



UNIVERZITET U NIŠU

MEDICINSKI FAKULTET



Irena Ćojbašić

**KLINIČKI I MORFOMETRIJSKI POKAZATELJI TERAPIJSKOG
ODGOVORA KOD HRONIČNE MIJELOIDNE LEUKEMIJE**

Doktorska disertacija

Niš, 2014.



UNIVERSITY OF NIŠ

FACULTY OF MEDICINE



Irena Ćojbašić

**CLINICAL AND MORPHOMETRIC INDICATORS OF
THERAPEUTIC RESPONSE IN CHRONIC MYELOID LEUKEMIA**

Doctoral dissertation

Niš, 2014

Mojoj voljenoj Emiliji

Mentor:

Prof. dr Lana Mačukanović-Golubović, redovni profesor
Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu

Članovi komisije:

1. **Prof. dr Stevan Popović**, redovni profesor
Medicinskog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu
2. **Prof. dr Lana Mačukanović-Golubović**, redovni profesor
Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu
3. **Prof. dr Dragan Mihailović**, redovni profesor
Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu
4. **Prof. dr Goran Marjanović**, vanredni profesor
Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu
5. **Doc. dr Miodrag Vučić**, docent
Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu

Datum odbrane:

Zahvalnost autora

Na ovom mestu želim da se zahvalim svima koji su pomogli u završetku ove teze. Posebnu i iskrenu zahvalnost dugujem:

- Prof. dr Lani Mačukanović-Golubović, mom mentoru, na svestranoj i dragocenoj pomoći, usmeravanju i podsticanju u toku izrade disertacije.
- Prof. dr Draganu Mihailoviću, na inspiraciji, smernicama i pragmatičnim savetima tokom realizacije ovog rada.
- Prof. dr Stevanu Popoviću, Prof. dr Goranu Marjanoviću i Doc. dr Miodragu Vučiću na korisnim sugestijama, razumevanju i podršci tokom izrade ovog rada.
- Doc. dr Stevi Lukiću na nesebičnoj prijateljskoj i kolegijalnoj podršci i velikodušnoj pomoći, kao i doc. dr Aleksandru Petroviću na kolegijalnoj saradnji i pomoći.
- Kolegama i saradnicima Klinike za hematologiju i kliničku imunologiju i Instituta za patologiju Kliničkog centra u Nišu za kolegijalnost i iskrenu prijateljsku podršku.

Zahvalnost dugujem i svojoj porodici, koja uloženom trudu daje poseban smisao, zbog njihove nesebične podrške i razumevanja.

U Nišu, maja 2014.

Irena Čojbašić

Rezime

Klinički i morfometrijski pokazatelji terapijskog odgovora kod hronične mijeloidne leukemije

CILJ: Istraživački cilj ove disertacije predstavlja ispitivanje i određivanje stope citogenetskog i molekularnog odgovora pacijenata sa hroničnom mijeloidnom leukemijom kao i utvrđivanje kliničkih i laboratorijskih parametara koji utiču na klinički tok bolesti odnosno na postizanje kompletnog citogenetskog i velikog molekularnog odgovora na primenjenu terapiju. Takođe, cilj ove disertacije je određivanje i komparacija bazičnih morfometrijskih parametara angiogeneze koštane srži ispitivanih grupa pacijenata radi dokazivanja razlike u stepenu angiogeneze, kao i identifikovanje prognostičkih morfometrijskih parametara angiogeneze koji utiču na postizanje kompletnog citogenetskog i velikog molekularnog odgovora. Rad obuhvata i razvoj i poređenje prognostičkih modela regresione analize u kojima su bazičnim kliničkim parametrima dodati pojedinačni morfometrijski parametri angiogeneze kako bi se povećala tačnost predviđanja kompletnog citogenetskog i velikog molekularnog odgovora na primenjenu terapiju.

METODOLOGIJA: Ispitivanjem u okviru ovog istraživanja obuhvaćeno je 40 pacijenata sa hroničnom mijeloidnom leukemijom Filadelfija pozitivnom u hroničnoj fazi i 20 pacijenata sa Hočkinovim i ne-Hočkinovim limfomom kod kojih nema dokaza o limfomskoj infiltraciji koštane srži, koji su lečeni u Klinici za hematologiju i kliničku imunologiju Kliničkog centra u Nišu.

Morfometrijska analiza mikrovaskularnih struktura koštane srži obavljena je na uzorcima biopsije svih ispitanika. Imunohistohemijski CD34 obojeni mikroskopski preparati su analizirani na Leica DMR mikroskopu sa digitalnom kamerom primenom direktne digitalizacije. Kvantifikacija na digitalnim slikama je obavljena pomoću softvera (ImageJ Software, National Institutes of Health, USA) na personalnom računaru. Najpre je određivan totalni broj mikrovaskularnih struktura po optičkom polju. Za svaku brojivu mikrovaskularnu strukturu koja je identifikovana, procenjavani su veličina zavisni i oblik zavisni morfometrijski parametri: velika dužina ose, mala dužina ose, površina, obim, slučajni prečnik, cirkularnost, odnos oblika, zaobljenost i punoća.

REZULTATI: U ispitivanoj grupi pacijenata kumulativna stopa potpunog citogenetskog odgovora je 75%, a velikog molekularnog odgovora 57,14%. Identifikovani su klinički pozitivni prognostički faktori za postizanje potpunog citogenetskog odgovora: prisustvo manje od 3% perifernih blasta, manje od 4% perifernih bazofila i manje od 4% bazofila u koštanoj srži, dok je prisustvo manje od 4% perifernih bazofila pozitivan prognostički parametar za postizanje velikog molekularnog odgovora ($p < 0,01$). Komparacija morfolometrijskih parametara angiogeneze između ispitivanih grupa pacijenata pokazala je da su mikrovaskularna gustina i svi ispitivani parametri veličine i oblika bili viši u hroničnoj fazi hronične mijeloidne leukemije nego u kontrolnoj grupi. Analiziran je prognostički značaj angiogeneznih parametara u odnosu na postignut potpun citogenetski odgovor i identifikovani su sledeći pozitivni prognostički faktori: vrednost mikrovaskularne gustine manja od 9/HPF, dužina male ose manja od 10 μm , površine manja od 350 μm^2 , cirkularnost manja od 0,5, zaobljenost krvnoga suda manja od 0,35 i odnosa oblika veći od 3,5 ($p < 0,01$). U ovom istraživanju između angiogeneznih parametara identifikovana je vrednost mikrovaskularne gustine manja od 9/HPF kao pozitivan prognostički faktor za postizanje velikog molekularnog odgovora ($p < 0,01$). Na ispitivanoj grupi pacijenata razvijeni su višestruki modeli logističke regresije sa ciljem predviđanja potpunog citogenetskog odgovora posle 6, 12 i 18 meseci terapije, ukupnog potpunog citogenetskog i velikog molekularnog odgovora. Za razliku od osnovnog modela koji se bazirao samo na EUTOS skoru, modeli kojima su pridodati morfolometrijski parametri angiogeneze imali su superiornu predikciju terapijskog odgovora.

ZAKLJUČAK: Istraživanje je značajno u razumevanju kliničkog značaja angiogeneze kod pacijenta sa hroničnom mijeloidnom leukemijom. Rezultati disertacije pružaju objašnjenje o prognostičkom značaju nekih bazičnih kliničkih, laboratorijskih i morfolometrijskih parametara angiogeneze koštane srži u predviđanju postizanja citogenetskog i molekularnog odgovora na terapiju kod pacijenata sa hroničnom mijeloidnom leukemijom. Rezultati postignuti u ovom istraživanju ukazuju da dodavanje pojedinačnih morfolometrijskih parametara krvnih sudova standardnom prognostičkom scoring sistemu povećava tačnost predviđanja potpunog citogenetskog i velikog molekularnog odgovora. Rana identifikacija pacijenata koji neće postići potpun citogenetski i veliki molekularni odgovor, može ukazati na pacijente sa znatno većim rizikom od progresije bolesti i kraćim preživljavanjem što implicira neophodnost pažljivijeg praćenja i ranije terapijske intervencije.

Ključne reči: hronična mijeloidna leukemija, angiogeneza, mikrovaskularna morfolometrija, klinički ishod, prognoza, prognostički modeli.

Naučna oblast: Hematologija

Uža naučna oblast: Leukemija

UDK broj: 616.155.392

Abstract

Clinical and morphometric indicators of therapeutic response in chronic myeloid leukemia

PURPOSE: Research aim of this dissertation is to examine and determine the rates of cytogenetic and molecular responses in patients with chronic myeloid leukemia as well as identification of clinical and laboratory parameters that influence clinical course of the disease and achievement of complete cytogenetic and major molecular response to therapy. Also, the goal of this dissertation is determination and comparison of the basic morphometric parameters of bone marrow angiogenesis for studied groups of patients in order to prove the difference in the degree of angiogenesis, as well as identification of prognostic morphometric parameters of angiogenesis affecting the achievement of complete cytogenetic and major molecular responses. Thesis also includes development and comparison of regression predictive models in which single morphometric parameters of angiogenesis were added to the basic clinical parameters in order to increase the accuracy of prediction of complete cytogenetic and major molecular responses to therapy.

METHODOLOGY: This research included 40 patients with chronic myeloid leukemia Philadelphia positive in chronic phase and 20 patients with Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphoma in which there was no evidence of lymphoma infiltration of the bone marrow, which were treated at the Clinic of Hematology and Clinical Immunology of the Clinical Center Niš.

Morphometric analysis of the microvascular structure of the bone marrow has been performed on biopsy specimens of all patients. Immunohistochemical CD34 stained microscopic preparations have been analyzed on Leica DMR microscope with a digital camera using the direct digitization. Quantification of the digital images was performed using software (ImageJ software, National Institutes of Health, USA) on a personal computer. Firstly total number of microvascular structures by optical field has been determined. For every countable microvascular structure that has been identified, the size dependent and shape dependent morphometric parameters have been evaluated: major axis, minor axis, area, perimeter, feret diameter, circularity, aspect ratio, roundness and solidity.

RESULTS: In the study group of patients the cumulative rate of complete cytogenetic response was 75%, and of major molecular response 57.14%. Clinically positive prognostic factors for achieving a complete cytogenetic response have been indentified: the presence of less than 3% of peripheral blasts, less than 4% of the peripheral basophils and less than 4% of basophils in the bone marrow, while the presence of less than 4% of the peripheral basophils was positive prognostic factor for reaching major molecular response ($p < 0.01$). Comparison of angiogenesis morphometric parameters among investigated groups of patients has shown that the microvascular density and all the parameters of size and shape were higher in the chronic phase of chronic myeloid leukemia group compared to controls. The prognostic significance of parameters of angiogenesis in relation to the achievement of a complete cytogenetic response have been analysed and the following positive prognostic factors have been indentified: the value of microvascular density less than 9, the length of the minor axis less than 10 μm , the area less than 350 μm^2 , circularity less than 0.5, the roundness the blood vessel less than 0.35 and the aspect ratio more than 3.5 ($p < 0.01$). In the study group of patients multiple logistic regression models have been developed with the aim of predicting a complete cytogenetic response after 6, 12 and 18 months of treatment, the cumulative rate of the complete cytogenetic and major molecular responses. In contrast to the basic model that is solely based on EUTOS score, models including morphometric parameters of angiogenesis were superior predictors of treatment response.

CONCLUSIONS: The study is significant for understanding of the clinical importance of angiogenesis in patients with chronic myeloid leukemia. Results of the dissertation provide an explanation of the prognostic significance of some basic clinical, laboratory and morphometric parameters of bone marrow angiogenesis in predicting the achievement of cytogenetic and molecular responses to therapy in patients with chronic myeloid leukemia. Results obtained in this research indicate that the addition of individual morphometric parameters of blood vessels to standard prognostic scoring system increases the accuracy of prediction of complete cytogenetic and major molecular responses. Early identification of patients who will not achieve complete cytogenetic and major molecular responses may indicate patients with a significantly higher risk of disease progression and shorter survival which implies the necessity of closer monitoring and early therapeutic intervention.

Key words: chronic myeloid leukemia, angiogenesis, microvessel morphometry, clinical outcome, prognosis, prognostic models.

Scientific field: Hematology

Specific scientific field: Leukemia

UDC number: 616.155.392

Sadržaj

Zahvalnost autora	5
Rezime	6
Abstract.....	8
Sadržaj.....	10
Lista tabela i slika.....	13
1. UVOD	16
2. HRONIČNA MIJELOIDNA LEUKEMIJA – PREGLED LITERATURE I STANJE ISTRAŽIVANJA	19
2.1. Definicija	19
2.2. Istorijski aspekti	19
2.3. Epidemiologija i etiologija.....	20
2.4. Klinička prezentacija	21
2.5. Kliničke i laboratorijske karakteristike	23
2.5.1. Simptomi i znaci	23
2.5.2. Laboratorijsko-patološki nalaz	23
2.5.2.1. Nalaz u perifernoj krvi.....	23
2.5.2.2. Nalaz u koštanoj srži	24
2.5.3. Biohemijske abnormalnosti	26
2.6. Prognostički scoring sistemi.....	26
2.6.1. Sokal skor rizika.....	27
2.6.2. Euro skor rizika.....	28
2.6.3. EUTOS skor rizika	28
2.7. Citogenetski nalaz	29
2.8. Molekularna događanja u hroničnoj mijeloidnoj leukemiji	31
2.8.1. Molekularne probe	31
2.8.2. Molekularna biologija BCR-ABL.....	32
2.8.3. Leukemogeneza BCR-ABL	33
2.8.4. BCR-ABL mutacije.....	37
2.9. Angiogeneza.....	38

2.9.1. Angiogeneza u hematološkim malignitetima	38
2.9.2. Evaluacija angiogeneze	40
2.9.3. Angiogeneza u hroničnoj mijeloidnoj leukemiji.....	41
2.10. Dijagnoza hronične mijeloidne leukemije.....	44
2.11. Lečenje hronične mijeloidne leukemije	44
2.11.1. Inicijalno lečenje	44
2.11.2. Interferon- α	45
2.11.3. Alogena transplantacija matične ćelije hematopoeze.....	45
2.11.4. Inhibitori tirozin kinaze	47
2.11.4.1. <i>Imatinib-inhibitor tirozin kinaze prve generacije</i>	<i>47</i>
2.11.4.2. <i>Inhibitori tirozin kinaze druge generacije kao prva terapijska linija.....</i>	<i>49</i>
2.11.4.3. <i>Inhibitori tirozin kinaze druge generacije kao druga terapijska linija.....</i>	<i>50</i>
2.11.5. Odgovor na terapiju inhibitorima tirozin kinaze.....	50
2.11.6. Preporuke za lečenje hronične mijeloidne leukemije.....	51
2.12. Praćenje terapijskog odgovora	53
2.13. Prognostički značaj postizanja kompletnog citogenetskog i velikog molekularnog odgovora	55
2.14. Prognoza i predikcija u kliničkoj medicini	58
2.14.1 Modeli regresione analize.....	59
3. CILJEVI RADA.....	62
4. PACIJENTI I METODE.....	64
4.1. Karakteristike pacijenata i tretman.....	64
4.2. Hematološka, citogenetska i molekularna procena.....	64
4.3. Kriterijumi odgovora	65
4.4. Morfometrijska analiza	66
4.5. Statističke metode	68
5. REZULTATI	70
5.1. Karakteristike pacijenata pre tretmana	70
5.2. Hematološki i citogenetski odgovor	72
5.3. Molekularni odgovor.....	73
5.4. Podnošljivost imatinib mesilata	74
5.5. Prognostički faktori koji utiču na postizanje kompletnog citogenetskog i velikog molekularnog odgovora	75
5.6. Komparacija angiogeneznih parametara između kontrolne i grupe sa hroničnom mijeloidnom leukemijom	80

5.7. Korelacija parametara angiogeneze sa citogenetskim i molekularnim odgovorom	81
5.8. Prognostički angiogenezni parametri koji utiču na postizanje kompletnog citogenetskog i velikog molekularnog odgovora	82
5.9. Prognostički faktori koji utiču na postizanje kompletnog citogenetskog odgovora u različitim vremenskim intervalima.....	85
5.10. Prognostički angiogenezni faktori koji utiču na postizanje kompletnog citogenetskog odgovora u različitim vremenskim intervalima	90
5.11. Značaj morfometrijskih parametara za predviđanje kompletnog citogenetskog odgovora u različitim vremenskim intervalima.....	94
5.12. Značaj morfometrijskih parametara za predviđanje ukupnog kompletnog citogenetskog odgovora i velikog molekularnog odgovora	107
6. DISKUSIJA	117
7. ZAKLJUČAK.....	134
8. LITERATURA.....	137
Biografija autora	150

Lista tabela i slika

Tabela 1. Kriterijumi za definisanje faze akceleracije i blastne transformacije hronične mijeloidne leukemije po preporuci ELN i WHO	21
Tabela 2. Definisanje odgovora na prvu liniju inhibitora tirozin kinaze	51
Tabela 3. Preporuke za lečenje hronične faze: prva, druga i naknadne linije lečenja.....	52
Tabela 4. Preporuke za citogenetsko i molekularno praćenje	53
Tabela 5. Najčešće korišćeni višestruki modeli u kliničkoj medicini (113)	60
Tabela 6. Karakteristike pacijenata i bolesti pre početka lečenja imatinib mesilatom	71
Tabela 7. Step en citogenetskog odgovora u različitim vremenskim intervalima.....	72
Tabela 8. Značaj postignutog molekularnog odgovora za održavanje kompletne citogenetske remisije	74
Tabela 9. Stopa lek-zavisnih hematoloških i nehematoloških neželjenih efekata	74
Tabela 10. Prognostički faktori udruženi sa kompletnim citogenetskim odgovorom.....	76
Tabela 11. Prognostički faktori udruženi sa velikim molekularnim odgovorom	78
Tabela 12. Evaluacija vaskularnih morfometrijskih parametara u kontrolnoj i grupi pacijenata sa hroničnom mijeloidnom leukemijom	80
Tabela 13. Korelacija kompletnog citogenetskog odgovora i angiogeneznih parametara	81
Tabela 14. Korelacija velikog molekularnog odgovora i angiogeneznih parametara.....	82
Tabela 15. Angiogenezni parametri udruženi sa kompletnim citogenetskim odgovorom	83
Tabela 16. Angiogenezni parametri udruženi sa velikim molekularnim odgovorom.....	84
Tabela 17. Kliničke i laboratorijske karakteristike pacijenata u vreme dijagnoze prema kompletnom citogenetskom odgovoru posle 6, 12 i 18 meseci terapije	86
Tabela 18. Morfometrijski parametri angiogeneze u vreme dijagnoze prema kompletnom citogenetskom odgovoru posle 6, 12 i 18 meseci terapije	91
Tabela 19. Predviđanje kompletnog citogenetskog odgovora posle 6 meseci terapije upotrebom različitih LR skorova u vreme dijagnoze.....	95
Tabela 20. Poređenje prediktivnih modela za predviđanje kompletnog citogenetskog odgovora posle 6 meseci terapije	96
Tabela 21. Predviđanje kompletnog citogenetskog odgovora posle 12 meseci terapije upotrebom različitih LR skorova u vreme dijagnoze.....	99
Tabela 22. Poređenje prediktivnih modela za predviđanje kompletnog citogenetskog odgovora posle 12 meseci terapije	100
Tabela 23. Predviđanje kompletnog citogenetskog odgovora posle 18 meseci terapije upotrebom različitih LR skorova u vreme dijagnoze.....	103
Tabela 24. Poređenje prediktivnih modela za predviđanje kompletnog citogenetskog odgovora posle 18 meseci terapije	104

Tabela 25. Predviđanje ukupnog kompletnog citogenetskog odgovora upotrebom različitih LR skorova u vreme dijagnoze	108
Tabela 26. Poređenje prediktivnih modela za predviđanje ukupnog kompletnog citogenetskog odgovora.....	109
Tabela 27. Predviđanje velikog molekularnog odgovora upotrebom različitih LR skorova u vreme dijagnoze.....	112
Tabela 28. Poređenje prediktivnih modela za predviđanje velikog molekularnog odgovora.....	113
Slika 1. Periferni razmaz krvi kod hronične mijeloidne leukemije. Povišen broj leukocita i trombocita. Karakterističan niz nezrelih (mijeloblasta, mijelocita i metamijelocita) i zrelih ćelija granulocitne loze.....	24
Slika 2. HML, hronična faza. Aspirat koštane srži koji pokazuje prisustvo mikromegakariocita sa povećanim brojem nezrelih mijeloidnih prekursora, eozinofila i bazofila.	25
Shema 1. Šematski prikaz nastanka Filadelfija hromozoma.....	30
Shema 2. Translokacija t(9;22) i njeni produkti: BCR-ABL onkogen na Ph-hromozomu i recipročni BCR-ABL na izvedenom 9q+ hromozomu	34
Shema 3. Fiziološka regulacija normalnog ABL proteina i disregulacija BCR-ABL u ključnim ćelijskim procesima kao što su proliferacija, adherencija i apoptoza.	35
Shema 4. Signalni transdukциони putevi na koje utiče BCR-ABL	36
Shema 5. Dinamika angiogeneze u hematološkim malignitetima: autokrini i parakrini stimulacija.....	39
Slika 3. Kvantifikacija gustine krvnih sudova u koštanoj srži kod hematoloških maligniteta: a. Prema hot spot tehnici samo područja sa intenzivnom neovaskularizacijom se analiziraju, b. Koštana srž sa povećanom količinom masnih ćelija, c. Smanjena prokrvljenost koštane srži posle hemoterapije ili transplantacije, d. Funkcionalne karakteristike perfuzije kao što su vaskularna površina, vijugavost i grananje treba morfolometrijski analizirati.....	41
Slika 4. Angiogeneza u koštanoj srži na dijagnozi Ph+HML: a. Hipercelularna koštana srž otkriva značajan porast malih krvnih sudova iregularnog oblika, b. Abnormalno grananje sa varijabilnom luminalnom distenzijom.	42
Grafikon 1. Distribucija pacijenata unutar različitih prognostičkih scoring sistema	70
Grafikon 2. Distribucija pacijenata prema stepenu molekularnog odgovora	73
Grafikon 3. Vrednosti bazičnih laboratorijskih parametara koje su udružene sa postizanjem ukupnog kompletnog citogenetskog odgovora	77
Grafikon 4. Vrednosti bazičnih laboratorijskih parametara koje su udružene sa postizanjem velikog molekularnog odgovora	79
Grafikon 5. Vrednosti bazičnih laboratorijskih parametara i splenomegalije u odnosu na postizanje kompletnog citogenetskog odgovora u različitim vremenskim intervalima	87
Grafikon 6. Distribucija pacijenata sa i bez kompletnog citogenetskog odgovora u odnosu na bazični procenat blasta u različitim vremenskim intervalima.....	88
Grafikon 7. Distribucija pacijenata sa i bez kompletnog citogenetskog odgovora u odnosu na bazični procenat bazofila u različitim vremenskim intervalima.....	89
Grafikon 8. Vrednosti bazičnih parametara površine i dužine male ose u odnosu na postizanje kompletnog citogenetskog odgovora u različitim vremenskim intervalima	92

Grafikon 9. Vrednosti bazičnih parametra mikrovaskularne gustine i faktora oblika u odnosu na postizanje kompletnog citogenetskog odgovora u različitim vremenskim intervalima	93
Grafikon 10. Poređenje ROK kriva modela za predviđanje kompletnog citogenetskog odgovora posle 6 meseci terapije A. Model 1, B. Model 2, C. Model 3, D. Model 4	98
Grafikon 11. Poređenje ROK kriva modela za predviđanje kompletnog citogenetskog odgovora posle 12 meseci terapije A. Model 1, B. Model 2, C. Model 3, D. Model 4	102
Grafikon 12. Poređenje ROK kriva modela za predviđanje kompletnog citogenetskog odgovora posle 18 meseci terapije A. Model 1, B. Model 2, C. Model 3, D. Model 4	106
Grafikon 13. Poređenje ROK kriva modela za predviđanje ukupnog kompletnog citogenetskog odgovora na terapiju A. Model 1, B. Model 2, C. Model 3, D. Model 4	111
Grafikon 14. Poređenje ROK kriva modela za predviđanje velikog molekularnog odgovora na terapiju A. Model 1, B. Model 2, C. Model 3, D. Model 4.....	115

1. UVOD

Hronična mijeloidna leukemija (HML) je hronična mijeloproliferativna bolest koju karakteriše maligni klonalni preobražaj na nivou pluripotentne matične ćelije hematopoeze. Odlikuje se Filadelfija hromozomom (Ph), genetskom abnormalnošću koja proizilazi iz recipročne translokacije t (9;22) (q34;q11). Ova translokacija nastaje pod uticajem gena koji kodiraju BCR i ABL i rezultuje ekspresijom konstitutivno aktivnog proteina tirozin kinaze BCR-ABL. Filadelfija hromozom je prisutan kod više od 90% odraslih pacijenata sa HML, kod 15-30% odraslih sa akutnom limfoblastnom leukemijom (ALL) i kod 2% pacijenata sa akutnom mijeloidnom leukemijom (AML) (1). Transkripcijom BCR-ABL fuzionog gena nastaje hibridna informaciona RNK, od koje procesom translacije nastaju različiti fuzioni proteini zavisno od količine aminokiselina na BCR kraku. Većina pacijenata sa HML ima fuzioni protein od 210kDa, dok su kod 30% pacijenata sa Ph+ALL i kod manjeg procenta pacijenata sa HML udruženi sa BCR-ABL proteinom od 190kDa. HML je progresivna neoplazma koja obuhvata tri klinički prepoznate faze: hroničnu fazu (CP), fazu akceleracije (AC) i blastnu fazu (BP). Otprilike 90% pacijenata se dijagnostikuju tokom tipične indolentne hronične faze koja praćena fazom akceleracije i terminalnom blastnom fazom. Iako je prolazak kroz sve tri faze najčešći, 20-25% pacijenata progrediraju direktno iz hronične u blastnu fazu. Vreme potrebno za progresiju bolesti može ekstremno varirati. Mehanizmi koji stoje iza progresije HML nisu u potpunosti razjašnjeni (2). Kako pacijenti prolaze kroz različite faze bolesti, pored Ph-hromozoma mogu biti detektovane i druge citogenetske abnormalnosti. Mogu se javiti mutacije i delecije specifičnih gena (p53, p16/INK4a i RB). Postoji sve više dokaza da je porodica Src kinaza uključena u progresiju HML tako što indukuje citokinsku nezavisnost i zaštitu od apoptoze (3). Identifikacija krucijalne uloge BCR-ABL je dovela do dizajna i razvoja imatinib mesilata, prve terapije koja deluje na patofiziologiju HML.

