 | X=2,06 | X=0,11 | X=0,3 | X=0,17 | X=0,36 | X=35,9 | X=626 | X=82,6 | X=3,02 | X=418 | X=352 |
| Status | P=0,01 | # | # | P=0,04 | # | # | P=0,02 | P=0,04 | # | # | P<0,001 | P<0,001 |
| | # | # | # | # | # | # | # | # | # | # | P=0,002 | P<0,001 |
| Umrli | X=59,5 | X=2,99 | X=0,22 | X=0,36 | X=0,2 | X=0,37 | X=72,2 | X=885 | X=67,8 | X=2,85 | X=172 | X=62 |
| Živi | X=51 | X=2,3 | X=0,11 | X=0,26 | X=0,13 | X=0,31 | X=31,3 | X=468 | X=80,4 | X=2,9 | X=366 | X=318 |
| WHO-podjela: | # | P=0,05 | # | # | # | # | P=0,025 | # | # | # | # | # |
| - gen.aberacije | X=47,7 | X=2,01 | X=1,56 | X=0,31 | X=0,06 | X=0,25 | X=31,4 | X=949 | X=63,1 | X=3,01 | X=354 | X=238 |
| - iz MDS | X=59,5 | X=3,57 | X=1,57 | X=0,38 | X=0,16 | X=0,30 | X=25,9 | X=614 | X=92,2 | X=2,95 | X=214 | X=82 |
| - nakon terapije | X=63,3 | X=1,93 | X=1,67 | X=0,37 | X=0,35 | X=0,55 | X=72,2 | X=948 | X=49,2 | X=2,95 | X=270 | X=129 |
| - NOS | X=54,4 | X=2,52 | X=1,36 | X=0,28 | X=0,16 | X=0,34 | X=61,4 | X=599 | X=73 | X=2,81 | X=274 | X=199 |
| Citološki nalaz | # | P<0,001 | # | # | # | # | # | # | P=0,001 | P=0,036 | # | # |
| | # | P<0,001 | # | # | # | # | # | # | # | # | # | # |
| min.diferenc. | X=72 | X=7,58 | X=0,39 | X=0,43 | X=0,18 | X=0,28 | X=84,9 | X=336 | X=60,8 | X=2,76 | X=106 | X=37,8 |
| bez sazrijev. | X=58,3 | X=5,36 | X=0,17 | X=0,33 | X=0,26 | X=0,33 | X=85,3 | X=717 | X=25,7 | X=2,52 | X=164 | X=0 |
| sa sazrijev. | X=55 | X=2,13 | X=0,14 | X=0,23 | X=0,14 | X=0,26 | X=70,9 | X=550 | X=53,1 | X=2,73 | X=346 | X=244 |
| promijelocitna | X=54,3 | X=1,61 | X=0,07 | X=0,35 | X=0,00 | X=0,26 | X=14,4 | X=1138 | X=30 | X=3,95 | X=281 | X=204 |
| mijelomonoci. | X=56 | X=1,72 | X=0,10 | X=0,32 | X=0,16 | X=0,38 | X=36,1 | X=577 | X=142 | X=3,06 | X=296 | X=235 |
| monobl/monoc. | X=53,8 | X=1,01 | X=0,10 | X=0,32 | X=0,27 | X=0,54 | X=62,5 | X=1086 | X=71,3 | X=3,14 | X=298 | X=161 |
| eritroidna | X=49 | X=3,79 | X=0,16 | — | — | — | X=1,8 | X=261 | X=70 | X=2,72 | X=719 | X=689 |
| megakarioblast. | X=73 | X=1,53 | X=0,16 | X=0,60 | X=0,15 | X=0,84 | X=23,9 | X=1119 | X=10 | X=2,03 | X=349 | — |
| Citogenetika | P=0,008 | # | # | # | # | # | # | # | # | # | P=0,05 | # |
| povoljno | X=49,6 | X=1,87 | X=0,11 | X=0,32 | X=0,02 | X=0,31 | X=12,7 | X=944 | X=56 | X=3,11 | X=384 | X=228 |
| intermedijarno | X=59,4 | X=2,39 | X=0,18 | X=0,29 | X=0,15 | X=0,31 | X=62,5 | X=583 | X=76 | X=2,75 | X=306 | X=222 |
| nepovoljno | X=47,3 | X=2,57 | X=0,11 | X=0,42 | X=0,29 | X=0,39 | X=39,7 | X=721 | X=76,3 | X=3,14 | X=189 | X=114 |

LDH, laktat-dehidrogenaza; *Lkc*, leukociti; *Trc*, trombociti; *Erc*, eritrociti; *UP*, ukupno preživljavanje; *PZB*, preživljavanje bez znakova bolesti, *KR*, kompletna remisija

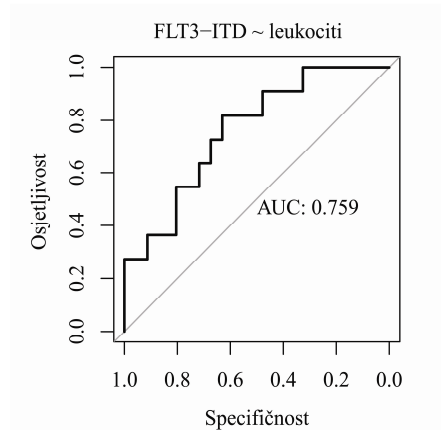


Slika 9. Grafički prikaz (Box-Whisker) utjecaja kategoričkih varijabli na numeričke varijable: a) citogenetička prognostička stratifikacija AML i dob bolesnika; b) razdioba AML prema SZO i broj leukocita u krvi; c) citološka klasifikacija i broj trombocita u krvi; d) citološka klasifikacija i broj eritrocita u krvi novootkrivenih bolesnika s AML; i e) mutacija FLT3-ITD i broj leukocita u krvi

Analizom međuodnosa numeričkih varijabli primjenom testa za ispitivanje korelacije različite od nule bez prilagodbe analize za višesteruka testiranja utvrđena je statistički značajna negativna korelacija između dobi bolesnika u trenutku postavljanja dijagnoze i razine serumske LDH ($P < 0,001$, $R = -0,46$) i broja eritrocita u krvi ($P = 0,001$, $R = -0,3$), dok je istodobno nađena pozitivna korelacija između dobi bolesnika i broja trombocita u krvi ($P = 0,006$, $R = 0,25$). Pored toga, broj trombocita pokazuje statistički značajnu negativnu korelaciju s brojem leukocita ($P = 0,005$, $R = -0,26$) i brojem eritrocita u krvi bolesnika pri dijagnozi ($P = 0,0016$, $R = -0,29$) (Tablica 6).

Analizom istih varijabli korištenjem metode s prilagodbom za višestruka testiranja potvrđena je ovisnost dobi bolesnika s razinom serumske LDH u trenutku postavljanja dijagnoze ($P < 0,001$) (Tablica 7).

Analizom utjecaja numeričkih varijabli na kategoričke varijable s dva razreda pomoću ROC-krivulja nađena je povezanost broja leukocita pri dijagnozi s nalazom mutacije *FLT3-ITD* (AUC=0,76) (Slika 10).



Slika 10. ROC krivulje. Utjecaj numeričkih varijabli na kategoričke varijable s dva razreda: leukociti i *FLT3-ITD*

Tablica 6. Korelacijski test bez prilagodbe analize za višestruka testiranja - međuodnos numeričkih varijabli. *P*-vrijednosti (iznad dijagonale) i koeficijenti korelacije *R* (ispod dijagonale)

| <i>P</i> <i>R</i> | dob | <i>P</i> -gp aktivnost | <i>P</i> -gp izražaj | Akt | ERK1/2 | p38 | Lkc | LDH | Trc | Erc | UP | PZB |
|---------------------------|-------|---------------------------|-------------------------|-------|--------------|--------------|--------|--------------|--------------|---------------|-------------|--------------|
| Dob | 1 | <0,001 | <0,001 | 0,16 | 0,001 | 0,13 | 0,53 | <0,001 | 0,006 | 0,001 | 0,02 | 0,26 |
| <i>P</i> -gp aktivnost | 0,43 | 1 | <0,001 | 0,26 | 0,3 | 0,001 | <0,001 | 0,01 | 0,71 | <0,001 | <0,001 | 0,001 |
| <i>P</i> -gp izražaj | 0,45 | 0,94 | 1 | 0,69 | 0,43 | 0,1 | <0,001 | 0,001 | 0,47 | 0,003 | 0,02 | 0,16 |
| Akt | -0,13 | 0,11 | -0,04 | 1 | 0,56 | <0,001 | 0,5 | 0,001 | 0,36 | 0,33 | <0,001 | <0,001 |
| ERK1/2 | -0,3 | -0,1 | -0,07 | 0,05 | 1 | 0,08 | 0,4 | <0,001 | 0,03 | 0,98 | 0,02 | 0,52 |
| p38 | -0,14 | -0,31 | -0,15 | 0,38 | 0,16 | 1 | 0,065 | <0,001 | 0,96 | 0,001 | 0,42 | 0,89 |
| Lkc | 0,06 | 0,82 | 0,81 | 0,06 | 0,08 | -0,17 | 1 | 0,1 | 0,005 | 0,4 | <0,001 | <0,001 |
| LDH | -0,46 | -0,23 | -0,29 | 0,31 | 0,38 | 0,39 | 0,15 | 1 | 0,36 | 0,43 | <0,001 | <0,001 |
| Trc | 0,25 | 0,035 | -0,07 | 0,09 | 0,2 | 0,005 | -0,26 | -0,09 | 1 | 0,0016 | 0,01 | 0,29 |
| Erc | -0,29 | -0,32 | -0,27 | 0,09 | -0,002 | 0,3 | -0,08 | 0,07 | -0,29 | 1 | 0,15 | 0,39 |
| UP | -0,21 | -0,34 | -0,22 | -0,43 | 0,21 | -0,08 | -0,39 | -0,34 | 0,23 | 0,13 | 1 | <0,001 |
| PZB | -0,11 | -0,31 | -0,13 | -0,47 | -0,06 | 0,013 | -0,34 | -0,39 | 0,098 | 0,079 | 0,9 | 1 |

LDH, laktat-dehidrogenaza; *Lkc*, leukociti; *Trc*, trombociti; *Erc*, eritrociti; *UP*, ukupno preživljavanje; *PZB*, preživljavanje bez znakova bolesti

Tablica 7. Korelacijski test s prilagodbom analize za višestruka testiranja - međuodnos numeričkih varijabli. P-vrijednosti (iznad dijagonale) i koeficijenti korelacije R (ispod dijagonale)

| <i>R</i> \ <i>P</i> | Dob | P-gp aktivnost | P-gp izražaj | Akt | ERK1/2 | p38 | Lkc | LDH | Trc | Erc | UP | PZB |
|---------------------|-------|----------------|--------------|-------|--------|-------|--------|--------|-------|-------|--------|--------|
| Dob | 1 | <0,001 | <0,001 | 1 | 0,05 | 1 | 1 | <0,001 | 0,26 | 0,06 | 0,89 | 1 |
| P-gp aktivnost | 0,43 | 1 | <0,001 | 1 | 1 | 0,03 | <0,001 | 0,5 | 1 | 0,025 | 0,012 | 0,035 |
| P-gp izražaj | 0,45 | 0,94 | 1 | 1 | 1 | 1 | <0,001 | 0,06 | 1 | 0,15 | 0,79 | 1 |
| Akt | -0,13 | 0,11 | -0,04 | 1 | 1 | 0,001 | 1 | 0,036 | 1 | 1 | 0,001 | 0,001 |
| ERK1/2 | -0,3 | -0,1 | -0,07 | 0,05 | 1 | 1 | 1 | 0,0017 | 1 | 1 | 0,93 | 1 |
| p38 | -0,14 | -0,31 | -0,15 | 0,38 | 0,16 | 1 | 1 | 0,001 | 1 | 0,043 | 1 | 1 |
| Lkc | 0,06 | 0,82 | 0,81 | 0,06 | 0,08 | -0,17 | 1 | 1 | 0,24 | 1 | <0,001 | 0,009 |
| LDH | -0,46 | -0,23 | -0,29 | 0,31 | 0,38 | 0,39 | 0,15 | 1 | 1 | 1 | 0,009 | <0,001 |
| Trc | 0,25 | 0,035 | -0,07 | 0,09 | 0,2 | 0,005 | -0,26 | -0,09 | 1 | 0,08 | 0,5 | 1 |
| Erc | -0,3 | -0,32 | -0,27 | 0,09 | -0,002 | 0,3 | -0,08 | 0,07 | -0,29 | 1 | 1 | 1 |
| UP | -0,21 | -0,34 | -0,22 | -0,43 | 0,21 | -0,08 | -0,39 | -0,34 | 0,23 | 0,13 | 1 | <0,001 |
| PZB | -0,11 | -0,31 | -0,13 | -0,47 | -0,06 | 0,013 | -0,34 | -0,39 | 0,098 | 0,079 | 0,9 | 1 |

LDH, laktat-dehidrogenaza; Lkc, leukociti; Trc, trombociti; Erc, eritrociti; UP, ukupno preživljavanje; PZB, preživljavanje bez znakova bolesti

Analizom međuodnosa imunofenotipskih kategoričkih varijabli (CD biljezi: DA/NE) Fisherovim egzaktnim testom bez prilagodbe analize za višestruka testiranja utvrđeno je da postoji statistički značajna pozitivna korelacija između izražaja biljega CD34 i CD7 ($P=0,03$) i izražaja biljega CD34 i TdT ($P=0,002$), kao i negativna korelacija između izražaja biljega CD34 i CD56 ($P=0,004$), odnosno biljega CD34 i nalaza mutacije *FLT3-ITD* mutacije ($P=0,05$) (podaci nisu prikazani). Međutim, primjenom metode s prilagodbom analize za višestruka testiranja istih varijabli statistička značajnost nije dosegnuta.

4.3. Izražaj i aktivnost P-glikoproteina i odnos prema poznatim prognostičkim pokazateljima AML

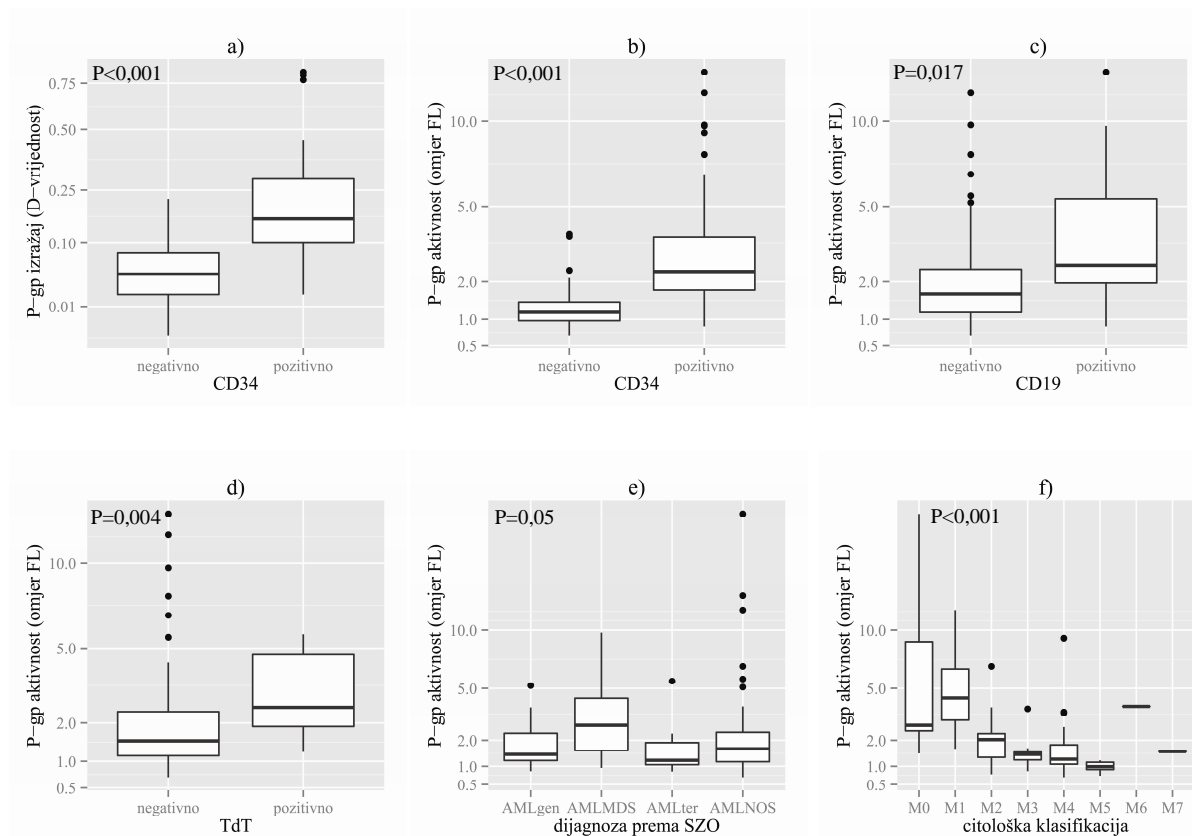
Srednja vrijednost aktivnosti P-gp izražena kao omjer fluorescencije (FL) za sve izmjerene uzorke iznosila je $X=2,63$ (raspon 0,68–25,2). Srednja vrijednosti izražaja P-gp izražena kao D-vrijednost dobivena Kolmogorov-Smirnovljevim testom iznosila je $X=0,17$ (raspon 0–0,82).

Analizom P-glikoproteina nađen je njegov izražaj na membrani leukemijskih stanica u 34% bolesnika s AML, dok je aktivnosti istog proteina na blastima potvrđena u 25% bolesnika. Srednje vrijednosti izražaja i aktivnosti P-gp korištene su kao granične vrijednosti za određivanje pozitivnosti i negativnosti ispitivanih varijabli (Tablica 3 i Tablica 4).

Izražaj i aktivnost P-gp su potom analizirani u odnosu na poznate prognostičke parametre blasta AML. U tu je svrhu usporedba utjecaja kategoričkih varijabli na numeričke varijable izvedena s pomoću Mann-Whitney-Wilcoxonovog testa na dva načina. Prvim načinom na rezultate testova nije primjenjena prilagodba analize za višestruka testiranja, dok je u drugom primjenjen test Holm-Bonferroni s prilagodbom analize za višestruka testiranja (Tablica 5).

Pri testiranju bez prilagodbe analize uočena je statistički značajna povezanost izražaja P-gp i biljega CD34 na membrani leukemijskih stanica ($P < 0,001$). Drugim riječima, akutne mijeloične leukemije čiji blasti izražavaju biljeg CD34 imaju i jak izražaj P-gp, za razliku od CD34-negativnih AML ($X=0,23$ vs. $X=0,07$).

Veća transportna aktivnost P-gp povezana je s izražajem biljega CD34 ($P < 0,001$) ($X=3,24$ vs. $X=1,31$) i CD19 ($P=0,017$) ($X=4,43$ vs. $X=2,18$) kao i s nalazom enzima limfoidnih prekursora TdT u blastima AML ($P=0,004$) ($X=3,02$ vs. $X=2,25$). Pored toga, transportna aktivnost P-gp povezana je s podvrstom AML prema SZO i s citomorfološkim tipom. Pri tome su podvrste AML prema WHO klasifikaciji pokazale razlike u aktivnosti P-gp na granici statističke značajnosti ($P=0,05$), uz najveću aktivnost P-gp u bolesnika s AML nastalom iz mijelodisplazije ($X=3,57$), potom u bolesnika s nespecificiranim oblikom (NOS) AML ($X=2,52$), dok su niže vrijednosti P-gp aktivnosti nađene u bolesnika s AML i rekurentnim citogenetskim promjenama ($X=2,01$) i bolesnika koji su AML razvili nakon terapije ($X=1,93$). U odnosu na citomorfološki tip, nađena je značajna statistička povezanost između skupina AML s obzirom na transportnu aktivnost medijatora otpornosti P-gp ($P < 0,001$). Pri tome je najjača aktivnost P-gp izmjerena u bolesnika s minimalno diferenciranom AML ($X=7,58$) i AML bez sazrijevanja ($X=5,36$), a najmanja u bolesnika s monoblastnim/monocitnim oblikom AML ($X=1,01$) (Slika 11) (Tablica 5).



Slika 11. Grafički prikaz (Box-Whisker) utjecaja kategoričkih varijabli na numeričke varijable: a) izražaj CD34 i P-gp; b) izražaj CD34 i P-gp aktivnosti; c) izražaj CD19 i P-gp aktivnosti; d) izražaj TdT i P-gp aktivnosti; e) SZO klasifikacija AML i P-gp aktivnost; f) citomorfološka klasifikacija AML i P-gp aktivnost

Primjenom prilagodbe analize za višestruka testiranja u obradi istih podataka P-gp aktivnost pokazuje statistički značajnu povezanost samo s izražajem biljega CD34 ($P < 0,001$) i pripadnosti citološkom klasifikacijskom sustavu ($P < 0,001$).