Ne tako davno, postojale su dve glavne opcije lečenja za pacijente sa hroničnom mijeloidnom leukemijom: interferon- α i transplantacija matičnih ćelija hematopoeze. Interferon- α , mada efikasna i čak u nekim slučajevima kurativna terapija, imala je značajnu toksičnost koja je ograničavala mogućnost primene kod svih pacijenata. TMČH je imala priznat lekovit potencijal, ali je bila primenjiva za mali broj pacijenata i nosila je značajan morbiditet i mortalitet. Kod pacijenata koji nisu imali adekvatni odgovor na ove dve terapijske opcije, dalje terapijske mogućnosti su bile ograničene na primenu palijativne terapije ili primenu lekova koji su u fazi ispitivanja.

Otkriće inhibitora tirozin kinaze je promenilo pristup u lečenju hronične mijeloidne leukemije. Ustanovljeni su novi algoritmi lečenja, ciljevi lečenja, načini praćenja terapijskog odgovora, ali i drugačija očekivanja pacijenata i lekara. Tretman sa inhibitorima tirozin kinaze je relativno jednostavan, sa primenom oralnih agensa i sa mnogo boljom tolerancijom leka, ali zahteva strogo poštovanje principa koji pružaju najbolju nadu za dugoročno povoljan ishod bolesti. Mnogi od osnovnih principa lečenja kod HML praćeni su kontroverzama, sa postojanjem divergentnih mišljenja koji odražavaju stalnu evoluciju algoritma lečenja i potrebe za dodatnim istraživanjima.

Imatinib mesilat je danas prva terapijska linija za HML: on se kompetetivno vezuje za neaktivnu formu BCR-ABL, sprečava prelazak u aktivnu formu i delimično blokira mesta vezivanja enzima ATP. Njegova aktivnost sprečava BCR-ABL autofosforilaciju, njeno aktiviranje i blokira signale transdukcije. On inhibiše aktivnost tirozin kinaze čime se prekidaju signali koji kontrolišu leukemijski fenotip. Imatinib mesilat ima visoku i relativno specifičnu biohemijsku aktivnost kao i prihvatljiv farmakokinetški i toksični profil (4).

Za proteklih 12 godina inhibitor tirozin kinaze prve generacije, imatinib mesilat postao je standardni tretman u hroničnoj fazi HML na osnovu više studija koje su demonstrirale efikasnost i prihvatljivu podnošljivost. Faza III Internacionalne Randomizirane Studije IFN prema STI571, IRIS studija, poredila je imatinib i interferon- α plus citarabin kod 1106 HML pacijenata u ranoj hroničnoj fazi. Osmogodišnje praćenje ovih pacijenata pokazalo je kumulativnu stopu kompletnog citogenetskog odgovora od 89%, procenjenu stopu preživljavanja od 85% i preživljavanje bez progresije od 93%. IRIS studija i druge nezavisne studije pokazale su da je citogenetska prekretnica stepen citogenetskog odgovora posle 12 i 18 meseci terapije i da je rani odgovor posle 3 i 6 meseci važan (5-7).

Obzirom da se primenom inhibitora tirozin kinaze postiže visoka stopa kompletnog citogenetskog odgovora, cilj terapije je da se postigne molekularni odgovor, koji se meri redukcijom ili eliminacijom BCR-ABL transkripta. Prognostička važnost stepena i vremena postizanja molekularnog odgovora je još uvek predmet rasprave. Neke studije su pokazale da je postizanje velikog molekularnog odgovora (MMoR) bilo udruženo sa signifikantno boljim dugoročnim trajanjem remisije i preživljavanjem bez progresije, dok je uloga MMoR na ukupno preživljavanje još uvek kontroverzna. Međunarodna Randomizirana Studija Interferona i STI571 (8) je pokazala da je značajno veći procenat pacijenata koji su bili u potpunoj citogenetskoj remisiji posle 6 meseci terapije imao najmanje smanjenje 3-log nivoa BCR-ABL/ABL ako su lećeni imatinibom u poređenju sa onim koji su lećeni interferonom- α , 42% naspram 13%. Pacijenti sa smanjenjem 3-log nivoa BCR-ABL/ABL posle 12 meseci terapije imali su značajno bolju verovatnoću preživljavanja bez bolesti u poređenju sa onima sa kompletnom citogenetskom remisijom bolesti ali sa smanjenjem manjim od 3-log nivoa BCR-ABL/ABL transkripta.

Angiogeneza je formiranje novih krvnih sudova iz postojećih krvnih sudova i predstavlja važnu komponentu normalnog razvoja. To uključuje degradaciju ekstracelularnog matriksa proteina i aktivaciju, proliferaciju i migraciju endotelnih ćelija i pericita u višestepenom procesu. Pored svoje fiziološke uloge u vaskularizaciji za vreme ovulacije, placencije i embriogeneze, angiogeneza je povezana sa rastom, širenjem i metastazama solidnih tumora. U odsustvu angiogeneze, tumori ne mogu rasti iznad 1-2 mm u veličini. Dokazano je da je nekoliko pozitivnih i negativnih regulatornih molekula uključeno u proces angiogeneze. Najmoćniji i sa specifičnom pozitivnom regulatornom ulogom su vaskularni endotel faktor rasta (VEGF) i osnovni fibroblastni faktor rasta (bFGF). Pored njih i za citokine kao što su faktor nekroze tumora- α (TNF- α), tumorski faktor rasta- β (TGF- β), tumorski faktor rasta- α (TGF- α) i hepatocitni faktor rasta (HGF) je pokazano da imaju angiogenezu aktivnost.

Neo-angiogeneza je važna za rast i širenje mnogih solidnih tumora. Kod solidnih tumora, sposobnost tumora da pokrene angiogenezu u tumorskom tkivu je povezana sa povećanom mogućnošću za širenjem i metastaziranjem. Iako su mnoge inicijalne studije obavljene na solidnim tumorima, novija ispitivanja pokazuju da je angiogeneza povećana i značajna i u hematološkim malignitetima. Analogno, patološko povećanje stromalnih malih krvnih sudova u koštanoj srži dokazano je u više malignih hematoloških poremećaja. Porast angiogeneze koštane srži ustanovljen je kod limfoproliferativnih bolesti (multiplog mijeloma, hronične limfocitne leukemije i akutne limfoblastne leukemije) i kod mijeloidnih poremećaja (akutne mijeloidne leukemije, mijelodisplazije i hronične mijeloidne leukemije). Smatra se da endotelne ćelije novih krvnih sudova igraju važnu ulogu u opstanku i širenju malignih ćelija u ovim poremećajima, posebno zbog dejstva faktora rasta i citokina. Ovi podaci su neosporan dokaz koji ukazuje da angiogeneza koštane srži ima ulogu u patofiziologiji i toku nekih leukemija i limfoproliferativnih poremećaja.

U literaturi se mogu naći radovi koji se bave uticajem angiogeneze na progresiju i klinički ishod pacijenata sa hroničnom mijeloidnom leukemijom, u odnosu na više kliničko-patoloških parametara. Ti podaci pružaju dokaze o prognostičkoj vrednosti stepena angiogeneze i kalibra malih krvnih sudova i preporučuju ih kao dodatnu promenjivu varijablu u kliničko prognostičkim modelima. Ovi podaci potvrđuju hipotezu da stvaranje novih krvnih sudova može biti esencijalno u višestepenom procesu konverzije normalne koštane srži u hroničnu mijeloidnu leukemiju. Ovi podaci ukazuju da angiogeneza može imati značajnu ulogu u patofiziologiji leukemija i da antiangiogenezna terapija može imati anti kancerski efekat. I upravo efikasnost terapije imatinibom se zasniva na značajnom antiangiogeneznom efektu koji dovodi do redukcije vaskularizacije u koštanoj srži što je udruženo sa postizanjem kompletnog citogenetskog odgovora (9).

2. HRONIČNA MIJELOIDNA LEUKEMIJA – PREGLED LITERATURE I STANJE ISTRAŽIVANJA

2.1. Definicija

Hronična mijeloidna leukemija je hronična mijeloproliferativna bolest koju karakteriše maligni klonalni preobražaj na nivou pluripotentne matične ćelije hematopoeze. Glavna karakteristika bolesti je izrazito nakupljanje nezrelih i zrelih ćelija granulocitne loze u koštanoj srži, perifernoj krvi, u jetri i slezini. Klinički se najpre razvija hronična faza koja za prosečno 3-4 godine prelazi u akutnu fazu, tj. akutnu leukemiju.

Hronična mijeloidna leukemija je bolest pluripotentne matične ćelije hematopoeze koja se karakteriše anemijom, izrazito povišenim granulocitima i prekursorima granulocita, bazofilijom, često trombocitozom i splenomegalijom. Ćelije hematopoeze sadrže recipročnu translokaciju dugih krakova hromozoma 9 i 22, što se naziva Filadelfija hromozom. Molekularna posledica ove translokacije je nastanak novog BCR-ABL fuzionog gena sa posledičnom ekspresijom BCR-ABL fuzionog proteina što dovodi do povećane aktivnosti tirozin kinaze koja je odgovorna za leukemogenezu.

2.2. Istorijski aspekti

Hronična mijeloidna leukemija je verovatno bila prva forma leukemije koja je priznata kao poseban entitet. Godine 1845, opisana su dva pacijenta sa masivnom splenomegalijom i leukocitozom, što je predstavljalo novi entitet koji nije mogao da objasni druge uzroke splenomegalije kao što je bila tuberkuloza. Te iste godine John Hughes Bennet u Kraljevskoj ambulanti u Edinburgu po prvi put je opisao hroničnu mijeloidnu leukemiju kao klonalni mijeloproliferativni poremećaj pluripotentne matične ćelije hematopoeze. Ona je bila klasifikovana kao mijeloproliferativni poremećaj uz agnogenu mijeloidnu metaplaziju, policitemiju veru i esencijalnu trombocitemiju (10).

Prvi značajan putokaz u patogenezi došao je mnogo kasnije, kada su 1960. godine Nowell i Hungerford uz pomoć novo razvijene tehnike za proučavanje humanih ćelija u mitozu, otkrili doslednu hromozomsku abnormalnost, kasnije nazvanu Filadelfija hromozom identifikovanu kao 22q-, kod osoba sa ovom bolešću (11). Rowley je 1973. godine je primetio da je Ph-

hromozom rezultat recipročne translokacije koja još uključuje hromozom 9, tako da je abnormalnost tada određena kao t (9;22) (q34;q11) (12). Godine 1980, dokazano je da Ph-hromozom nosi jedinstven fuzioni gen, za koji se sada veruje da je glavni uzrok nastanka hronične mijeloidne leukemije. Od ključnog značaja je bila demonstracija da ova translokacija uključuje ABL (Abelson) protoonkogen na hromozomu 9 i BCR gen na hromozomu 22 (13). Od tada konstantan tok kliničkih i bazičnih istraživanja učinili su da je HML jedna od najviše proučavanih malignih bolesti u populaciji.

Do 1980. godine HML je smatrana neizlečivom i fatalnom bolešću. Poznato je da odabrani pacijenti mogu biti lečeni i u mnogim slučajevima izlečeni primenom alogene transplantacije matične ćelije hematopoeze. Međutim, naponi da se ovaj vid lečenja primeni na sve pacijente sa HML su osujećeni zbog nedostatka odgovarajućih donora i povećanog prisustva potencijalno smrtonosne komplikacije kalcema protiv domaćina kod starijih primalaca. Uvođenje u kliničku praksu inhibitora tirozin kinaze koji posebno blokiraju enzimsku aktivnost BCR-ABL fuzionog proteina, već su dali veliki doprinos u lečenju HML, a mogu postati vodeći agens koji uvodi u eru uspešne molekularne ciljane terapije za leukemije, limfome i druge kancere.

2.3. Epidemiologija i etiologija

Hronična mijeloidna leukemija je retka bolest u svetu. Predstavlja 14% svih leukemija i 20% leukemija odraslih. Godišnja incidenca je 1,6 slučajeva na 100.000 odraslih osoba, sa češćom pojavom u osoba muškoga pola, odnos muškarca i žena je 1,4:1. Prosečna starost u trenutku postavljanja dijagnoze je 55 godina. Iako se HML javlja kod dece i adolescenata, manje od 10% svih slučajeva javlja kod osoba između 1 i 20 godina starosti, odnosno HML predstavlja oko 3% svih leukemija kod dece. Učestalost bolesti se povećava sa godinama života. Specifična stopa incidence za HML povećava se logaritamski sa godinama, od oko 0,2 obolelih na 100.000 osoba mlađih od 20 godina do stope od oko 10 obolelih na 100.000 godišnje kod 80-godišnjaka.

Nije dokazana nasledna, porodična, geografska, etnička, ekonomska ili druga povezanost sa HML, dakle bolest se ne može sprečiti niti naslediti. Višestruki slučajevi pojavljivanja HML u porodici su retki. Ne postoji povećana učestalost pojave bolesti između identičnih blizanaca. Kod većine pacijenata, faktor odgovoran za nastanak Ph-hromozoma je nepoznat, mada je primećena povećana učestalost HML kod osoba izloženih visokim dozama zračenja kao posle eksplozije atomske bombe u Japanu 1945. godine, kod radiologa i kod pacijenata sa ankilozirajućim spondilitisom lečenih zračnom terapijom.

2.4. Klinička prezentacija

Hronična mijeloidna leukemija se prezentuje i prolazi kroz 3 faze: hroničnu fazu (CP), fazu akceleracije (AP) i blastnu krizu (BP). Oko 90% pacijenata sa HML se dijagnostikuje u CP i imaju medijanu preživljavanja od blizu 5 godina. Dijagnoza se često postavlja posle rutinski urađene kompletne krvne slike iz drugih razloga. Pacijenti sa HML-CP imaju kompetentni imuni sistem i mogu ostati bez simptoma tokom dužeg vremenskog perioda. Kada se simptomi pojave oni su uglavnom povezani sa širenjem HML ćelija i to su obično slabost, gubitak težine i nelagodnost izazvana splenomegalijom. Leukocitoza je glavna karakteristika CP, a broj belih krvnih zrnaca može biti visok $1000 \times 10^9/L$, što u retkim slučajevima dovodi do znakova i simptoma hiperviskoznosti: retinalna hemoragija, priapizam, cerebrovaskularni akcidenti, zujanje u ušima, konfuzija i tupost. Posle prosečno 3 do 5 godina, nelečeni pacijenti sa HML-CP neminovno progrediraju u HML-BP, agresivan oblik akutne leukemije koji je visoko refraktoran na hemioterapiju. Rizik od transformacije u HML-BP je procenjen na 3 % do 4% godišnje (14). Hronična mijeloidna leukemija u fazi akceleracije se karakteriše sve većim prekidom u sazrevanju koji obično najavljuje transformaciju u HML-BP.

Mada se sve tri faze HML jasno prepoznaju, kriterijumi koji ih definišu variraju u velikoj meri u literaturi. U tabeli 1 prikazani su kriterijumi faze akceleracije i blastne transformacije HML prema najčešće korišćenim klasifikacijama.

Tabela 1. Kriterijumi za definisanje faze akceleracije i blastne transformacije hronične mijeloidne leukemije po preporuci ELN i WHO

Faza akceleracije	
ELN preporuke	• Blasti u koštanoj srži 15-29%, ili blasti plus promijelociti u koštanoj srži više od 30%, sa blastima < 30% • Bazofili u perifernoj krvi $\geq 20\%$ • Perzistentna trombocitopenija $< 100 \times 10^9/L$ bez povezanosti sa terapijom • Klonalne hromozomske abnormalnosti u Ph + ćelijama (CCA/Ph +)
WHO preporuke	• Blasti u koštanoj srži 10-19% • Bazofili u perifernoj krvi $\geq 20\%$ • Perzistentna trombocitopenija $< 100 \times 10^9/L$ bez povezanosti sa terapijom • CCA/Ph + bez tretmana • Trombocitoza $> 1000 \times 10^9/L$ bez povezanosti sa terapijom • Porast veličine slezine i porast leukocita bez povezanosti sa terapijom
Blastna faza	
ELN preporuke	• Blasti u perifernoj krvi ili koštanoj srži $\geq 30\%$ • Ekstramedularna blastna proliferacija, pored slezine
WHO preporuke	• Blasti u perifernoj krvi ili koštanoj srži $\geq 20\%$ • Ekstramedularna blastna proliferacija, pored slezine • Velika ognjišta ili klasteri blasta u biopsiji koštane srži

Različiti kriterijumi su korišćeni za definisanje HML-AP. Jedna od najčešće korišćenih klasifikacija AP se definiše kao prisustvo najmanje jedne od sledećih hematoloških karakteristika: 15% ili više blasta, 30% ili više blasta plus promijelocita, 20% ili više bazofila, ili broj trombocita manji od $100 \times 10^9/L$ koji nije povezan sa terapijom (15). Treba napomenuti da većina klasifikacionih sistema za HML-AP i HML-BP koji se mogu naći u literaturi su razvijeni pre uvođenja imatiniba, a neki kao što je predlog klasifikacije faza bolesti HML dat od strane Svetske zdravstvene organizacije, još uvek nisu potvrđeni u kliničkim studijama (16). Prelazak iz HML-CP u HML-AP je obično subklinički, te je zato laboratorijsko praćenje neophodno za otkrivanje progresije bolesti. Medijana preživljavanja kod pacijenata sa HML-AP je jedna do dve godine. Većina pacijenata će ostati u AP tokom 4 do 6 meseci, pre nego što pređu u BP.

Kriterijumi European LeukemiaNet definišu HML-BP kao prisustvo od najmanje 30% blasta u perifernoj krvi ili koštanoj srži ili prisustvo ektramedularne bolesti. Preporuka Svetske zdravstvene organizacije je smanjenje blasta od 30% ili više na 20% ili više blasta za dijagnozu HML-BP. Pacijenti koji se nalaze u fazi HML-BP imaju simptome i znake povezane sa porastom tumorske mase, uključujući nesposobnost da kontrolišu broj leukocita dotadašnjom terapijom, prisustvo opštih simptoma (povišena temperatura, noćno znojenje, anoreksija, malaksalost, gubitak težine), infarkt slezine zbog masivne splenomegalije, bol u kostima, kao i povećan rizik od infekcije i krvarenja. Za blastnu krizu je karakteristično prisustvo dodatnih citogenetskih abnormalnosti osim Filadelfija hromozoma (klonalna evolucija) od kojih su najčešće trizomija 8, izohromozom 17 i dvostruki Filadelfija hromozom. Imunofenotipski, HML-BP može imati mijeloidni ili limfoidni fenotip. U retkim slučajevima blasti mogu biti bifenotipski, sa mešovitom limfoblastno-mijeloidnom linijom. Limfoidna blastna transformacija se dešava kod 20-30% pacijenata, mijeloidna kod 50%, a nediferentovana kod 25%. Pacijenti sa limfoidnom blastnom transformacijom imaju nešto bolju prognozu nego oni sa mijeloidnim fenotipom. Prognoza pacijenata sa HML-BP je loša sa medijanom preživljavanja od 3 do 6 meseci. Dve-trećine pacijenata koji razviju HML-BP prolaze kroz intermedijarnu tj. fazu akceleracije (17).

U skladu sa ovim preporukama su i modifikovane preporuke European LeukemiaNet panela iz 2006. godine. Predlog ELN je nešto liberalniji u odnosu na WHO predlog u pogledu procenta blasta i odgovara ranijim klasifikacijama HML. Tako da je predlog panela Srpske Grupe za HML da se u redovnom kliničkom radu koristi predlog European LeukemiaNet iz 2006. godine za definiciju faza bolesti (18).

2.5. Kliničke i laboratorijske karakteristike

2.5.1. Simptomi i znaci

Oko 70% pacijenata imaju simptome u trenutku postavljanja dijagnoze. Oni se najčešće žale na lak umor, malaksalost, smanjenu toleranciju na napor, anoreksiju, nelagodnost u stomaku, osećaj rane sitosti, gubitak težine i preterano znojenje. Simptomi su nejasni, nespecifični i postepeno napreduju. Ređe se mogu javiti simptomi koji uključuju znake hipermetabolizma (znojenje, netolerancija toplote, gubitak težine) simulirajući tireotoksikozu; akutni artritis, kao posledica hiperurikemije; priapizam, zujanje u ušima ili stupor zbog leukostaze; bol u levom gornjem kvadrantu i levom ramenu kao posledica infarkta slezine i perisplenitisa; akne urtike povezane sa hiperhistaminemijom.

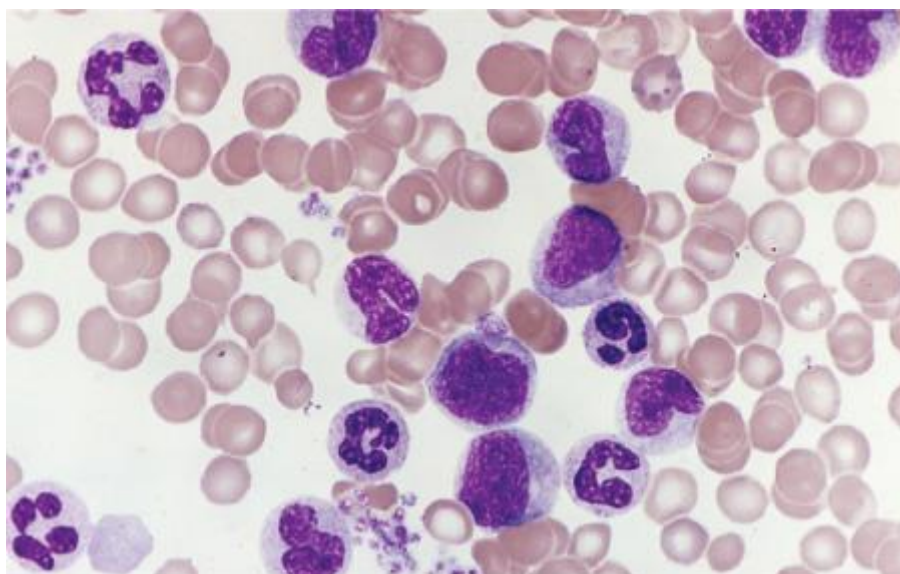
Fizičkim pregledom može se otkriti bledilo i hepatosplenomegalija. Splenomegalija je prisutna kod oko 90% pacijenata i rezultat je infiltracije traka crvene pulpe granulocitima u različitim stadijumima sazrevanja. Spontana ruptura slezine je retka. Jetra može biti infiltrirana granulocitnom masom u portnoj regiji i hepatičnim sinusoidima.

2.5.2. Laboratorijsko-patološki nalaz

2.5.2.1. Nalaz u perifernoj krvi

Laboratorijski nalaz u hroničnoj mijeloidnoj leukemiji uključuje leukocitozu sa značajnim skretanjem u levo, bazofiliju i eozinofiliju. Ukupan broj leukocita je uvek povišen u vreme dijagnoze i obično je preko $25 \times 10^9/L$. Broj leukocita raste progresivno ako se pacijenti ne leče. Diferencijalna formula pokazuje granulocite u svim stadijumima diferencijacije u perifernoj krvi (slika 1). Cirkulišući granulociti su obično normalnog izgleda. Procenat blasta je između 0,5% i 10%. Sve faze sazrevanja mijeloidne loze su prisutne, uz dominaciju mijelocita. Može se pretpostaviti da primarni biološki defekt u HML nije nekontrolisano umnožavanje matičnih ćelija leukemije, već poremećaj u sazrevanju koji dovodi do malog kašnjenja u sazrevanju ćelija u okviru mijeloidne loze što rezultuje povećanjem mijeloidne mase (19).

Aktivnost leukocitne alkalne fosfataze je niska ili odsutna kod više od 90% pacijenata, a fagocitna funkcija ostaje suštinski normalna. Niske vrednosti mogu biti prisutne i u agnogenoj mijeloidnoj metaplaziji, a aktivnost se može povećati u infekciji, kliničkoj remisiji, ili na početku BP (20).