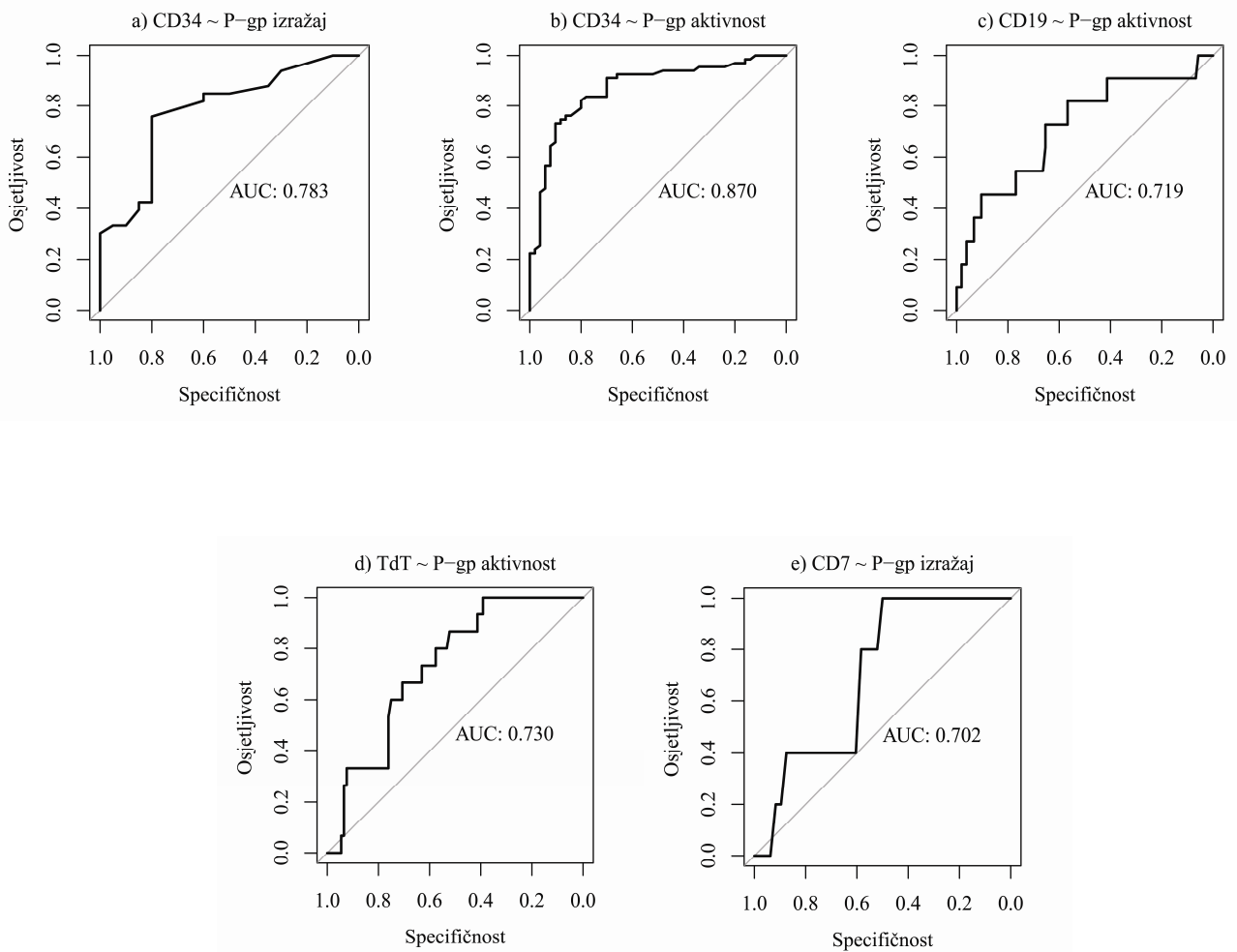
Koristeći korelacije te pripadni test o postojanju korelacije različite od nule bez prilagodbe analize za višestruka testiranja, statistički značajnim pokazao se odnos između izražaja i aktivnosti P-gp ($P < 0,001$, $R = 0,94$). Oba parametra pokazuju statistički značajnu korelaciju s nizom ispitivanih varijabli u trenutku postavljanja dijagnoze. Prvo, izražaj i aktivnost P-gp pokazuju pozitivnu korelaciju s dobi bolesnika ($P < 0,001$, $R = 0,45$; $P < 0,001$, $R = 0,43$) i brojem leukocita u krvi pri dijagnozi ($P < 0,001$, $R = 0,81$; $P < 0,001$, $R = 0,82$), a negativno koreliraju s razinom serumske laktat-dehidrogenaze ($P = 0,001$, $R = -0,29$; $P = 0,01$, $R = -0,23$) i brojem eritrocita u krvi pri dijagnozi ($P = 0,003$, $R = -0,27$; $P < 0,001$, $R = -0,32$). Pokazano je da izražaj i aktivnost P-gp negativno koreliraju s ukupnim preživljavanjem bolesnika s AML ($P = 0,02$, $R = -0,22$; $P < 0,001$,

R=-0,34), dok preživljavanje bez znakova bolesti negativno korelira s aktivnošću (P=0,001, R=-0,31), ali ne i s izražajem P-gp (Tablica 6).

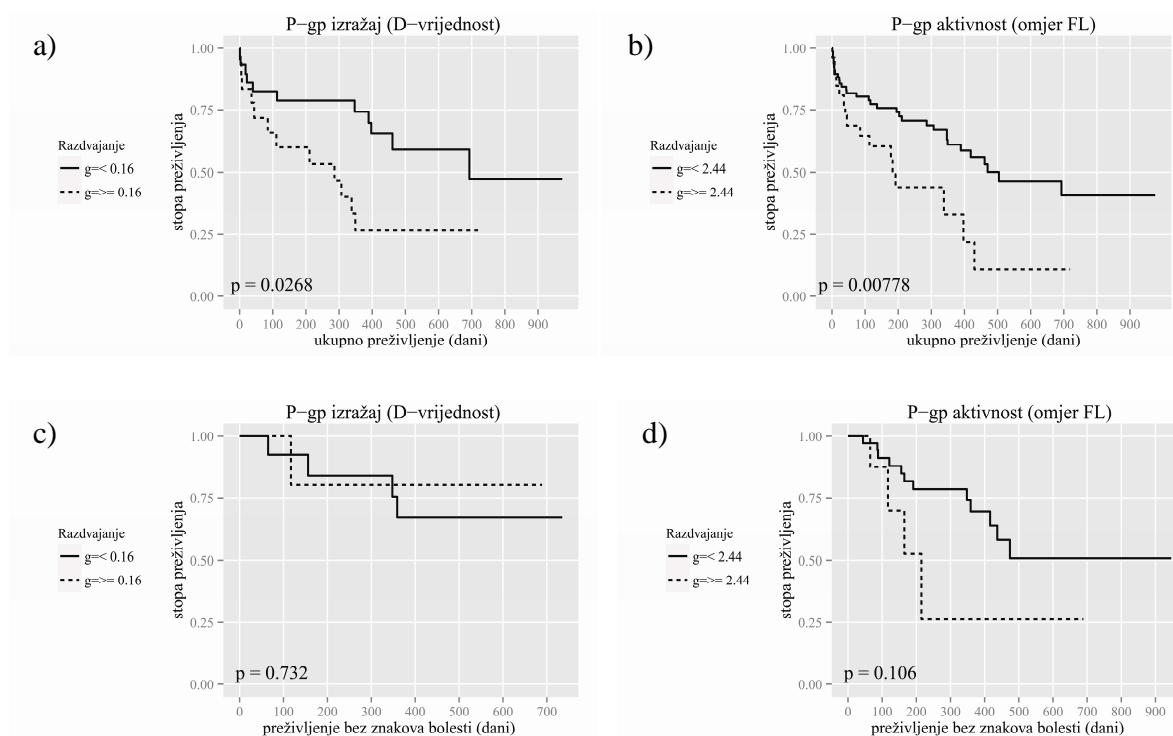
Ako se rezultati analiziraju s prilagodbom za višestruka testiranja rezultata korelacijskih testova, većina od navedenih korelacija se zadržava, uključujući međusobnu korelaciju izražaja i aktivnosti P-gp (P<0,001), kao i pozitivnu korelaciju izražaja i aktivnosti P-gp s dobi bolesnika (P<0,001; P<0,001) i brojem leukocita u perifernoj krvi (P<0,001; P<0,001). Aktivnost, ali ne i izražaj P-gp negativno korelira s brojem eritrocita u krvi bolesnika (P=0,025), preživljavanjem bez znakova bolesti (P=0,035) i ukupnim preživljavanjem bolesnika s AML (P=0,012) (Tablica 7).

Analizom utjecaja numeričkih varijabli na kategoričke varijable s dva razreda pomoću ROC-krivulja utvrđena je povezanost izražaja (AUC=0,783) i aktivnosti P-gp (AUC=0,870) s izražajem biljega CD34 na leukemijskim stanicama, povezanost između aktivnosti P-gp i izražaja jezgrinog enzima TdT (AUC=0,730) i biljega CD19 (AUC=0,719) te između izražaja P-gp i biljega CD7 (AUC=0,702) (Slika 12).

Utjecaj izražaja i aktivnosti P-gp na preživljavanje bolesnika s AML dodatno je analiziran primjenom metode Kaplan-Meier za procjenu krivulje preživljavanja bez prilagodbe analize za višestruka testiranja. Pri tome su analizirani podaci za bolesnike s AML koji su bili liječeni kemoterapijskim protokolima, dok su iz analize isključeni bolesnici liječeni palijativno. Analizirano je preživljavanje bolesnika u odnosu na dvije podskupine bolesnika – s vrijednostima manjim i vrijednostima većim od aritmetička sredina ispitivanog parametra. Pokazan je statistički značajan utjecaj izražaja P-gp (aritmetička sredina X=0,16) (P=0,027) i aktivnosti P-gp (aritmetička sredina aktivnosti X=2,44) (P=0,008) na duljinu ukupnog preživljavanja (Slike 13a i 13b). Prilagodbom metode Kaplan-Meier za višestruka testiranja, utjecaj izražaja i aktivnosti P-gp na ukupno preživljavanje bolesnika s AML ne doseže statističku značajnost (P=0,621, P=0,208) (nije prikazano). Ista analiza za preživljavanje bez znakova bolesti ne pokazuje statistički značajan utjecaj na duljinu preživljavanja bez (P=0,732, P=0,106) (Slika 13c i 13d) i s prilagodbom analize za višestruka testiranja (P=1, P=1). Ipak, skupina bolesnika s jakom aktivnošću P-gp ima kraće preživljavanje bez znakova bolesti u odnosu na bolesnike sa slabijom P-gp aktivnošću (P=0,106) (Slika 13d).



Slika 12. ROC krivulje. Utjecaj numeričkih varijabli na kategoričke varijable s dva razreda. a) izražaj biljega CD34 i izražaj P-gp; b) izražaj biljega CD34 i P-gp aktivnost; c) izražaj biljega CD19 i P-gp aktivnost; d) izražaj enzima TdT i P-gp aktivnost; e) izražaj biljega CD7 i P-gp izražaj



Slika 13. Kaplan-Meierove krivulje za ukupno preživljavanje bolesnika s AML i preživljavanje bez znakova bolesti bez prilagodbe analize za višestruka testiranja: a) utjecaj izražaja P-gp izražaja na ukupno preživljavanje; b) utjecaj aktivnosti P-gp na ukupno preživljavanje; c) utjecaj izražaja P-gp na preživljavanje bez znakova bolesti; i d) utjecaj aktivnosti P-gp na preživljavanje bez znakova bolesti. Os x=dani, os y=preživljavanje bolesnika

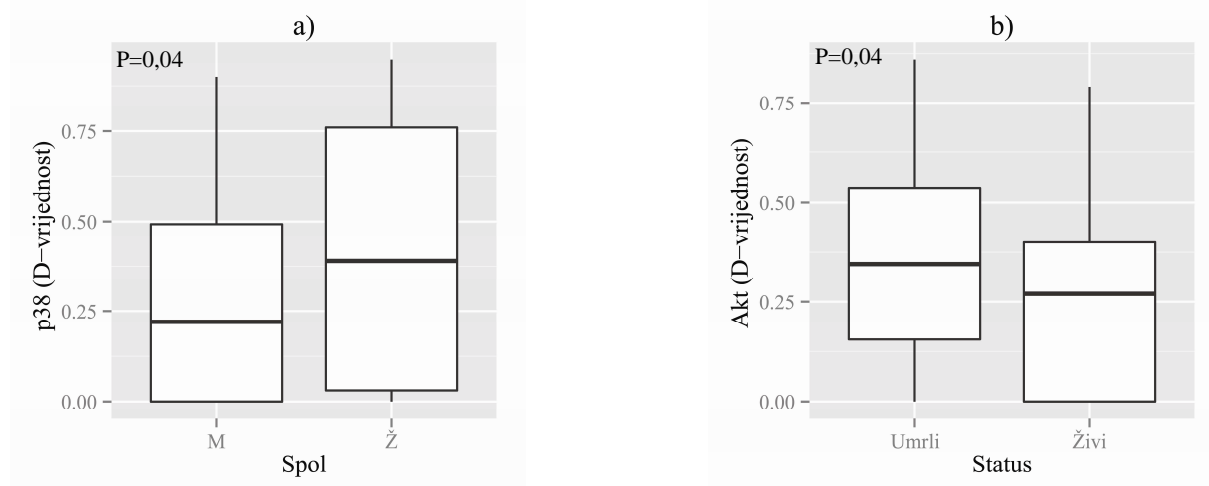
4.4. Aktivacija molekula signalnih putova PI3K i MAPK i odnos prema poznatim prognostičkim pokazateljima AML

Srednje vrijednosti razine fosforilacije molekula Akt, ERK1/2 i p38 izražene kao D-vrijednosti dobivene Kolmogorov-Smirnovljevim statističkim testom iznosile su $X=0,31$, $X=0,16$ i $X=0,34$ (raspon za Akt 0-0,86, raspon za ERK1/2=0-0,86, raspon za p38 0-0,95). Analiza molekula Akt i p38 je učinjena u 97 bolesnika za, a molekule ERK1/2 u 90 bolesnika. Fosforilacija molekule Akt nađena je u 49%, molekule ERK1/2 u 39%, a molekule p38 u blastima 44% bolesnika s novootkrivenom AML. Srednje vrijednosti razine fosforilacije korištene su kao granične vrijednosti za određivanje pozitivnosti i negativnosti ispitivanih varijabli (Tablica 3 i Tablica 4).

Usporedbom utjecaja kategoričkih varijabli na numeričke varijable testiranjem Mann-Whitney-Wilcoxonovim testom bez prilagodbe analize za višestruka testiranja utvrđeno je da postoji povezanost između konstitutivne fosforilacije/aktivacije molekule p38 signalnog puta MAPK i

ženskog spola ($P=0,04$) ($X=0,41$ vs. $X=0,28$). Nadalje, bolesnici koji su umrli imali su statistički značajno veću razinu fosforilacije molekule Akt signalnog puta PI3K/Akt ($P=0,04$) ($X=0,36$ vs. $X=0,26$) (Slika 14) (Tablica 5). Pri testiranju istih varijabli s prilagodbom analize za višestruka testiranja, niti jedna od utvrđenih povezanosti ne prelazi prag statističke značajnosti.

Koristeći korelacije te pripadni test o postojanju korelacije različite od nule bez prilagodbe analize za višestruka testiranja nalazi se statistički značajna korelacija između razine fosforiliranosti molekule ERK1/2 s nizom ispitivanih parametara pri postavljanju dijagnoze AML. Prvo, nađena je negativna korelacija između fosforilacije ERK1/2 i dobi bolesnika ($P<0,001$, $R=-0,3$), dok je isti parametar pozitivno korelirao s razinom serumske laktat dehidrogenaze ($P<0,001$, $R=0,38$), brojem trombocita u krvi ($P=0,033$, $R=0,2$) i duljinom ukupnog preživljavanja ($P=0,024$, $R=0,21$). Izražaj fosforiliranog oblika molekule Akt pokazao je statistički značajnu pozitivnu korelaciju s razinom serumske LDH ($P<0,001$, $R=0,31$), ali i negativnu korelaciju s duljinom ukupnog preživljavanja ($P<0,001$, $R=-0,43$) i preživljavanja bez znakova bolesti ($P<0,001$, $R=-0,47$). Izražaj fosforiliranog oblika molekule p38 pokazao je statistički značajnu pozitivnu korelaciju s razinom serumske LDH ($P<0,001$, $R=0,39$) i brojem eritrocita u krvi bolesnika ($P=0,001$, $R=0,3$). Zanimljivo, ovim načinom analize pokazalo se da postoji statistički značajna pozitivna korelacija između razine fosforilacije između molekula Akt i p38 ($P<0,001$, $R=0,38$) (Tablica 6).

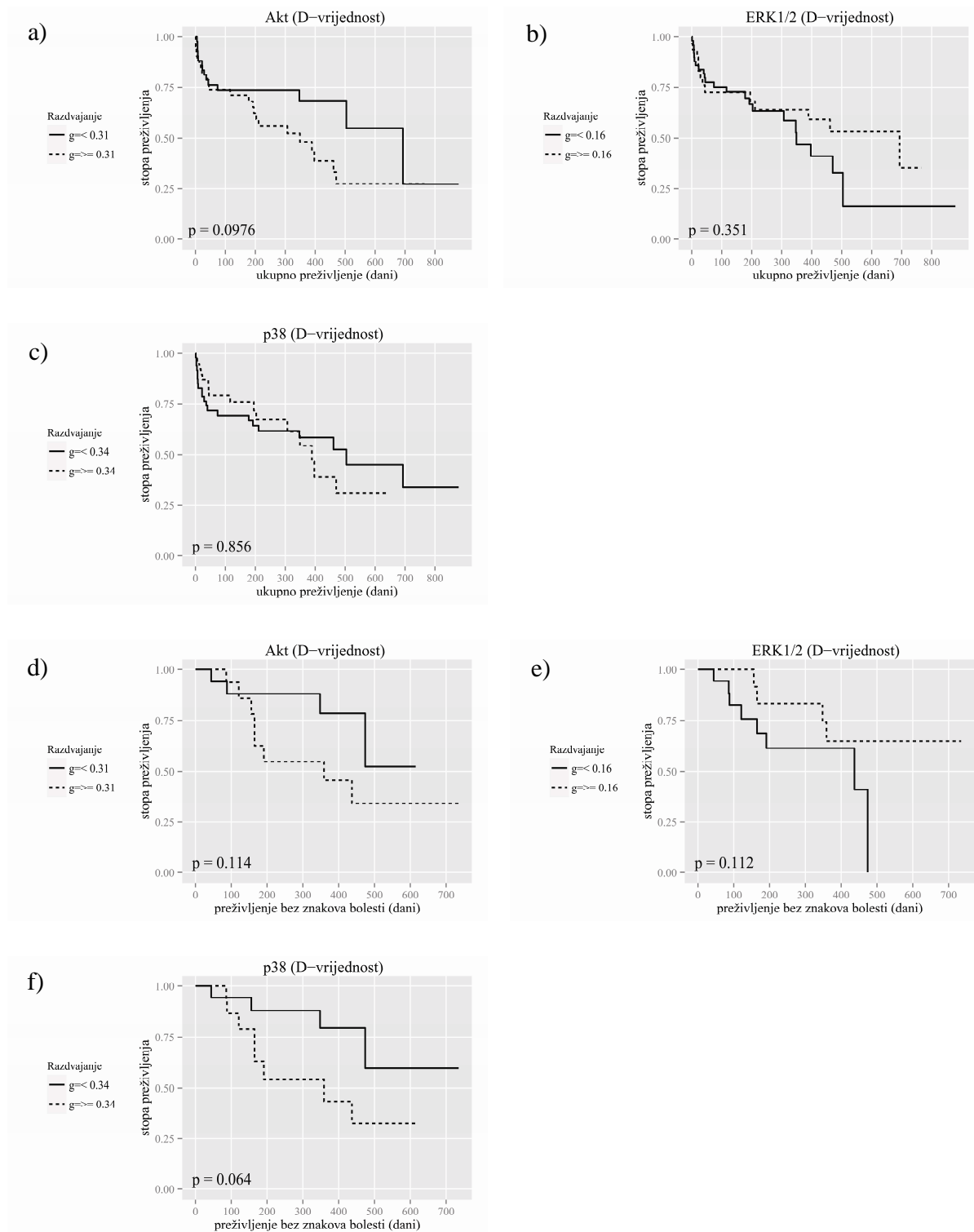


Slika 14. Grafički prikaz (Box-Whisker) utjecaja kategoričkih varijabli na numeričke varijable: a) spol bolesnika i p38 MAPK; b) umrli/živi i Akt

Prilagodбом analize za višestruka testiranja rezultata korelacijskih testova zadržana je međuovisnost većine prethodno utvrđenih varijabli. Razina fosforilacije molekule ERK1/2 i dalje statistički značajno korelira s dobi bolesnika ($P=0,05$) i razinom serumske LDH ($P=0,0017$), razina fosforilacije molekule Akt statistički značajno korelira s razinom serumske LDH ($P=0,036$) i duljinom ukupnog preživljavanja ($P=0,001$) i duljini preživljavanja bez znakova bolesti ($P=0,001$), dok razina fosforilacije molekule p38 statistički značajno korelira s razinom serumske LDH ($P=0,001$) i brojem eritrocita u krvi ($P=0,043$). Također, ovim tipom analize ponovno je potvrđena korelacija razine fosforilacije između dviju molekula signalnih putova - Akt i p38 ($P=0,001$) (Tablica 7).

Utjecaj fosforiliranosti molekula Akt, ERK1/2 i p38 na ukupno preživljavanje bolesnika s novootkrivenom AML dodatno je analiziran primjenom metode Kaplan-Meier za procjenu krivulje preživljavanja. Pri tome su analizirani podaci za bolesnike s AML koji su bili liječeni kemoterapijskim protokolima, dok su iz analize isključeni bolesnici liječeni palijativno. Razina fosforiliranosti svake od triju ispitivanih molekula kategorizirana je kao pozitivna ili negativna ovisno o aritmetičkoj sredini svih ispitivanih uzoraka. Aritmetička sredina izmjerenih vrijednosti fosforilacije molekule Akt u bolesnika liječenih kemoterapijskim protokolom iznosila je 0,31, za ERK1/2 0,16, a za p38 0,34.

Primjenom metode Kaplan-Meier nije utvrđen statistički značajan utjecaj razine fosforilacije molekula Akt, ERK1/2 i p38 na ukupno preživljavanje bolesnika s novootkrivenom AML bez obzira na vrst analize: bez prilagodbe za višestruka testiranja $P=0,098$, $P=0,35$ i $P=0,86$ (Slika 15a, 15b i 15c), a s prilagodбом za višestruka testiranja $P=1$ za sve tri molekule (nije prikazano). Analizom preživljavanja bez znakova bolesti utvrđeno je da fosforilacija molekula Akt i ERK1/2 nema statistički značajan utjecaj primjenom testa bez ($P=0,114$, $P=0,112$) (Slika 15d i 15e) i s prilagodбом analize za višestruka testiranja ($P=1$, $P=1$) (nije prikazano). Ipak, veća razina fosforilacije molekule p38 pokazuje trend kraćeg preživljavanja bez znakova bolesti primjenom metode Kaplan-Meier bez prilagodbe analize za višestruka testiranja ($P=0,064$) (Slika 15f).



Slika 15. Kaplan-Meierove krivulje za preživljavanje bolesnika s AML bez prilagodbe analize za višestruka testiranja: utjecaj razine fosforilacije molekula a) Akt, b) ERK1/2 i c) p38 na ukupno preživljavanje; utjecaj razine fosforilacije molekula d) Akt, e) ERK1/2 i f) p38 na preživljavanje bez znakova bolesti

4.5. Odnos između P-glikoproteina i fosforiliranosti Akt, ERK1/2 i p38 u leukemijskim blastima AML

Analiza međuodnosa numeričkih varijabli izražaja i aktivnosti P-gp i konstitutivne fosforilacije signalnih putova pokazala je statistički značajnu negativnu korelaciju između aktivnosti P-gp i razine fosforilacije molekule p38 signalnog puta MAPK primjenom metode bez (P=0,001, R=-0,31) i s prilagodbom analize za višestruka testiranja (P=0,032). Sličan odnos nije nađen za aktivnost P-gp i razinu fosforilacije molekula ERK1/2 i Akt (Tablica 6 i Tablica 7).

Međuodnos P-gp i signalnih putova i njihov sinergistički utjecaj na ukupno preživljavanje bolesnika opisan je odjeljku 4.6.2.

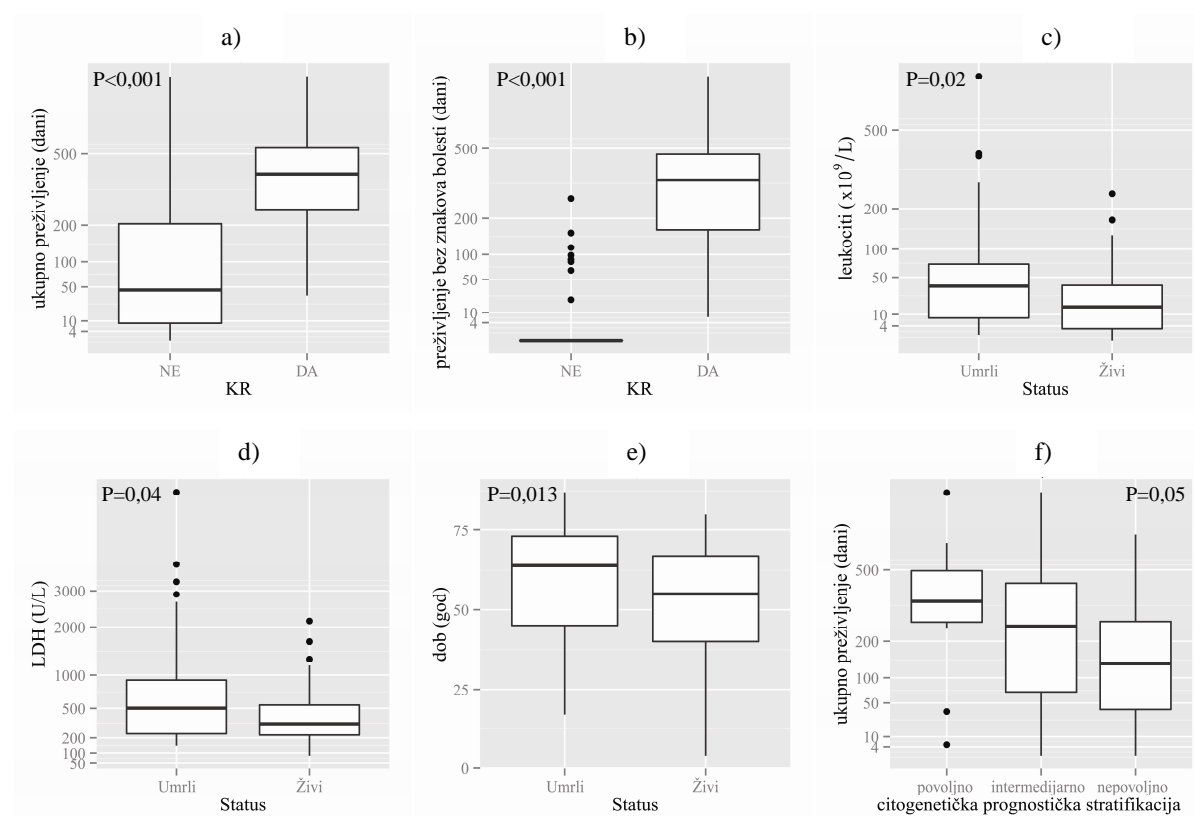
4.6. Analiza čimbenika koji utječu na preživljavanje bolesnika s AML

4.6.1. Univarijatna analiza

Analizom utjecaja kategoričkih varijabli na numeričke varijable Mann-Whitney-Wilcoxonovim statističkim testom bez primjene prilagodbe analize za višestruka testiranja pokazano je da izražaj i aktivnost P-gp, te razine fosforilacije molekula Akt, ERK1/2 i p38 u leukemijskim blastima nemaju značajan utjecaj na postizanje kompletne remisije bolesnika s AML (Tablica 5). Bolesnici koji su u trenutku zaključivanja studije bili živi imali su statistički značajno nižu razinu fosforilacije molekule Akt u trenutku postavljanja dijagnoze (Slika 14) (Tablica 5) (detaljno opisano u odlomcima 4.3 i 4.4).

Bolesnici koji postignu kompletnu remisiju nakon prve indukcijske terapije imaju statistički značajno dulje ukupno preživljavanje (P<0,001) (X=418 vs. X=135 dana) i preživljavanje bez znakova bolesti (P<0,001) (X=352 vs. X=26 dana). Nadalje, bolesnici koji su u trenutku završetka studije bili živi imali su pri dijagnozi statistički značajno niži broj leukocita u krvi (P=0,02) (X=31,3 vs. X=72,2x10⁹/L) i nižu serumsku razinu LDH (P=0,04) (X=468 vs. X=885 U/L) i bili su mlađe životne dobi (P=0,013) (X=51 vs. X=59,5). Stratifikacija bolesnika u citogenetičke skupine očituje se statistički značajno različitim duljinama ukupnog preživljavanja bolesnika, pri čemu prognostički povoljna skupina ima najdulje ukupno preživljavanje, a prognostički nepovoljna skupina najkraće ukupno preživljavanje (P=0,05) (X=384 vs. X=306 vs. X=189 dana) (Slika 16) (Tablica 5).

Korelacijskim testom nađena je statistički značajna povezanost između duljine ukupnog preživljavanja i nekoliko poznatih kliničko-laboratorijskih varijabli. Ukupno preživljavanje bolesnika negativno je koreliralo s dobi bolesnika ($P=0,022$, $R=-0,21$), brojem leukocita u krvi ($P<0,001$, $R=-0,39$) i razinom serumske LDH ($P<0,001$, $R=-0,34$) pri dijagnozi bolesti, dok je pozitivna korelacija nađena između ukupnog preživljavanja i broja trombocita u krvi pri postavljanju dijagnoze ($P=0,012$, $R=0,23$). I duljina preživljavanja bolesnika bez znakova bolesti negativno je korelirala s brojem leukocita u krvi ($P<0,001$, $R=-0,34$) i razinom serumske LDH ($P<0,001$, $R=-0,39$) (Tablica 6). Analizom istih numeričkih varijabli metodom s prilagodbom za višestruka testiranja potvrđena je statistički značajna negativna korelacija između duljine ukupnog preživljavanja i broja leukocita ($P<0,001$), odnosno razine serumske LDH ($P=0,009$), dok je duljina preživljavanja bez znakova bolesti i dalje ovisila o broju leukocita u perifernoj krvi ($P=0,009$) i razini serumske LDH ($P<0,001$) pri dijagnozi bolesti (Tablica 7).



Slika 16. Grafikoni (Box-Whisker) utjecaja kategoričkih varijabli na numeričke varijable. a) kompletna remisija i ukupno preživljavanje; b) kompletna remisija i preživljavanje bez znakova bolesti; c) živi/umrli i broj leukocita pri dijagnozi; d) živi/umrli i razina serumske LDH, e) živi/umrli i dob pri dijagnozi; f) citogenetička prognostička stratifikacija i ukupno preživljavanje

Analizom međuodnosa numeričkih varijabli primjenom testa za ispitivanje korelacije različite od nule bez prilagodbe analize za višestruka testiranja utvrđena je statistički značajna negativna korelacija između aktivnosti P-gp i duljine ukupnog preživljavanja ($P < 0,001$, $R = -0,34$) i preživljavanja bez znakova bolesti ($P = 0,001$, $R = -0,31$). Nadalje izražaj P-gp također negativno korelira s duljinom ukupnog preživljavanja ($P = 0,02$, $R = -0,22$) bolesnika (Tablica 6).

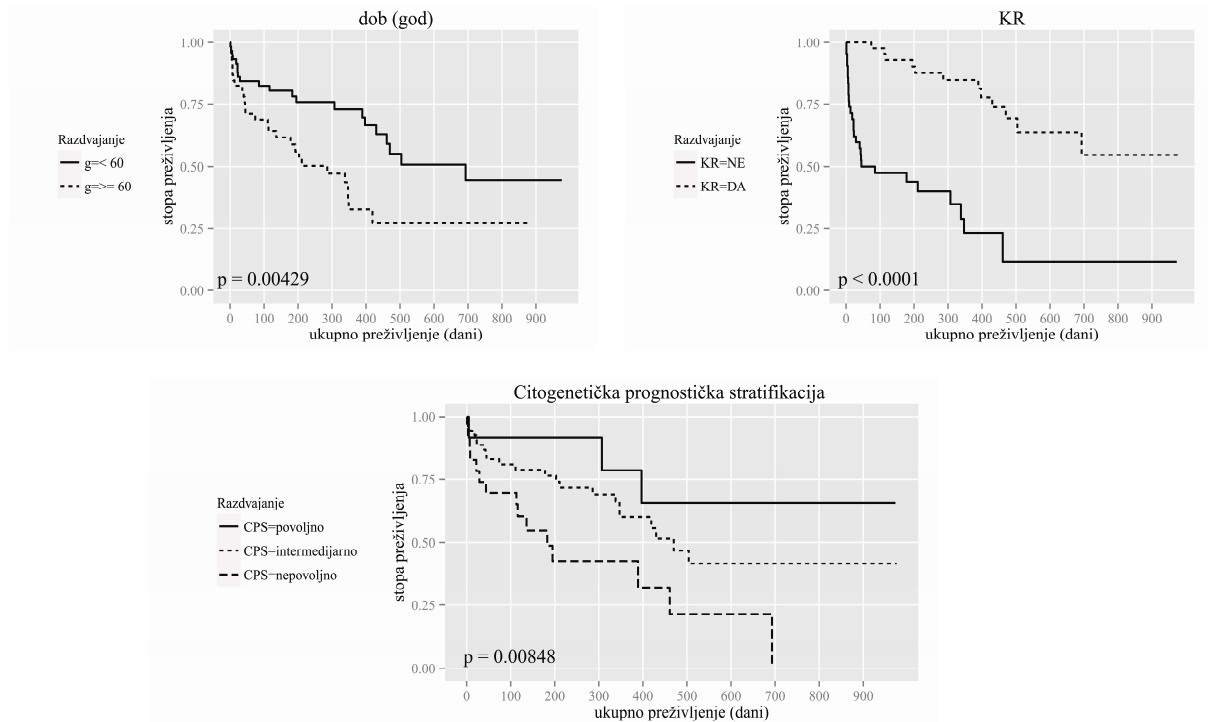
Razina fosforilacije signalnih putova također korelira s duljinom ukupnog preživljavanja i preživljavanja bez znakova bolesti kao npr. razina fosforilacije molekule Akt ($P < 0,001$, $R = -0,43$; $P < 0,001$, $R = -0,47$). Zanimljivo, viša razina fosforilacije molekule ERK1/2 statistički je značajno povezana s duljim ukupnim preživljavanjem ($P = 0,02$, $R = 0,21$) (Tablica 6). Prilagodbom za višestruka testiranja zadržava se statistička značajnost negativne korelacije duljine ukupnog preživljavanja i preživljavanja bez znakova bolesti s razinom aktivnosti P-gp ($P = 0,012$, $P = 0,035$) i razinom fosforilacije molekule Akt ($P = 0,001$, $P = 0,001$) (Tablica 7) (detaljno opisano u odlomcima 4.3 i 4.4).

Primjenom metode Kaplan-Meier bez prilagodbe analize za višestruka testiranja za analizu krivulje preživljavanja utvrđeno je da izražaj i aktivnost P-gp statistički značajno utječu na duljinu ukupnog preživljavanja i preživljavanja bez znakova bolesti ($P = 0,027$, $P = 0,008$) (Slika 13) (detaljno opisano u odlomku 4.3). Međutim, ovom metodom nije pokazan utjecaj fosforilacije molekula Akt, ERK1/2 i p38 na duljinu ukupnog i preživljavanja bez znakova bolesti u ovoj kohorti bolesnika. Unatoč ovom rezultatu, može se uočiti trend duljeg ukupnog preživljavanja i preživljavanja bez znakova bolesti kod bolesnika čije leukemijske stanice ne pokazuju fosforiliranost molekula Akt ($P = 0,098$, $P = 0,11$) i p38 ($P = 0,86$, $P = 0,064$), a pokazuju fosforiliranost molekule ERK1/2 ($P = 0,35$, $P = 0,11$) (Slika 15) (detaljno opisano u odlomku 4.4).

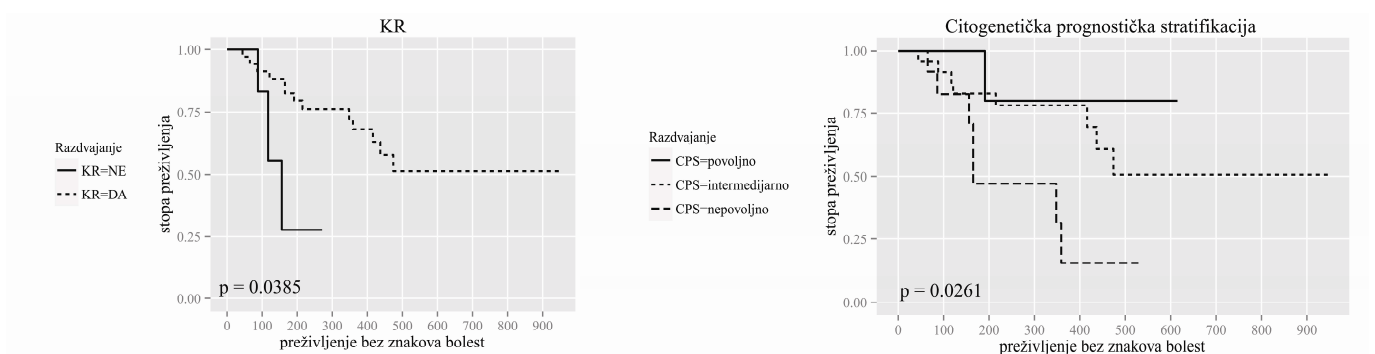
Osim toga, dob bolesnika < 60 god. $>$ ($P = 0,004$), postizanje kompletne remisije (KR) nakon prve indukcijske terapije ($P < 0,001$) i stratifikacija bolesnika u skupine rizika temeljem nalaza citogenetičke analize ($P = 0,009$) statistički značajno utječu na ukupno preživljavanje bolesnika s novootkrivenom AML (Slika 17). Prilagodbom metode Kaplan-Meier za višestruka testiranja utvrđeno je da samo varijabla postignuća kompletne remisije nakon prve indukcijske terapije statistički značajno utječe na ukupno preživljavanje bolesnika ($P < 0,001$).

Također, primjenom metode Kaplan-Meier utvrđeno je da statistički značajan utjecaj na preživljavanje bez znakova bolesti imaju postizanje kompletne remisije nakon prve indukcijske terapije ($P = 0,039$) i stratifikacija bolesnika u skupine rizika temeljem nalaza citogenetičke

analize ($P=0,026$) (Slika 18). Međutim, korištenjem prilagodbe za višestruka testiranja pri analizi istih varijabli razlika ne dostiže statističku značajnost ($P=0,975$ i $P=0,203$) (nije prikazano).



Slika 17. Kaplan-Meierove krivulje za ukupno preživljavanje bolesnika bez prilagodbe analize za višestruka testiranja



Slika 18. Kaplan-Meierove krivulje za preživljavanje bez znakova bolesti bez prilagodbe analize za višestruka testiranja

4.6.2. Multivarijatna analiza - Coxov regresijski model

A) Ukupno preživljavanje

Coxov model za predviđanje duljine ukupnog preživljavanja bolesnika s novootkrivenom AML korišten je sa sljedećim ulaznim parametrima: postizanje kompletne remisije nakon prve indukcijske terapije (KR), dob i spol bolesnika, broj leukocita u krvi pri dijagnozi, pripadnost određenoj rizičnoj skupini prema WHO i prema nalazu citogenetičke analize, aktivnost P-gp i status fosforiliranosti ERK1/2, Akt, p38 molekula i izražaju biljega CD7, CD19, CD34 i CD56 na membrani leukemijskih stanica.

Primjenom metode dodavanja varijabli (engl. *forward selection*) koje značajno utječu na bolje predviđanje rezultata dobiven je model opisan u tablici 8 (Harell-C indeks=0,859, $R^2=0,567$). Model je testiran na ispravnost pretpostavke o proporcionalnosti hazarda te nije pokazao odstupanje od pretpostavke. Dobiveni model je u konačnici sadržavao slijedeće nezavisne varijable za duljinu ukupnog preživljavanja: postizanje kompletne remisije nakon prve indukcijske terapije (KR), spol bolesnika, broj leukocita u krvi pri dijagnozi, pripadnost rizičnoj skupini prema nalazu citogenetičke analize, aktivnost P-gp i razinu fosforiliranosti molekula ERK1/2 i Akt. Osim toga, interakcija P-gp aktivnosti i razine fosforilacije molekule Akt pokazala se važnom za predviđanje duljine ukupnog preživljavanja u ovoj kohorti bolesnika (Tablica 8).

Utjecaj aktivnosti P-gp i razine fosforiliranosti molekula Akt i ERK1/2 kao nezavisnih prediktora za duljinu ukupnog preživljavanja bolesnika prikazan je s pomoću četiri prognostičke skupine koje uzimaju u obzir parametre iz Coxovog modela – postizanje KR, spol, broj leukocita u krvi i citogenetičku skupinu (Slika 19). Prva skupina su bolesnici koji bi bili svrstani u prognostički povoljnu skupinu, druge dvije skupine čine bolesnici koji bi bili svrstani u skupinu srednjeg rizika, a četvrtu skupinu čine bolesnici iz prognostički nepovoljne skupine (Tablica 9).

Tablica 8. Coxov model za predviđanje duljine ukupnog preživljavanja

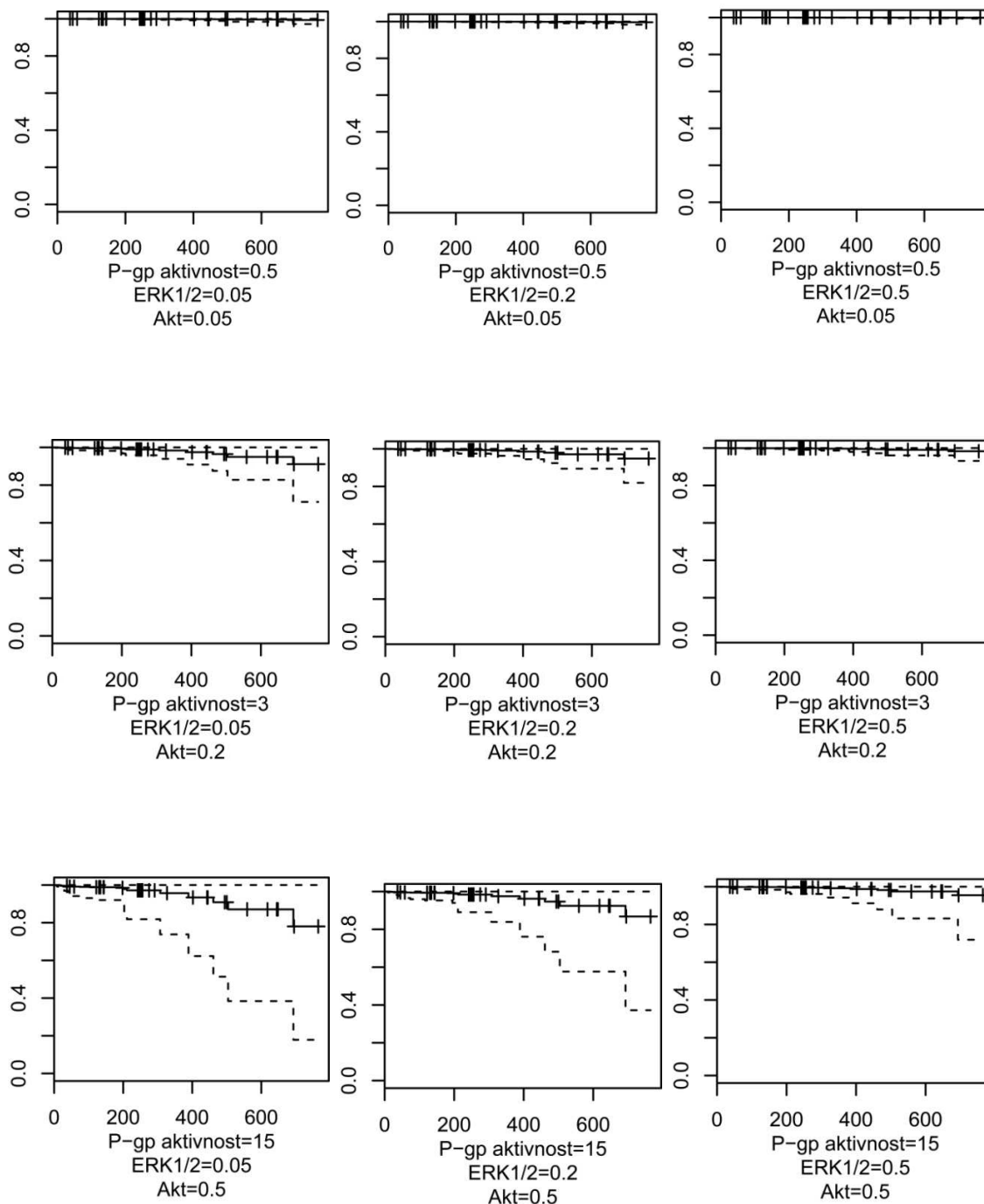
| Varijabla | | Omjer hazarda | Waldov test (P) | SE | 95% CI |
|------------------------------------|----------------|---------------|-----------------|-------|------------------|
| KR | DA | 0,07079 | <0,001 | 0,682 | (0,019, 0,269) |
| KR | NE | 1 | — | — | — |
| Spol | Ž | 0,30728 | 0,034 | 0,557 | (0,103, 0,916) |
| Spol | M | 1 | — | — | — |
| Leukociti / 10 | — | 1,23178 | <0,001 | 0,056 | (1,104, 1,375) |
| Citogenetička prognostička skupina | Intermedijarna | 7,14599 | 0,116 | 1,250 | (0,616, 82,919) |
| | Nepovoljna | 27,31161 | 0,017 | 1,386 | (1,805, 413,153) |
| | Povoljna | 1 | — | — | — |
| P-gp aktivnost | — | 3,61609 | 0,0323 | 0,601 | (1,114, 11,733) |
| ERK1/2 x 10 | — | 0,688 | 0,007 | 0,140 | (0,522, 0,905) |
| Akt x 10 | — | 1,733 | 0,039 | 0,267 | (1,027, 2,923) |
| P-gp aktivnost:Akt x 10 | — | 0,792 | 0,050 | 0,119 | (0,627, 1,001) |