Slika 1. Periferni razmaz krvi kod hronične mijeloidne leukemije. Povišen broj leukocita i trombocita. Karakterističan niz nezrelih (mijeloblasta, mijelocita i metamijelocita) i zrelih ćelija granulocitne loze.

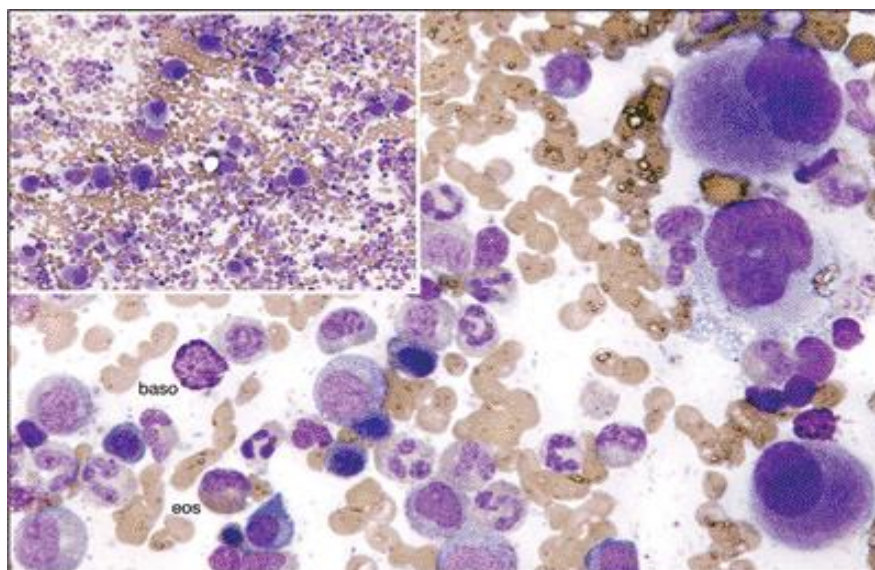
Funkcionalne abnormalnosti neutrofila su blage i nisu udružene sa predispozicijom ka infekciji. Iako proporcija eozinofila obično nije povišena, apsolutan broj eozinofila jeste. Apsolutan broj bazofila je skoro uvek povišen u HML. Proporcija bazofila je obično manja od 15% kod pacijenata u hroničnoj fazi, mada retko može biti i viša. Apsolutni broj limfocita je povišen prosečno $15 \times 10^9/L$ kod pacijenata sa HML u trenutku postavljanja dijagnoze, kao rezultat porasta T-helper i T-supresor ćelija ali ne i B limfocita. Aktivnost NK-ćelija je poremećena kao rezultat opadajućeg sazrevanja ovih ćelija in vivo i smanjenja apsolutnog broja cirkulišućih NK-ćelija.

Broj trombocita može biti povišen ili snižen, a blaga anemija je uobičajen nalaz. Broj trombocita je povišen kod 50% pacijenata u vreme postavljanja dijagnoze i može rasti tokom trajanja hronične faze. Prisutna je i disfunkcija trombocita, ali su poremećaji tipa tromboze i hemoragije retki. Deficijencija u drugom talasu agregacije na epinefrin je najčešća abnormalnost i udružena je sa deficijencijom adenin nukleotida. Trombocitopenija se retko javlja pri dijagnozi i obično je znak progresije u fazu akceleracije. Hematokrit je snižen kod većine pacijenata u trenutku postavljanja dijagnoze. Eritrociti imaju tendenciju da pokazuju samo blage promene sa porastom raznovrsnosti veličine i oblika. Manji broj eritrocita sa jedrom i blaga retikulocitoza mogu biti prisutne.

2.5.2.2. Nalaz u koštanoj srži

Ispitivanje koštane srži pacijenata sa hroničnom mijeloidnom leukemijom obično otkriva hipercelularnu srž, sa 75% do 90% celularnosti. Granulocitno-eritrocitni odnos je povišen od 10:1 do 30:1, sa porastom granulocitopoeze i redukcijom eritrocitopoeze. Eozinofili i bazofili

mogu biti povišeni. Blasti obično predstavljaju manje od 5% ćelija. Prisustvo više od 10% blasta ukazuje na transformaciju u fazu akceleracije. U hroničnoj fazi bolesti, zbir blasta i promijelocita obično čini manje od 10% celularnosti koštane srži (slika 2).



Slika 2. HML, hronična faza. Aspirat koštane srži koji pokazuje prisustvo mikromegakariocita sa povećanim brojem nezrelih mijeloidnih prekursora, eozinofila i bazofila.

Megakariociti su tipično manji nego obično i mogu imati hipolobulirano jedro. Broj megakariocita može biti normalan ili neznatno snižen, ali 40% do 50% pacijenata pokazuje umerenu do opsežnu proliferaciju megakariocita. Megakariociti mogu biti i povećani, a ćelije nalik Gaucher-ovim mogu se videti kod 10% slučajeva. Kolagen tipa III koji se vidi posle bojenja srebrom je tipično povišen u trenutku postavljanja dijagnoze. Otprilike polovina pacijenata pokazuje porast retikulinske fibroze koja može biti udružena sa porastom broja megakariocita u koštanoj srži. Porast fibroze može korelisati sa većom slezinom, težim stepenom anemije i većim procentom blasta u perifernoj krvi i koštanoj srži. Smanjena apoptoza mijeloidnih ćelija doprinosi širenju ovog odeljka i nepravilnim prijanjanjem nezrelih HML ćelija na stromalne ćelije srži in vitro, sa kasnijim početkom puštanja u cirkulaciju (21). Kako HML napreduje, mogu se videti različiti stepeni retikulinske fibroze, kao rezultat interakcije između proliferativnog klona megakariocita i citokina (trombocitni faktor rasta, transformišući faktor rasta β i bazični fibroblastni faktor rasta) čiji su plazmatski nivoi značajno povišeni u HML. Treba napomenuti da ovi citokini igraju važnu ulogu u modulisanju angiogeneze, a karakteristično je da koštana srž pacijenata sa HML pokazuje najveći broj krvnih sudova i najveću vaskularnu površinu od svih leukemija (22).

Blasti kod pacijenata sa limfoidnom blastnom krizom eksprimiraju terminalnu deoksinukleotidil transferazu, enzim koji katalizuje polimerizaciju deoksinukleotidil trifosfataze i uglavnom se nalazi u slabo diferenciranim B i T ćelijama. U većini slučajeva limfoidne HML-BP, blasti pokazuju B-ćelijski imunofenotip, izražavajući CD10, CD19 i CD22 (23). Nasuprot tome, mijeloidna HML-BP ima karakteristike akutne mijeloidne leukemije, a

blasti se boje peroksidazom i ekspimiraju mijeloidne markere kao što su CD13, CD33 i CD117. Često se mijeloidni markeri kao što su CD13 i CD33 mogu naći kod pacijenata sa limfoidnom HML-BP. Opisani su retki slučajevi megakarioblastne, eritroblastne i mastoblastne transformacije.

2.5.3. Biohemijske abnormalnosti

Biohemijske abnormalnosti koje se mogu videti kod pacijenata sa ne lečenom hroničnom mijeloidnom leukemijom obuhvataju hiperurikemiju i hiperurikozuriju. Uratna ekskrecija je često 2-3 puta viša nego normalno. Formiranje uratnih kamenaca je često kod obolelih od HML, a pacijenti koji su podložni mogu razviti akutni uratni artritis ili uratnu nefropatiju.

Neutrofili sadrže vitamin B₁₂-vezujući protein, transkobalamin I i III. Pacijenti sa mijeloproliferativnim bolestima imaju povećan serumski nivo kapaciteta vezivanja vitamina B₁₂, a izvor proteina je uglavnom zreo neutrofilini granulocit. Serumski nivo vitamina B₁₂ kod HML je u proseku 10 puta viši nego što je normalno. Povećanje je srazmerno ukupnom broju leukocita u ne lečenih pacijenata i opada ka normalnom nivou sa tretmanom, mada povišen nivo B₁₂ uglavnom perzistira čak i kada se bela krvna zrnaca spuste na skoro normalan nivo sa terapijom.

Serumski nivo LDH je povišen u hroničnoj mijeloidnoj leukemiji. Pseudohiperkaliemija može se videti kao posledica otpuštanja kalijuma iz leukocita tokom zgrušavanja. Hiperkalcemija i/ili hipokaliemija nastaju u hroničnoj fazi bolesti, ali takve komplikacije su veoma retke dok se bolest ne transformiše u akutnu leukemiju. Serumski holesterol je smanjen kod pacijenata sa HML. Lažna hipoglikemija ili hipoksemija može biti rezultat potrošnje od strane neutrofila posle uzimanja uzorka.

Srednji nivo histamina je značajno povišen kod pacijenata u hroničnoj fazi (medijana: ≈ 5000 ng/mL) u odnosu na zdrave osobe (medijana: ≈ 50 ng/mL) i ovaj porast je u korelaciji sa brojem bazofila u perifernoj krvi. Slučajevi izražene bazofilije praćeni svrabom, urtikarijom i hiperaciditetom želuca povezani su sa ogromnim porastom (nekoliko stotina puta) koncentracije histamina u krvi.

Vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF), fibroblastni faktor rasta, faktor rasta hepatocita, angiogenin i endoglin, su upadljivo povećani u serumu pacijenata sa HML.

2.6. Prognostički scoring sistemi

Zbog postojanja razlike u kliničkoj agresivnosti između početne CP i uznapredovale faze HML i zbog toga što prognoza HML može značajno varirati čak i kod pacijenata u istoj fazi bolesti, razvijeno je nekoliko prognostičkih scoring sistema u pokušaju da se predvidi ishod bolesti i planira i individualizuje lečenje pacijenata sa HML. Za pacijente u hroničnoj fazi uobičajeno

je da se koristi neki od dostupnih prognostičkih scoring sistema, kao što su Sokal, Euro ili nedavno razvijen EUTOS skor. Za izračunavanje svih ovih scoring sistema koriste se parametri koji se dobijaju pri dijagnozi bolesti iz kliničkog pregleda i nalaza u perifernoj krvi, a pre započinjanja bilo kakve terapije. Najnovije preporuke su da se koristi podela pacijenata na nisko rizičnu (uključujući i srednje rizičnu) i visoko rizičnu populaciju, bez obzira na sistem koji se koristi. Još uvek nema dokaza da je bilo koji od ova tri scoring sistema superiorniji i ne postoje jasni dokazi da se pacijenti sa srednjim rizikom ponašaju drugačije od onih sa niskim rizikom. Delecija hromozoma 9 i varijantna translokacija nisu od značaja za prognozu, dok klonska evolucija Ph-hromozoma ima negativnu prognostičku vrednost, naročito u slučaju trizomije 8, trizomije Ph+, izohromozoma 17, trizomije 19. Visok rizik i klonska evolucija Ph-hromozoma mogu pomoći u identifikaciji pacijenata koji su pogodni za klinička ispitivanja ali u svakodnevnoj praksi ne zahtevaju drugačiji početni tretman. Razvoj klonske evolucije Ph-hromozoma tokom lečenja je znak prelaska u fazu akceleracije.

2.6.1. Sokal skor rizika

Prognostički sistem koji se najviše koristi je Sokal skor, jer doslednije predviđa ishod bolesti u poređenju sa drugim prognostičkim sistemima. Sokal skor je izveden iz rezultata lečenja 813 pacijenata sa HML prikupljenih iz 6 evropskih i američkih serija tokom 1960-ih i 1970-ih (24). U ovom sistemu, rizik od smrti obračunava se na osnovu bazičnih karakteristika pacijenata i bolesti uz korišćenje sledeće formule:

$$\lambda_i (+) / \lambda_o (t) = \text{Exp } 0,0116 (\text{starost} - 43,4) + 0,0345 (\text{slezina} - 7,51) + 0,188 [(\text{trombociti}/700)^2 - 0,563] + 0,0887 (\text{blasti} - 2,10).$$

Ovaj sistem bodovanja ustanovljava 3 prognostičke grupe sa niskim, umerenim i visokim rizikom, odnosno sa vrednostima < 0,8; 0,8-1,2 i > 1,2 i srednjom medijanom preživljavanja od 2,5; 3,5; i 4,5 godina, respektivno. Treba napomenuti da većina pacijenata od kojih je Sokal skor izveden su tretirani terapijama koje nisu više u upotrebi, kao što su busulfan, intenzivna hemioterapija i splenektomija. Međutim, nekoliko sprovedenih studija 90-tih godina XX veka su pokazale primenljivost ovog scoring sistema u modernim serijama. Rezultati GALGB studije su pokazali da od 625 pacijenata sa HML-CP koji su lečeni hemioterapijom, njih 168 (27%) su imali visok rizik i 2-godišnje preživljavanje od 70% i naknadnu verovatnoću smrti od oko 30% godišnje. Nasuprot tome, grupa niskog rizika je imala 2-godišnje preživljavanje od 91% i naknadni rizik od smrti od oko 17% godišnje (25).

Sokal skor ima nekoliko ograničenja. Prvo, kod asimptomatskih pacijenata čija se bolest može otkriti samo molekularnim testiranjem, vreme može biti suštinski relativno u odnosu na one pacijente koji su dijagnostikovani posle prezentovanja simptoma bolesti. Drugo, korišćenje potentnijih terapijskih modaliteta u HML, kao što je primena imatiniba, povezano je sa gubitkom prediktivne vrednosti nekih prognostičkih faktora. Ipak, Sokal skor identifikuje pacijente sa značajno različitim verovatnoćama odgovora na imatinib, iako

pacijenti sa visokim skorom rizika sada imaju mnogo bolji ishod (26). Sokal skor se koristi i u eri inhibitora tirozin kinaze, jer koreliše sa odgovorom na imatinib, sa preživljavanjem bez događaja, i čak sa mogućnošću postizanja dugotrajne kompletne molekularne remisije.

2.6.2. Euro skor rizika

Hasford je 1998. godine objavio rezultate meta-analize koja je sprovedena sa ciljem da razvije pouzdan prognostički scoring sistem za procenu preživljavanja pacijenata sa HML lečenih interferonom- α . Pacijenti su ispitivani u prospektivnoj studiji kako bi se identifikovali prognostički faktori za preživljavanje pacijenata i otkrile grupe sa značajnom razlikom u preživljavanju.

Hasford skor ima najbolje karakteristike i najviše je rasprostranjen, i za njegovo izračunavanje potrebno je: starost pacijenta, broj trombocita, procenat perifernih blasta, veličina slezine, procenat perifernih eozinofila i bazofila. Izračunava se prema formuli:

Hasford skor = $(0,6666 \times \text{starost})$ [0 kada je starost < 50 godina; 1, inače] + $0,0420 \times$ veličina slezine [cm ispod rebarnog luka] + $0,0584 \times$ blasti [%] + $0,0413 \times$ eozinofili [%] + $0,2039 \times$ bazofili [0 kada su bazofili < 3%; 1, inače] + $1,0956 \times$ broj trombocita [0 kada su trombociti < $1500 \times 10^9/L$; 1, inače]) $\times 1000$.

Među analiziranim pacijentima, tri različite rizične grupe su identifikovane: grupa niskog, umerenog i visokog rizika sa vrednostima nižim od 780, između 780 i 1480 i višim od 1480. Srednje vreme preživljavanja u grupi niskog rizika je bilo 98 meseci, srednjeg rizika 65 meseci i visokog rizika 42 meseca (27). Neke analize su pokazale da ovaj sistem bodovanja ima manju sposobnost predviđanja među pacijentima lečenim imatinibom, dok su drugi našli da je još uvek koristan.

2.6.3. EUTOS skor rizika

Rezultati lečenja hronične mijeloidne leukemije su se značajno promenili uvođenjem inhibitora tirozin kinaze u terapiju što je dovelo do potrebe razvoja novog prognostičkog sistema. Hasford J. i sar. (28) su 2011. godine izveli novi prognostički sistem koji je superiorniji od Sokal i Euro skora i u prognostičkim mogućnostima i u jednostavnosti. Novi EUTOS skor je razvijen i potvrđen u studiji koja se oslanja na bazu podataka više od 2000 prospektivno dijagnostikovanih, lečenih i praćenih pacijenata sa hroničnom fazom HML lečenih imatinib mesilatom, koji su bili uključeni u nezavisnu studiju. EUTOS skor se zasniva samo na procentu bazofila u perifernoj krvi i veličini slezine, ali je formulisan i pokazuje da ima poboljšanu moć predviđanja. Izračunava se prema formuli:

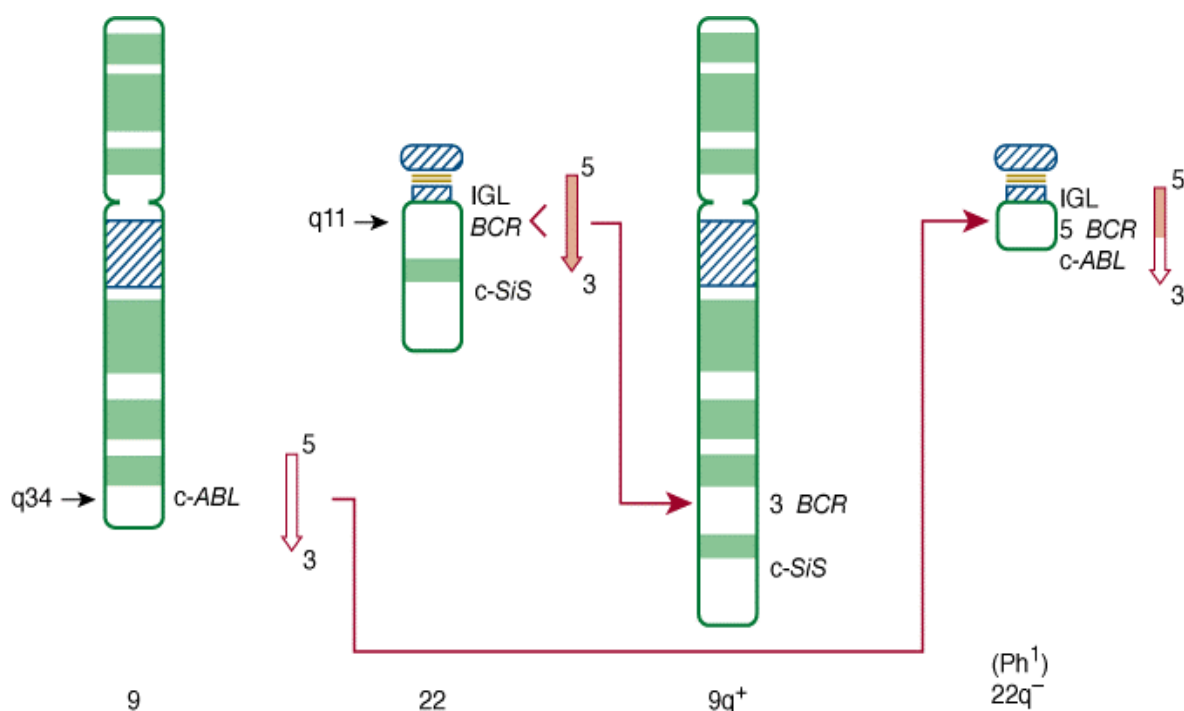
EUTOS skor = $(7 \times \text{bazofili}) + (4 \times \text{veličina slezine})$,

gde se veličina slezine meri u santimetrima ispod rebarnog luka. Novi prognostički scoring sistem identifikuje visoko rizičnu grupu sa vrednošću skora ≥ 87 i nisko rizičnu grupu čija je vrednost <87 . EUTOS skor predviđa da 34% visoko rizičnih pacijenata neće postići kompletan citogenetski odgovor posle 18 meseci terapije. Predviđa preživljavanje bez progresije posle 5 godina koje u grupi visokog rizika iznosi 82%, a u grupi niskog rizika 90%. Među pacijentima u visoko rizičnoj grupi 12% je progrediralo u uznapredovalu fazu bolesti u poređenju sa 7% u nisko rizičnoj grupi. Skor može biti korišćen u identifikaciji pacijenata sa HML sa signifikantno nižom mogućnošću odgovora na terapiju i preživljavanjem, upozoravajući na one koji zahtevaju pažljivije praćenje i raniju promenu terapije. Novi EUTOS skor nije revolucionaran, kao što je to bio slučaj posle uvođenja Sokal i Euro skora, ali on donosi signifikantni napredak jer pruža bolje predviđanje preživljavanja u odnosu na prethodne scoring sisteme. On se posebno odnosi na pacijente lečene imatinibom i više nema potrebe za korišćenjem prognostičkih klasifikacija koje uključuju faktore za koje nije nađeno da utiču na odgovor na terapiju imatinibom. Novi skor je još jednostavniji i praktičniji u primeni jer koristi samo dve varijable koje mogu biti lako izmerene u rutinskoj praksi. Vrednost skora bi trebalo da bude ispitivana od strane drugih istraživača u budućnosti, iako će biti teško poboljšati ga jer je terapijska efikasnost imatiniba visoka. Jedino će napredak u proceni molekularnog odgovora podržati nove prognostičke sisteme.

2.7. Citogenetski nalaz

Definitivna dijagnoza HML se oslanja na citogenetska i molekularna testiranja za identifikaciju t (9; 22) (q34.1; q11.21) i/ili BCR-ABL hibridnog gena, koji je patognomoničan za ovu bolest. Ph-hromozom je rezultat uravnoteženog premeštanja citogenetskog materijala posle pauze na hromozomu 9 na kraku q34.1 koji premešta 3' segment ABL gena do 5' segmenta BCR gena na hromozomu 22 na kraku q11.21 (shema 1). Ph-hromozom je otkriven kod 95% pacijenata sa HML i kod 5% dece i 15% do 30% odraslih sa akutnom limfoblastnom leukemijom. Pored toga, oko 2% pacijenata sa novodijagnostikovanom akutnom mijeloidnom leukemijom mogu imati ovu citogenetsku abnormalnost. Ph-hromozom se prezentuje u svim hematopoeznim ćelijskim linijama (eritroblastima, granulocitima, monocitima, megakariocitima, T i B-ćelijskim progenitorima) ali nije prisutan u većini B i T limfocita periferne krvi.

Otprilike 70% pacijenata u hroničnoj fazi imaju klasičan Ph-hromozom u ćelijama. Preostalih 20% pacijenata još imaju gubitak Y hromozoma [t (Ph),-Y]; dodatni hromozom C-grupe, obično broj 8 [t (Ph),+8]; dodatni hromozom 22q- ali bez 9q+ [t (Ph),22q-]; ili t (Ph) plus bilo koju drugu stabilnu translokaciju ili drugi minorni klon. Povremeno se javljaju translokacije koje uključuju 3 ili više hromozoma i nazivaju se varjanta Ph-hromozom translokacije. Varjanta Ph-hromozom translokacije se javlja kod 5% pacijenata sa HML i uključuju kompleksne rearanžmane i svaki hromozom izuzev Y hromozoma može biti uključen.



Shema 1. Šematski prikaz nastanka Filadelfija hromozoma

Postoji jednostavna varijanta Ph-hromozom translokacije, gde je Ph-hromozom koji je 22q- prisutan ali celokupna promena hromozomskog materijala uključuje hromosome osim 9 i kompleksna varijanta koja uključuje promene materijala između hromozoma 9,22 i trećeg ili više hromozoma. Iako se u početku mislilo da je to znak loše prognoze, najnoviji podaci (pacijenata lečenih imatinibom) su pokazali da je varijanta Ph-hromozom translokacije povezana sa sličnom prognozom u poređenju sa pacijentima koji pokazuju klasičan Ph-hromozomom (29).

Kod 5% pacijenata sa tipičnim HML fenotipom, Ph-hromozom se ne može detektovati, ali se može utvrditi prisustvo BCR-ABL transkripta. Ovi pacijenti imaju istu biologiju i ishod kao i oni koji izražavaju Ph-hromozom. Među 5% do 10% pacijenata sa kliničkim karakteristikama HML koji ne ispoljavaju Ph-hromozom, 30% do 50% ima molekularni dokaz koji uključuje rearanžman BCR i ABL. Oni koji ne izražavaju ovu molekularnu abnormalnost tj. oni koji su zaista Ph-hromozom negativni, predstavljaju atipičnu HML i imaju drugačiju prognozu i tretman (30).

Malo se zna o mehanizmima koji su uključeni u blastnu transformaciju ove bolesti, ali sticanje dodatnih citogenetskih abnormalnosti, klonska evolucija, dešava se u Ph-hromozom pozitivnim ćelijama i igra značajnu ulogu u progresiji HML. Najčešće sekundarne citogenetske anomalije koje se nalaze kod pacijenata sa klonskom evolucijom kao što su trizomija 8, izohromozom 17, dvostruki Ph-hromozom, mogu biti povezane sa prekomernim izražavanjem c-Myc i BCR-ABL kao i gubitkom 17p. Ostale citogenetske aberacije, kao što je

trizomija 19, trizomija 21, trizomija 17 i delecija 7, povezuju se sa manje od 10% slučajeva klonske evolucije (31). Ove genetske lezije više se vezuje za mijeloidnu nego za limfoidnu HML-BP. Međutim jasna korelacija između ovih molekularnih događanja i progresije bolesti još uvek nije ustanovljena. Nedavni rezultati pokazuju da se progresija HML u blastnu krizu verovatno uključuje nekoliko događanja u primitivnim progenitorima, uključujući BCR-ABL amplifikaciju, sticanje otpornosti na apoptozu, genomsku nestabilnost, izbegavanje urođenog i adaptivnog imunog odgovora i aktivaciju β -katenina u granulocitno-makrofagnim progenitorima, što je rezultiralo sticanjem samoobnovljajućeg kapaciteta (32).