Tablica 9. Četiri prognostičke skupine prema Coxovom modelu za analizu utjecaja aktivnosti P-gp i razine fosforilacije Akt i ERK1/2 na duljinu ukupnog preživljavanja bolesnika s AML

| | Kompletna remisija (KR) | Spol | Leukociti | Citogenetička prognostička skupina |
|----|-------------------------|------|-----------------------|------------------------------------|
| 1. | DA | Ž | 5x10 ⁹ /L | Povoljna |
| 2. | DA | Ž | 5x10 ⁹ /L | Intermedijarna |
| 3. | NE | M | 50x10 ⁹ /L | Intermedijarna |
| 4. | NE | M | 50x10 ⁹ /L | Nepovoljna |

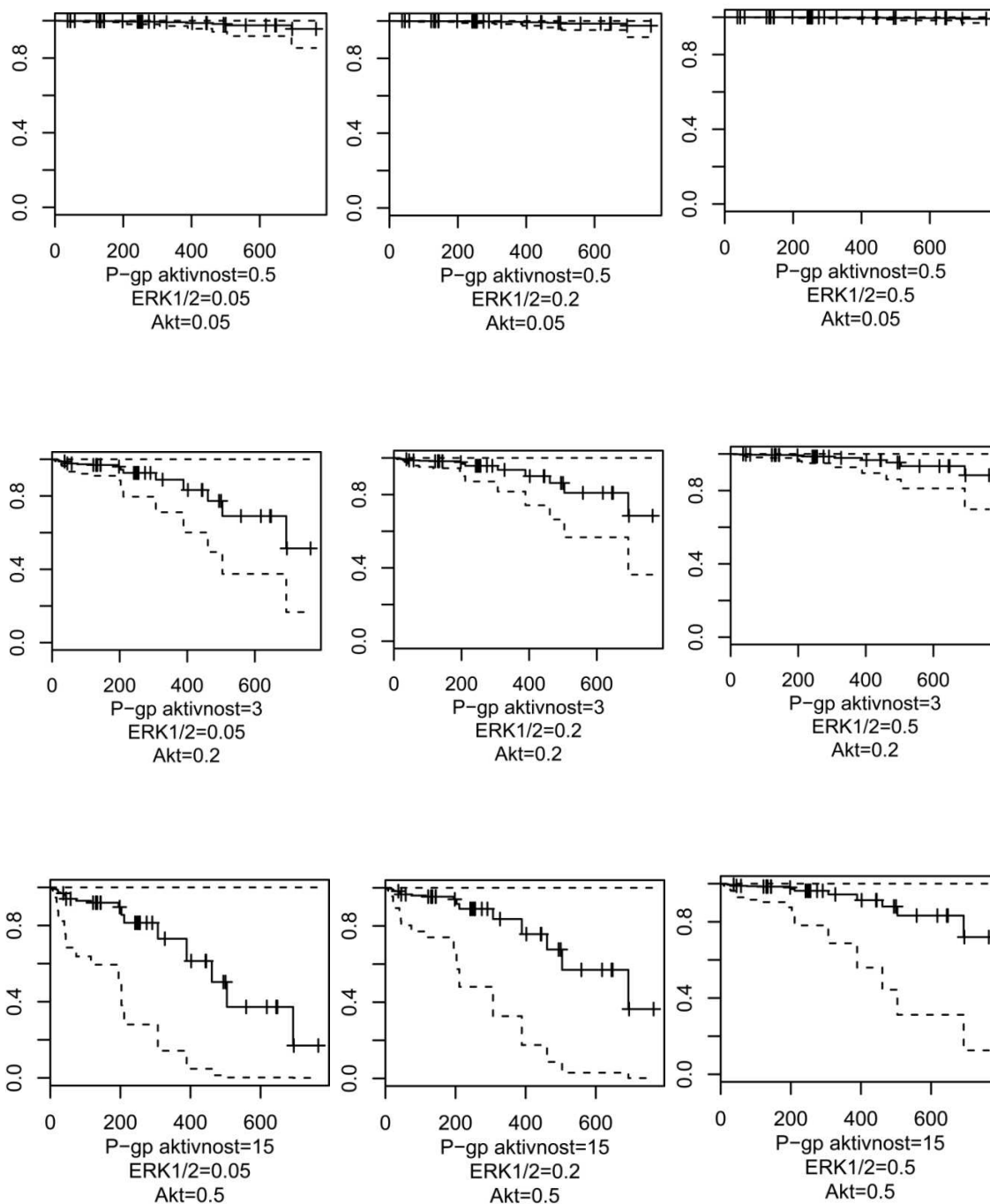
Na slici 19 prikazan je utjecaj aktivnosti P-gp, razine fosforilacije molekula Akt i ERK1/2 kao nezavisnih prediktora ukupnog preživljavanja bolesnika u četiri prognostičke skupine navedene u tablici 9. Slike su posložene tako da redovi pokazuju utjecaj postupnog povećanja razine fosforilacije molekule ERK1/2 u uvjetima kada su vrijednosti za aktivnost P-gp i razinu fosforilacije molekule Akt konstantne. Na ovaj način može su uočiti da povećanje razine fosforilacije molekule ERK1/2 ima povoljan učinak na duljinu ukupnog preživljavanja bolesnika. Drugim riječima, što je veća razina fosforilacije molekule ERK1/2, dulje je ukupno preživljavanje bolesnika u svim skupinama. Nasuprot tome, okomiti grafikoni prikazuju utjecaj postupnog povećanja aktivnosti P-gp i razine fosforilacije molekule Akt u uvjetima kada je razina fosforilacije molekule ERK1/2 konstantna. Iz grafičkih prikaza jasno je da veća aktivnost P-gp i veća razina fosforilacije molekule Akt znatno skraćuju ukupno preživljavanje bolesnika. To posebno dolazi do izražaja kod prve i druge intermedijarne skupine (Slika 19b i 19c) koja je veoma heterogene skupine bolesnika u pogleda kliničko-laboratorijskih pokazatelja, a posebice heterogene citogenetike. Unutar te skupine nužno je potrebno imati čimbenike koji mogu pružiti informaciju o tijeku i ishodu bolesti. P-gp, Akt i ERK1/2 mogli bi poslužiti kao dodatni stratifikatori bolesnika u pripadajuće skupine rizika.

a) KR=DA; spol=Ž; leukociti= $5 \times 10^9/L$; citogenetika=povoljna



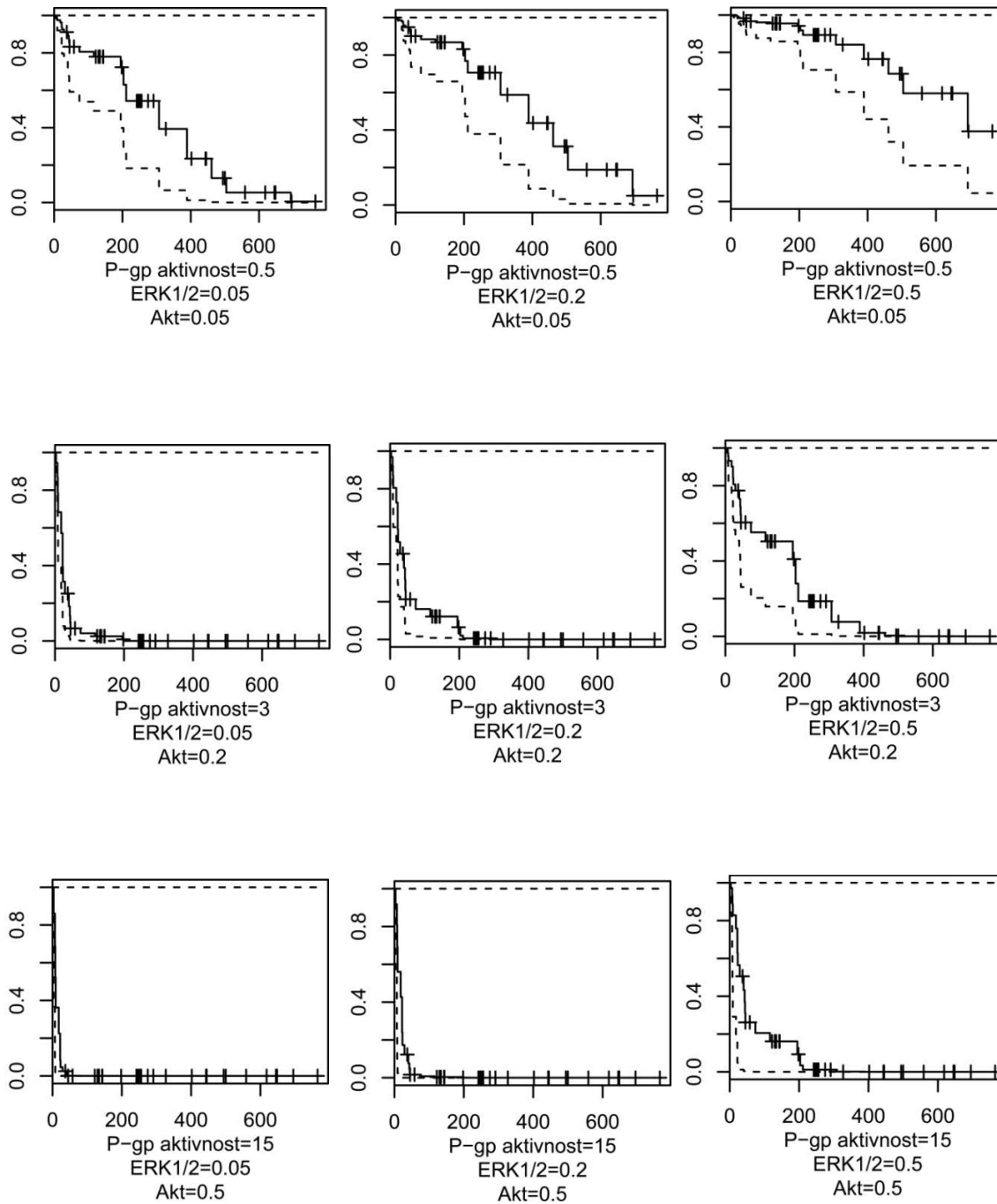
Slika 19. Coxov regresijski model za predviđanje ukupnog preživljavanja bolesika s AML. Utjecaj aktivnosti P-gp i razine fosforilacije molekula Akt i ERK1/2 u četiri prognostičke skupine: a) prognostički povoljna skupina (detalji u Tablici 8 i Tablici 9)

b) KR=DA; spol=Ž; leukociti=5x10⁹/L; citogenetika=intermedijarna



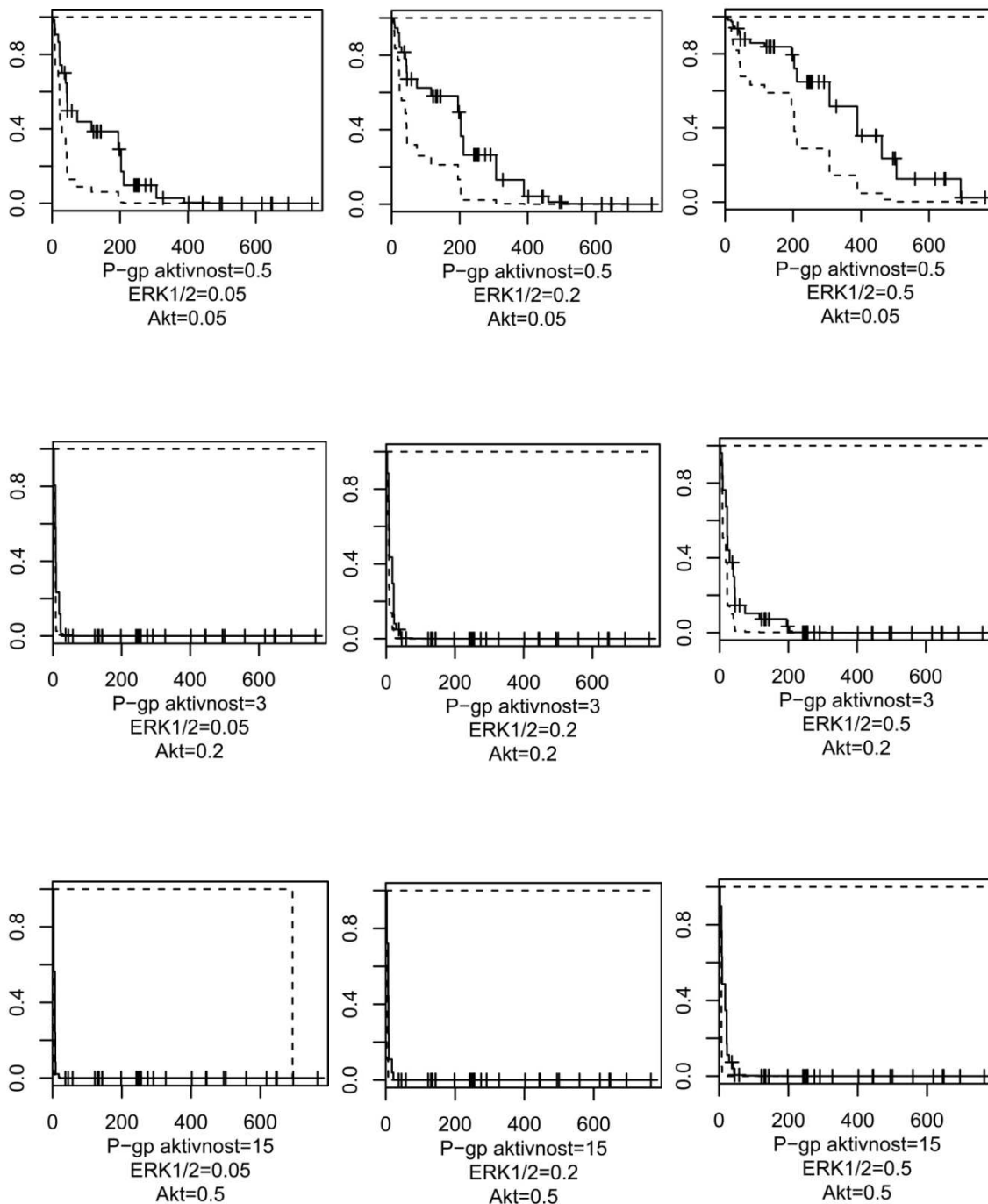
Slika 19. Coxov regresijski model za predviđanje ukupnog preživljavanja bolesika s AML. Utjecaj aktivnosti P-gp i razine fosforilacije molekula Akt i ERK1/2 u četiri prognostičke skupine: b) intermedijarna I. skupina (detalji u Tablici 8 i Tablici 9)

c) KR=NE; spol=M; leukociti=50x10⁹/L; citogenetika=intermedijarna



Slika 19. Coxov regresijski model za predviđanje ukupnog preživljavanja bolesika s AML. Utjecaj aktivnosti P-gp i razine fosforilacije molekula Akt i ERK1/2 u četiri prognostičke skupine: c) intermedijarna II. skupina (detalji u Tablici 8 i Tablici 9)

d) KR=NE; spol=M; leukociti=50x10⁹/L; citogenetika=nepovoljna



Slika 19. Coxov regresijski model za predviđanje ukupnog preživljavanja bolesika s AML. Utjecaj aktivnosti P-gp i razine fosforilacije molekula Akt i ERK1/2 u četiri prognostičke skupine: d) prognostički nepovoljna skupina (detalji u Tablici 8 i Tablici 9)

B) Preživljavanje bez znakova bolesti

Kod proučavanja preživljavanja bez znakova bolesti otegotna okolnost je manji broj analiziranih bolesnika koji su imali sve dostupne podatke za ispitivane varijable. Stoga je u analizi primjenjena metodologija uvrštenja u Coxov model početnih varijabli koje su pokazale značajnost u modelu za ukupno preživljavanje, nakon čega je model reduciran izbacivanjem statistički neznačajnih varijabli na razini od 0,1. Nezavisne varijable koje su ostale u modelu su sljedeće: postizanje kompletne remisije (KR), citogenetička prognostička stratifikacija i razina fosforilacije molekule ERK1/2. Nakon toga su u model dodavane varijable koje do tada nisu bile korištene i kao jedina značajna pokazala se dob bolesnika pri postavljanju dijagnoze.

Dobiveni model opisan je u tablici 10 (Harell-C indeks=0,793, $R^2=0,327$) Model je testiran na ispravnost pretpostavke o proporcionalnosti hazarda te nije pokazao odstupanje od pretpostavke.

Tablica 10. Coxov model za predviđanje duljine preživljavanja bez znakova bolesti

| Varijabla | | Omjer hazarda | Waldov test (P) | SE | 95% CI |
|------------------------|----------------|----------------------|------------------------|-----------|------------------|
| KR | DA | 0,05827 | 0,014 | 1,161 | (0,006, 0,567) |
| KR | NE | 1 | — | — | — |
| Dob | — | 1,04334 | 0,0489 | 0,021 | (1,001, 1,088) |
| Citogenetička prognoza | Intermedijarna | 5,67187 | 0,139 | 1,173 | (0,568, 56,598) |
| | Nepovoljna | 25,007 | 0,011 | 1,278 | (2,040, 306,519) |
| | Povoljna | 1 | — | — | — |
| ERK1/2 x 10 | — | 0,808 | 0,108 | 0,132 | (0,622, 1,048) |

Prikazan je utjecaj statusa fosforiliranosti molekule ERK1/2 i dobi bolesnika na duljinu preživljavanja bez znakova bolesti unutar četiri prognostičke skupine koje uzimaju u obzir nezavisne varijable iz Coxovog modela – postizanje kompletne remisije i citogenetičku stratifikaciju bolesnika (Slika 20). Prvu skupinu čine bolesnici koji bi bili svrstani u prognostički povoljnu skupinu, druge dvije skupine su bolesnici svrstani u skupinu srednjeg rizika, a četvrtu skupinu čine bolesnici iz prognostički nepovoljne skupine (Tablica 11).