Prisustvo citogenetskih aberacija u Ph-hromozom negativnim ćelijama se povremeno pominje tokom tretmana sa interferonom- α ali i tokom tretmana sa imatinibom, a javlja se u 5-10% pacijenata. Ove aberacije ne predstavljaju klonsku evoluciju bolesti jer se pojavljuju u ćelijama bez Ph-hromozoma i ne treba ih posmatrati kao deo faze akceleracije. Značaj ovih događaja je trenutno nepoznat (33). Najčešće takve citogenetske promene su trizomija 8, monozomija 5 ili 7, delecija 7 ili 20q (34, 35). Ovi poremećaji često nestaju spontano i ukazano je da pacijenti sa ovim poremećajima imaju sličan dugoročni ishod kao i pacijenti bez ovakvih anomalija. Međutim, postoje podaci da pojedinačni slučajevi sa monozomijom ili delecijom 7 hromozoma mogu progredirati u akutnu mijeloidnu leukemiju ili mijelodisplastični sindrom.

2.8. Molekularna događanja u hroničnoj mijeloidnoj leukemiji

Za svakog novog pacijenta čija krvna slika ukazuje na dijagnozu hroničnog mijeloproliferativnog poremećaja, otkrivanje BCR-ABL transkripata u uzorku krvi je verovatno najbolji način da se potvrdi dijagnoze HML. Trenutne smernice sugerišu da se pre započinjanja lečenja meri cirkulišući broj BCR-ABL transkripta i da se uradi citogenetska analiza koštane srži kod svakog novog pacijenata sa HML. Citogenetika je od suštinskog značaja da se identifikuju neke neuobičajene translokacija ili dodatne citogenetske abnormalnosti, dok će RQ-PCR za BCR-ABL na dijagnozi identifikovati da li su prisutni uobičajeni transkripti e13a2 (b2a2) ili e14a2 (b3a2), ili jedan od manje čestih fuzionih transkripata.

2.8.1. Molekularne probe

Kod malog procenta pacijenata sa kliničkom slikom HML, citogenetska ispitivanja ne ukazuju na klasičnu varijantu ili maskirani Ph-hromozom. U ovim slučajevima, korišćenje molekularnih proba za region graničnih klastera na 22. hromozomu gotovo uvek otkrije preuređenje fragmenata. Ovaj nalaz je doveo do zaključka da su skoro svi slučajevi HML imaju abnormalnosti na dugom kraku hromozoma broj 22. odnosno BCR rearanžman. Ph-hromozom negativna HML sa BCR rearanžmanom može izraziti p210^{BCR-ABL} i takvi pacijenti

imaju sličan klinički tok kao i Ph-hromozom pozitivna HML. Molekularne probe se mogu obaviti sa uzorkom periferne krvi što je mnogo lakše za primenu, nego citogenetske analize metafaza ćelija koštane srži.

Sposobnost da se identifikuju molekularne posledice t(9;22), kao što je BCR rearanžman, transkripti mRNK mutiranog fuzionog gena i p210^{BCR-ABL}, omogućili su dodatni dijagnostički testovi koji dopunjuju citogenetske analize. Ovi testovi uključuju Southern blot analizu BCR rearanžmana, polimeraznu lančanu reakciju (PCR) koja pojačava abnormalnu mRNK i na kraju manje složenu varijantu, fluorescentnu in situ hibridizaciju (FISH).

PCR-om se može postići osetljivost od jedne pozitivne ćelije na oko 500.000 do 1 miliona ćelija. Ova ekstremna osetljivost zahteva posebnu pažnju u analizi i uključivanje negativnih kontrola. Imunodijagnoza HML je moguća identifikacijom p210^{BCR-ABL}. Ovaj tumor-specifični protein za HML je jedinstven, zasniva se na spoju amino kiselina između ABL i BCR sekvence. Oligopeptidi koji odgovaraju spoju aminokiselina su sintetizovani i koriste se kao antigeni kako bi se razvila antitela na specifičan p210^{BCR-ABL} protein. Kvantitativni PCR je metoda izbora za praćenje rezidualne bolesti, kod ponovne pojave bolesti posle transplantacije koštane srži i za praćenje odgovora na inhibitore tirozin kinaze ako su rutinska citogenetika i FISH negativni za Filadelfija hromozom. Kvantitativni PCR može detektovati ponovnu pojavu ili povećanje nivoa RNK BCR-ABL transkripta pre pojave kliničkog recidiva kod pacijenata posle transplantacije (36).

Višebojni FISH je brza i osetljiva metoda za otkrivanje fuzionog BCR-ABL gena kod pacijenata sa HML. Koristi se u dijagnostičke svrhe jer je jednostavna, precizna i osetljiva metoda koja može otkriti razne molekularne fuzije (npr. e13a2, e14a2, e1a2). Interfazni FISH je brža i osetljivija metoda od citogenetike u identifikovanju Ph-hromozoma. Ako je koncentracija HML ćelija veoma niska, interfazni FISH ne može detektovati BCR-ABL, tako da ima ograničenu upotrebu za detekciju minimalne rezidualne bolesti (37). Hipermetafazni FISH omogućava analizu do 500 metafaza po uzorku za 1 dan. Nekoliko faktora utiče na lažno-pozitivne i lažno-negativne rezultate FISH identifikacije BCR-ABL, kao što su definicija nuklearne fuzije signala, veličina jedra i genomska poziciju ABL tačke prekida (38). Predloženo je da se koriste dupli BCR-ABL fuzioni signali (double-fusion) D-FISH kao tačnija metoda od metode fuzionog signala koja koristi dve boje (single-fusion) S-FISH, jer se u tom slučaju mali procenat normalnih BCR i ABL signala preklapaju (39).

2.8.2. Molekularna biologija BCR-ABL

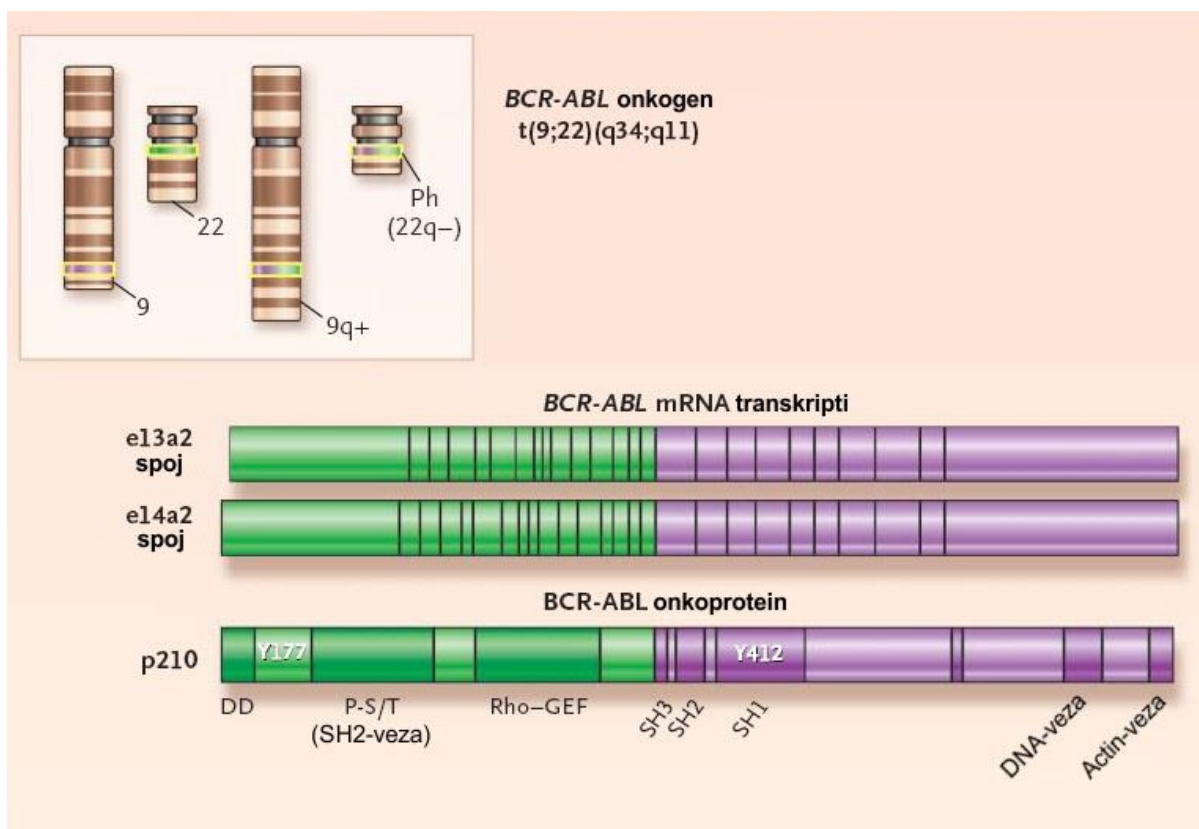
Klasični BCR-ABL gen koji je prisutan kod HML, rezultat je fuzije delova dva normalna gena: ABL gena na hromozomu 9 i BCR gena na hromozomu 22. Oba gena su prisutna svuda u normalnom tkivu, ali njihova precizna funkcija nije dobro definisana. ABL gen je ljudski homolog v-abl onkogen virusne mišje Abelson leukemije i on kodira nonreceptor tirozin kinaze. Zauzvrat, BCR kodira protein sa serin-treonin kinaznom aktivnošću. Fuzija ova dva

gena rezultuje aktivacijom c-ABL protoonkogenom u njegovu onkogenom formu. Kod većine pacijenata sa HML i trećine onih sa Ph-hromozom pozitivnom ALL, prekid se događa unutar 5.8-kb površine koja se proteže do BCR eksona e12-e16 (ranije b1-b5), koja se naziva glavna tačka prekida klaster regiona (M-bcr). Zbog alternativnog spajanja, fuzioni transkript sa bilo b2a2 ili b3a2 krakom može dovesti do sinteze 210-kd hibridnog proteina (p210^{BCR-ABL}) (40, 41). Kliničke karakteristike i odgovor na lečenje su na izgled slični za oba transkripta. U dve trećine pacijenata sa Ph-hromozom pozitivnom ALL i retko u HML, u okviru tačke prekida BCR lokalizovane na površini od 54,4 kb između eksona e2' i e2, nazvana je sporedna tačka prekida klaster regiona (m-bcr), što dovodi do e1a2 mRNK koja se pretvara u 190-kd protein (p190^{BCR-ABL}). Pacijenti sa HML koji nose ovaj transkript klinički se prezentuju sa izraženom monocitozom i mogu imati lošiju prognozu od onih sa tipičnom p210^{BCR-ABL} (42). Identifikovana je treća tačka prekida klaster regiona (μ -BCR) u području ispod 19 eksona, što dovodi do stvaranja 230-kd fuzionog proteina (p230^{BCR-ABL}) koji je povezan sa slučajevima hronične neutrofilne leukemije. Iako sva tri transkripta mogu indukovati poremećaje poput HML kod miševa, p230^{BCR-ABL} ima smanjenu tirozin kinaznu aktivnost u odnosu na p190^{BCR-ABL} i samo delimičnu nezavisnost faktora rasta, što je povezano sa blažim kliničkim tokom hronične neutrofilne leukemije (43). Sve izoforme BCR-ABL imaju aktivnu i neaktivnu konfiguraciju. Zanimljivo, korišćenjem reverzne transkriptaze-polimeraze lančane reakcije (RT-PCR) sa osetljivošću od oko 10⁻⁸, BCR-ABL himerizam je identifikovan kod 25 % do 30% zdrave populacije odraslih. Jedna hipoteza za objašnjenje ovog fenomena je da BCR-ABL možda neće biti jedina genetska lezija neophodna za razvoj hronične mijeloidne leukemije (44).

2.8.3. Leukemogeneza BCR-ABL

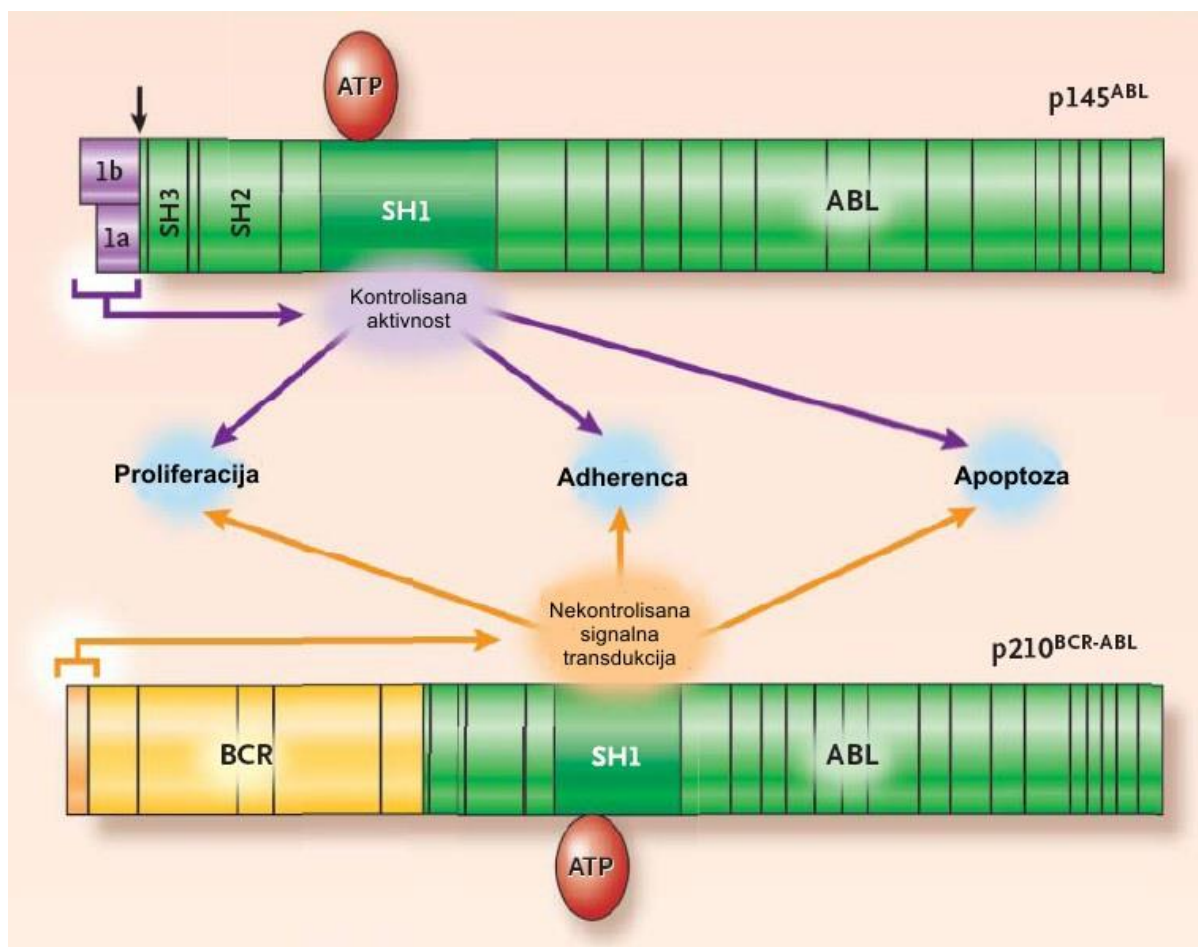
Leukemogeni potencijal p210^{BCR-ABL} leži u činjenici da normalno regulisanje tirozin kinazne aktivnosti ABL proteina je sastavni deo aktivacije priključivanjem nepodudarne BCR sekvence. BCR deluje promovišući dimerizaciju onkoproteina, tako da dva susedna BCR-ABL molekula fosforilišu međusobno na tirozin ostatke u njihovim kinaznim aktivacionim petljama. Nekontrolisana kinaza aktivnost BCR-ABL zatim preuzima fiziološke funkcije normalnog ABL enzima interakcijom sa različitim efektnim proteinima, što rezultuje disregulacijom ćelijske proliferacije, smanjenom aderencom leukemijskih ćelija u stromi koštane srži i smanjenim apoptotskim odgovorom na mutagene stimulanse. Nažalost, relativni doprinos tih efekata na fenotip hronične faze HML je i dalje slabo razumljiv (45).

U klasičnoj HML, BCR-ABL se transkribuje u mRNA molekule sa e13a2 ili e14a2 kracima, koji se prevode u p210^{BCR-ABL} onkoprotein. Ovaj onkoprotein je hibrid koji sadrži funkcionalne domene na N-terminalnom kraju BCR (dimerizacija [DD], SRC-homolog 2 [SH2] mesto vezivanja i Rho GTP-GDP- faktor razmene [GEF] domena) i C-terminalnom kraju ABL. Tirozin 177 (Y177) u BCR delu fuzionog gena i tirozin 412 (Y412) u ABL delu su važni za vezivanje adapternih proteina i za BCR-ABL autofosforilaciju (shema 2).



Shema 2. Translokacija t(9;22) i njeni produkti: BCR-ABL onkogen na Ph-hromozomu i recipročni BCR-ABL na izvedenom 9q+ hromozomu

Aktivnost tirozin kinaze normalnog ABL proteina p145^{ABL}, kodirana je svojim SH1 (SRC-homolog 1) domenom i drži se pod strogom kontrolom, verovatno intramolekulskim vezivanjem na N-terminalnom području koji obuhvata prvi ekson (1b ili 1a) i prvi deo eksona a2. Kod BCR-ABL fuzionog proteina (p210^{BCR-ABL}), nedostatak ABL kap regiona i dimerizacija domena kodiranog prvog eksona BCR su odgovorni za suštinsko aktiviranje ABL SH1 domena, što dovodi do nekontrolisane transdukcije signala i abnormalnog ćelijskog fenotipa. Različiti funkcionalni domeni ABL proteina uključuju SH3 i SH2 (SRC-homolog 3 i SRC-homolog 2) regulatorne domene, SH1 domen sa svojim mestom vezivanja ATP, domen za DNK-vezivanje, G-aktin i F-aktin domen za vezivanje DNK. Poslednja dva su važna za kontrolu organizacije citoskeleta, adheziju ćelija, pokretljivost ćelija i integrin-receptor posredovane transdukcije signala (shema 3).



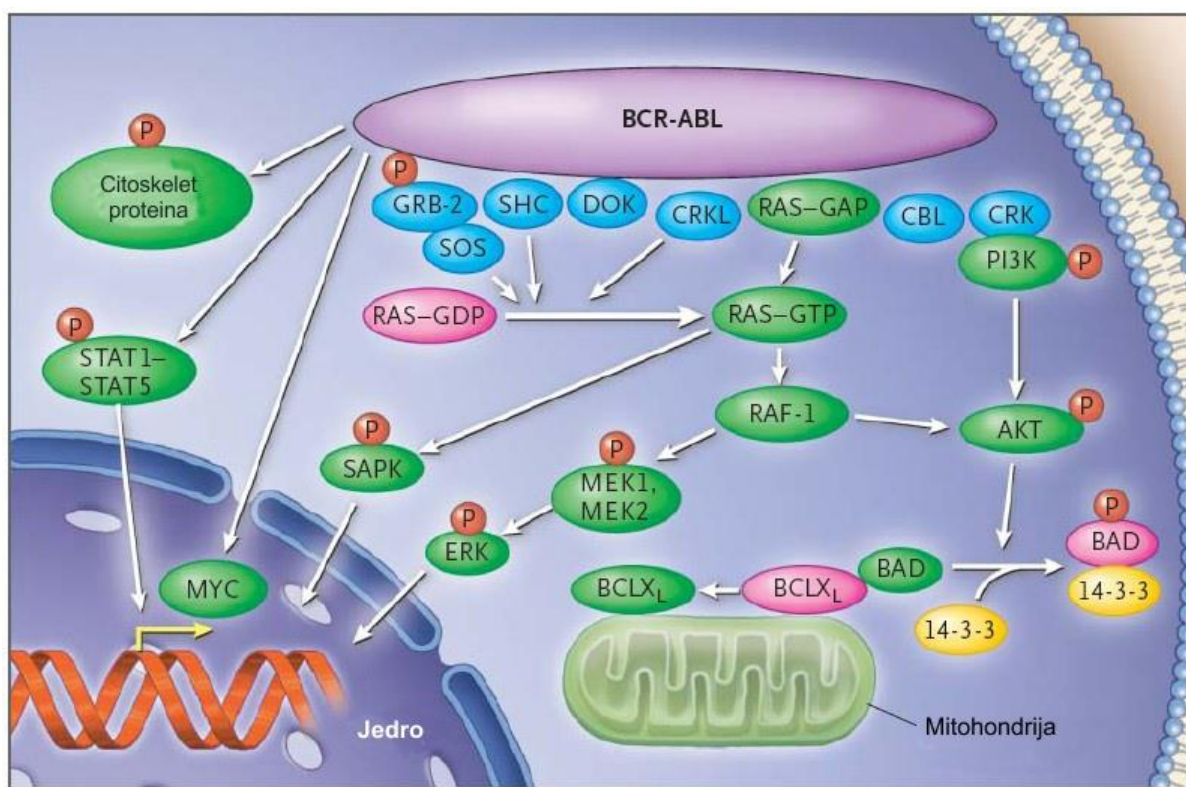
Shema 3. Fiziološka regulacija normalnog ABL proteina i disregulacija BCR-ABL u ključnim ćelijskim procesima kao što su proliferacija, adherencija i apoptoza.

Struktura BCR-ABL proteina i biohemijskih puteva koji su uključeni u leukemogenezu su intenzivno proučavani. Poznavanje uloge nekoliko funkcionalnih oblasti koje proističu iz BCR i ABL proteina omogućava da se testiraju određena svojstva fuzionog proizvoda. Tirozin kinaza kodirana SH1 domenom ABL komponente BCR-ABL je nesumnjivo najvažnija za onkogenu transformaciju. Druga važna mesta za leukemogenezu u ABL delu su SH2 domen i mesta vezivanja na C-terminalnom domenu. Na BCR delu, prvi ekson je odgovoran za dimerizaciju onkoproteina, dok je tirozin na poziciji 177 od ključnog značaja za vezivanje adaptera proteina kao što su faktor rasta receptor-vezanog proteina 2, a N-terminalni fosfoserin i fosfotreonin su potrebni za interakciju sa proteinima koji sadrže SH2 domen, uključujući i samu ABL (46).

Tirozin kinazna aktivnost p210^{BCR-ABL} je uzročno povezana sa razvojem Ph-hromozom pozitivne leukemije kod ljudi. Za razliku od ABL proteina koji se uglavnom nalazi u jedru, protein p210^{BCR-ABL} se nalazi u citoplazmi što ga čini dostupnim velikom broju interakcija posebno sa komponentama signalnih puteva transdukcije. On vezuje i/ili fosforiliše više od 20 ćelijskih proteina u svojoj ulozi onkoproteina. Putevi i interakcije koji uključuju učešće BCR-ABL na mitogen-aktiviranim protein kinazama su višestruki i kompleksni. Nekoliko

bioloških modela, kao što BCR-ABL-izražavajuće CD34+ ćelije u kulturi ili retroviralna transdukcija BCR-ABL u ćelijama miša, su pokazali da je BCR-ABL onkogen taj koji pokreće patogenezu HML. Brojni su putevi aktiviranja u BCR-ABL izražavajućim ćelijama, a fosforilacija na Y177 mestu BCR je od suštinskog značaja za BCR-ABL leukemogenezu (47).

Ćelijski efekti BCR-ABL se ispoljavaju kroz interakciju sa različitim proteinima koji prenose onkogene signale odgovorne za aktivaciju ili represiju transkripcije gena, mitohondrijalnu obradu apoptotičnih odgovora, organizaciju citoskeleta i degradaciju inhibitornih proteina. U ove procese uključeni su različiti proteini RAF, RAS, mitogen aktivirani protein (MAP) kinaza, pretvarači signala i aktivatori transkripcije (STAT), fosfatidilinozitol 3-kinaze (PI3K) i MYC. Većina interakcija se odvija kroz tirozin fosforilaciju i zahtevaju vezivanje BCR-ABL na adapter proteine kao što su faktor rasta receptor-vezanog proteina 2 (GRB-2), DOK, CRK, CRK-sličan protein (CRKL), SRC-homolog-sadržavajući protein (SHC) (shema 4).



Shema 4. Signalni transdukциони putevi na koje utiče BCR-ABL

RAF-kodirana serin-treonin kinazna aktivnost je regulisana p210^{BCR-ABL}. Nishodna regulacija RAF ekspresije inhibira kako BCR-ABL-zavistan rast ćelija HML tako i faktor rasta-zavisnu proliferaciju normalnih progenitora hematopoeze (48). Efikasnost transformacije ćelija pod dejstvom BCR-ABL vrši se uz pomoć adapternog proteina koji može dovesti tirozin kinazne signale do RAS-a. Ovo uključuje i faktor rasta receptor-vezanog proteina 2 (GRB-2), mada p210^{BCR-ABL} aktivira više alternativnih puteva za RAS (49).