Tablica 11. Četiri prognostičke skupine prema Coxovom modelu za analizu utjecaja razine fosforilacije molekule ERK1/2 na duljinu preživljavanja bez znakova bolesti bolesnika s AML

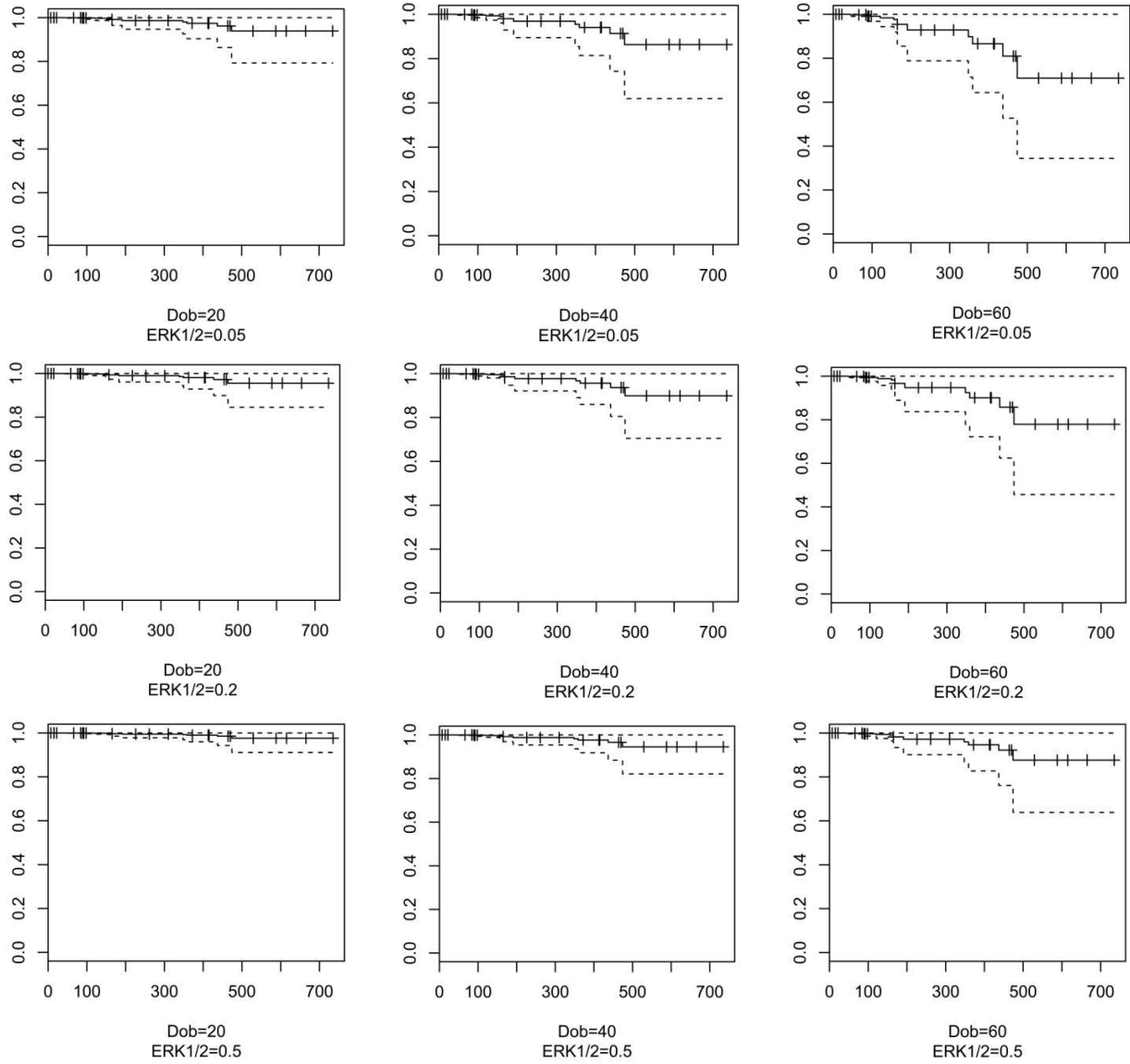
| | Kompletna remisija (KR) | Citogenetička prognostička skupina |
|----|--------------------------------|---|
| 1. | DA | Povoljna |
| 2. | DA | Intermedijarna |
| 3. | NE | Intermedijarna |
| 4. | NE | Nepovoljna |

Na slici 20 prikazan je utjecaj razine fosforilacije molekule ERK1/2 i dobi bolesnika u trenutku postavljanja dijagnoze kao nezavisnih prediktora duljine preživljavanja bez znakova bolesti u četiri prognostičke skupine navedene u tablici 11. Slike su posložene tako da redovi pokazuju utjecaj postupnog povećanja dobi bolesnika u uvjetima kada su vrijednosti razine fosforilacije molekule ERK1/2 konstantne. Na ovaj način uočava se da stariji bolesnici očekivano imaju kraće preživljavanje bez znakova bolesti u svim prognostičkim skupinama. Nasuprot tome, stupci pokazuju utjecaj postupnog povećanja razine fosforilacije molekule ERK1/2 u uvjetima kada je dob bolesnika konstantna. Iz grafičkih prikaza jasno je da veća razina fosforilacije molekule ERK1/2 znatno produljuje preživljavanje bez znakova bolesti. Kao i u prethodnom modelu (odjeljak 4.6.2.A) važnost ovog rezultata posebice dolazi do izražaja kod prve i druge intermedijarne skupine (Slika 20b i 20c). Informacija o razini fosforilacije molekule ERK1/2 može poslužiti kao dodatni stratifikator bolesnika svrstanih u skupinu srednjeg rizika.

Coxov regresijski model za procjenu duljine ukupnog preživljavanja i preživljavanja bez znakova bolesti, te analiza metodom Kaplan-Meier uključili su sve bolesnike koji su primili bilo koji od opisanih kemoterapijskih protokola (odjeljak 3.1). Bolesnici koji su liječeni samo palijativnom terapijom nisu bili uključeni u ove statističke analize. Unatoč težnji da se bolesnici dodatno podijele na skupine ovisno o primjenjenoj terapiji, takva analiza nije bila moguća. Razlog tome jest prvenstveno relativno mali broj bolesnika uključenih u studiju. Svakako tome doprinosi i činjenica da postoji djelomični nedostatak pojedinih informacija za neke bolesnike što dodatno smanjuje broj bolesnika na temelju kojih se može graditi model za procjenu duljine preživljavanja. Tako Coxov regresijski model za procjenu duljine preživljavanja bez znakova bolesti uključuje svega 35 bolesnika stoga svaka daljnja stratifikacija bolesnika u dodatne

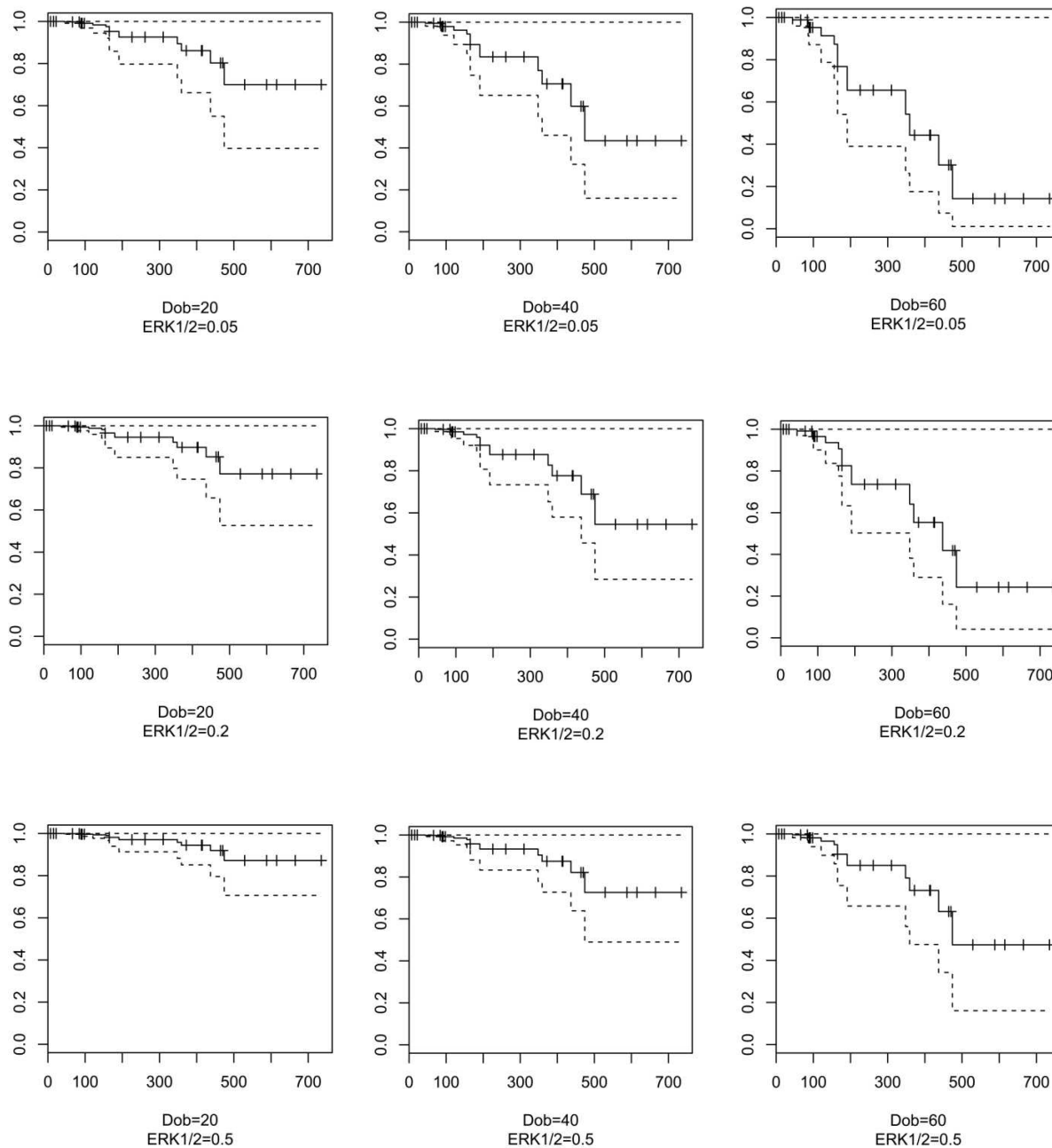
podskupine temeljem terapijskog protokola nije preporučena. Time bi se smanjila pouzdanost i vjerodostojnost statističke analize. Utoliko ova studija nije bila u mogućnosti pokazati utjecaj izražaja i aktivnosti P-glikoproteina, te aktivacije signalnih putova PI3K/Akt i MAPK na duljine ukupnog preživljavanja i preživljavanja bez znakova bolesti u ovisnosti o načinu liječenja bolesnika.

a) KR=DA; citogenetika=povoljna



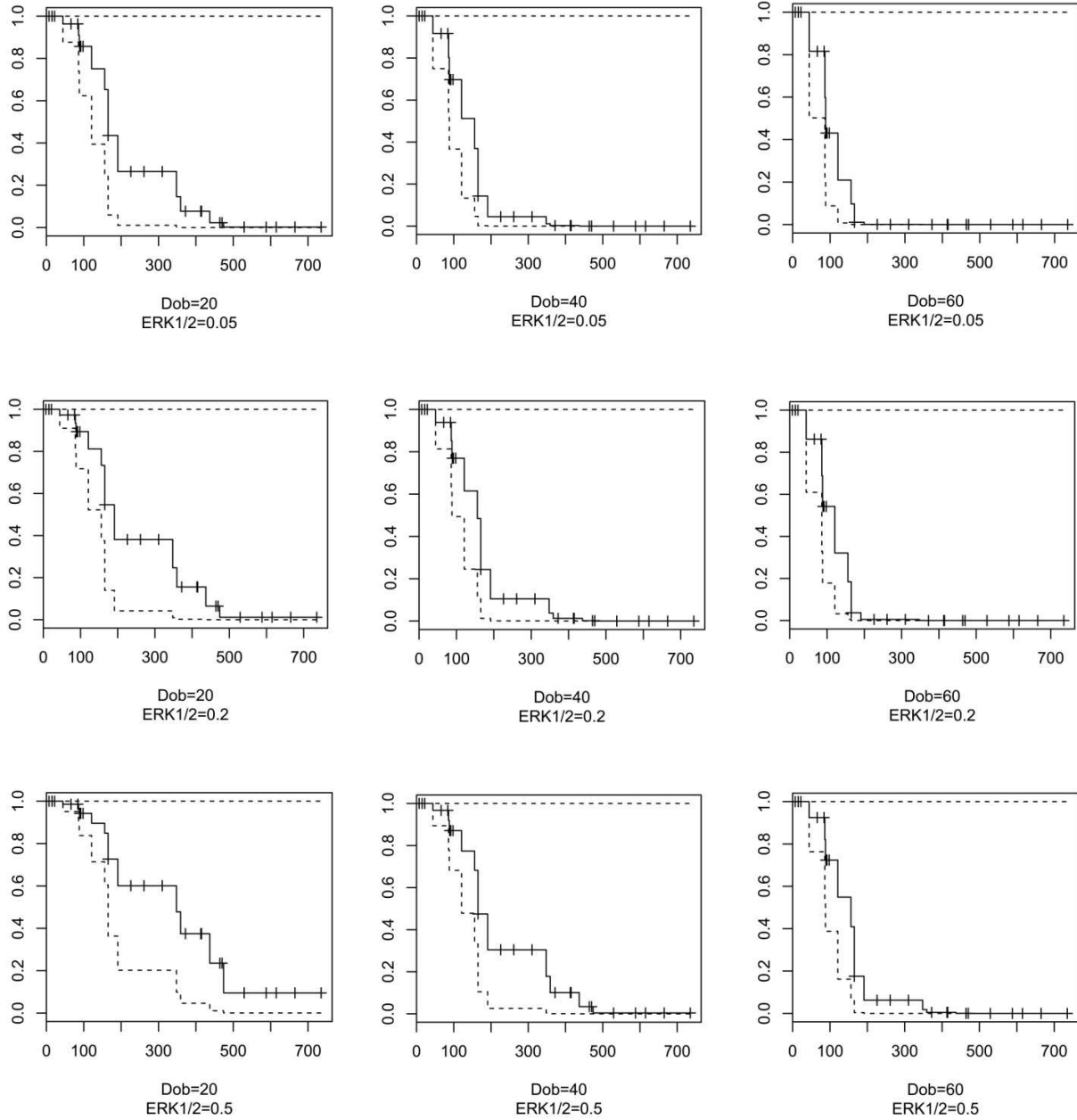
Slika 20. Coxov regresijski model za predviđanje preživljavanja bez znakova bolesti bolesnika s AML. Utjecaj dobi bolesnika i razine fosforilacije molekule ERK1/2 u četiri prognostičke skupine: a) prognostički povoljna skupina (detalji u Tablici 10 i Tablici 11)

b) KR=DA; citogenetika=intermedijarna



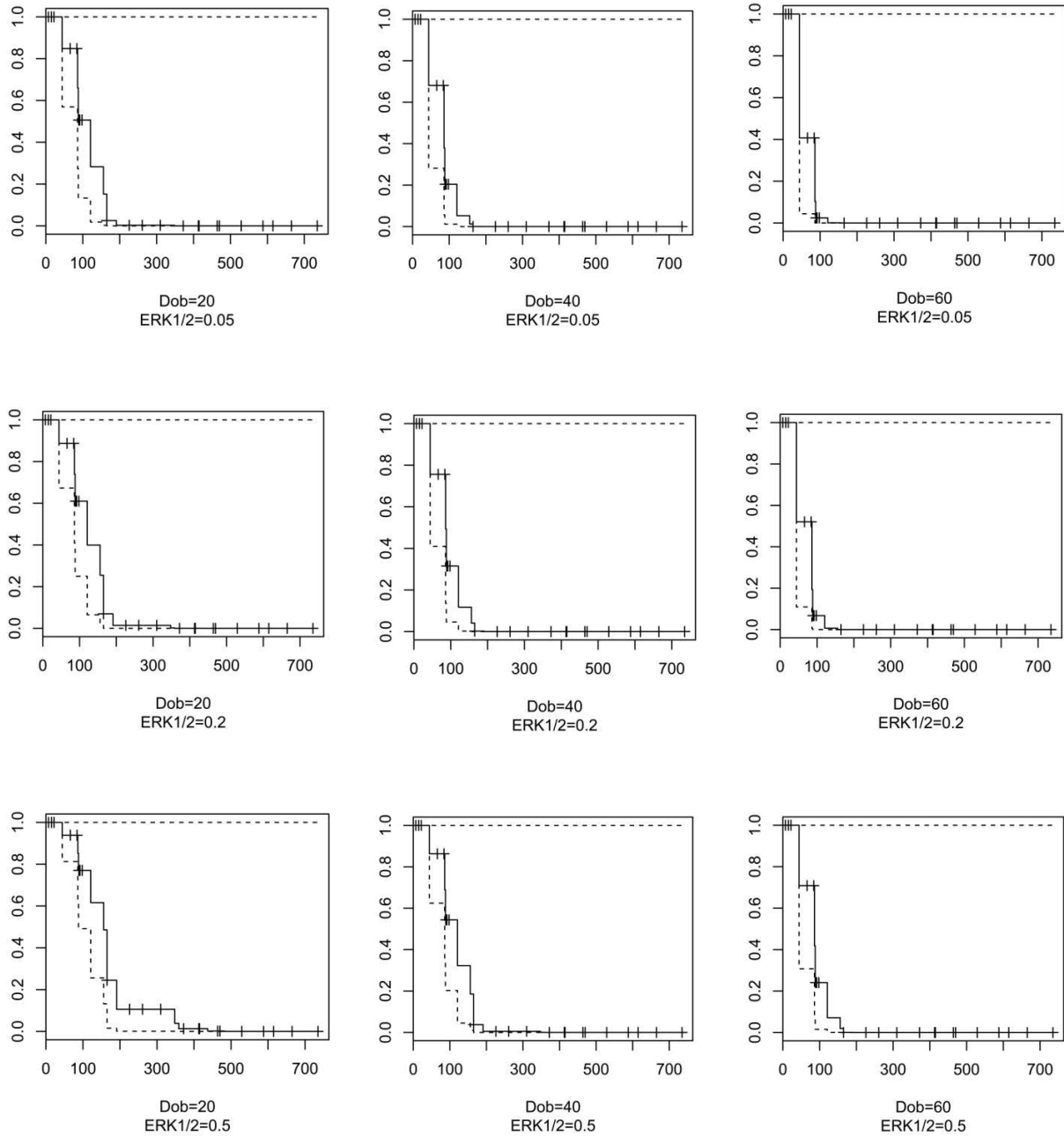
Slika 20. Coxov regresijski model za predviđanje preživljavanja bez znakova bolesti bolesnika s AML. Utjecaj dobi bolesnika i razine fosforilacije molekule ERK1/2 u četiri prognostičke skupine: b) intermedijarna I. skupina (detalji u Tablici 10 i Tablici 11)

c) KR=NE; citogenetika=intermedijarna



Slika 20. Coxov regresijski model za predviđanje preživljavanja bez znakova bolesti bolesnika s AML. Utjecaj dobi bolesnika i razine fosforilacije molekule ERK1/2 u četiri prognostičke skupine: c) intermedijarna II. skupina (detalji u Tablici 10 i Tablici 11)

d) KR=NE; citogenetika=nepovoljna



Slika 20. Coxov regresijski model za predviđanje preživljavanja bez znakova bolesti bolesnika s AML. Utjecaj dobi bolesnika i razine fosforilacije molekule ERK1/2 u četiri prognostičke skupine: d) prognostički nepovoljna skupina (detalji u Tablici 10 i Tablici 11)

5. RASPRAVA

Akutne mijeloične leukemije pokazuju izuzetno veliku heterogenost kliničkih obilježja i bioloških obilježja leukemijskih stanica, odnosno blasta. Poznata prognostička obilježja leukemijskih stanica - broj leukocita u perifernoj krvi, razina serumske laktat dehidrogenaze, nalazi citogenetske i molekularne analize pri dijagnozi bolesti te postizanje kompletne remisije nakon prve indukcijske terapije – godinama su u službi hematologa kao pomoć pri odluci o odabiru terapijskog protokola, duljine i inteziteta liječenja.^{1-6,70-95} Budući da ispitivana obilježja mogu doprinjeti potpunijoj slici o naravi i prognozi bolesti, veliki se naponi ulažu u njihovoj svakodnevnoj i potpunijoj primjeni u cilju individualiziranog pristupa liječenju akutnih mijeloičnih leukemija. Upravo iz tih razloga se javlja i potreba za novim prognostičkim obilježjima koja će imati utjecaj na tijek i ishod bolesti, a time i odabir odgovarajućeg načina liječenja.

P-glikoprotein, njegova aktivnost i membranski izražaj općenito su povezivani sa slabijim odgovorom bolesnika na kemoterapiju i kraćim ukupnim preživljavanjem.^{20-25,119-125} Također, neke studije navode aktivaciju signalnih putova fosforilacijom kao statistički značajni faktor u procjeni uspjeha liječenja bolesnika s AML.^{34,45-47} Međutim, postoje radovi kojima pokazuju upravo suprotno.³³ Cilj ovog istraživanja bio je ispitati izražaj i aktivnost proteina kemorezistencije P-gp i aktivaciju molekula signalnih putova Akt, ERK1/2 i p38 u blastima AML i njihovu povezanost s poznatim prognostičkim kliničkolaboratorijskim obilježjima AML na kohorti od 118 neselekcioniranih bolesnika s AML liječenih u KBC Zagreb u periodu od 35 mjeseci (rujan 2009-kolovoz 2012).

Izražaj i aktivnost P-gp povezani su s drugim prognostički važnim čimbenicima AML. U prvom redu to je povezanost izražaja i aktivnosti P-gp s dobi bolesnika, brojem leukocita i eritrocita u krvi, ali i duljinom ukupnog preživljavanja i preživljavanja bez znakova bolesti. Upravo prethodni rezultati dodatno potvrđuju važnost određivanja izražaja i aktivnosti P-gp u uzorcima akutnih mijeloičnih leukemija i potvrđuju status P-gp kao prognostičkog markera. Uz to, poznato je da AML sa znacima mijelodisplazije imaju lošiji tijek i ishod⁴, odnosno da pripadaju skupini visokog rizika. Na temelju ovog istraživanja može zaključiti da je najjača aktivnost P-gp povezana s podskupinom AML koja nastaje iz mijelodisplazije (MDS), što također govori u prilog prognostičkog značaja P-gp.

Kao i u prethodno objavljenim radovima, ovo istraživanje je dodatno potvrdilo jaču aktivnost P-gp u određenim citološkim kategorijama AML, a to se primarno odnosi na vrlo nezrele oblike AML (minimalno diferenciranu AML i AML bez sazrijevanja).^{1-4,21,22} S druge strane, monoblastne/monocitne AML imaju najmanju aktivnost ovog transportnog proteina. Ovaj rezultat, ali i rezultati povezanosti imunofenotipskih karakteristika blasta i P-gp primarno svjedoče o prirodi blasta na kojima nalazimo aktivni P-gp. U kohorti bolesnika uključenih u ovu studiju leukemijske stanice koje izražavaju CD34, TdT i CD19, dakle vrlo nezreli („*stem-like*“) fenotip uz znakove koekspresije limfoidnih biljega imaju značajno veću razinu aktivnosti P-gp. To je u skladu s literaturnim navodima koji pokazuju da hematopoetske matične stanice izražavaju aktivni P-gp kao zaštitu od toksina.¹² Sukladno tome, leukemijske stanice koje su izrazito nezrele i nediferencirane zadržavaju jaku aktivnost P-gp transportera, dok zreliji i diferenciraniji oblici, a posebice promijelocitni i monocitni/monoblastni gube izražaj membranskog P-gp.^{5,6,25,117,118}

Primjenom Coxovog regresijskog modela P-glikoprotein se pokazao kao nezavisni prognostički faktor za ukupno preživljavanje bolesnika, ali ne i preživljavanje bez znakova bolesti. Bolesnici s većom transportnom aktivnosti medijatora kemorezistencije P-gp imaju kraće očekivano ukupno preživljavanje. Metoda Kaplan-Meier kao procjenitelj funkcije preživljavanja u skupini bolesnika liječenih kemoterapijom (uz isključenje bolesnika liječenih palijativno) pokazuje kraće ukupno preživljavanje bolesnika koji na membrani leukemijskih stanica imaju izražen aktivni P-gp (vrijednost aktivnosti $\geq 2,44$ na protočnoj citometriji) u odnosu na bolesnike s vrijednošću P-gp aktivnosti $< 2,44$ (aritmetičke sredina).

Budući da aktivnost P-gp korelira s izražajem tog proteina na membrani, bolesnici liječeni kemoterapijom čiji blasti pokazuju izražaj P-gp \geq od aritmetičke sredine ($\bar{X}=0,16$) imaju statistički značajno kraće ukupno preživljavanje. Izražaj i aktivnost P-gp nemaju utjecaj na preživljavanje bez znakova bolesti pri analizi s metodom Kaplan-Meier. Treba naglasiti da je granica razdvajanja kod analize krivulja preživljavanja metodom Kaplan-Meier izabrana koristeći aritmetičku sredinu, te da je moguće da postoji i granica kod koje bi postojala statistički značajna razlika. Ova studija stoga potvrđuje rezultate drugih objavljenih znanstvenih radova^{20-25, 119-125} o značajnosti P-gp kao varijable s utjecajem na tijek i ishod bolesti.

Iako je P-gp povezivan s odgovorom na terapiju^{119,120}, ovo istraživanje nije pokazalo povezanost P-gp s postizanjem kompletne remisije nakon prve indukcijske terapije.

Signalni putovi imaju veoma važnu ulogu u brojnim staničnim procesima. Poremećaj stanične signalizacije i konstitutivna aktivacija pojedinih signalnih putova može biti čimbenik koji doprinosi malignoj transformaciji i leukemogenezi.²⁶⁻³⁴ Ispitivanjem statusa fosforiliranosti triju molekula (Akt, ERK1/2 i p38) koje su integralni dijelovi dva različita signalna puta (PI3K/Akt i MAPK) ovim se istraživanjem htjelo dobiti uvid u potencijalnu prognostičku važnost aktiviranih signalnih putova u seriji bolesnika s AML. Tim više jer su podaci iz dostupne literature u najmanju ruku nedorečeni i dvosmisleni, pa tako znanstvenici zastupaju potpuno oprečna mišljenja.^{33,34} Drugim riječima, nema konsenzusa predstavlja li fosforilacija/aktivacija signalnih putova prognostički povoljnu ili nepovoljnu karakteristiku.

Metodom primjenjenom u ovom radu (D-vrijednosti na protočnoj citometriji), nalaz konstitutivne fosforilacije molekula Akt, ERK1/2 i p38 je su u skladu s literaturnim podacima u pogledu frekvencije pozitivnih nalaza.^{30,33,34} Ono što je od posebnog interesa jest njihov prognostički značaj. U ovom istraživanju univarijatna analiza metodom Kaplan-Meier ne pokazuje utjecaj fosforilacije/aktivacije niti jednog od ispitivanih putova na ukupno preživljavanje bolesnika, ali je ipak uočen trend kraćeg preživljavanja bez znakova bolesti za one bolesnike koji imaju konstitutivno fosforiliranu/aktiviranu molekulu p38 signalnog puta MAPK. Vjerojatni razlog toj pojavi jest analiza kategoričkih varijabli (pozitivno vs. negativno), a ne kontinuirane varijable, tj. njezine kvantitativne vrijednosti.

S druge strane, Coxov regresijski model (multivarijatna analiza) uzima kontinuirane numeričke vrijednosti ispitivanih parametara. Model za ukupno preživljavanje izdvaja aktivaciju molekule ERK1/2 kao povoljni nezavisni prognostički pokazatelj leukemijskih stanica te jaku aktivnost P-glikoproteina kao nepovoljni nezavisni prognostički pokazatelj leukemijskih stanica. Model Coxove regresije za preživljavanje bez znakova bolesti pokazuje da je fosforilacija/aktivacija molekule ERK1/2 i dalje povoljan nezavisni prognostički pokazatelj u AML, dok aktivnost P-gp gubi prognostički značaj. Nadalje, Coxov regresijski model za predviđanje duljine ukupnog preživljavanja bolesnika s AML nalazi fosforilaciju/aktivaciju molekule Akt kao nepovoljni nezavisni prognostički čimbenik, što potvrđuje rezultate Gallaya i suradnika.³⁴ U istoj studiji univarijatnom analizom pokazano je da fosforilacija molekule Akt na aminokiselini treonin (Thr308) rezultira kraćim ukupnim i preživljavanjem bez znakova bolesti. Multivarijatna analiza, međutim, nije izdvojila razinu fosforilacije treonina 308 kao nezavisni prediktor preživljavanja bolesnika s AML. Naprotiv, fosforilacija molekule Akt na aminokiselini serin (Ser473) ne

pokazuje statistički značajan utjecaj na tijek i ishod bolesti u univarijatnoj i multivarijatnoj statističkoj analizi. Druga skupina istraživača³¹ utvrdila je kraće ukupno preživljavanje za bolesnike čije leukemijske stanice pokazuju veću razinu fosforilacije molekule Akt na obje aminokiseline (Thr308 i Ser473). Međutim rezultat je bio statistički značajan samo univarijntnom, ali ne i multivarijatnom analizom. Studija provedena u svrhu izrade ovog doktorata pokazala je multivarijatnom statističkom analizom Coxovom regresijom značajno kraće ukupno preživljavanje za bolesnike s većom razinom fosforilacije molekule Akt na aminokiselini treonin 308, dok dulje ukupno preživljavanje i preživljavanje bez znakova bolesti imaju bolesnici s većom razinom fosforilacije molekule ERK1/2. Kako u ovoj studiji nije ispitana fosforilacija serina 473 molekule Akt, nije moguće izvesti zaključke o njenom potencijalnom prognostičkom značaju, te utvrditi prirodu odnosa između dva fosforilacijska događaja bitnih za aktivaciju molekule Akt signalnog puta PI3K.

Međutim, važno je naglasiti rezultat ovog istraživanja o statistički značajnom sinergističkom utjecaju, odnosno interakciji između aktivnosti P-gp i fosforilacije/aktivacije molekule Akt, za predviđanje kraćeg ukupnog preživljavanja bolesnika Coxovim regresijskim modelom. Ovaj tip multivarijatne statističke analize otkriva dodatnu vrijednost određivanja navedenih parametara kod novootkrivenih AML, gdje nam njihov specifični međuodnos daje više informacija o tijeku i ishodu bolesti u usporedbi s univarijatnom analizom svake varijable zasebno.

U ovom istraživanju aktivacija molekule ERK1/2 predstavlja prognostički nezavisni povoljan čimbenik što se ne slaže s nekim literaturnim navodima. Da bismo potvrdili ovaj nalaz i dodatno utvrdili razloge tome, trebalo bi sprovesti prospektivnu studiju u kojoj bi se detaljno analizirale ciljne molekule ovog puta prijenosa signala. Molekula ERK1/2 ima cijeli niz ciljnih molekula koje imaju najrazličitije uloge u staničnim procesima.^{29,30} Utvrđivanjem tih molekula i procesa koji se odvijaju posljedično potencijalno bi se moglo razjasniti u kojim slučajevima aktivacija ERK1/2 molekule uvjetuje bolju, a u kojim lošiju prognozu. U tom je smislu pokazano da fosforilacija molekule ERK1/2 u staničnim linijama AML pozitivno regulira indukciju apoptoze¹⁵⁵ i diferencijacije.¹⁵⁶ Van konteksta hematoonkoloških bolesti, aktivacija molekule ERK1/2 signalnog puta MAPK povezana je s povoljnom prognozom u žena s karcinomom dojke¹⁵⁷ i muškaraca s rakom prostate.¹⁵⁸

O prognostičkom značaju aktivacije molekule Akt dodatno govori informacija da bolesnici koji su u trenutku zaključivanja studije bili živi imaju nižu razinu fosforilacije molekule Akt. Drugim

riječima, preminuli bolesnici su u trenutku postavljanja dijagnoze u leukemijskim stanicama imali statistički značajno veću razinu aktivacije signalnog puta PI3K/Akt što govori u prilog nepovoljnog utjecaja na ishod bolesti. Ovom studijom pokazan je utjecaj aktivacije PI3K/Akt signalnog puta na ukupno preživljavanje, ali ne i na preživljavanje bez znakova bolesti metodom Coxove regresije. Nadalje, korelacijski testovi utvrdili su statistički značajnu negativnu korelaciju duljine ukupnog preživljavanja i preživljavanja bez znakova bolesti s razinom fosforilacije molekule Akt.

O važnosti određivanja statusa fosforilacije signalnih putova dodatno govore rezultati kojima se očituje ovisnost između razine aktivacije pojedinih molekula i drugih, dobro poznatih, prognostičkih varijabli u AML. Zanimljivo je što razina serumske LDH pozitivno korelira s aktivacijom svih ispitivanih signalnih molekula pri dijagnozi. LDH kao mjera opterećenja tumorskom masom predstavlja važan prognostički indikator, a prirodu ove ovisnosti s Akt, ERK1/2 i p38 trebalo bi daljnje ispitati. Aktivacija pojedinih signalnih putova povezuje se s većim proliferativnim potencijalom malignih stanica, stoga je ovo jedno od mogućih objašnjenja ovog fenomena.^{35,41,42}

Veoma zanimljiv rezultat je svakako i statistički značajna pozitivna korelacije između razine fosforilacije dva ispitivana signalna puta - molekula Akt i p38. Priroda ovog odnosa može svjedočiti o potencijalnom sinergističkom djelovanju i međusobnoj koaktivaciji dvaju signalnih putova. Mogući mehanizam takvog djelovanja podrazumijevao bi postojanje zajedničke uzvodne molekule ili receptora koji aktiviraju i prenose informaciju na oba signalna puta. Koaktivacija Akt i p38 molekula u AML nije do sada opisana u literaturi i predstavlja potencijal za ispitivanje učinka istovremene inhibicije PI3K/Akt i MAPK putova prijenosa signala. Za potpuno razumijevanje uzroka i posljedica ovog rezultata daljnja ispitivanja su nužna.

Literatura navodi potencijalni utjecaj aktivacije signalnih putova na izražaj i aktivaciju proteina uključenih u razvoj višestruke otpornosti na lijekove. Obzirom da su Tazzari *et al.*⁴⁸ pokazali da je izražaj MRP1 proteina pod kontrolom signalnog puta PI3K/Akt, jedan od ciljeva ovog istraživanja bio je testiranje hipoteze o kontroli izražaja P-gp od strane PI3K/Akt i/ili MAPK-signalnih putova. Korelacija izražaja i aktivnosti medijatora kemorezistencije P-gp i molekula signalnih putova Akt i ERK1/2 nije dosegla razinu statističke značajnosti. Međutim, postoji statistički značajna negativna korelacija između fosforilacije/aktivacije molekule p38 i aktivnosti P-gp. Jedan od mogućih razloga ove pojave može biti postojanje kontrole izražaja i aktivnosti P-

gp od strane molekule p38. Ovdje bi se, dakako, radilo o negativnoj povratnoj sprezi, u kojoj inhibicija fosforilacije/aktivacije signalne molekule omogućuje izražaj aktivnog P-gp. Sam mehanizam inhibicije i nizvodne molekule uključene u prijenos signala, s podacima koji su trenutno na raspolaganju nije moguće definirati. Određenoj vezi aktivnosti P-gp i aktivacije ERK1/2 i Akt molekula svjedoči i Coxov regresijski model koji nalazi navedene tri varijable statistički značajnima i neovisnim prediktorima za predviđanje duljine ukupnog preživljavanja bolesnika. Uz to, kao što je prethodno već opisano, u multivarijatnoj analizi Coxovim regresijskim modelom, interakcija aktivnosti P-gp i razine fosforilacije Akt molekule ima značajnu ulogu u predviđanju duljine ukupnog preživljavanja bolesnika.

Glede nalaza mutacije *FLT-ITD*, ovo istraživanje je pokazalo statistički značajnu povezanost te mutacije s brojem leukocita u krvi pri postavljanju dijagnoze, čime su potvrđeni rezultate drugih studija⁹⁴⁻¹⁰⁵, ali nije nađena povezanost mutacije *FLT3-ITD* s konstitutivnom fosforilacijom/aktivacijom niti jednog od ispitivanih signalnih putova. Stoga se može zaključiti da leukemijske stanice bolesnika s AML ne koriste PI3K/Akt i MAPK za prijenos signala od genetički promijenjenog FLT-receptora. Bitno je naglasiti da je analiza mutacije *FLT3-ITD* učinjena u svega 49% uzoraka, stoga je ovaj rezultat moguće objasniti i relativno malenim brojem ispitanih bolesnika.

Rezultati ovog istraživanja koji su se pokazali statistički značajni za opis i/ili prognozu bolesti, ali koji nisu izravno vezani za P-gp i signalne putove PI3K/Akt i MAPK samo dodatno potvrđuju dosadašnje rezultate mnogih istraživanja AML.⁶⁹⁻⁹¹ Iako se radi o podacima na manjem broju ispitanika (n=118), potvrđena je prediktivna i prognostička važnost postizanja kompletne remisije nakon prve indukcijske terapije za ukupno preživljavanje i preživljavanje bez znakova bolesti. Nadalje, pokazano je da su bolesnici koji su u vrijeme zaključivanja studije bili živi bili statistički značajno mlađe dobi, imali značajno niži broj leukocita i nižu razinu serumske LDH pri postavljanju dijagnoze, kao i dulje ukupno preživljavanje i preživljavanje bez znakova bolesti. Duljina ukupnog preživljavanja bolesnika pokazala je ovisnost o dobi, broju leukocita i trombocita u krvi i razini serumske LDH, a duljina preživljavanja bez znakova bolesti o broju leukocita u krvi, razini serumske LDH i duljini ukupnog preživljavanja. Naposljetku, duljina ukupnog preživljavanja bolesnika ovisna je o pripadnosti bolesnika određenoj rizičnoj skupini temeljem nalaza citogenetičke analize.

Zaključno, određivanjem izražaja i aktivnosti P-gp i konstitutivne aktivacije signalnih putova PI3K/Akt i MAPK u blastima akutnih mijeloičnih leukemija dodatno je pokazana biološka i kliničkolaboratorijska složenost i heterogenost ove zloćudne bolesti. Za očekivati je da će daljnja karakterizacija leukemijskih stanica na proteinskoj i genetskoj razini, a posebice analiza mutacija gena novim tehnologijama (kao npr. sekvencioniranje cijelog genoma) omogućiti bolju stratifikaciju bolesnika u rizične i prognostičke skupine, a time i individualizirani pristup terapiji.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovi rezultata provedenog istraživanja može se zaključiti slijedeće:

1. P-gp je izražen na leukemijskim stanicama u 34%, a aktivan je u 25% bolesnika s AML;
2. izražaj i aktivnost P-glikoproteina povezani su s poznatim prognostičkim čimbenicima AML: dobi bolesnika i brojem leukocita pri dijagnozi, imunofenotipski (CD34, TdT i CD19) i citomorfološki nezreljim oblicima AML, kao i s kraćim ukupnim preživljavanjem i preživljavanjem bez znakova bolesti;
3. Kaplan-Meierovim krivuljama preživljavanja izražaj i aktivnost P-glikoproteina predstavljaju prognostičke čimbenike za kraće ukupno preživljavanje bolesnika s AML;
4. konstitutivna fosforilacija/aktivacija molekula signalnih putova Akt, ERK1/2 i p38 nađena je u 48%, 39% i 44% bolesnika s akutnom mijeloičnom leukemijom;
5. razina konstitutivne fosforilacije molekule Akt signalnog puta Akt/PI3K korelira s razinom fosforilacije molekule p38 signalnog puta MAPK što ukazuje na potencijalnu komunikaciju ovih putova prijenosa signala u AML;
6. razina konstitutivne fosforilacije/aktivacije molekule Akt korelira s razinom LDH u serumu i kraćim ukupnim preživljavanjem i preživljavanjem bez znakova bolesti, razina fosforilacije molekule ERK1/2 sa serumskom razinom LDH i mlađom dobi bolesnika, a razina fosforilacije molekule p38 sa serumskom razinom LDH, brojem eritrocita u krvi pri postavljanju dijagnoze AML i negativno s razinom aktivnosti P-gp;
7. razina konstitutivne fosforilacije molekule Akt u multivarijatnoj analizi je negativan nezavisni prognostički prediktor za duljinu ukupnog preživljavanja bolesnika, a razina fosforilacije molekule ERK1/2 je pozitivan nezavisni prognostički prediktor za duljinu ukupnog preživljavanja i preživljavanja bez znakova bolesti. Pri tome je interakcija i sinergistički utjecaj aktivnosti P-gp i razine fosforilacije molekule Akt važan prediktor duljine ukupnog preživljavanja bolesnika s AML;
8. u multivarijatnoj analizi, citogenetički nalaz, postizanje kompletne remisije nakon prve indukcijske terapije, dob bolesnika i razina konstitutivne fosforilacije molekule ERK1/2 najvažniji su nezavisni prognostički prediktori za preživljavanje bez znakova bolesti u ispitivanoj skupini bolesnika. Broj leukocita u krvi, citogenetički nalaz, postizanje kompletne remisije nakon prve indukcijske terapije, spol bolesnika, razine aktivnosti P-

gp i konstitutivne fosforilacije molekula Akt i ERK1/2 najvažniji su nezavisni prognostički prediktori za ukupno preživljavanje u ispitivanoj skupini bolesnika.

7. SAŽETAK

Akutna mijeloična leukemija (AML) jest heterogena skupina malignih klonskih bolesti krvotvornog sustava koje nastaju malignom transformacijom mijeloidnih progenitorskih stanica zbog oštećenja kromosoma ili mutacije gena. Specifične citogenetičke promjene i nalaz specifičnih mutacija danas predstavljaju glavne prognostičke čimbenike i temelj suvremene klasifikacije AML. Međutim, budući da se u značajnog broja bolesnika s AML navedene promjene ne nalaze, to znanstvenicima pruža prostora za istraživanje drugih još uvijek nepoznatih gena i biološki relevantnih obilježja leukemijskih stanica u cilju što bolje terapijske i prognostičke stratifikacije bolesnika. Sukladno tome, u ovom su radu ispitani izražaj i aktivnost medijatora kemorezistencije P-glikoproteina (P-gp) te razina fosforilacije unutarcitoplazmatskih signalnih molekula Akt, ERK1/2 i p38 u blastima bolesnika s novootkrivenom AML metodom protočne citometrije. Specifični ciljevi rada bili su analizirati navedena obilježja leukemijskih stanica u odnosu na poznate prognostičke kliničko-laboratorijske parametre bolesnika s AML, njihovu međusobnu povezanost kao i njihov potencijalni prognostički utjecaj na preživljavanje bolesnika s AML. Istraživanjem je pokazan izražaj P-gp na blastima 34%, a aktivnost u blastima 25% bolesnika s AML. Potvrđeno je da izražaj i aktivnost P-gp koreliraju sa starijom dobi, većim brojem leukocita pri dijagnozi, izražajem nezrelih biljega (CD34 i TdT) i citomofološki nezreljim oblicima AML te da predstavljaju prognostičke čimbenike za kraće ukupno preživljavanje. Konstitutivna fosforilacija Akt signalnog puta PI3K/Akt nađena je u blastima 48% bolesnika, a signalnog puta MAPK u 39% (ERK1/2), odnosno 44% (p38) bolesnika, pri čemu nalaz fosforilacije Akt korelira s nalazom fosforilacije molekule p38, ali ne i molekule ERK1/2. Konstitutivna fosforilacija Akt, ERK1/2 i p38 u blastima korelira s pokazateljem tumorske mase – serumskim LDH pri dijagnozi, fosforilacija Akt s ukupnim preživljavanjem i preživljavanjem bez znakova bolesti, fosforilacija ERK1/2 s mlađom dobi bolesnika, a fosforilacija p38 s brojem eritrocita pri dijagnozi. Štoviše, nađena je i negativna korelaciju između razine fosforilacije p38 i aktivnosti P-gp u blastima AML što bi indirektno moglo govoriti u prilog potencijalne uloge p38 u regulaciji P-gp. U multivarijatnoj analizi s pomoću Coxovog regresijskog modela pokazano je da je aktivnost P-gp nezavisni negativni prediktor za ukupno preživljavanje bolesnika, fosforilacija ERK1/2 nezavisni pozitivni prediktor za ukupno preživljavanje i preživljavanje bez pojave bolesti, a fosforilacija Akt nezavisni negativni prediktor za ukupno preživljavanje bolesnika. To govori u prilog da aktivnost P-gp i razina

konstitutivne fosforilacije signalnih putova Akt i ERK1/2 u kombinaciji s poznatim kliničko-laboratorijskim čimbenicima bi mogli predstavljati dodatne parametre za prognostičku stratifikaciju bolesnika s AML.

8. SUMMARY

Acute myeloid leukemia (AML) is a heterogeneous group of malignant clonal disorders of the hematopoietic system originating from malignant transformation of the myeloid precursor cell due to chromosome alterations or gene mutations. Cytogenetic rearrangements and specific mutations are the most important prognostic factors and form the basis for latest AML classification system. Nevertheless, since genetic alterations are not present in a significant number of AML patients, it provides space for scientists to investigate other biological characteristics of leukemic cells with the ultimate goal of improvement of patients' risk stratification and treatment regimens. Accordingly, this study investigated the expression and activity level of chemotherapy resistance mediator P-glycoprotein (P-gp), as well as the phosphorylation level of intracytoplasmic signalling molecules Akt, ERK1/2 and p38 in leukemic blasts of patients with *de novo* AML by flow cytometry. Specific objectives of the study were to analyze those leukemic cells' features in relation to the known prognostic clinical and laboratory parameters of patients with AML, their interconnection as well as their potential prognostic impact on the survival of patients with AML. This research showed P-gp expression in 34% and its activity in 25% of AML patients. It was confirmed that the expression and activity of P-gp correlated with older age, higher number of leukocytes, immature cell markers expression (CD34 and TdT) and cytomorphologically immature AMLs, and that they represent unfavourable prognostic factors for overall survival. Constitutive phosphorylation of Akt molecule of the PI3K signalling pathway was found in 48%, while MAPK signalling pathway was activated in 39% (ERK1/2) and 44% (p38) of all tested AML samples, respectively. Significant correlation was found between Akt and p38 phosphorylation levels, but not with the ERK1/2 molecule. Serum lactat-dehydrogenase (LDH) level, an indicator of tumor burden, correlated with the phosphorylation levels of all three signalling molecules. In addition, Akt phosphorylation correlated with overall survival and relapse-free survival, ERK1/2 with younger patient age, while p38 correlated with the number of red blood cells at diagnosis of AML. Moreover, negative correlation was found between levels of p38 phosphorylation and P-gp activity in AML, indicating a possible role of p38 in P-gp regulation. Multivariate Cox regression analysis showed that P-gp activity and Akt phosphorylation are independent negative predictors of overall survival, while phosphorylation of ERK1/2 is an independent positive predictor of overall survival and disease free survival of AML patients. This P-gp activity and level of constitutive

phosphorylation of the signalling pathways molecules in combination with other previously established clinical and laboratory features could represent additional parameters for the prognostic stratification of patients with AML.