Adaptorni molekul CRKL (tirozin-fosforilisani protein neutrofila u HML) je glavni in vivo supstrat za p210^{BCR-ABL}, a deluje tako što se dovodi u vezu sa opadajućim efektima p210^{BCR-ABL}. CRKL je linker protein koji ima sličnost sa v-crk onkogenim proizvodom. Antitela na CRKL mogu imunoprecipitirati paxillin. Paxillin je fokalni adhezioni protein koga fosforiliše p210^{BCR-ABL}, a sam p210^{BCR-ABL} može biti fizički povezan sa paxillinom (50).

Nuklearni faktor (NF- κ B) aktivacije je potreban za p210^{BCR-ABL} posredovanu transformaciju. Ekspresija p210^{BCR-ABL} dovodi do aktivacije NF- κ B-zavisne transkripcije preko nuklearnih translokacija (51).

Ćelijske linije koje eksprimiraju p210^{BCR-ABL} pokazuju konstitutivno aktiviranje Janus povezanih kinaza (JAKs) i pretvarača signala i aktivatora transkripcije (STATs), obično STAT5. STAT5 se aktivira u osnovnim ćelijama koštane srži miša koje su transformisane pod uticajem BCR-ABL. p210^{BCR-ABL} se taloži i fosforiliše zajedničke subjedinice IL-3 i GM-CSF receptora i JAK2. ABL i BCR su multifunkcionalni regulatori GTP-vezujućeg proteina porodice Rho i faktor rasta-vezujućeg proteina GRB2, koji povezuju tirozin kinazu i RAS, a formiraju i kompleks sa BCR-ABL i nukleotidnog promenjenog faktora Sos koji dovodi do aktivacije RAS (52).

Jun kinaze aktivira p210^{BCR-ABL} jer je potrebno prisustvo Jun kinaza za transformaciju. U nekim HML ćelijskim linijama, p210^{BCR-ABL} je povezan sa retinoblastoma (RB) proteinom. Gubitak neurofibromatoznog (NF1) tumor supresor gena i RAS-GTP-aze aktivirajućeg proteina, je dovoljan da proizvede mijeloproliferativni sindrom kod miševa koji liči na ljudsku HML usled RAS-posredovane preosetljivosti na GM-CSF (53).

Dokazano je da p210^{BCR-ABL} utiče na širenje malignog klonu u HML preko inhibicije apoptoze. Apoptozu inhibira p210^{BCR-ABL} odlažući G2/M tranziciju ćelijskog ciklusa posle DNK oštećenja, a može imati anti apoptotski efekat na faktor-zavisne hematopoeze ćelije (54).

2.8.4. BCR-ABL mutacije

Prisustvo tačkastih mutacija BCR-ABL kinaznog domena može se detektovati kod oko 50% pacijenata koji dožive neuspeh terapije inhibitorima tirozin kinaze ili progresiju bolesti. Klinički značaj mutacija se ocenjuje primenom tehnike niske osetljivosti kao što je Sangerovo sekvencioniranje. Mutacije se mogu ranije identifikovati osetljivijim metodama i predvideti ishod bolesti. Mutacije, koje ne treba mešati sa ABL polimorfizmom, sugerišu genetsku nestabilnost i povećan rizik od progresije. Otkriveno je više od 80 zamena amino kiselina za koje je prijavljeno da su povezane sa otpornošću na imatinib, dok dasatinib i nilotinib imaju mnogo manji spektar rezistentnih mutacija, ali ne sprečavaju T315I mutaciju. Mutacije u ABL delu BCR-ABL onkogeni su prisutne kod oko 40% pacijenata koji ne postignu hematološki ili citogenetski odgovor na imatinib, odnosno kod pacijenata sa primarnom i stečenom rezistencijom. Najčešće mutacije povezane sa rezistencijom na imatinib su Thr315Ile, Gli250Glu, Glu255Lis, a Thr253His. Kod pacijenata koji su relapsirali na nilotinib najčešće se

javljaju stečene I253H, E255K/V, F359V/C/I, ili T315I mutacije, dok kod pacijenata koji su relapsirali na dasatinib najčešće su stečene V299L, F317L/V/I/C, T315A, T315I mutacije. T315I mutacija je otporna na bosutinib, dok ponatinib inhibira T315I in vitro, a efikasan je kod pacijenata sa T315I in vivo.

2.9. Angiogeneza

2.9.1. Angiogeneza u hematološkim malignitetima

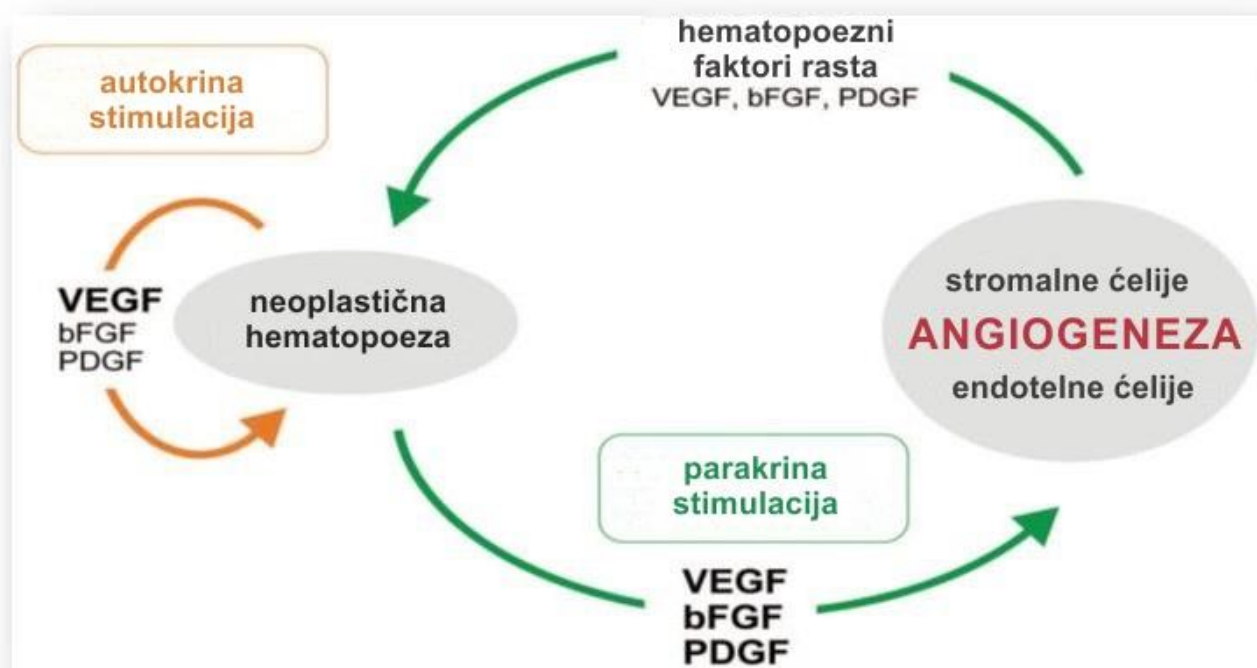
Angiogeneza predstavlja formiranje novih krvnih sudova iz postojeće vaskulature. To uključuje degradaciju proteina ekstracelularnog matriksa i aktivaciju, proliferaciju i migraciju endotelних ćelija i pericita u više stepenom procesu. Pored njene fiziološke uloge u vaskularizaciji tokom ovulacije, placentacije i embriogeneze, angiogeneza je povezan sa rastom, širenjem i metastazama solidnih tumora (55).

Dosadašnja istraživanja su pokazala da je nekoliko pozitivnih i negativnih regulatornih molekula uključeno u proces angiogeneze. Dva najznačajnija regulatorna molekula koji su moćni i specifični pozitivni regulatori su vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF) i osnovni fibroblastni faktor rasta (bFGF). Pokazano je da angiogenezu aktivnost imaju i drugi citokini kao što su faktor nekroze tumora- α (TNF- α), trombocitni faktor rasta (PDGF), tumorski faktor rasta- β (TGF- β), tumorski faktor rasta- α (TGF- α) i hepatocitni faktor rasta (HGF). Ove molekule sekretuju same tumorske ćelije ili ćelije poput makrofaga, mast ćelija, limfocita i fibroblasta. U ovom kontekstu stimulacija sekrecije VEGF i drugih angiogeneznih molekula je u korelaciji sa lošom prognozom kod solidnih tumora. Pretpostavka je da je ovaj efekat VEGF posledica inhibicije apoptoze endotelних ćelija i njihove povećane mogućnosti za migraciju (56).

Što se tiče hematoloških maligniteta, dokazano je izraženo prisustvo VEGF u različitim kulturama ili izolovanim humanim leukemijskim ćelijama uz pomoć parakrinih i autokrinih puteve transdukcije signala. Ovi kompleksni patološki mehanizmi parakrinom regulacijom dovode do direktne stimulacije endotelnih ćelija sa posledičnom proliferacijom, nakupljanjem i otpuštanjem faktora rasta, a sa druge strane autokrinom regulacijom uz pomoć angiogeneznih faktora koje sekretuju neoplastične ćelije i pokreću ćelijski rast i inhibiše apoptozu, što na kraju dovodi do širenja ćelija neoplastičnog klon (shema 5). Prema ovim nalazima, mikrovaskularna gustina u koštanoj srži može postati buduća meta za inovativne anti-angiogenezne i anti-leukemijske terapijske strategije i zbog toga zahteva razmatranje i sistemsko istraživanje.

Mnoge studije su potvrdile pretpostavku o značaju angiogenezne sposobnosti tumorskih ćelija koje utiču na širenje i metastaziranje u različitim malignitetima. Više studija je potvrdilo da je povećana gustina mikrovaskularizacije u područjima gde je neovaskularizacija

bila najintenzivnija, značajan i nezavistan prognostički indikator u ranoj fazi raka dojke. Studije karcinoma prostate, melanoma, gastrointestinalnog karcinoma i karcinoma jajnika, su sugerisale da je angiogenezni indeks koristan prognostički faktor (57).



Shema 5. Dinamika angiogeneze u hematološkim malignitetima: autokrini i parakrini stimulacija

U literaturi postoji manje podataka o angiogenezi i o molekulima povezanim sa angiogenezom u hematološkim malignitetima. Normalna vaskulatura u koštanoj srži formira sinusoidne mreže koje su podržane ćelijama hematopoeze, slično kao ćelijska podrška u drugim organima poput bubrega i slezine. Bliska veza u fizičkom i konceptualnom smislu između hematopoezne funkcije koštane srži i njene vaskularne mreže podržava shvatanje da ćelije leukemije zavise od vaskularne podrške kao i ćelije većine solidnih tumora (58). Zajedničko poreklo hematopoeznih i vaskularnih ćelija tokom embrionalnog razvoja i stvaranje hematopoeznih faktora rasta od strane endotelne ćelije su u skladu sa ovim konceptom. Nedavna istraživanja angiogeneznih aspekata hematološke onkologije je potvrdilo postojanje paralele sa angiogenezom solidnih tumora. Iako se klinički značaj ove pojave u većini hematoloških maligniteta još uvek ispituje, postoje nepobitni dokazi koji indirektno ukazuju da angiogeneza koštane srži ima ulogu u patofiziologiji i toku nekih leukemija i limfoproliferativnih bolesti. Pokazano je da, intracelularni i/ili serumskih vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF) koji je potentan antiangiogenezni molekul, ima

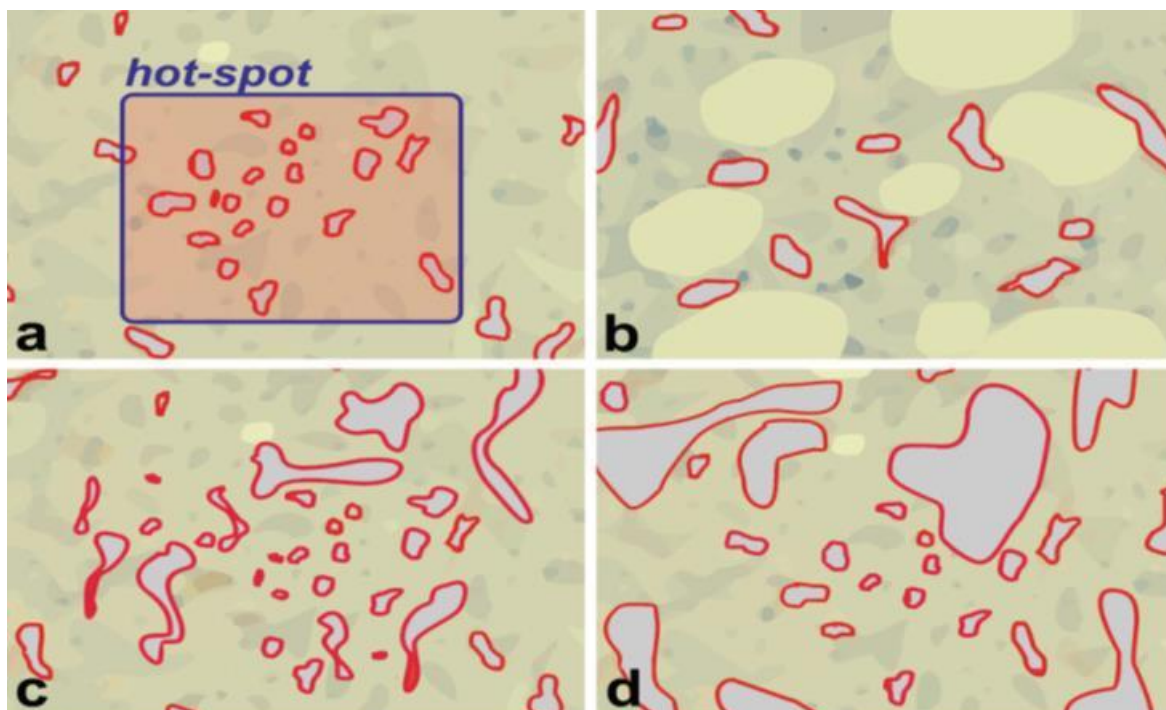
prognostički značaj u akutnim mijeloidnim leukemijama (59), hroničnoj limfocitnoj leukemiji (60) i ne-Hoćkinskom limfomu (61). Stepem angiogeneze u hroničnoj mijeloidnoj leukemiji analiziran je u nekoliko studija, koje su dokumentovale povišene vrednosti gustine malih krvnih sudova (MVD) u koštanoj srži pacijenata sa HML (62). Posle toga je usledilo istraživanje koje je pokazalo da je Tie-1 molekul koji je ukljućen u regulisanje angiogeneze, nezavistan pokazatelj preživljavanja u ranoj hroničnoj fazi HML (63). Intrigantna identifikacija BCR-ABL u sastavu u endotelnih ćelija u HML je povećala interesovanje za istraživanje u ovoj oblasti, što podrazumeva da endotelne ćelije mogu biti integrativni deo u procesu leukemogeneze.

2.9.2. Evaluacija angiogeneze

Određivanje vaskularnosti mora da uključi patofiziološke aspekte perfuzije. Tokom godina istraživanja angiogeneze bile su korišćene različite tehnike kako bi odredile gustinu vaskularnih struktura kao što su sinusoidi, kapilari i veliki krvni sudovi u koštanoj srži. Imunohistohemijske metode koje se koriste u ovim istraživanjima moraju se analizirati veoma kritički, jer neki markeri mogu otkriti različite strukture koštane srži a samim tim i različite aspekte vaskularnih struktura. Među različitim imunohistohemijskim markerima za identifikaciju endotelnih ćelija CD34 i CD105 su se pokazali kao najpouzdaniji u većini studija koje su proučavale angiogenezu koštane srži. Imunohistohemijsko bojenje sa CD34 je veoma pouzdana metoda, jer i pored toga što boji i hematopoezne progenitor ćelije omogućava jasno razlikovanje morfologije endotelnih ćelija (64).

Istraživanja su potvrdila da je razumno da se morfometrijska analiza zasniva na kvantifikaciji mikrovaskularne gustine i drugih parametara koji karakterišu vaskularnu arhitekturu. U tom pogledu, mikrovaskularna gustina je došla u žižu naučnog interesovanja, jer ovaj parametar odražava angiogenezni kapacitet neoplastičnih ćelija, a samim tim predstavlja ogledalo agresivnosti bolesti. Iz praktičnih razloga definisana su tzv. hot spot područja, odnosno područja sa najvećom mikrovaskularnom gustinom koja se prvo identifikuju na niskom uvećanju ($\times 100$) na uzorku tkiva i potom se konačna procena vrši na velikom uvećanju ($\times 400$). Ova tehnika se koristi sa ciljem da neutrališe mogućnost heterogene distribucije vaskularnih struktura u okviru neoplastičnog tkiva (65).

Kada je u pitanju koštana srž treba imati u vidu da tu ne postoji homogena neoplastična ćelijska populacija i da stroma signifikantno utiče na razvoj krvnih sudova uključujući i sinusoidne. Uticaj starosti pacijenta i tipa hematološkog maligniteta na različitu količinu masnog tkiva, fibroznog matriksa ili edema ne treba zanemariti. Kao posledica toga, kvantifikacija mikrovaskularne gustine mora da se obavlja prema celularnosti, odnosno hematopoeznoj površini. Kvantifikacija mikrovaskularne gustine od strane tzv. hot spot metoda treba da bude poboljšana parametrima koji karakterišu protok krvi kao što su mikrovaskularna površina, oblik, vijugavost i grananje (slika 3) (60, 64, 66, 67).

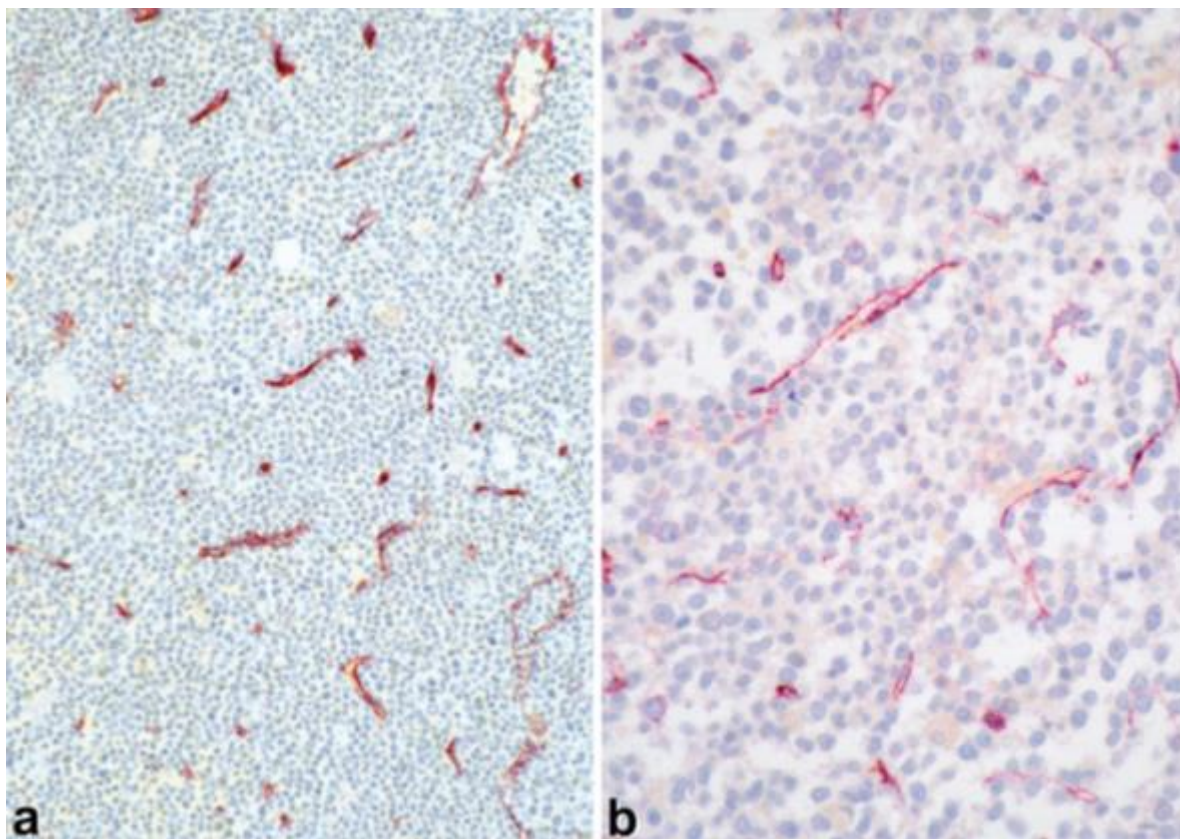


Slika 3. Kvantifikacija gustine krvnih sudova u koštanoj srži kod hematoloških maligniteta: *a.* Prema hot spot tehnici samo područja sa intenzivnom neovaskularizacijom se analiziraju, *b.* Koštana srž sa povećanom količinom masnih ćelija, *c.* Smanjena prokrvljenost koštane srži posle hemoterapije ili transplantacije, *d.* Funkcionalne karakteristike perfuzije kao što su vaskularna površina, vijugavost i grananje treba morfometrijski analizirati.

2.9.3. Angiogeneza u hroničnoj mijeloidnoj leukemiji

Postoji obilje podataka o ključnoj ulozi angiogeneze na rast tumora, uključujući i njen potencijal za invaziju, metastaziranje i napredovanje. Iako je poznata činjenica da endotelne ćelije u koštanoj srži deluju kao mikrookolina za hematopoezne matične ćelije održavajući normalnu hematopoezu, tek je nedavno bio prepoznat značaj mikrovaskularizacije za razvoj hematoloških neoplazmi. U tom smislu većina istraživanja su u skladu sa pretpostavkom da kod akutnih i hroničnih leukemija, uključujući mijelodisplastični sindrom i multipli mijelom, mikrovaskularna gustina (MVD) ima značajan uticaj na širenje ćelija neoplastičnog klon. Međutim manje podataka se može naći o angiogenezi u koštanoj srži kod hroničnih mijeloproliferativnih bolesti. U poređenju sa normalnom koštanom srži ispitivanje Filadelfija hromozom pozitivne hronične mijeloidne leukemije pokazalo je dvostruko povećanje MVD što je funkcionalno povezano sa povišenim nivoima angiogeneznih citokina (60, 62, 67). Prema trodimenzionalnim snimcima struktura novoformiranih krvnih sudova je značajno izmenjena i pokazuje veću nepravilnost oblika i abnormalno grananje sa posledničnim izmenjenim protokom krvi, kao i povećanjem vlakana što je praćeno višim stepenom MVD (62). Plazmatski nivoi angiogeneznih citokina VEGF i bFGF su dokazano povišeni u kontekstu

neoangiogeneze u hroničnoj mijeloidnoj leukemiji, a preliminarne studije na maloj seriji pacijenata sa HML ukazuju da su viši nivoi VEGF povezani sa nepovoljnom prognozom (60, 62, 63). U poređenju sa normalnom koštanoj srži, kod HML je uočena signifikantno viša MVD. Krvni sudovi su manji, više iregularnog oblika i otkrivaju upadljivu izvijuganost kod pacijenata sa HML (slika 4).



Slika 4. Angiogeneza u koštanoj srži na dijagnozi Ph+HML: a. Hipercelularna koštana srž otkriva značajan porast malih krvnih sudova iregularnog oblika, b. Abnormalno grananje sa varijabilnom luminalnom distenzijom.

Studija Kvasnicka HM. i sar. (68) je analizirala vaskularnost koštane srži u seriji od 98 pacijenata sa hroničnom fazom Filadelfija hromozom pozitivne hronične mijeloidne leukemije. Koštana srž ovih pacijenata pri dijagnozi pokazala je značajno više vrednosti mikrovaskularne gustine, mikrovaskularne površine, izvijuganosti malih krvnih sudova i iregularnosti oblika u odnosu na kontrolnu grupu. Pacijenti su lečeni monoterapijom interferonom- α , hidroksiureom ili kombinacijom interferona- α i hidroksiure. U studiju su ušli i pacijenti lečeni inhibitorima tirozin kinaze, imatinibom kao prvom terapijskom linijom (69). Morfometrijska analiza je pokazala da u poređenju sa kontrolom primena imatiniba kao prve terapijske linije dovodi do značajnog smanjenja gustine malih krvnih sudova i retikulinskih vlakana. Kod većine pacijenata, smanjenje vaskularnosti koštane srži je bilo povezano sa kompletnim citogenetskim odgovorom. Značajan antiangiogenezni efekat je primećen posle tretmana hidroksiureom, nasuprot primeni interferona- α kao monoterapije ili u kombinaciji sa hidroksiureom. Tako da je ova studija potvrdila antiangiogenezni kapacitet imatiniba koji

dovodi do normalizacije vaskularnosti i regresije fibroze koštane srži. Nasuprot tome, hematološki odgovor na terapiju interferonom- α je nezavistan od angiogeneze koštane srži.

Interesantna je i studija Thiele J. i sar. (70), koja je analizirala koštanu srž pacijenata sa hroničnom mijeloidnom leukemijom koji su lečeni mijeloablativnom terapijom praćenom alogenom transplantacijom matične ćelije hematopoeze (TMČH). Koštana srž je analizirana primenom imunohistohemijskih i morfometrijskih tehnika u pre i post transplantacionom periodu. Ova analiza je pokazala da pacijenti koji imaju fibrozu koštane srži pri dijagnozi u odnosu na normalnu koštanu srž imaju značajan porast srednje vrednosti mikrovaskularne površine (MVA) ali i drugih morfometrijskih parametara koji karakterišu izvijuganost (iregularnost oblika) i grananje vaskularnih struktura (faktor oblika, maksimalna dužina, odstupanje od cirkularnosti). Krvni sudovi su više iregularnog oblika i otkrivaju upadljivu izvijuganost. Čak i nefibrotična koštana srž kod HML pokazuje značajan porast količine malih krvnih sudova u odnosu na kontrolnu grupu. Rezultati studije Kumar S. i sar. (71) su ukazali da u ranom periodu posle TMČH postoji značajan porast u MVD, ali i da se posle 6 meseci od TMČH normalizuje MVD. Međutim, čak i posle 6 meseci MVA je veći od normalnog i arhitektura krvnih sudova ostaje grubo izmenjena. Anomalije mikrovaskularne arhitekture su lako dokazive primenom trodimenzionalne kompjuterske rekonstrukcije pre i posle TMČH. U pre transplantacionim biopsijama vaskularna mreža je nepravilnog oblika, mogu se dokazati izvijugani i razgranati krvni sudovi. U ranom periodu posle transplantacije oko 20 dana, broj malih krvnih sudova je povećan, posle 60 dana složenost vaskularnih struktura je smanjena, vaskularna arhitektura je i dalje poremećena i pokazuje iregularnost oblika i slepo završene sinusoide.

Ovi rezultati pokazuju da se terapijska efikasnost imatiniba u značajnoj meri zasniva i na njegovoj antiangiogenezoj aktivnosti. Naime dokazano je da imatinib značajno redukuje BCR-ABL posredovano lučenje VEGF koji je uglavnom odgovoran za angiogenezne efekte (72). Pošto imatinib deluje na aktivnost PDGF receptora, na normalizaciju vaskularnih struktura mogu uticati efekti megakariocitopoze tako što neutrališu svoju stimulativnu funkciju na stromu koštane srži (73). Moguće je da specifična efikasnost ovog leka zavisi od nekih drugih mehanizama delovanja koje su verovatno važni kao antiangiogenezni potencijal. Uzimajući sve činjenice u obzir može se zaključiti da su u hematološkim bolestima verovatno različiti citokini koji posreduju u angiogenezi (VEGF, bFGF) uključeni ne samo u autokrine petlje hematopoetskih malignih ćelija već i u parakrine puteve, gde stromalne ćelije stimulirane malignim ćelijama proizvode faktore rasta za endotelne ćelije i posle toga oslobađaju medijatore za neoplastičnu ćelijsku populaciju. Tri glavna faktora su prisutna u ovom složenom procesu povećane angiogeneze: hematopoetske maligne ćelije, stromalne ćelije i endotelne ćelije. Verovatno je da inhibicija samo jedne od ovih različitih populacija nije dovoljna da eliminiše bolest i budući inovativni terapijskih pristup moraće će da uzme u obzir potrebu da cilja na sve tri komponente.

2.10. Dijagnoza hronične mijeloidne leukemije

Dijagnoza HML se može postaviti na osnovu nalaza u perifernoj krvi i uvećanja slezine. Povišen broj belih krvnih zrnaca sa skretanjem u levo, često prisutna bazofilija i uvećana slezina ukazuju da je reč o HML. Iako se dijagnoza bolesti može potvrditi prisustvom BCR-ABL transkripta primenom FISH metode ili PCR za BCR-ABL, aspiracija koštane srži sa citogenetskom analizom je obavezna dijagnostička procedura. Citološki pregled koštane srži nam pokazuje da li možda postoji povećan procenat blasta ili bazofila što je neophodno za određivanje faze bolesti (hronične, faze akceleracije ili blastne krize). Citogenetska analiza ukazuje da li postoje dodatne hromozomske anomalije pored Filadelfija hromozoma tj. da li postoji klonaska evolucija bolesti. Ako se citogenetika ne bi uradila pri postavljanju dijagnoze a kasnije se identifikuju takve promene, nemoguće je da se utvrdi da li je ovo nova pojava ili upornost ranije prisutnih abnormalnosti. Zato se kod svih pacijenata kod kojih se sumnja na HML sprovodi citološko i citogenetsko ispitivanje koštane srži kao i ispitivanje prisustva fuzionog BCR-ABL gena primenom FISH ili PCR metode. Apsolutni nivo BCR-ABL transkripta pri dijagnozi nije od značaja, mada se može desiti da u slučaju prisustva retkih rearazmana (npr. e13a3, e14a3, e19a2) standardnim PCR tehnikama njihovo prisustvo nije moguće detektovati. Ako bazični PCR nije urađen kod pacijenta sa ovakvim abnormalnostima to može stvoriti konfuziju kada se tokom praćenja efekata terapije PCR-om dobije nalaz ne detektabilnih transkripta. To bi moglo da se protumači kao kompletan molekularni odgovor što predstavlja ne relevantni test. Posle postavljanja dijagnoze bolesti vrši se određivanje faze bolesti, a za pacijente u hroničnoj fazi uobičajeno je da se uradi stratifikacija pacijenata primenom prognostičkih scoring sistema Sokal skora, Euro skora ili nedavno razvijenog EUTOS skora.

2.11. Lečenje hronične mijeloidne leukemije

2.11.1. Inicijalno lečenje

Kada se kod pacijenta sumnja na postojanje hronične mijeloidne leukemije ali još uvek ne postoji potvrda, može se otpočeti lečenje hidroksiureom ako je broj leukocita visok ($80-100 \times 10^9/L$), kako bi se njihov broj smanjio blizu normalnog nivoa. Hidroksiurea se daje u dozi od 1 do 6 gr/dnevno oralno, a redukuje se na 1 do 2 gr/dnevno kada broj leukocita padne na $20 \times 10^9/L$, a privremeno prekida pri broju $5 \times 10^9/L$. Sa primenom hidroksiure se nastavlja dok se ne potvrdi prisustvo Filadelfija hromozoma. Kod visokog broja leukocita primenjuje se i alopurinol kako bi se smanjile komplikacije vezane za sindrom lize tumora. Kada se postavi definitivna dijagnoza, dalje lečenje se nastavlja inhibitorima tirozin kinaze (TKI). Nije neophodno da se broj leukocita dovede na normalan nivo pre uvođenja TKI, a kada se započne terapija sa TKI, hidroksiurea se prekida.

2.11.2. Interferon- α

Pre uvođenja imatiniba kao prve terapijske linije, interferon- α je bio prihvaćen kao najbolja terapijska opcija za lečenje hronične mijeloidne leukemije u hroničnoj fazi kod pacijenata koji nisu pogodni za alogenu transplantaciju matične ćelije hematopoeze. Većina istraživanja su pokazala da nema benefita od visokih doza interferon- α u poređenju sa niskim dozama za lečenje hronične faze HML (5 miliona i.j./m² dnevno naspram 3 miliona i.j./m² pet puta nedeljno). Niže doze interferon- α minimalizuju toksičnost i troškove lečenja. Može se primeniti i pegilovani interferon- α koji ima duži poluživot i primenjuje se u optimalnoj dozi od 4,5 mcg/kg nedeljno i dokazano je da pegilovani interferon- α u odnosu na standardni ima manju toksičnost a veću stopu odgovora. Lek ima širok spektar neželjenih efekta, posebno kod starih osoba, kao što su umor, drhtavica, gubitak težine, osip, glavobolja, mučnina, retencija tečnosti, porast transaminaza, klinički signifikantne citopenije i neuropsihijatrijske simptome.

Rekombinantni humani interferon- α je pokazao značajnu antitumorsku i imunomodulatornu aktivnost u lečenju hronične mijeloidne leukemije. Citogenetski odgovor na interferon- α je stabilan i dugotrajan. Veliki citogenetski odgovor se postiže kod 40% pacijenata a kompletan citogenetski odgovor kod 25% pacijenata. Dodavanje citarabina dovodi do signifikantno veće mogućnosti postizanja kompletnog citogenetskog odgovora kod 35% pacijenata. Postizanje kompletnog citogenetskog odgovora je udruženo sa poboljšanim preživljavanjem, 78% pacijenata koji postignu kompletan citogenetski odgovor žive 10 godina, tako da je postizanje ovog odgovora bio terapijski cilj u eri interferona- α (74, 75). Oko 30% pacijenata sa kompletnim citogenetskim odgovorom ima ne detektabilan nivo BCR-ABL transkripta na PCR-u, tj. kompletan molekularni odgovor i niko od njih nije relapsirao posle srednjeg praćenje od 10 godina. Ono što je zanimljivo, 40% do 60% pacijenata sa kompletnim citogenetskim odgovorom uz prisustvo minimalne rezidualne bolesti na molekularnom nivou nije relapsiralo posle 10 godina (76). Ono što se pripisuje interferon- α indukovanoj imunomodulaciji, je prisustvo citotoksičnih T limfocita za specifičan PR1, peptid koji potiče iz proteinaze 3, koji je više izražen u ćelijama HML. Ova pojava je prisutna kod pacijenata u kompletnoj remisiji posle terapije interferonom- α i TMČH, ali ne i kod onih koji ne uspevaju da postignu kompletan citogenetski odgovor ili onih koji su lečeni hemioterapijom (77).

2.11.3. Alogena transplantacija matične ćelije hematopoeze

Do nedavno, interferona- α i alogena transplantacija matične ćelije hematopoeze su bile jedine terapijske opcije za pacijente sa hroničnom mijeloidnom leukemijom. Trenutno, TMČH je i dalje validna terapijska opcija, posebno za pacijente koji nemaju zadovoljavajući odgovor na inhibitore tirozin kinaze. Generalno je prihvaćeno da je TMČH terapijski modalitet koji može dovesti do izlečenja u odabranih pacijenata sa HML ali je udružen sa značajnim rizikom od komplikacija i smrti. Odluka o tome da li treba primeniti transplantaciju kao vid lečenja kod određenog pacijenta, zavisi od faktora koji utiču na rizik

od smrti povezane sa transplantacijom, a koji uključuju starost pacijenta, fazu bolesti, trajanje bolesti, stepen histokompatibilnosti donora i primaoca i pol donora.

Transplantacija matične ćelije hematopoeze ostaje važna terapijska opcija u lečenju HML, posebno za mlađe osoba koje imaju HLA-identičnog davaoca. Međutim, samo jedna trećina do jedne polovine pacijenata može imati odgovarajućeg HLA-podudaranog donora i ispuniti stroge kriterijume za uključivanje, kao što su starost, adekvatna funkcija organa i performans status, što može isključiti mogućnost primene TMČH u velikog broja pacijenata. Strategija da se prevaziđe nedostatak odgovarajućih donora je korišćenje HLA podudarnih nesrodnih donora.

Pored toga, TMČH nosi puno rizika kao što su bolest kalem-protiv-domaćina, veno-okluzivne bolesti opasne po život, infekcije, rizik od maligniteta, srednjeg i lošijeg ukupnog kvaliteta života. Takođe, sve se više prepoznaje rizik od kasnog recidiva. Studija Kiss TL i sar. (78) je analizirala ishod i kvalitet života pacijenata sa hroničnom mijeloidnom leukemijom posle TMČH. Posle više od 10 godina praćenja 31% pacijenata su bili živi, a srednje vreme pojave hematološkog ili citogenetskog recidiva bilo je 7,7 godina. U izveštaju Seattle grupe (79) objavljeni su rezultati praćenja pacijenata sa hroničnom fazom HML kod kojih je sprovedena TMČH posle primene busulfana ili ciklofosfamida kao kondicionih režima. Posle 3 godine, projektovana stopa smrtnosti koja nije bila povezana sa relapsom bila je 14%, a projektovana stopa živih i bez bolesti bila je 78%. Nasuprot tome, pacijenti sa uznapređovalom fazom HML, koji su bili podvrgnuti TMČH imali verovatnoću 5 godišnjeg preživljavanja od 40% do 60% u fazi akceleracije, a 10% do 20% u fazi blastne transformacije.

Prepoznavanje značajne uloge kalem-protiv-leukemija efekata u eliminisanju HML posle allograftinga, dovelo do koncepta da toksični efekti koji su povezani sa allograftingom mogu biti značajno umanjeni smanjenjem intenziteta pre transplantacionog kondicionog režima. Ovaj pristup podrazumeva znatno smanjenje doze citotoksičnih lekova ili zračenja koji se koriste u kondicioniranju, umesto upotrebe imunosupresivnih lekova. U isto vreme, broj matičnih ćelija hematopoeze i limfocitna donorska infuzija trebalo bi da obezbede maksimalni engraftment i optimalan kalem-protiv-leukemije efekat. Primena kondicionih režima smanjenog intenziteta se koristi kao sredstvo da bi TMČH bila dostupna širem broju pacijenata koji inače ne ispunjavaju uslove za standardnu TMČH. Ovaj pristup ima prednost zahvaljujući sposobnosti T ćelija koje su prisutne u graftu da uklone ćelije HML (kalema-protiv-leukemija efekat) za razliku od dobijanja ovog efekta pomoću ablative citotoksične hemioterapije. Ova strategija povećava toleranciju same procedure, smanjuje značajno morbiditet i mortalitet i dovodi do visokog procenta preživljavanja bez bolesti od 85% posle 70 meseci (80). Nasuprot tome, studija evropskog registra za transplantaciju koštane srži (EBMT) (81) izvestila je da je 3-godišnja stopa ukupnog preživljavanja bila 58% a stopa preživljavanja bez progresije 37%. Pacijenti koji posle 12 meseci od TMČH imaju detektovanu minimalnu rezidualnu bolest na PCR-u imaju rizik nastanka recidiva od 30% do 40% u poređenju sa 5% kod pacijenata sa negativnim PCR rezultatom. Međutim, recidiv se

može uspešno savladati primenom donorske limfocitne infuzije kod 70% pacijenata sa recidivom u hroničnoj fazi bolesti, naročito kada se primeni u vreme molekularnog recidiva. Alternativno, može se koristiti imatinib u post transplantacionom recidivu i pokazano je da indukuje kompletnu citogenetsku remisiju u više od 40% pacijenata lečenih u hroničnoj fazi bolesti (82).

Značajne su studije koje su analizirale alogenu TMČH i primenu inhibitora tirozin kinaze pre i posle transplantacije. Prospektivna studija koja je sprovedena od strane Nemačke HML Studijske Grupe (83) je objavila rezultate lečenja grupe pacijenata gde je alogena TMČH sprovedena kao prva terapijska linija ili posle neuspeha terapije imatinibom sa srodnim ili nesrodnim donorom. Stopa 3-godišnjeg preživljavanja bila je 88% u grupi gde je TMČH bila prva terapijska linija, 94% kod pacijenata posle neuspeha terapije imatinibom koji su i dalje u hroničnoj fazi i 59% u grupi sa uznapredovalom fazom bolesti. Smrtnost povezana sa transplantacijom bila je 8%, a hronična bolest kalem protiv domaćina je registrovana kod 46% ispitivanih pacijenata.

Centar za međunarodnu transplantaciju koštane srži (CIBMTR) je izvestio retroaktivno o velikoj grupi pacijenta starijih od 40 godina, koji su dobijali kondicioni režim umanjenog intenziteta. Polovina pacijenata su u bili u hroničnoj fazi u vreme transplantacije a njih 74% je dobilo imatinib pre transplantacije. Stopa 6-godišnjeg ukupnog preživljavanja iznosila je 89%, 60% i 30% za transplantirane pacijente sa EBMT skorom rizika od 0-2, 3 i više od 3 respektivno. Ishod pacijenata koji su transplantirani u fazi blastne krize bio je veoma loš, sa ukupnim preživljavanjem manjim od 10% (84).

2.11.4. Inhibitori tirozin kinaze

2.11.4.1. Imatinib-inhibitor tirozin kinaze prve generacije

Prva terapijska linija za sve bolesnike u hroničnoj fazi hronične mijeloidne leukemije su inhibitori tirozin kinaze. Tokom poslednjih godina menjali su se stavovi koje inhibitore tirozin kinaze treba koristiti i u kojoj dozi. U periodu od 2000. godine do 2005. godine svi pacijenti su lečeni imatinibom primenom standardne (400mg) ili visoke doze (800mg). Posle toga su počeli da se primenjuju inhibitori tirozin kinaze druge generacije nilotinib, dasatinib i bosutinib.

Imatinib mesilat (IM) je oralni bioraspoloživ 2-fenilaminopirimidin sa ciljanom inhibitornom aktivnošću protiv aktivnog proteina tirozin kinaze koji je produkt BCR-ABL fuzionog gena. Pored toga, imatinib inhibira i druge kinaze, kao što su c-kit, trombocitni faktor rasta α i β i ABL-srodne gene. Imatinib je postao standardna terapija za lečenje HML zbog svoje izuzetne aktivnosti i blagog toksičnog profila (85).

IRIS studija je pokazala vrhunsku bezbednost i efikasnost imatiniba u odnosu na interferon- α plus citarabin. Na osnovu rezultata ove studije, imatinib mesilat je postao prva terapijska linija u lečenju pacijenata sa hroničnom mijeloidnom leukemijom u hroničnoj fazi. Rezultati 8-godišnjeg ažuriranja IRIS studije (86) su pokazali dugoročnu efikasnost i bezbednost imatinib mesilata. Pacijenti sa HML u hroničnoj fazi koji odgovore na imatinib imaju nizak ukupni rizik da progrediraju u uznapredovalu fazu bolesti. Pacijenti koji su postigli minor citogenetski odgovor posle 3 meseca, parcijalni citogenetski posle 6 i 12 meseci i kompletan citogenetski posle 18 meseci imali su stabilan kompletan citogenetski odgovor tokom perioda praćenja. Bezbedonosni profil imatinib mesilata ostaje nepromenjen posle 8 godina bez prethodno prijavljenih neželjenih efekata prepoznatih u poslednjih 36 meseci. Ovi podaci ukazuju da pacijenti koji reaguje na imatinib verovatno će održati svoje odgovore tokom dugotrajne terapije i potvrđuju povoljan odnos koristi i rizika kod pacijenata u hroničnoj fazi HML.

Te iste godine objavljeni su rezultati primene visokih doza imatiniba koji su bolji u odnosu na rezultate postignute standardnim dozama. Dve randomizovane studije, prva Baccarani M. i sar. (87) sprovedena kod pacijenata sa visokim Sokal rizikom a druga Cortes JE. i sar. (88) kod svih pacijenata, pokazale su da nema dugoročne koristi za pacijente koji se leče visokim dozama imatiniba. Poslednja studija sugerše da pacijenti postižu kompletan citogenetski i veliki molekularni odgovor ranije sa visokim dozama (6 meseci, kompletan citogenetski odgovor, 57% naspram 45%), ali da na kraju dostignu isti nivo (12 meseci, kompletan citogenetski odgovor, 70% naspram 66%). Nasuprot tome, nedavna studija Hehlmann R. i sar. (89) ukazuje na višu stopu kompletnog citogenetskog i velikog molekularnog odgovora pacijenata na visokim dozama imatiniba, posle 12 meseci stopa velikog molekularnog odgovora je 59% sa visokim u odnosu na 44% sa standardnim dozama imatiniba. Posle 3 godine, stopa je ekvivalentna (82% naspram 79%, respektivno), ali je održiv napredak u stopi kompletne molekularne remisije (57% naspram 46%). Kod pacijenata lečenih visokim dozama imatiniba poboljšano je preživljavanje bez progresije.

Imatinib u dozi od 400 mg dnevno ima značajnu efikasnost i bezbednost i dugo je bio standardna prva linija terapije za hroničnu mijeloidnu leukemiju. Primenjuje se kao monoterapija, međutim do 35% pacijenata ima neželjena dejstva, nezadovoljavajući odgovor ili progresiju bolesti. Tako da kod značajnog broja pacijenata postoji potreba za alternativnom terapijom. Da bi se poboljšao ishod, imatinib je kombinovan sa konvencionalnim hemoterapeutskim agensima ili biološkim modifikatorima. Biološka i klinička zapažanja sugeršu da kombinovanje imatinib sa interferonom- α može poboljšati ishod lečenja u hroničnoj mijeloidnoj leukemiji. Simonsson B. i sar. (90) su poredili efikasnost monoterapije imatinibom i kombinacije imatiniba i pegiliranog interferona- $\alpha 2b$ u lečenju pacijenata sa hroničnom fazom HML. Stopa velike molekularne remisije posle 12 meseci praćenja bila je značajno veća u grupi pacijenata lečenih imatinibom plus pegiliranim interferonom- $\alpha 2b$ i iznosila je 82%, u poređenju sa 54% u grupi koja je bila na terapiji imatinibom kao monoterapijom. Stopa velike molekularne remisije se povećavala sa

trajanjem terapije pegiliranog interferona- α 2b, posle manje od 12 nedelja stopa velike molekularne remisije je bila 67%, a posle više od 12 nedelja ta stopa je bila 91%. Vršena su ispitivanja da li se dodavanjem pegiliranog interferona- α 2b i GM-CSF visokim dozama imatiniba može poboljšati stopa kompletnog molekularnog odgovora kod pacijenata sa HML u hroničnoj fazi. Cortes J. i sar. (91) su objavili rezultate svog istraživanja kojim su dokazali da nije bilo razlike u stopama kompletnog citogenetskog odgovora (87% naspram 90%), velikog molekularnog (75% naspram 77%) i kompletnog molekularnog odgovora (11% naspram 13%) posle 12 meseci između ispitivanih grupa pacijenata, ili u bilo kom trenutku u toku studije. Na osnovu ovih rezultata zaključeno je da dodavanje pegiliranog interferona- α 2b i GM-CSF visokim dozama imatiniba ne poboljšava značajno stopu citogenetskog ili molekularnog odgovora u poređenju sa primenom samo visokih doza imatiniba. Visoka stopa prekida terapije pegiliranog interferona- α 2b zbog toksičnih efekata može ugroziti njegov potencijalni imunomodulatorni benefit.

2.11.4.2. Inhibitori tirozin kinaze druge generacije kao prva terapijska linija

Dve prospektivne randomizirane studije pokazale su inicijalnu superiornost druge generacije inhibitora tirozin kinaze nilotiniba i dasatiniba, kao prve terapijske linije naročito u brzini i dubini odgovora. ENEST-ova studija, koja je poredila nilotinib u dozi od 300mg dva puta dnevno naspram imatiniba 400mg dnevno, pokazala je značajno višu stopu kompletnog citogenetskog odgovora posle 2 godine 87% naspram 77%, velikog molekularnog odgovora posle 3 godine od 73% naspram 53%, kao i znatno nižu stopu transformacije u fazu akceleracije i blastne transformacije od 2,1%-3,2% naspram 6,7%, respektivno (92, 93). DASISION studija je izvestila o benefitu pacijenata lečenih dasatinibom u dozi od 100mg dnevno naspram standardne doze imatiniba, sa značajno višom stopom kompletnog citogenetskog odgovora posle 1 godine 83% naspram 72% ali ne i posle 2 godine lečenja 85% naspram 82%, sa stopom velikog molekularnog odgovora posle 3 godine od 68% naspram 55%, sa stopom transformacije u fazu akceleracije ili blastne transformacije od 3,5% naspram 5,8%, respektivno (94, 95). BELA studija (96) je testirala bosutinib 500mg dnevno u odnosu na imatinib 400mg dnevno i izvestila o boljoj stopi velikog molekularnog odgovora posle 1 godine od 41% naspram 27% u grupi sa bosutinibom, dok je stopa kompletne citogenetske remisije u obe ispitivane grupe bila slična i iznosila je 70% naspram 68%. U sve tri studije, rezultati lečenja inhibitorima tirozin kinaze druge generacije su neznatno u korist novih inhibitora što se tiče stope progresije ili neuspeha terapije, dok je ukupno preživljavanje slično u periodu praćenja od tri godine za nilotinib i dasatinib, a jedne godine za bosutinib.

2.11.4.3. Inhibitori tirozin kinaze druge generacije kao druga terapijska linija

Dasatinib i nilotinib su odobreni za drugu liniju lečenja pacijenta sa HML koji ne tolerišu ili su doživeli neuspeh na imatinib. Na osnovu objavljenih podataka 40% do 60% pacijenata će postići kompletan citogenetski odgovor a 10% do 15% će izgubiti svoj odgovor. Nedavne dve velike randomizirane studije su potvrdile odlične rezultate o primeni inhibitora tirozin kinaza druge generacije posle terapije imatinibom, sa višim stopama kompletnog citogenetskog i velikog molekularnog odgovora i sa nižom stopom transformacije. U ovim studijama je pokazano da je stopa velikog molekularnog odgovora 28% posle 2 godine nilotiniba i 42% posle 5 godina dasatiniba, da postoji stabilnost kompletnog citogenetskog odgovora koji je jednom postignut i da je preživljavanje bez progresije 57% posle 4 godine sa nilotinibom i 56% posle 5 godina sa dasatinibom (97, 98).