9. LITERATURA

1. Labar B, Hauptman E i sur. Hematologija. 4. izdanje. Zagreb, Hrvatska. Školska knjiga, d.d.; 2007.
2. Smith M, Barnett M, Bassan R, Gatta G, Tondini C, Kern W. Adult acute myeloid leukemia. Crit Rev Oncol Hematol. 2004; 50(3):197-222.
3. Rowe JM. Clinical progress in acute myeloid leukemia. Preface. Best Pract Res Clin Haematol. 2008; 21(4):597-9.
4. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW, urednici. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. 4. izdanje. Lyon, Francuska. International agency for research on cancer (IARC); 2008.
5. Mrozek K, Heerema NA, Bloomfield CD. Cytogenetics in acute leukemia. Blood Rev. 2004; 18(2):115-36.
6. Grimwade D. The clinical significance of cytogenetic abnormalities in acute myeloid leukemia. Best Pract Res Clin Haematol. 2001; 14(3):497-529.
7. Bodor M, Kelly EJ, Ho RJ. Characterization of the human *MDR1* gene. AAPS J. 2005; 7(1):E1-5.
8. Hamada H, Tsuruo T. Purification of the 170- to 180-kilodalton membrane glycoprotein associated with multidrug resistance- 170- to 180-kilodalton membrane protein is an ATPase. J Biol Chem. 1998; 263(3):1454-8.
9. Cordon-Cardo C, O'Brien JP, Casalas D, Rittman-Grauer L, Biedler JL, Melamed MR, Bertino JR. Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. Proc Natl Acad Sci USA. 1989; 86(2):695-8.
10. Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, Gottesman MM, Pastan I, Willingham MC. Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. Proc Natl Acad Sci USA. 1987; 84(21):7735-8.

11. Chaudhary PM, Mechetner EB, Roninson IB. Expression and activity of the multidrug-resistance P-glycoprotein in human peripheral blood lymphocytes. *Blood*. 1992; 80(11):2735-9.
12. Chaudhary PM, Roninson IB. Expression and activity of P-glycoprotein, a multidrug efflux pump, in human hematopoietic stem cells. *Cell*. 1991; 66(1):85-94.
13. Arceci RJ, Croop JM, Horowitz SB, Housman D. The gene encoding multidrug resistance is induced and expressed at high levels during pregnancy in the secretory epithelium of the uterus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1988; 85(12):4350-4.
14. Hamada H, Tsuruo T. Characterization of the ATPase activity of the Mr 170,000 to 180,000 membrane glycoprotein (P-glycoprotein) associated with multidrug resistance in K562/ADM cells. *Cancer Res*. 1988; 48(17):4926-32.
15. Gottesman MM, Pastan I. The multidrug transporter, a double-edged sword. *J Biol Chem*. 1988; 263(25):12163-6.
16. Endicott JA, Ling V. The biochemistry of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Annu Rev Biochem*. 1989; 58:137-71.
17. Ueda K, Cardarelli C, Gottesman MM, Pastan I. Expression of a full-length cDNA for the human „MDR1“ gene confers resistance to colchicine, doxorubicin, and vinblastine. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987; 84(9):3004-8.
18. Horowitz SB, Cohen D, Rao S, Ringel I, Shen HJ, Yang CP. Taxol: mechanisms of action and resistance. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 1993; (15):55-61.
19. Beck WT, Qian XD. Photoaffinity substrates for P-glycoprotein. *Biochem Pharmacol*. 1992; 43(1):89-93.
20. Borg AG, Burgess R, Green LM, Scheper RJ, Yin JA. Overexpression of lung-resistance protein and increased P-gp function in acute myeloid leukemia cells predict a poor response to chemotherapy and reduced patient survival. *Br J Haematol*. 1998; 103(4):1083-91.

21. Nussler V, Pelka-Fleischer R, Zwierzina H, Nerl C, Beckret B, Giesler F, Diem H, Ledderose G, Gullis E, Sauer H, Wilmanns W. P-glycoprotein expression in patient with acute leukemia – clinical relevance. *Leukemia*. 1996; 10(Suppl. 3):S23-S31.
22. Zhou DC, Zittoun R, Marie JP. Expression of multidrug resistance associated protein (MRP) and multidrug resistance (MDR1) genes in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 1995; 9(10):1661-6.
23. Takeshita A, Shinjo K, Ohnishi K, Ohno R. Expression of multidrug resistance P-glycoprotein in myeloid progenitor cells of different phenotype: comparison between normal bone marrow cells and leukaemia cells. *Br J Haematol*. 1996; 93(1):18-21.
24. Varma MV, Ashokraj Y, Dey CS, Panchagnula R. P-glycoprotein inhibitors and their screening: a perspective from bioavailability enhancement. *Pharmacol Res*. 2003; 48(4):347-59.
25. Benderra Z, Faussat AM, Sayada L, Perrot JY, Tang R, Chaoui D, Morjani H, Marzac C, Marie JP, Legrand O. MRP3, BCRP and P-glycoprotein activities are prognostic factors in adult acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res*. 2005; 11(21):7764-72.
26. Yuan TL, Cantley LC. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene*. 2008; 27(41):5497-510.
27. Martelli AM, Tazzari PL, Evangelisti C, Chiarini F, Blalock WL, Billi AM, Manzoli L, McCubrey JA, Cocco L. Targeting the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin module for acute myelogenous leukemia therapy: from bench to bedside. *Curr Med Chem*. 2007; 14(19):2009-23.
28. Sholl C, Gilliland DG, Frohling S. Deregulation of signaling pathways in acute myeloid leukemia. *Semin Oncol*. 2008; 35(4):336-45.
29. Steelman LS, Abrams SL, Whelan J, Bertrand FE, Ludwig DE, Basecke J, Libra M, Stivala F, Milella M, Tafuri A, Lunghi P, Bonati A, Martelli AM, McCubrey JA. Contributions of the Raf/MEK/ERK, PI3K/PTEN/Akt/mTOR and Jak/STAT pathways to leukemia. *Leukemia*. 2008; 22(4):686-707.

30. Towatari M, Iida H, Tanimoto M, Iwata H, Hamaguchi M, Saito H. Constitutive activation of mitogen-activated protein kinase pathway in acute leukemia cells. *Leukemia*. 1997; 11(4):479-484.
31. Min YH, Eom JI, Cheong JW, Maeng HO, Kim JY, Jeung HK, Lee ST, Hahn JS, Ko YW. Constitutive phosphorylation of Akt/PKB protein in acute myeloid leukemia: its significance as a prognostic variable. *Leukemia*. 2003; 17(5):995-7.
32. Tazzari PL, Cappellini A, Grafone T, Mantovani I, Ricci F, Billi AM, Ottaviani E, Conte R, Martinelli G, Martelli AM. Detection of serine 473 phosphorylated Akt in acute myeloid leukemia blasts by flow cytometry. *Br J Haematol*. 2004; 126(5):675-81.
33. Tamburini J, Elie C, Bardet V, Chapuis N, Park S, Broet S, Cornillet-Lefebvre P, Lioure B, Ugo V, Blanchet O, Ifrah N, Witz F, Dreyfus F, Mayeux P, Lacombe C, Bouscary D. Constitutive phosphoinositide 3-kinase/Akt activation represents a favorable prognostic factor in *de novo* acute myelogenous leukemia patients. *Blood*. 2007; 110(3):1025-8.
34. Gallay N, Dos Santos C, Cuzin L, Bousquet M, Simmonet Gouy V, Chaussade C, Attal M, Payrastre B, Demur C, Recher C. The level of AKT phosphorylation on threonine 308 but not on serine 473 is associated with high-risk cytogenetics and predicts poor overall survival in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2009; 23(6):1029-38.
35. Cantrell DA. Phosphoinositide 3-kinase signalling pathways. *J Cell Sci*. 2001; 114(Pt 8):1439-45.
36. Vanhaesebroeck B, Leever SJ, Ahmadi K, Timms J, Katso R, Driscoll PC, Woscholski R, Parker PJ, Waterfield MD. Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. *Annu Rev Biochem*. 2001; 70:535-602.
37. Franke TF. PI3K/Akt: getting it wright matters. *Oncogene*. 2008; 27(50):6473-88.
38. Brazil DP, Yang ZZ, Hemmings BA. Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts. *Trends Biochem Sci*. 2004; 29(5):233-42.
39. Liu P, Cheng H, Roberts TM, Zhao JJ. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov*. 2009; 8(8):627-44.

40. Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell*. 2007; 129(7):1261-74.
41. Xu Q, Simpson SE, Scialla TJ, Bagg A, Carroll M. Survival of acute myeloid leukemia cells requires PI3 kinase activation. *Blood*. 2003; 102(3):972-80.
42. Grandage VL, Gale RE, Linch DC, Khwaja A. PI3-kinase/Akt is constitutively active in primary acute myeloid leukaemia cells and regulates survival and chemoresistance via NF-kappaB, Mapkinase and p53 pathways. *Leukemia*. 2005; 19(4):586-94.
43. Muranyi AL, Dedhar S, Hogge DE. Combined inhibition of integrin linked kinase and Fms-like tyrosine kinase 3 is cytotoxic to acute myeloid leukemia progenitor cells. *Exp Hematol*. 2009; 37(4):450-60.
44. Brandts CH, Sargin B, Rode M, Biermann C, Lindtner B, Schwable J, Buerger H, Muller-Tidow C, Choudhary C, McMahon M, Berdel WE, Serve H. Constitutive activation of Akt by Flt3 internal tandem duplications is necessary for increased survival, proliferation, and myeloid transformation. *Cancer Res*. 2005; 65(21):9643-50.
45. Min YH, Cheong JW, Kim JY, Eom JI, Lee ST, Hahn JS, Ko YW, Lee MH. Cytoplasmic mislocalization of p27Kip1 protein is associated with constitutive phosphorylation of Akt or protein kinase B and poor prognosis in acute myelogenous leukemia. *Cancer Res*. 2004; 64(15):5225-31.
46. Kornblau SM, Womble M, Qiu YH, Jackson CE, Chen W, Konopleva W, Estey EH, Andreeff M. Simultaneous activation of multiple signal transduction pathways confers poor prognosis in acute myelogenous leukemia. *Blood*. 2006; 108(7):2358-65.
47. Kornblau SM, Tibes R, Qiu YH, Kantarjian HM, Andreeff M, Coombes KR, Mills GB. Functional proteomic profiling of AML predicts response and survival. *Blood*. 2009; 113(1):154-64.
48. Tazzari PL, Capellini A, Ricci F, Evangelisti C, Papa V, Grafone T, Martinelli G, Conte R, Cocco L, McCubrey JA, Martelli AM. Multidrug resistance-associated protein 1 expression is

under the control of phosphoinositide 3 kinase/Akt signal transduction network in human acute myelogenous leukemia blasts. *Leukemia*. 2007; 21(3):427-38.

49. Raman M, Chen W, Cobb MH. Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene*. 2007; 26(22):3100-12.

50. McCubrey JA, Steelman LS, Kempf CR, Chappell WH, Abrams SL, Stivala F, Malaponte G, Nicoletti F, Libra M, Basecke J, Maksimovic-Ivanic D, Mijatovic S, Montalto G, Cervello M, Cocco L, Martelli AM. Therapeutic resistance resulting from mutations in Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR signaling pathways. *J Cell Physiol*. 2011; 226(11):2762-81.

51. McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Wong EW, Chang F, Lehmann B, Terrian DM, Milella M, Tafuri A, Stivala F, Libra M, Basecke J, Evangelisti C, Martelli AM, Franklin RA. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta*. 2007; 1773(8):1263-84.

52. McCubrey JA, Steelman LS, Abrams SL, Bertrand FE, Ludwig DE, Basecke J, Libra M, Stivala F, Milella M, Tafuri A, Lunghi P, Bonati A, Martelli AM. Targeting survival cascades induced by activation of Raf/MEK/ERK, PI3K/PTEN/Akt/mTOR and Jak/STAT pathways for effective leukemia therapy. *Leukemia*. 2008; 22(4):708-22.

53. Franklin RA, Rodriguez-Mora OG, Lahair MM, McCubrey JA. Activation of the calcium/calmodulin-dependent protein kinases as a consequence of oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*. 2006; 8(9-10):1807-17.

54. Marais R, Light Y, Paterson HF, Marshal CJ. Ras recruits Raf-1 to the plasma membrane for activation by tyrosine phosphorylation. *EMBO J*. 1995; 14(13):3136-45.

55. Xu S, Robbins D, Frost J, Dang A, Lange-Carter C, Cobb MH. MEKK1 phosphorylates MEK1 and MEK2 but does not cause activation of mitogen-activated protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995; 92(15): 6808-12.

56. Derijard B, Raingeaud J, Barrett T, Wu IH, Han J, Ulevitch RJ, Davis RJ. Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms. *Science*. 1995; 267(5198):682-5.

57. Xing J, Ginty DD, Greenberg ME. Coupling of the RAS/MAPK pathway to gene activation by RSK2, a growth factor-regulated CREB kinase. *Science*. 1996; 273(5277):959-63.
58. Davis RJ. Transcriptional regulation by MAP kinases. *Mol Reprod Dev*. 1995; 2(4):459-67.
59. Kyriakis JM, Avruch J. Protein kinase cascades activated by stress and inflammatory cytokines. *Bioessays*. 1996; 18(7):567-77.
60. Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev*. 2001; 81(2):807-69.
61. Guo YL, Kang B, Williamson JR. Inhibition of the expression of the mitogen-activated protein phosphatase-1 potentiates apoptosis induced by tumor necrosis factor-alpha in rat mesangial cells. *J Biol Chem*. 1998; 273(17):10362-6.
62. Ono K, Han J. The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell Signal*. 2000; 12(1):1-13.
63. Adams RH, Porras A, Alonso G, Jones M, Vintersten K, Panelli S, Valladares A, Perez L, Klein R, Nebreda AR. Essential role of p38alpha MAP kinase in placental but not embryonic cardiovascular development. *Mol Cell*. 2000; 6(1):109-16.
64. Nagata Y, Moriguchi T, Nishida E, Todokoro K. Activation of p38 MAP kinase pathway by erythropoietin and interleukin-3. *Blood*. 2007; 90(3):929-34.
65. Verma A, Mohindru M, Deb DK, Sassano A, Kambhampati S, Ravandi F, Minucci S, Kalvakolanu DV, Plataniias LC. Activation of Rac-1 and the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in response to arsenic trioxide. *J Biol Chem*. 2002; 277(47):44988-95.
66. Katsoudilis E, Li Y, Mears H, Plataniias LC. The p38 mitogen-activated protein kinase pathway in interferon signal transduction. *J Interferon Cytokine Res*. 2005; 25(12):749-56.
67. Jacobs-Helber SM, Ryan JJ, Sawyer ST. JNK and p38 are activated by erythropoietin (EPO) but are not induced in apoptosis following EPO withdrawal in EPO-dependent HCD57 cells. *Blood*. 2000; 96(3):933-40.

68. Chang YI, Hua WK, Yao CL, Hwang SM, Hung YC, Kuan CJ, Leou JS, Lin WJ. Protein-arginine methyltransferase 1 suppresses megakaryocytic differentiation via modulation of the p38 MAPK pathway in K562 cells. *J Biol Chem.* 2010; 285(27):20595-606.
69. Hiddemann W, Kern W, Schoch C, Fonatsch C, Heinecke A, Wormann B, Buchner T. Management of acute myeloid leukemia in elderly patients. *J Clin Oncol.* 1999; 17(11):3569-76.
70. Appelbaum FR, Gundacker H, Head DR, Slovak ML, Wilman CL, Godwin JE, Anderson JE, Petersdorf SH. Age and acute myeloid leukemia. *Blood.* 2006; 107(9):3481-5.
71. Juliusson G, Antunovic P, Derolf A, Lehmann S, Mollgard L, Stockelberg D, Tidefelt U, Wahlin A, Hoglund M. Age and acute myeloid leukemia: real world data on decision to treat and outcomes from the Swedish acute leukemia registry. *Blood.* 2009; 113(18):4179-87.
72. Wheatley K, Brookes CL, Howman AJ, Goldstone AH, Milligan DW, Prentice AG, Moorman AV, Burnett AK. Prognostic factor analysis of the survival of the elderly patients with AML in MRC AML11 and LRF AML14 trials. *Br J Haematol.* 2009; 145(5):598-605.
73. Burnett AK, Hills RK, Milligan DW, Goldstone AH, Prentice AG, McMullin MF, Duncombe A, Gibson B, Wheatley K. Attempts to optimize induction and consolidation treatment in acute myeloid leukemia: results of the MRC AML12 trial. *J Clin Oncol.* 2009; 28(4):586-95.
74. Sekeres MA, Stone RM. The challenge of acute myeloid leukemia in older patients. *Curr Opin Oncol.* 2002; 14(1):24-30.
75. Dalley CD, Lillington DL, Bradburn M, Carter M, Ames JA, Rohatiner AZ, Lister TA. Acute myelogenous leukaemia in older patients at St Bartholomew's Hospital: outcome with mitoxantrone and cytarabine. *Hematol J.* 2002; 3(5):237-43.
76. Martin G, Barragan E, Bolufer P, Chillon C, Garcia-Sanz R, Gomez T, Brunet S, Gonzales M, Sanz MA. Relevance of presenting white blood cell count and kinetics of molecular remission in the prognosis of acute myeloid leukemia with CBFbeta/MYH11 rearrangement. *Haematologica.* 2000; 85(7):699-703.
77. Nguyen S, Leblanc T, Fenaux P, Witz F, Blaise D, Pigneux A, Thomas X, Rigal-Huguet F, Lioure B, Auvrignon A, Fiere D, Reiffers J, Castaigne S, Leverger G, Harousseau JL, Socie G,

Dombret H. A white blood cell index as the main prognostic factor in t(8;21) acute myeloid leukemia (AML): a survey of 161 cases from the French AML intergroup. *Blood*. 2002; 99(10):3517-23.

78. Dohner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Buchner T, Burnett AK, Dombret H, Fenaux P, Grimwade D, Larson RA, Lo-Coco C, Naoe T, Niederwieser D, Ossenkoppele GJ, Sanz MA, Sierra J, Tallman MS, Lowenberg B, 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(3):453-74.

79. Larson RA. Is secondary leukemia an independent poor prognostic factor in acute myeloid leukemia? *Best Pract Res Clin Haematol*. 2007; 20(1):29-37.

80. Grimwade D, Walker H, Oliver F, Wheatley K, Harrison C, Harrison G, Rees J, Hann I, Stevens R, Burnett A, Goldstone A. The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. *Blood*. 1998; 92(7):2322-33.

81. Grimwade D, Walker H, Harrison G, Oliver F, Chatters S, Harrison CJ, Wheatley K, Burnett A, Goldstone A. The predictive value of hierarchical cytogenetic classification in older adults with acute myeloid leukemia (AML): analysis of 1065 patients entered into the United Kingdom Medical Research Council AML11 trial. *Blood*. 2001; 98(5):1312-20.

82. Smith ML, Hills RK, Grimwade D. Independent prognostic variables in acute myeloid leukaemia. *Blood Rev*. 2011; 25(1):39-51.

83. Slovak ML, Gundacker H, Bloomfield CD, Dewald G, Appelbaum FR, Larson RA, Tallman MS, Bennett JM, Stirewalt DL, Meshinchi S, Willman CL, Ravindranath Y, Alonzo TA, Carroll AJ, Raimondi SC, Heerema NA. A retrospective study of 69 patients with t(6;9)(p23;q34) AML emphasizes the need for a prospective, multicenter initiative for rare „poor prognosis“ myeloid malignancies. *Leukemia*. 2006; 20(7):1295-7.

84. Soupir CP, Vergilio JA, Dal Cin P, Muzikanski A, Kantarijan H, Jones D, Hasserrjian RP. Philadelphia chromosome-positive acute myeloid leukemia: a rare aggressive leukemia with

clinicopathological features distinct from chronic myeloid leukemia in myeloid blast crisis. *Am J Clin Pathol.* 2007; 127(4):642-50.

85. Nahi H, Lehmann S, Bengtzen S, Jansson M, Mollgard L, Paul C, Merup M. Chromosomal aberrations in 17p predict in vitro drug resistance and short overall survival in acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2008; 49(3):508-16.

86. Grimwade D. Impact of cytogenetics on clinical outcome in AML. U: Karp JE, ur. *Acute myelogenous leukemia.* Totowa, NJ: Humana Press; 2007, str. 177-92.

87. Breems DA, Van Putten WL, De Greef GE, Van Zelderren-Bhola SL, Gerssen-Schoorl KB, Mellink CH, Nieuwint A, Jotterand M, Hagemeyer A, Beverloo HB, Lowenberg B. Monosomal karyotype in acute myeloid leukemia: a better indicator of poor prognosis than a complex karyotype. *J Clin Oncol.* 2008; 26(29):4791-7.

88. Breems DA, Lowenberg B. Acute myeloid leukemia with monosomal karyotype at the far end of the unfavorable prognostic spectrum. *Haematologica.* 2011; 96(4):491-3.

89. Dohner K, Dohner H. Molecular characterization of acute myeloid leukemia. *Haematologica.* 2008; 93(7):976-82.

90. Mrozek K, Dohner H, Bloomfield CD. Influence of new molecular prognostic markers in patients with karyotypically normal acute myeloid leukemia: recent advances. *Curr Opin Hematol.* 2007; 14(2):106-14.

91. Schlenk RF, Dohner K, Krauter J, Frohling S, Corbacioglu A, Bullinger L, Habdank M, Spath D, Morgan M, Benner A, Schlegelberger B, Heil G, Ganser A, Dohner H. Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N Eng J Med.* 2008; 358(18):1909-18.

92. Yamamoto Y, Kiyoi H, Nakano Y, Suzuki R, Kadera Y, Miyawaki S, Asou N, Kuriyama K, Yagasaki F, Shimazaki C, Akiyama H, Saito K, Nishimura M, Motoji T, Shinagawa K, Takeshita A, Saito H, Ueda R, Ohno R, Naoe T. Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. *Blood.* 2001; 97(8):2434-9.

93. Abu-Duhier FM, Goodeve AC, Wilson GA, Care RS, Peake IR, Reilly JT. Identification of novel FLT-3 Asp835 mutations in human acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol.* 2001; 113(4):983-8.
94. 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(4):1262-70.
95. Noguera NI, Breccia M, Divona M, Diverio D, Costa V, De Santis S, Awisati G, Pinazzi MB, Petti MC, Mandelli F, Lo Coco F. Alternations of the FLT3 gene in acute promyelocytic leukemia: association with diagnostic characteristics and analysis of clinical outcome in patients treated with Italian AIDA protocol. *Leukemia.* 2002; 16(11):2185-9.
96. Gale RE, Hills R, Pizzey AR, Kottaridis PD, Swirsky D, Gilkes AF, Nugent E, Mills KI, Wheatley K, Solomon E, Burnett AK, Linch DC, Grimwade D. Relationship between FLT3 mutation status, biologic characteristics, and response to targeted therapy in acute promyelocytic leukemia. *Blood.* 2005; 106(12):3768-76.
97. Steudel C, Wermke M, Schaich M, Schakel U, Illmer T, Ehniger G, Thiede C. Comparative analysis of MLL partial tandem duplication and FLT3 internal tandem duplication mutations in 956 adult patients with acute myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer.* 2003; 37(3):237-51.
98. Kottaridis PD, Gale RE, Frew ME, Harrison G, Langabeer SE, Belton AA, Walker H, Wheatley K, Bowen DT, Burnett AK, Goldstone AH, Linch DC. The presence of a FLT3 internal tandem duplication with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials. *Blood.* 2001; 98(6):1752-9.
99. Frohling S, Schlenk RF, Breitruck J, Benner A, Kreitmeier S, Tobis K, Dohner H, Dohner K. Prognostic significance of activating FLT3 mutations in younger adults (16 to 60 years) with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics. *Blood.* 2002; 100(13):4372-80.

100. Whitman SP, Archer KJ, Feng L, Baldus C, Becknell B, Carlson BD, Carroll AJ, Mrozek K, Vardiman JW, George SL, Kolitz JE, Larson RA, Bloomfield CD, Caligiuri MA. Absence of the wild-type allele predicts poor prognosis in adult de novo acute myeloid leukemia with normal cytogenetics and the internal tandem duplication of FLT3: a cancer and leukemia group B study. *Cancer Res.* 2001; 61(19):7233-9.
101. Thiede C, Steudel C, Mohr B, Schaich M, Schakel U, Platzbecker U, Wermke M, Bornhauser M, Ritter M, Neubauer A, Ehninger G, Illmer T. Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood.* 2002, 99(12):4326-35.
102. Gale RE, Green C, Allen C, Meade AJ, Burnett AK, Hills RK, Linch DC. The impact of FLT3 internal tandem duplication mutant level, number, size and interaction with NPM1 mutations in a large cohort of young adult patients with acute myeloid leukemia. *Blood.* 2008; 111(5):2776-84.
103. Yanada M, Matsuo K, Suzuki T, Kiyoi H, Naoe T. Prognostic significance of FLT3 internal tandem duplication and tyrosine kinase domain mutations for acute myeloid leukemia: a meta-analysis. *Leukemia.* 2005; 19(8):1345-9.
104. Whitman SP, Ruppert AS, Radmacher MD, Mrozek K, Paschka P, Langer C, Baldus CD, Wen J, Rucke F, Powell BL, Kolitz JE, Larson RA, Caligiuri MA, Marcucci G, Bloomfield CD. FLT3 D835/I836 mutations are associated with poor disease-free survival and a distinct gene-expression signature among younger adults with *de novo* cytogenetically normal acute myeloid leukemia lacking FLT3 internal tandem duplication. *Blood.* 2008; 111(3):1552-9.
105. Bacher U, Haferlach C, Kern W, Haferlach T, Schnittger S. Prognostic relevance of FLT3-TKD mutations in AML: the combination matters—an analysis of 3082 patients. *Blood.* 2008; 111(5):2527-37.
106. Verhaak RG, Goudswaard CS, van Putten W, Bijl MA, Sanders MA, Hagens W, Uitterlinden AG, Erpelinck CA, Delwel R, Lowenberg B, Valk PJ. Mutations in nucleophosmin (NPM1) in acute myeloid leukemia (AML): association with other gene abnormalities and

previously established gene expression signatures and their favorable prognostic significance. *Blood*. 2005; 106(12):3747-54.

107. Dohner K, Schlenk RF, Habdank M, Scholl C, Rucker FG, Corbacioglu A, Bullinger L, Frohling S, Dohner H. Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: interaction with other gene mutations. *Blood*. 2005; 106(12):3740-6.

108. Dufour A, Schneider F, Metzeler KH, Hoster E, Schneider S, Zellmeier E, Benthaus T, Sauerland MC, Berdel WE, Buchner T, Wormann B, Braess J, Hiddermann W, Bohlander SK, Spiekermann K. Acute myeloid leukemia with biallelic CEBPA gene mutations and normal karyotype represents a distinct genetic entity associated with a favorable clinical outcome. *J Clin Oncol*. 2010; 28(4):570-7.

109. Wouters BJ, Lowenberg B, Erpelinck-Verschueren CA, van Putten WL, Valk PJ, Delwel R. Double CEBPA mutations, but not single CEBPA mutations, define a subgroup of acute myeloid leukemia with a distinctive gene expression profile that is uniquely associated with a favourable outcome. *Blood*. 2009; 113(13):3088-91.

110. Pabst T, Eyholzer M, Fos J, Mueller BU. Heterogeneity within AML with CEBPA mutations; only CEBPA double mutations, but not single CEBPA mutations are associated with favourable prognosis. *Br J Cancer*. 2009; 100(8):1343-6.

111. Renneville A, Boissel N, Gachard N, Naguib D, Bastard C, de Botton S, Nibourel O, Pautas C, Reman O, Thomas X, Gardin C, Terre C, Castaigne S, Preudhomme C, Dombret H. The favorable impact of CEBPA mutations in patients with acute myeloid leukemia is only observed in the absence of associated cytogenetic abnormalities and FLT3 internal tandem duplication. *Blood*. 2009; 113(21):5090-3.

112. Paschka P, Marcucci G, Ruppert AS, Mrozek K, Chen H, Kittles RA, Vukosavljevic T, Perrotti D, Vardiman JW, Carroll AJ, Kolitz JE, Larson RA, Bloomfield CD. Adverse prognostic significance of KIT mutations in adult acute myeloid leukemia with inv(16) and t(8;21): A Cancer and Leukemia Group B Study. *J Clin Oncol*. 2006; 24(24):3904-11.

113. Cairoli R, Beghini A, Grillo G, Nadali G, Elice F, Ripamonti CB, Colapietro P, Nichelatti M, Pezzetti L, Lunghi M, Cuneo A, Viola A, Ferrara F, Lazzarino M, Rodeghiero F, Pizzolo G, Larizza L, Morra E. Prognostic impact of c-KIT mutations in core binding factor leukemias: an Italian retrospective study. *Blood*. 2006; 107(9):3463-8.
114. Schnittiger S, Kohl TM, Haferlach T, Kern W, Hiddemann W, Spiekermann K, Schoch C. KIT-D816 mutations in AML1-ETO-positive AML are associated with impaired event-free and overall survival. *Blood*. 2006; 107(5):1791-9.
115. Cancer Genom Atlas Research Network. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2013; 368(22):2059-74.
116. Mikulić M, Hostić V, Batinić D, Serventi-Seiwerth R, Zadro R, Davidović S, Dubravčić K, Rončević P, Nemet D, Labar B. Prognostic value of aberrant phenotypes in acute myeloid leukemia. *Medicina Fluminensis*. 2011; 4:375-380.
117. Chang H, Salma F, Yi QL, Patterson B, Brien B, Minden MD. Prognostic relevance of immunophenotyping in 379 patients with acute myeloid leukemia. *Leuk Res*. 2004; 28(1):43-8.
118. Venditti A, Del Poeta G, Buccisano F, Tamburini A, Cox-Froncillo MC, Aronica G, Bruno A, Del Moro B, Epiceno AM, Battaglia A, Forte L, Postorino M, Cordero V, Santinelli S, Amadori S. Prognostic relevance of the expression of Tdt and CD7 in 335 cases of acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 1998; 12(7):1056-63.
119. Wuchter C, Leonid K, Ruppert V, Schrappe M, Buchner T, Schoch C, Haferlach T, Harbott J, Ratei R, Dorken B, Ludwig WD. Clinical significance of P-glycoprotein expression and function for response to induction chemotherapy, relapse rate and overall survival in acute leukemia. *Haematologica*. 2000; 85(7):711-21.
120. Laupeze B, Amiot L, Drenou B, Bernard M, Branger B, Grosset JM, Lamy T, Fauchet R, Fardel O. High multidrug resistance protein activity in acute myeloid leukaemias is associated with poor response to chemotherapy and reduced patient survival. *Br J Haematol*. 2002; 116(4):834-8.

121. Tsuji K, Motoji T, Sugawara I, Shiozaki H, Wang YH, Motomura S, Okada M, Yasunami T, Sano F, Takahashi M, Kawada H, Maseki N, Hoshino S, Ishida M, Mizoguchi H. Significance of lung resistance-related protein in the clinical outcome of acute leukaemic patients with reference to P-glycoprotein. *Br J Haematol.* 2000; 110(2):370-8.
122. Volk EL, Farley KM, Wu Y, Li F, Robey RW, Schneider E. Overexpression of wild-type breast cancer resistance protein mediates methotrexate resistance. *Cancer Res.* 2002; 62(17):5035-40.
123. Schaich M, Soucek S, Thiede C, Ehniger G, Illmer T. MDR1 and MRP1 gene expression are independent predictors for treatment outcome in adult acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol.* 2005; 128(3):324-32.
124. Benderra Z, Faussat AM, Sayada L, Perrot JY, Tang R, Chaoui D, Morjani H, Marzac C, Marie JP, Legrand O. MRP3, BCRP, and P-glycoprotein activities are prognostic factors in adult acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res.* 2005; 11(21):7764-72.
125. Legrand O, Zompi S, Perrot JY, Faussat AM, Benderra Z, Chaoui D, Marie JP. P-glycoprotein and multidrug resistance associated protein-1 activity in 132 acute myeloid leukemias according to FAB subtypes and cytogenetics risk groups. *Haematologica.* 2004; 89(1):34-41.
126. Grković L, Labar B. Akutna mijeloična leukemija u odraslih: dijagnostika i liječenje. *Medicina fluminensis.* 2011; 47(4):335-342.
127. Labar B, Nemet D, Sučić M, Batinić D, Zadro R, Mrsić S, Serventi-Seiwerth R, Sertić D, Mikulić M, Duraković N. Current approach to diagnosis and treatment of acute leukemia in adults. *Acta Medica Croatica.* 2008; 62(4):403-408.
128. Willemze R, Suciú S, Meloni G, Labar B, Marie JP, Halkes CJ, Muus P, Mistrik M, Amadori S, Specchia G, Fabbiano F, Nobile F, Sborgia M, Camera A, Selleslag DL, Lefrère F Sr, Magro D, Sica S, Cantore N, Beksac M, Berneman Z, Thomas X, Melillo L, Guimaraes JE, Leoni P, Luppi M, Mitra ME, Bron D, Fillet G, Marijt EW, Venditti A, Hagemeijer A, Mancini M, Jansen J, Cilloni D, Meert L, Fazi P, Vignetti M, Trisolini SM, Mandelli F, de Witte T. High-dose cytarabine in induction treatment improves the outcome of adult patients

younger than age 46 years with acute myeloid leukemia: results of the EORTC-GIMEMA AML-12 trial. *J Clin Oncol*. 2014; 32(3):219-28.

129. EORTC Leukemia groupa and Gruppo Italiano Malattie Ematologiche dell' Adulto. The value of high dose vs. standard dose Ara-C during induction and od IL-2 after intensive consolidationUautologous tem cell transplantation in patients (aged 15-60 years) with acute myelogenous leukemia. A randomized phase 3 trial of the EORTC and GIMEMA leukemia groups AML12 protocol. EORTC 06991. 2006. 60 stranica.

130. Adès L, Chevret S, Raffoux E, Guerci-Bresler A, Pigneux A, Vey N, Lamy T, Huguet F, Vekhoff A, Lambert JF, Lioure B, de Botton S, Deconinck E, Ferrant A, Thomas X, Quesnel B, Cassinat B, Chomienne C, Dombret H, Degos L, Fenaux P; European APL group. Long-term follow-up of European APL 2000 trial, evaluating the role of cytarabine combined with ATRA and Daunorubicin in the treatment of nonelderly APL patients. *Am J Hematol*. 2013; 88(7):556-9.

131. Fenaux P, Chastang C, Chevret S, Sanz M, Dombret H, Archimbaud E, Fey M, Rayon C, Huguet F, Sotto JJ, Gardin C, Makhoul PC, Travade P, Solary E, Fegueux N, Bordessoule D, san Miguel J, Link H, Desablens B, Stamatoullas A, Deconincek E, Maloisel F, Castaigne S, Preudhomme C, Degos L. A randomized comparison of All Transretinoic Acid (ATRA) followed by chemotherapy and ATRA plus chemotherapy and the role of maintenance therapy in newly diagnosed acute promyelocytic leukemia. *Blood*. 1999; 94:1192-200.

132. Adès L, Sanz MA, Chevret S, Montesinos P, Chevallier P, Raffoux E, Vellenga E, Guerci A, Pigneux A, Huguet F, Rayon C, Stoppa AM, de la Serna J, Cahn JY, Meyer-Monard S, Pabst T, Thomas X, de Botton S, Parody R, Bergua J, Lamy T, Vekhoff A, Negri S, Ifrah N, Dombret H, Ferrant A, Bron D, Degos L, Fenaux P. Treatment of newly diagnosed acute promyelocytic leukemia (APL): a comparison of French-Belgian-Swiss and PETHEMA results. *Blood*. 2008; 111(3):1078-84.

133. Pethema&hovon groups. Treatment of Acute Promyelocytic leukemia Pethema lpa 2005/hovon 79 APL. Remission Induction with ATRA + Idarubicin. Risk-adapted consolidation with ATRA and Anthracycline-based Chemotherapy (Idarubicin/Mitoxantrone) with Addition of

Ara-C for High-risk Patients. Maintenance Therapy with ATRA + Low Dose Chemotherapy (Methotrexate + Mercaptopurine). 2005. 39 stranica.

134. Hiddemann W, Kreutzmann H, Straif K, Ludwig WD, Mertelsmann R, Planker M, Donhuijsen-Ant R, Lengfelder E, Arlin Z, Büchner T. High-dose cytosine arabinoside in combination with mitoxantrone for the treatment of refractory acute myeloid and lymphoblastic leukemia. *Semin Oncol*. 1987; 14(2 Suppl 1):73-7.

135. Hiddemann W, Kreutzmann H, Straif K, Ludwig WD, Mertelsmann R, Donhuijsen-Ant R, Lengfelder E, Arlin Z, Büchner T. High-dose cytosine arabinoside and mitoxantrone: a highly effective regimen in refractory acute myeloid leukemia. *Blood*. 1987; 69(3):744-9.

136. Mikulic M, Batinic D, Sucic M, Davidovic-Mrsic S, Dubravcic K, Nemet D, Serventi-Seiwerth R, Sertic D, Labar B. Biological features and outcome of biphenotypic acute leukemia: a case series. *Hematol Oncol Stem Cell Ther*. 2008;1(4):225-30.

137. Knuutila S, Vuopio P, Elonen E, Siimes M, Kovanen R, Borgstrom GH, de la Chapelle A. Culture of bone marrow reveals more cells with chromosomal abnormalities than the direct method in patients with hematological disorders. *Blood*. 1981; 58(2):369-75.

138. Keinanen M, Knuutila S, Bloomfield CD, Elonen E, de la Chapelle A. The proportion of mitoses in different cell lineages changes during short-term culture of normal human bone marrow. *Blood*. 1986; 67(5):1240-3.

139. Keinanen M, Knuutila S, Bloomfield CD, Elonen E, de la Chapelle A. Bone marrow cytogenetics: the lineage of dividing cells changes during the first few hours in culture. *Leukemia*. 1987; 1(1):32-7.

140. Seabright M. A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet*. 1971; 2(7731):971-2.

141. Gozzeti A, Le Beau MM. Fluorescence in situ hybridizations: Uses and limitations. *Seminar in Hematol*. 2000; 37(4):320-33.

142. Schaffer LG, Slovak ML, Campbell LJ. ISCN 2009: An international system for human cytogenetic nomenclature: Recommendations of the International standing committee on human cytogenetic nomenclature. Švicarska, Basel. Karger Medical Scientific; 2009.
143. Nakao M, Yokota S, Iwai T, Kaneko H, Horiike S, Kashima K, Sonoda Y, Fujimoto T, Misawa S. Internal tandem duplication of the *flt3* gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 1996; 10(12):1911-8.
144. Huet S, Marie JP, Gualde N, Robert J. Reference method for detection of Pgp mediated multidrug resistance in human hematological malignancies: a method validated by laboratories of the French Drug Resistance Network. *Cytometry*. 1998; 34(6):248-56.
145. Petriz J, Garcia-Lopez J. Flow cytometric analysis of P-glycoprotein function using Rhodamine 123. *Leukemia*. 1997; 11(7):1124-30.
146. Krutzik PO, Nolan GP. Intracellular phospho-protein staining techniques for flow cytometry: monitoring single cell signaling events. *Cytometry A*. 2003;55(2):61-70.
147. Krutzik PO, Irish JM, Nolan GP, Perez OD. Analysis of protein phosphorylation and cellular signaling events by flow cytometry: techniques and clinical applications. *Clin Immunol*. 2004; 110(3):206-21.
148. Bardet V, Tamburini J, Ifrah N, Dreyfus F, Mayeux P, Bouscary D, Lacombe C. Single cell analysis of phosphoinositide 3-kinase/Akt and ERK activation in acute myeloid leukemia by flow cytometry. *Haematologica*. 2006; 91(6):757-64.
149. Pauše Ž. Uvod u matematičku statistiku. Zagreb. Školska knjiga; 1993.
150. Hollander M, Douglas AW. Nonparametric statistical methods. New York. John Wiley and Sons; 1973.
151. Kleinbaum DG, Klein M. Survival analysis: a self learning text. New York. Springer; 2011.
152. Fawcett T. An introduction to ROC analysis. *Pattern Recog Lett*. 2006; 27(1):861-74.
153. Heagerty PJ, Lumley T, Pepe MS. Time-dependant ROC curves for censored survival data and a diagnostic marker. *Biometrics*. 2000; 56(2):337-44.

154. Holm S. A simple sequential rejective multiple test procedure. *Scandinavian Journal of Statistics*. 1979; 6:65-70.
155. Park S, Park CH, Hahm ER, Kim K, Kimler BF, Lee SJ, Park HK, Lee SH, Kim WS, Jung CW, Park K, Riordan HD, Lee JH. Activation of Raf1 and the ERK pathway in response to L-ascorbic acid in acute myeloid leukemia cells. *Cell Signal*. 2005; 17(1):111-9.
156. Fang Y, Zhong L, Lin M, Zhou X, Jing H, Ying M, Luo P, Yang B, He Q. MEK/ERK Dependent Activation of STAT1 Mediates Dasatinib-Induced Differentiation of Acute Myeloid Leukemia. *PLoS ONE*. 2013; 8(6): e66915. doi:10.1371/journal.pone.0066915.
157. Svensson S, Jirstrom K, Ryden L, Roos G, Emdin S, Ostrowski MC, Landberg G. ERK phosphorylation is linked to VEGFR2 expression and Ets-2 phosphorylation in breast cancer and is associated with tamoxifen treatment resistance and small tumours with good prognosis. *Oncogene*. 2005; 24:4370-9.
158. Deschenes-Simard X, Gaumont-Leclerc MF, Bourdeau V, Lessard F, Moiseeva O, Forest V, Igelmann S, Mallette FA, Saba-El-Leil MK, Meloche S, Saad F, Mes-Masson AM, Ferbeyre G. Tumor suppressor activity of the ERK/MAPK pathway by promoting selective protein degradation. *Genes Dev*. 2013; 27:900-15.

10. ŽIVOTOPIS

Sanja Prijic (rođ. Perković) rođena je 1985. godine u Splitu gdje je završila osnovnoškolsko i srednjoškolsko obrazovanje. Nakon mature u splitskoj I. jezičnoj gimnaziji 2004. godine upisala je Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Biološki odsjek, smjer Molekularna biologija. Kroz studij je aktivno sudjelovala u izvođenju nastavnog programa volontirajući kao demonstrator na vježbama kolegija Molekularna genetika. Diplomski rad izrađivala je tijekom akademske godine 2007/2008 na Institutu Ruđer Bošković, Laboratorij za mikrobijalnu genetiku. Diplomirala je 2009. godine obranivši diplomski rad naslova: „Učinkovitost popravka DNA u mutantu *ssb-1* bakterije *Escherichia coli*“. Od svibnja 2009. godine zaposlena je kao znanstveni novak – asistent na projektu prof.dr.sc. Drage Batinića (šifra projekta: 214-1081347-0355) u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb. Akademske godine 2009/2010 upisala je znanstveni poslijediplomski studij „Biomedicina i zdravstvo“ na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Autor je i koautor tri znanstvena rada od kojih su dva publicirana u časopisima koji su indeksirani u Current Contents-u, a jedan je rad publiciran u međunarodno indeksiranom časopisu.