Bosutinib je uveden nedavno, kao druga ili treća linija u lečenju pacijenata sa HML koji ne tolerišu ili dožive neuspeh na imatinib na osnovu rezultata studija Khoury HJ. i sar. (99) i Cortes JE. i sar. (100), koje su izvestile o stopi velike citogenetske remisije od 58% i stopi kompletne citogenetske remisije od 48% kod pacijenata rezistentnih na imatinib. Ponatinib je pan-inhibitor tirozin kinaze koji još inhibira T315I mutaciju. Nedavno je odobren za lečenje pacijenata u hroničnoj fazi HML koji su doživeli neuspeh na prethodnu terapiju sa dva ili čak tri inhibitora tirozin kinaze. Prema rezultatima studije ponatinib je bio u stanju da indukuje veliki citogenetski, kompletan citogenetski i veliki molekularni odgovor kod 56%, 46% i 34% pacijenata, sa višom stopom kod pacijenata sa kraćom istorijom bolesti i kraćim lečenjem i/ili sa T315I mutacijom (101).

2.11.5. Odgovor na terapiju inhibitorima tirozin kinaze

Odgovor na inhibitore tirozin kinaze je najznačajniji prognostički faktor. U prethodnoj verziji ELN preporuka iz 2009. godine (102) odgovor na prvu terapijsku liniju je bio ograničen na imatinib. Obzirom da sada ima više inhibitora tirozin kinaze preporuke ELN iz 2013. godine (103) ne preporučuju koji inhibitor treba koristiti, ali jasno definišu odgovor koji treba postići bez obzira koji se inhibitor koristi. Po najnovijim preporukama odgovor je definisan kao optimalan ili neuspeh terapije. Optimalan odgovor je povezan sa najboljim dugoročnim ishodom to jest sa trajanjem života koje je uporedivo sa opštom populacijom, što ukazuje da nema indikacija za promenu tog tretmana. Neuspeh znači da pacijent treba da promeni dotadašnju terapiju, da bi se ograničio rizik od progresije i smrti. Neuspeh može biti primarni, odnosno neuspeh da se postigne dati odgovor u datom trenutku ili sekundarni, odnosno gubitak prethodno postignutog odgovora. Između optimalnog odgovora i neuspeha terapije postoji srednja zona, koja se ranije nazivala suboptimalni odgovor, a sada je uveden termin "upozorenje". Upozorenje podrazumeva da karakteristike oboljenja i odgovor na lečenje zahtevaju češće praćenje, kako bi se omogućile blagovremene promene

u terapiji, u slučaju neuspešnog lečenja. Definicije optimalnog odgovora i neuspeha terapije na drugu generaciju inhibitora tirozin kinaze baziraju se na istim konceptima i ograničene su na dasatinib i nilotinib (103).

U tabeli 2 date su preporuke European LeukemiaNet iz 2013. godine za kriterijume odgovora na inhibitore tirozin kinaze. Definicije su iste za pacijente u CP, AP i BP, a važe i za drugu liniju lečenja, kada se prva linija menja zbog netolerancije. Odgovor se može procenjivati molekularnim ili citogenetskim testom, ali se oba testa preporučuju kad god je to moguće.

Tabela 2. Definisane odgovore na prvu liniju inhibitora tirozin kinaze

Vreme	Odgovor na terapiju TKI		
	Optimalan	Upozoravajući	Neuspeh
U vreme dijagnoze	NA	Visok rizik ili CCA/Ph+	NA
3 meseca	BCR-ABL $\leq$ 10% i/ili Ph+ $\leq$ 35%	BCR-ABL > 10%, i/ili Ph+ 36-95%	Bez CHR, i/ili Ph+ > 95%
6 meseci	BCR-ABL < 1% i/ili Ph + 0%	BCR-ABL 1-10%, i/ili Ph + 1-35%	BCR-ABL > 10%, i/ili Ph + > 35%
12 meseci	BCR-ABL $\leq$ 0,1%	BCR-ABL 0,1-1 %	BCR-ABL > 1%, i/ili Ph + > 0%
Bilo kada tokom tretmana	BCR-ABL $\leq$ 0,1%	CCA/Ph-(-7,ili7q) Gubitak CHR	Gubitak CHR Gubitak CCgR Potvrda gubitka MMR Mutacije CCA/Ph +

NA = Nije primenjivo, CHR = Kompletne hematološke remisije, CCgR = Kompletne citogenetske remisije, MMR = BCR-ABL $\leq$ 0,1% = Velika molekularna remisija, CCA/Ph+ = Klonalna hromozomska abnormalnost u Ph+ćelijama, CCA/Ph- = Klonalna hromozomska abnormalnost u Ph-ćelijama.

2.11.6. Preporuke za lečenje hronične mijeloidne leukemije

Za lečenje hronične mijeloidne leukemije u hroničnoj fazi po preporukama ELN može se koristiti bilo koji od tri inhibitora tirozin kinaze koji su odobreni za ovu indikaciju, imatinib (400 mg dnevno), nilotinib (300 mg dva puta dnevno), a dasatinib (100 mg dnevno). Ova tri inhibitora tirozin kinaze mogu se koristiti i za drugu ili treću liniju, u standardnoj ili višoj dozi (400 mg dva puta dnevno za imatinib, 400 mg dva puta dnevno za nilotinib i 70 mg dva puta dnevno ili 140 mg jednom dnevno za dasatinib). Bosutinib (500 mg dnevno) je odobren od strane FDA za pacijente rezistentne ili netolerantne na prethodnu terapiju. Ponatinib (45 mg dnevno) je odobren od strane FDA za bolesnike rezistentne ili netolerantne na prethodnu terapiju inhibitorima tirozin kinaze (103).

Terapijske preporuke za hroničnu mijeloidnu leukemiju u hroničnoj fazi predložene od strane ELN date su u tabeli 3. Ove preporuke su zasnovane na kritičkoj proceni efikasnosti, ali je prihvaćeno i preporučeno da pri izboru inhibitora tirozin kinaze mora uzeti u obzir

podnošljivost i bezbednost, kao i karakteristike pacijenata (starost i komorbiditeti) koje mogu predvideti neželjene efekte na neki od inhibitora.

Nema jasnih kriterijuma koji se mogu preporučiti pri pravljenju izbora. U drugoj terapijskoj liniji, promena leka ima prednost u odnosu na povećanje doze imatiniba. Pri prelasku sa jednog na drugi inhibitor tirozin kinaze uvek se mora uzeti u obzir prisustvo i tip mutacija, neželjena dejstva i toksičnost na prethodne inhibitore, a različiti komorbiditeti mogu biti od značaja sa različitim inhibitorima.

Tabela 3. Preporuke za lečenje hronične faze: prva, druga i naknadne linije lečenja

1. linija Imatinib, ili nilotinib, ili dasatinib. HLA tipizacija jedino u slučaju upozoravajućih karakteristika (visok rizik, CCA/Ph+).
2. linija, intolerancija na prvu liniju TKI Bilo koji drugi TKI dostupan u prvoj liniji (imatinib, nilotinib, dasatinib).
2. linija, neuspeh na imatinib kao prvu liniju Dasatinib, ili nilotinib, ili bosutinib, ili ponatinib. HLA tipizacija.
2. linija, neuspeh na nilotinib kao prvu liniju Dasatinib, ili bosutinib, ili ponatinib. HLA tipizacija. Traganje za nesrodnim donorom. Razmisliti o allo TMČH.
2. linija, neuspeh na dasatinib kao prvu liniju Nilotinib, ili bosutinib, ili ponatinib. HLA tipizacija. Traganje za nesrodnim donorom. Razmisliti o allo TMČH.
3. linija, neuspeh, i/ili intolerancija na dva TKI Bilo koji od preostalih TKI. Allo TMČH se preporučuje u pogodnih pacijenata.
Bilo koja linija, T315I mutacija. Ponatinib. HLA tipizacija. Traganje za nesrodnim donorom. Razmisliti o allo TMČH.

Alogena transplantacija matične ćelije hematopoeze je i dalje važna terapijska opcija za pacijente koji trajno ne reaguju na inhibitore tirozin kinaze. Tokom proteklih 14 godina, preporučeno vreme transplantacije se promenilo u 3. ili 4. liniju lečenja posle neuspeha 2. generacije inhibitora tirozin kinaze. Prihvaćen je stav da za pacijente u hroničnoj fazi, alogena transplantacija treba da bude rezervisana za one koji su otporni ili netolerantni na bar jedan inhibitor tirozin kinaze druge generacije. I dalje je kontraverzno pitanje koji tip kondicionog režima treba primeniti u hroničnoj fazi jer nema dokaza da u ovom trenutku mijeloablativni režimi donose bilo kakvu prednost u odnosu na kondicione režime smanjenog intenziteta. Pacijente treba pratiti posle transplantacije primenom RQ-PCR testa i tretirati donorskom limfocitnom infuzijom i/ili inhibitorima tirozin kinaze.

Pacijenti u blastnoj krizi treba da dobiju intenzivnu hemioterapiju sa ili bez inhibitora tirozin kinaze, kako bi se sproveda alogena TMČH nakon što bude uspostavljena druga hronična faza. Značaj primene terapije održavanja inhibitorima tirozin kinaze posle alogene TMČH nije

dokazan. Ako je moguće treba primeniti mijeloablativne kondicione režime. Pacijente u fazi akceleracije treba razmotriti za alogenu TMČH ukoliko ne postignu optimalan odgovor sa inhibitorima tirozin kinaze.

2.12. Praćenje terapijskog odgovora

Odgovor na terapiju se može procenjivati primenom citogenetskog i/ili molekularnog testa, zavisno od lokalnih mogućnosti centra, ali kad god je to moguće preporučuje se primena oba testa sve dok se ne postigne kompletan citogenetski i veliki molekularni odgovor. Zatim, kvantitativni-PCR sam može biti dovoljan. Test mutacionih analiza se preporučuje u slučaju progresije, neuspeha i upozorenja. U tabeli 4 prikazane su preporuke European LeukemiaNet iz 2013. godine za citogenetski i molekularni monitoring tokom terapije inhibitorima tirozin kinaze.

Ako se koristi citogenetska analiza ona se mora obaviti na ćelijama koštane srži na najmanje 20 metafaza posle 3, 6 i 12 meseci, dok se ne postigne kompletan citogenetski odgovor a zatim svakih 12 meseci. Postoje razlozi zašto je citogenetska analiza važna. Prvo, vreme postizanja citogenetskog odgovora ima važne prognostičke implikacije. Citogenetski odgovor se može analizirati FISH metodom koja dobro koreliše sa citogenetikom a radi se na uzorku periferne krvi. Zatim, citogenetska analiza je važna kod pacijenata koji su razvili dodatne hromozomske abnormalnosti u Ph negativnim ćelijama što se dešava kod 10-15% pacijenata i povećava rizik nastanka mijelodisplastičnog sindroma i akutne leukemije. Citogenetika omogućava da se identifikuje klonska evolucija bolesti koja se desila i da se napravi procena kariotipa što je važno kod pacijenata koji nisu u kompletnoj citogenetskoj remisiji.

Tabela 4. Preporuke za citogenetsko i molekularno praćenje

Pri dijagnozi	• Citogenetsko ispitivanje ćelija koštane srži; • FISH u slučaju Ph-, da se identifikuje varjanta i druge translokacije; • Kvalitativni-PCR, identifikacija tipa transkripta.
Tokom tretmana	• Kvantitativni-PCR za određivanje nivoa BCR/ABL transkripta prema internacionalnoj skali, vrši se svaka 3 meseca dok se MMoR (BCR-ABL$\leq$0,15 ili MR) ne postigne, zatim svakih 3 do 6 meseci; • Citogenetsko ispitivanje ćelija koštane srži na najmanje 20 metafaza, posle 3, 6, i 12 meseci dok ne bude postignut CCgR, zatim svakih 12 meseci. Kada se CCgR postigne, može se primeniti FISH na ćelijama periferne krvi.
Neuspeh, progresija	• Kvantitativni-PCR, mutacione analize i citogenetska analiza ćelija koštane srži. Imunofenotipizacija u blastnoj krizi.
Upozorenje	• Molekularne i citogenetske testove vršiti češće. Citogenetsko ispitivanje ćelija koštane srži preporučuje se u slučaju mijelodisplazije ili CCA/Ph- koja uključuje hromozom 7.

Kada pacijent sa HML postigne kompletan citogenetski odgovor, citogenetska evaluacija je manje korisna za praćenje rezidualne bolesti. Kvalitativni-PCR ima ograničenu vrednost u praćenju pacijenata sa HML. Zato je razvijen kvantitativni-PCR koji predstavlja savršen instrument za praćenje rezidualnih BCR-ABL transkripta tokom vremena, koji se izražavaju kao BCR-ABL % u internacionalnoj skali. Kvantitativni-PCR treba da se obavlja na svaka tri meseca dok se ne postigne veliki molekularni odgovor, zatim svakih tri do šest meseci. Procena minimalne rezidualne bolesti se izražava prema internacionalnoj skali (IS) koja se bazira na dve standardne vrednosti: standardni bazični nivo koji se uzima da je 100% na IS i standardna vrednost velikog molekularnog odgovora za koju se uzima 0,1% na IS (3-log redukcije od standardne bazične vrednosti). Vrednost od 1,0% je otprilike ekvivalent postizanja kompletnog citogenetskog odgovora. Za definisanje kompletnog molekularnog odgovora senzitivnost treba da bude 0,01% po IS što je ekvivalent 4-log redukcije ispod standardnog bazičnog nivoa.

U slučaju terapijskog odgovora koji se definiše kao upozorenje, preporučuje se češće ponavljanje citogenetskih i molekularnih testova, čak i mesečno. U slučaju neuspeha terapije, ili progresije u fazu akceleracije ili blastne transformacije, treba uraditi citogenetsku analizu, PCR i mutacionu analizu. Ako se razvije displastična morfologija ili drugi znaci mijelodisplazije kao što su neobjašnjiva ili produžena citopenija, preporučuju se patohistološke i citogenetske analize koštane srži.

Mutacije BCR-ABL kinaznog domena mogu izazvati ili doprineti, rezistenciji na inhibitore tirozin kinaze kod hronične mijeloidne leukemije. Preporuke European LeukemiaNet-a imaju za cilj da racionalizuju korišćenje testiranja na BCR-ABL mutacije kod hronične mijeloidne leukemije. Kod pacijenata u hroničnoj fazi koji dobijaju imatinib kao prvu liniju, analiza mutacija se preporučuje samo u slučaju neuspeha ili suboptimalnog odgovora u skladu sa kriterijumima ELN. Kod pacijenata rezistentnih na imatinib koji primaju TKI druge generacije, analiza mutacija se preporučuje u slučaju hematološkog ili citogenetskog neuspeha kao što je definisano ELN preporukama. Preporučuje se metodologija direktnog sekvencioniranja, iako se mogu koristiti i druge tehnike. Premda je poznavanje mutacionog statusa BCR-ABL kinaznog domena dragocen podatak koji treba da se integriše u donošenje algoritma lečenja a u cilju pronalaženja najbolje terapijske strategije za svakog pacijenata ponaosob: povećanje doze imatiniba, prebacivanje na drugu generaciju TKI dasatinib ili nilotinib, usmeravanje na alogenu transplantaciju matičnih ćelija hematopoeze, ili primena lekova u fazi ispitivanja (104). Posebno su značajne T315I Filadelfija hromozom-pozitivne leukemije koje su inherentno otporne na sve licencirane inhibitore tirozin kinaze i kod kojih su terapijske opcije ograničene. Studija Nicolini FE. i sar. (105) je izvestila o ishodu alogene transplantacije matičnih ćelija kod pacijenata sa dokumentovanom BCR-ABL T315I mutacijom. Mogućnost preživljavanja 24 meseca posle alogene TMČH bila je 59% kod pacijenata sa hroničnom fazom HML. Autori su zaključili da alogena transplantacija matičnih ćelija predstavlja dragoceno terapijsko sredstvo za pogodne pacijente sa BCR-ABL T315I

mutacijom, instrument koji može ili ne mora biti zamenjen trećom generacijom inhibitora tirozin kinaze.

Prema poslednjem vodiču European LeukemiaNet-a iz 2013. godine (103) preporučeno je da pacijenti sa HML koji je optimalno reaguju na terapiju TKI treba da nastave da ih primaju na neodređeno vreme, u standardnim preporučenim dozama. Sprovedene su kontrolisane studije kod kojih je prekinuta terapija imatinibom kod nekih pacijenata koji su postigli duboki molekularni odgovor (MR4,5 ili bolje). Oko 40% ispitivanih pacijenata održavalo je isti stepen odgovora, tokom jedne do četiri godine. Gotovo svi oni pacijenti koji su imali molekularni recidiv ponovo su postigli isti nivo dubokog molekularnog odgovora kada je nastavljeno lečenje sa imatinibom (128). Ovi podaci su pružili dokaz za hipotezu da tretman TKI može biti bezbedno prekinut, iako neke BCR-ABL pozitivne ćelija uvek ostaju detektabilne (129). Međutim, ovi podaci su još uvek nedovoljni da bi se postavile zvanične preporuke o obustavi lečenja van dobro dizajniranih, prospektivnih, kontrolisanih studija.

2.13. Prognostički značaj postizanja kompletnog citogenetskog i velikog molekularnog odgovora

Jasno je utvrđeno da je odgovor veoma važan prognostički faktor za dugoročni ishod u HML. Međutim, iako je dugoročna prognoza pacijenata sa HML koji su postigli kompletnan citogenetski odgovor na imatinib izuzetno povoljna, istraživanje prognostičkog značaja vremena postizanja odgovora treba da utvrdi ne samo povoljne posledice za postizanje željenog odgovora, već i rizike sa kojim se svaki pacijent suočava dok ovoj odgovor ne bude postignut. Iako neki pacijenti mogu sigurno da poboljšaju svoj odgovor tokom vremena sa nastavkom terapije imatinibom, pacijenti koji nisu postigli kompletnan citogenetski odgovor se stalno suočavaju sa dve suprotstavljene mogućnosti ili da postignu taj nivo odgovora ili eventualno progrediraju u uznapređovalu fazu bolesti. Tako se studija Quantis-Cardema A. i sar. (106), fokusirala ne samo na pacijente koji su ostvarili kompletnan citogenetski odgovor u različitim vremenskim intervalima, već i na analizu ishoda pacijenata sa HML koji nisu postigli kompletnan citogenetski odgovor u različitim vremenskim intervalima tokom terapije imatinibom. Njihovi rezultati su ukazali da je neuspeh da se postigne kompletnan citogenetski odgovor u prvih 12 meseci terapije imatinibom bio povezan sa višim stopama progresije bolesti i da je ovaj rizik bio primetan rano u toku terapije imatinibom. Verovatnoća postizanja kompletnog citogenetskog odgovora polako se smanjivala ako ovaj odgovor još uvek nije bio postignut posle 3, 6 i 12 meseci terapije imatinibom, sa sličnim smanjenjem verovatnoće postizanja velikog molekularnog odgovora. Među pacijentima koji su bili postigli kompletnan citogenetski odgovor nisu bile uočene značajne razlike u trajanju kompletnog citogenetskog odgovora i ukupnog preživljavanja bez obzira da li je taj odgovor bio postignut pre 6 meseci, između 6 i 12 meseci, ili posle 12 meseci. Rezultati ove studije su ukazali na to da iako je dugoročni ishod pacijenata koji su ostvarili kompletnan citogenetski

odgovor mogao biti sličan bez obzira na vreme u kojem je postignut, pacijenti koji nisu uspjeli da dostignu kompletan citogenetski odgovor u prvih 12 meseci terapije imatinibom imali su veću stopu progresije bolesti i nižu verovatnoću da postignu veliki molekularni odgovor. Dubina molekularnog odgovora posle 3 meseca mogla bi da identifikuje pod skup pacijenata sa povećanim rizikom od progresije, sugerišući da bi bilo poželjno primeniti alternativnu terapiju koja će dovesti do postizanja više stope ranog molekularnog odgovora.

Obzirom da je postizanje velikog molekularnog odgovora bilo povezano sa većom verovatnoćom trajne citogenetske remisije i ukupnog preživljavanja, Quantis-Cardema A. i sar. (106) su analizirali dugoročni ishod pacijenata koji nisu bili postigli veliki molekularni odgovor u različitim vremenskim intervalima tokom prvih 12 meseci terapije imatinibom. Posle 3 meseca terapije, pacijenti sa odnosom BCR-ABL/ABL transkripta većim od 10% imali su verovatnoću da eventualno postignu kompletan citogenetski odgovor od 67%, a samo 54% verovatnoće da postignu veliki molekularni odgovor, što je znatno niže od verovatnoće koji su imali pacijenti sa nivoom transkripta nižim od ili jednakim 10% u istom vremenskom trenutku. Zatim, posle 6 meseci terapije, otprilike 75% pacijenata imalo je nivoe BCR-ABL/ABL transkripta niže od ili jednake 1%, ali su razlike među grupama postale evidentnije sa stopom događaja od 23% kod pacijenata sa BCR-ABL/ABL odnosom većim od 10%. Konačno, mada je posle 12 meseci većina pacijenata imala niske nivoe transkripta, oni sa odnosom većim od 10% su imali jasno nižu verovatnoću poboljšanja njihovog citogenetskog odgovora (45%) i postizanja velikog molekularnog odgovora (7%) kao i veći rizik od razvijanja događaja (50%).

Rezultati TOPS studije (107), u kojoj su pacijenti sa novodijagnostikovanom HML dobijali ili imatinib 400 mg/dnevno ili 800 mg/dnevno kao inicijalnu terapiju, ukazali su da iako je postojalo poboljšanje stope kompletnog citogenetskog i velikog molekularnog odgovora u ranijim vremenskim intervalima, ove razlike su bile male i postajale su statistički beznačajne posle 12 meseci od početka od terapije. U ovoj studiji, primena imatiniba u dozi od 800 mg/dnevno je indukovala raniji kompletan citogenetski i veliki molekularni odgovor kod pacijenata sa novodijagnostikovanom hroničnom fazom HML. Razlike u stopi velikog molekularnog odgovora posle 3 i 6 meseci, vreme postizanja velikog molekularnog odgovora kao i stopa kompletnog citogenetskog odgovora posle 6 meseci između ispitivanih grupa pacijenata bile su statistički značajne. Znatno veći procenat pacijenata u grupi sa 800 mg/dnevno su rano bili postigli kompletan citogenetski odgovor i to u roku od 6 meseci. Posle 12 meseci terapije, stope velike molekularne remisije su bile uporedive između ispitivanih grupa. Razlozi za to su bili nepoznati. Moguće je da je tokom vremena, inhibitorni efekat imatiniba dostigao plato koji je bio dostignut ranije sa visokom dozom imatiniba a kasnije sa standardnom dozom.

Nasuprot TOPS studiji, u studiji sprovedenoj od strane ELN (87) stope velike molekularne remisije i kompletne citogenetske remisije su bile uporedive kod pacijenata sa novodijagnostikovanom hroničnom fazom HML koji su imali visok Sokal skor i koji su bili

tretirani dozom imatiniba od 800 mg/dnevno naspram 400 mg/dnevno. Stopa potpunog citogenetskog odgovora posle jedne godine lečenja bila je 64% i 58% za pacijente koji su lečeni visokom i standardnom dozom imatiniba, respektivno. Nije bila detektovana razlika u stopi potpunog citogenetskog odgovora posle 3 i 6 meseci, u stopi molekularnog odgovora u bilo kom trenutku i u stopi drugih događaja.

Prognostički Sokal skor je još uvek primenjiv i predstavlja najvažniji osnovni prognostički faktor jer je zasnovan na biološkim karakteristikama leukemije. Razlozi zašto su pacijenti sa visokim rizikom manje osetljivi na bilo koju terapiju, sa mogućim izuzetkom alogene transplantacije matične ćelije, nisu jasni. Pretpostavka je da starost, angažovanje megakariocitne loze, viši procenat blasta, kao i veće prisustvo ekstramedularne hematopoeze mogu svi biti uzroci ili posledice većeg stepena genomske nestabilnosti. Međutim, ne postoje izveštaji o značajnoj udruženosti Sokal rizika sa genskom ekspresijom profila leukemijskih ćelija ili drugim prognostičkim faktorima.

Rezultati studije Baccarani M. i sar. (87) su u korelaciji sa rezultatima studije Hehlmann R. i sar. (108), koja nije dokazala prednost upotrebe visokih doza imatiniba kod pacijenata sa visokim Euro i Sokal skorom rizika. Znatno brže postizanje remisije je bilo viđeno kod pacijenata sa niskim i srednjim rizikom, ali ne i kod pacijenata sa visokim rizikom što se može objasniti višim stepenom BCR-ABL nezavisnosti kod pacijenata sa visokim rizikom i poznate niže efikasnosti imatiniba u kasnijim stadijumima HML. Međutim u studiji Hehlmann R. i sar. (108) velika molekularna remisija posle 12 meseci je bila dostignuta signifikantno brže sa dozom imatiniba od 800mg/dnevno, nego sa dozom imatiniba od 400mg/dnevno ili sa imatinibom 400mg/dnevno plus interferonom- α , 55%, 31%, ili 35% respektivno. Incidenca velike molekularne remisije posle 12 meseci je bila signifikantno viša sa imatinibom 800mg/dnevno 59% naspram 45%, u poređenju sa kombinacijom imatiniba 400mg/dnevno plus interferonom- α 59% naspram 44%, u poređenju sa imatinibom 400mg/dnevno 59% naspram 46%. U istoj studiji stopa kompletne citogenetske remisije je bila postignuta znatno brže sa imatinibom 800 mg/dnevno tokom prvih 24 meseci terapije. Razlike u kumulativnim incidencama kompletne citogenetske remisije bile su dostigle maksimum od 13,5% posle 12 meseci i posle toga su se smanjivale.

Palandri F. i sar. (109) su procenjivali dugoročnu prognostičku vrednost molekularnog odgovora u retrospektivnoj analizi pacijenata sa HML koji su bili lečeni imatinibom i koji su postigli kompletan citogenetski odgovor sa standardnom dozom leka. Molekularni odgovor je bio podeljen na stabilni (postojan veliki molekularan odgovor), nestabilni (povremeno manje od velikog molekularnog odgovora) i nikada postignut veliki molekularni odgovor. Značajne razlike su primećene u pogledu trajanja potpunog citogenetskog odgovora i preživljavanja bez progresije između pacijenata sa stabilnim, nestabilnim i nikada postignutim velikim molekularnim odgovorom. Pacijenti sa stabilnim velikim molekularnim odgovorom su imali samo 4% rizika da izgube kompletan citogenetski odgovor u poređenju sa 21% pacijenata sa nestabilnim velikim molekularnim odgovorom ili 33% pacijenata koji

nisu nikada postigli veliki molekularni odgovor. Konačno, ako je veliki molekularni odgovor bio nestabilan, rizik od gubitka kompletne citogenetske remisije je bio veći, ali ne značajno nego ako taj odgovor nije bio postignut, 33% u odnosu na 21%. Molekularno praćenje pacijenata koji su postigli kompletan citogenetski odgovor ukazuju da pacijenti koji su postigli stabilan veliki molekularni odgovor su imali veću verovatnoću održavanja stabilnog potpunog citogenetskog odgovora, što je koreliralo sa boljom stopom preživljavanja bez progresije i ukupnim preživljavanjem. Ovi podaci su potvrdili da je postizanje velikog molekularnog odgovora prognostički važno, ali su i ukazali da je prognostički značaj postizanja velikog molekularnog odgovora veći ako je taj odgovor bio potvrđen i stabilan.

2.14. Prognoza i predikcija u kliničkoj medicini

Termin prognoza potiče od grčke reči πρόγνωση (prethodno znanje, prethodno saznavanje) i generalno se definiše kao procenjivanje verovatnoće nekog budućeg stanja tj. zaključivanje unapred o nečemu, dok se termin predikcija (lat. praedicere; pre- prethodno, dicere- reći) odnosi na iskaz kojim se predskazuje nešto u budućnosti.

U medicinskoj literaturi prognoza se često poistovećuje sa očekivanim tokom neke bolesti ili dugotrajnim ishodom bolesti. Esencijalni deo kliničke prakse već u Hipokratovoj medicini predstavlja dijagnoza, terapija, profilaksa i prognoza. Stoga prognoza ima centralno mesto u procesu donošenja kliničkih odluka (110). Prognostički modeli će postati još važniji u budućnosti, sa povećanjem kvantuma znanja o potencijalnim prediktorima ishoda npr. uticaju genetskih faktora. Takođe, broj primena prognostičkih studija će se povećavati u cilju rane detekcije bolesti ili individualizovanog pristupa dijagnostičkim testiranjima i tretmanu, jer moderna era medicine zasnovane na dokazima zahteva individualni pristup u procesu donošenja kliničkih odluka.

Prognostičke studije stoga zahtevaju pristup koji u dizajnu i analizi uključuje više varijabli da bi se odredili značajni prediktori studiranog ishoda, da bi se dobila verovatnoća pojave ishoda za različite kombinacije prediktora, ili da bi se izgradili alati za procenu ovakve verovatnoće. Ovi alati se često nazivaju prognostički modeli, prediktivni modeli, pravila predikcije, ili rizik skorovi (111). Oni omogućavaju lekarima da koriste različite kombinacije prediktora za procenu apsolutnog rizika ili verovatnoće da će se odgovarajući ishod dogoditi kod konkretne osobe.

Na osnovu ciljeva, prognostičke studije se generalno dele na: (a) studije razvoja prognostičkog modela, (b) studije validacije njegovih performansi na novim pacijentima i (v) studije proučavanja značaja i uticaja modela za kliničku praksu.

Postoji puno odličnih vodiča za praktičnu primenu statističkih procedura u razvoju prognostičkih studija (111, 112). Kao modeli predikcije u kliničkoj medicini su daleko najzastupljeniji modeli regresione analize, što je metodologija koja je primenjena i u ovom

istraživanju, iako postoje i drugi pristupi kao što su modeli klasifikacije i modeli veštačkih neuronskih mreža (113).

2.14.1 Modeli regresione analize

Regresija je termin koji je prvi upotrebio genetičar Galton u drugoj polovini 19. veka i često se koristi kao generalni termin koji obuhvata modele linearne regresije ili višestruke regresione modele. Kod ovih modela, pretpostavlja se da očekivana vrednost jedne varijable Y zavisi od jedne ili više drugih varijabli ($X_1, X_2, \dots$). Varijabla Y se naziva zavisna varijabla, varijabla odgovora ili ishodna varijabla. Varijable X se često nazivaju prediktorne, eksplanatorne, kontrolisane ili nezavisne varijable.

Regresiona analiza ispituje odnos između zavisne varijable Y i (najmanje jedne) nezavisne varijable X . Taj odnos je predstavljen matematičkim modelom (regresionim modelom), tj. jednačinom koja povezuje zavisnu sa nezavisnim varijablama u niz odgovarajućih pretpostavki. Model koji je konstruisan, predstavlja verovatan odnos među varijablama, a najčešće se koristi sa ciljem predviđanja ili ocene vrednosti zavisne varijable na osnovu odgovarajućih vrednosti nezavisnih varijabli (114).

Opšti oblik regresionog modela predstavljen je funkcionalnom vezom, regresionom funkcijom f između dve varijable:

$$Y = f(X) \quad (1)$$

Najjednostavniji oblik svih regresionih modela je linearni regresioni model sa dve varijable X i Y . Osim linearnih modela, mogu se primeniti i nelinearni modeli, npr. eksponencijalnog rasta, eksponencijalnog opadanja, asimptotske regresije ili logističkog rasta. Ovi modeli su nelinearni jer su parametri uglavnom u multiplikovanom obliku. Modeli višestruke regresije, koji prikazuju vezu zavisne promenljive Y i više nezavisnih promenljivih $X_1, X_2, \dots, X_n$, su prirodno uopštenje metoda koji ispituju odnos pojedinačnih varijabli i vrlo su čest način za rešavanje istraživačkih problema, jer omogućavaju uvid u odnos više varijabli sa ispitivanim ishodom. Ovi modeli se mogu koristiti za identifikaciju najvažnijih prediktornih varijabli i za kreiranje pravila predikcije (111).

Višestruki linearni modeli pretpostavljaju linearnu vezu između zavisne varijable Y i k nezavisnih varijabli $X_1, X_2, \dots, X_k$:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_k X_k + \varepsilon \quad (2)$$

Varijable X_i zovemo i eksplanatornim, zbog njihove osobine da objasne varijabilnost u Y ili prediktori zbog njihove upotrebe u predviđanju vrednosti Y varijable.

Primena modela koji uključuju više varijabli zavisi od prirode prediktornih i ishodnih varijabli, a pregled višestrukih regresionih modela koji se najčešće koriste u kliničkoj medicini

prikazan je u tabeli 5 (113). Kao što tip modela zavisi od prirode ishodnih varijabli, tako se menja i interpretacija regresionih koeficijenata. Dobijeni regresioni koeficijenti se tumače kao povećanje ili smanjenje srednje vrednosti, verovatnoće ili rizika ishoda u prisustvu određenog rizik faktora (za dihotomne varijable) tj. povećanja nezavisne kontinuirane varijable, kod višestruke linealne regresije, logističke regresije ili proporcionalnog hazardnog modela respektivno.

Za analizu dihotomnih ishodnih varijabli mogu se koristiti različiti matematički modeli, ali je daleko najpopularnija metoda logističke regresije (LR), koja je korišćena i ovom radu (115). Postoje dva primarna razloga za izbor logističke regresije: (a) LR je fleksibilna i lako primenljiva funkcija sa matematičke tačke gledišta i (b) LR daje biološki svrsishodna tumačenja.

Tabela 5. Najčešće korišćeni višestruki modeli u kliničkoj medicini (113)

Metod	Prediktorne varijable	Ishodne varijable
Višestruka linearna regresija	Kategorijske ili kontinuirane	Kontinuirane
Diskriminativna analiza	Kontinuirane sa normalnom distribucijom	Dihotomne
Višestruka logistička regresija*	Kategorijske ili kontinuirane	Dihotomne
Log-linearni modeli*	Kategorijske	Kategorijske
Cox-ov proporcionalni hazardni model*	Kategorijske ili kontinuirane	Vreme do pojave ishoda (npr. preživljavanje)

* Može se koristiti za procenu relativnog rizika prediktornih varijabli prilagođenih za ostale varijable

Logistička regresija ne vrši direktno modelovanje uslovne srednje vrednosti zavisne varijable, već je uslovna srednja vrednost transformisana upotrebom logit funkcije veze. Ova funkcija predstavlja prirodni logaritam šansi (eng. odds) ostvarivanja nekog događaja, tj. odnosa verovatnoće da će se neki događaj dogoditi sa verovatnoćom da se isti neće ostvariti:

$$\text{logit} = \log(\text{odds}) = \log(\pi/(1-\pi)) = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_k X_k \quad (3)$$

Primarna popularnost logističke regresije potiče iz činjenice da se izlazne vrednosti logističke funkcije nalaze u rasponu od 0 do 1, za bilo koje vrednosti prediktora. Kako je model dizajniran da bi se dobila predikcija verovatnoće nekog ishoda, koja je uvek neka vrednost između 0 i 1, jasna je prednost ovog modela obzirom da to nije uvek slučaj sa drugim alternativnim modelima. Drugi razlog popularnosti je oblik logističke funkcije. Naime, ako se X shvati kao reprezent indeksa koji kombinuje uticaje više različitih rizik faktora a $f(X)$ kao rizik pojave nekog ispitivanog događaja za datu vrednost X , onda izgled funkcije sugerise minimalni uticaj za male vrednosti X , do odgovarajućeg praga vrednosti X , nakon čega

verovatnoća naglo raste u okviru srednjih vrednosti X i ostaje ekstremno visoka kod visokih vrednosti X .

Konačno, za procenu parametara modela LR se koristi metod maksimalne verovatnoće, koji ima prednosti u odnosu na metod najmanjih kvadrata kod linearne regresije. Naime, model maksimalne verovatnoće se može primeniti i na kompleksne nelinearne i linearne modele jer nema nikakvih restrikcija u vezi karaktera nezavisnih varijabli i zbog toga je poželjnija opcija za prilagođavanje logističkih modela (116).

3. CILJEVI RADA

U cilju poboljšanja prognoze kliničkog ishoda pacijenata sa hroničnom mijeloidnom leukemijom sprovede se istraživanja koja kombinuju kliničke i morfometrijske parametre biopsata koštane srži.

Istraživački ciljevi disertacije su:

- Odrediti bazične kliničke karakteristike i laboratorijske parametre pacijenata sa hroničnom mijeloidnom leukemijom Filadelfija pozitivnom u hroničnoj fazi;
- Ispitati citogenetski i molekularni odgovor na primenjenu terapiju i odrediti stopu kompletnog citogenetskog i velikog molekularnog odgovora, kao i značaj postignutog molekularnog odgovora za održavanje kompletne citogenetske remisije;
- Utvrditi bazične kliničke i laboratorijske parametre koji utiču na klinički tok bolesti odnosno na postizanje kompletnog citogenetskog i velikog molekularnog odgovora kod lečenih pacijenata sa hroničnom mijeloidnom leukemijom;
- Sprovesti morfometrijsku analizu biopsata koštane srži sa određivanjem parametara angiogeneze (mikrovaskularna gustina, velika dužina ose, mala dužina ose, površina, obim, slučajni prečnik, cirkularnost, odnos oblika, zaobljenost i punoća krvnoga suda) kod pacijenata sa hroničnom mijeloidnom leukemijom i kontrolne grupe, pre početka lečenja;
- Komparirati morfometrijske parametre angiogeneze pacijenata sa hroničnom mijeloidnom leukemijom i kontrolne grupe radi dokazivanja razlike u stepenu angiogeneze;
- Identifikovati prognostičke morfometrijske parametre angiogeneze koji utiču na postizanje kompletnog citogenetskog i velikog molekularnog odgovora na primenjenu terapiju;
- Razviti i uporediti prognostičke modele regresione analize u kojima su bazičnim kliničkim parametrima dodati pojedinačni morfometrijski parametri angiogeneze kako bi se povećala tačnost predviđanja kompletnog citogenetskog i velikog molekularnog odgovora na primenjenu terapiju.

Radna hipoteza

Na osnovu podataka iz literature, pretpostavljeno je da postoje razlike u stepenu angiogeneze kod pacijenata sa hroničnom fazom hronične mijeloidne leukemije u poređenju sa osobama kod kojih nije prisutno ovo oboljenje.

To čini osnovu za hipotezu da uključivanje morfometrijskih parametara angiogeneze u prognostičke modele, zajedno sa dokazano uticajnim kliničkim i laboratorijskim parametrima, može poboljšati predviđanje postizanja kompletnog citogenetskog i velikog molekularnog odgovora na terapiju imatinibom.

Na osnovu toga, pretpostavljeno je da je među bazičnim kliničkim i morfometrijskim karakteristikama pacijenata moguće definisati udružene prognostičke faktore koji mogu odrediti tok bolesti i dovesti do razlika u ishodu lečenja.

4. PACIJENTI I METODE

4.1. Karakteristike pacijenata i tretman

Ovo ispitivanje sprovedeno je primenom savremenih dijagnostičkih i terapijskih procedura u lečenju hronične mijeloidne leukemije u cilju utvrđivanja kliničkog značaja angiogeneze i predviđanja ishoda lečenja.

Ispitivanja u okviru ovog istraživanja su obavljena u Klinici za hematologiju i kliničku imunologiju Kliničkog centra u Nišu, Institutu za patologiju Kliničkog centra u Nišu, Dečjoj internoj klinici-odeljenju za citogenetske analize Kliničkog centra u Nišu i Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije-laboratoriji za molekularnu genetiku. Istraživanje je obavljeno u periodu od januara 2009. godine do januara 2014. godine.

Ispitivanje je obuhvatilo 40 pacijenta sa dijagnozom hronične mijeloidne leukemije Filadelfija pozitivne u hroničnoj fazi, a kontrolnu grupu je činilo 20 pacijenta sa Hočkinovim i ne-Hočkinovim limfomom bez infiltracije koštane srži.

Svi pacijenti u okviru ovog istraživanja su započeli lečenje preporučenom dozom imatinib mesilata od 400mg dnevno. Doza leka je eskalirana na 600mg odnosno 800mg dnevno u slučaju neuspeha prethodne terapije, kod pacijenata sa citogenetskom refraktornošću ili sa citogenetskim relapsom.

4.2. Hematološka, citogenetska i molekularna procena

Pre početka lečenja svakom ispitaniku sa hroničnom mijeloidnom leukemijom su urađeni: klinički pregled, kompletna krvna slika sa leukocitarnom formulom na 200 ćelija, biohemijske analize, ultrazvučni pregled abdomena u cilju procene hepatosplenomegalije, aspiraciona punkcija koštane srži sa izradom mijelograma na 200 ćelija, biopsija koštane srži sa patohistološkom verifikacijom i određivanjem parametara angiogeneze, citogenetsko ispitivanje metodom morfološke citogenetike materijala iz koštane srži. Svim pacijentima je urađena procena relativnog rizika od progresije bolesti i smrti, primenom standardnih prognostičkih scoring sistema Sokal skora, Euro skora i EUTOS skora.

Ispitanicima iz kontrolne grupe su određivani parametri angiogeneze na materijalu biopsata koštane srži koja je obavljena za potrebe dijagnostike, kao deo standardne procedure za procenu stepena proširenosti bolesti kod limfoma. Kontrolnu grupu su činili pacijenti bez dokaza o limfomskoj infiltraciji koštane srži i koji nisu dobijali hemioterapiju.

Hronična faza hronične mijeloidne leukemije definisana je prema važećim preporukama European LeukemiaNet panela iz 2013. godine (101) kao prisustvo u krvnoj slici blasta manje od 15%, bazofila manje od 20%, blasta uz promijelocite manje od 30% i trombocita više od $100 \times 10^9/L$.

Posle otpočinjanja terapije imatinib mesilatom, procenjivan je hematološki, citogenetski i molekularni odgovor na terapiju.

Hematološki odgovor je procenjivan na osnovu kliničkih kriterijuma, kompletne krvne slike sa leukocitarnom formulom i standardnog biohemijskog panela. Pacijenti su praćeni svakog meseca do postizanja kompletne hematološke remisije, koja je morala da bude potvrđena dva puta uzastopno, a zatim posle 6 meseci ili u skladu sa drugim kontrolama.

Citogenetski odgovor procenjivan konvencionalnom citogenetskom tehnikom, direktnom preparacijom materijala iz koštane srži u medijumu u kojem se dodatkom kolhicina blokira mitozu ćelija u metafazi. Optimalan broj mitozu za analizu kariotipa i utvrđivanje prisustva t(9;22)(q34;q11) u trenutku postavljanja dijagnoze kao i za procenu stepena odgovora na terapiju bio je najmanje 20. Pacijenti su praćeni citogenetski na 6 meseci do postizanja i potvrde kompletnog citogenetskog odgovora, a zatim jednom godišnje u smislu otkrivanja dodatnih hromozomskih aberacija kariotipa.

Molekularni odgovor procenjivan je kod ispitanika metodom kvantitativnog PCR-a primenom reverzne transkriptaze na RNA periferne krvi posle postizanja kompletne citogenetske remisije na svaka 3 meseca. Izražavanje rezultata RQ-PCR je u procentima shodno međunarodnim preporukama. Kao kriterijum odgovora uzima se BCR-ABL/ABL odnos manji od 0,1% što se definiše kao veliki molekularni odgovor. Posle postizanja i potvrde velikog molekularnog odgovora RQ-PCR rađen je svakih 6 meseci.

4.3. Kriterijumi odgovora

Kriterijumi hematološkog, citogenetskog i molekularnog odgovora na terapiju su definisani u skladu sa važećim preporukama European LeukemiaNet panela iz 2013. godine (103).

Kompletnan hematološki odgovor je definisan: broj leukocita manji od $10 \times 10^9/L$, broj trombocita manji od $450 \times 10^9/L$, odsustvo mlađih elemenata (blasta, promijelocita, mijelocita) u perifernoj krvi i nestanak svih simptoma povezanih sa leukemijom (uključujući palpabilnu slezinu) u trajanju od najmanje četiri nedelje.

Citogenetski odgovor je procenjivan na najmanje 20 metafaza i definisan kao: kompletan 0% Ph⁺ ćelija, parcijalni 1%-35% Ph⁺ ćelija, mali 36%-65% Ph⁺ ćelija, minimalan 66%-95% Ph⁺ ćelija i odsutan >95% Ph⁺ ćelija. Veliki citogenetski odgovor podrazumeva zbir kompletnog i parcijalnog citogenetskog odgovora.

Procena molekularnog odgovora se najbolje ocenjuje prema Međunarodnoj skali (IS), kao odnos BCR-ABL transkripata i ABL transkripata i izražava se kao procenat BCR-ABL na log skali, gde 10%, 1%, 0,1%, 0,01%, 0,0032% i 0,001% odgovaraju smanjenju od 1, 2, 3, 4, 4,5 i 5, loga respektivno, odnosno logove ispod standardne osnovne linije koji je korišćena u IRIS studiji. BCR-ABL ekspresija od 0,1% ili manje odgovara velikom molekularnom odgovoru (MMoR). Najnovije preporuke ELN iz 2013. godine (103) predlažu da se sledeći kriterijumi koriste za definisanje dubine molekularne remisije. MR4,0 je detektabilna bolest sa < 0,01% BCR-ABL, dok je MR4,5 je detektabilna bolest sa < 0,0032% BCR-ABL transkripta. Predloženo je da termin "kompletan molekularni odgovor" treba izbegavati i zameniti ga terminom "molekularno nedetektabilna leukemija", uz navođenje broja kontrolnih transkripta kopija gena.

4.4. Morfometrijska analiza

Za morfometrijsku analizu mikrovaskularnih struktura koštane srži su korišćeni uzorci biopsije koji su bili pripremljeni na sledeći način. Reprezentativni uzorci biopsije koštane srži su bili fiksirani u formalinu, dekalcifikovani sa EDTA/HCl i uklapani parafinom. Iz svakog uzorka su pripremljeni preparati za imunohistohemijsku identifikaciju mikrovaskularnih endotelnih ćelija koji su bili obojeni monoklonskim mišjim antitelom CD34 (klon QBEnd 10; Dako, Carpinteria, CA, USA). U literaturi postoje podaci o značaju CD34 antigena kao izboru za procenu angiogeneze u koštanoj srži kod pacijenata sa mijeloproliferativnim bolestima. Imunohistohemijsko bojenje je bilo izvršeno korišćenjem standardne streptavidin perokidaza metode. U skladu sa objavljenim konsenzusom, smeđe obojene endotelne ćelije ili klasteri, sa ili bez lumena, koje su jasno odvojene od susednih malih krvnih sudova i drugih ćelija koštane srži, smatrali su se jednim malim krvnim sudom koji se broji. Pored endotelnih ćelija, mijeloidni blasti su bili snažno pozitivno obojeni CD34 antitelom, njihova morfologija je prilično lako prepoznatljiva te ih je bilo lako razlikovati od vaskularnih struktura a služili su kao kontrola za verifikovanje adekvatnosti bojenja.

Imunohistohemijski CD34 obojeni mikroskopski preparati su bili analizirani na Leica DMR mikroskopu sa digitalnom kamerom primenom direktne digitalizacije. Slike su prvo analizirane na uvećanju od 200× da bi se identifikovale oblasti koje pokazuju najintenzivniju vaskularizaciju takozvane "vruće tačke", a zatim su na uvećanju od 400× na području "vruće tačke" bile analizirane mikrovaskularne strukture. Kvantifikacija na digitalnim slikama bila je obavljena pomoću softvera (ImageJ Software, National Institutes of Health, USA) na personalnom računaru.

Određivani su sledeći morfometrijski parametri:

1. Mikrovaskularna gustina	MVD
2. Velika dužina ose	MAJOR AXIS
3. Mala dužina ose	MINOR AXIS
4. Površina	AREA
5. Obim	PERIMETER
6. Slučajni prečnik	FERET DIAMETER
7. Cirkularnost	CIRCULARITY
8. Odnos oblika	ASPECT RATIO
9. Zaobljenost	ROUNDNESS
10. Punoća	SOLIDITY

1. Mikrovaskularna gustina (MVD) predstavlja totalni broj mikrovaskularnih struktura po vidnom polju velikog uvećanja (400×), HPF (high power field), površine $\approx 0,5\text{mm}^2$;
2. Velika dužina ose (MAJOR AXIS) je rastojanje između dve tačke duž periferije krvnog suda koje su najudaljenije;
3. Mala dužina ose (MINOR AXIS) je najduža osa normalna na glavnu osu koja se formira od dve tačke duž periferije krvnog suda;
4. Površina (AREA) krvnog suda je izražena u kvadratnim pikselima ili u kalibrisanim kvadratnim jedinicama (mm^2 , μm^2);
5. Obim (PERIMETER) je dužina linije kojom je ograničen selektovani krvni sud;
6. Slučajni prečnik (FERET DIAMETER) predstavlja najduže rastojanje između bilo koje dve tačke duž granice selektovanog krvnog suda, poznato i kao maksimalni kaliper;
7. Cirkularnost (CIRCULARITY) je izvedena mera i dobija se iz površine i obima, prema formuli $\text{Cirkularnost} = (4\pi \times \text{Površina}) / \text{Obim}^2$. Vrednost cirkularnosti od 1,0 odgovara idealnom krugu, dok vrednost koja se približava 0,0 ukazuje na sve izduženiji oblik;
8. Odnos oblika (ASPECT RATIO) predstavlja odnos širine i visine fitovane elipse koja najbolje odgovara selektovanom krvnom sudu, izračunava se iz odnosa Velika osa/Mala osa;

9. Zaobljenost (ROUNDNESS) se izračunava po formuli $(4 \times \text{Površina}) / (\pi \times \text{Velika osa}^2)$ ili kao inverzni Odnos oblika;

10. Punoća (SOLIDITY) se izračunava po formuli Površina/Konveksna Površina.

Celokupno merenje za svakog od pacijenata je urađeno bez znanja drugih podataka o pacijentu.

4.5. Statističke metode

Dobijeni rezultati su prikazani tabelarno i grafički i obrađeni po metodologiji deskriptivne i analitičke statistike. Statistička izračunavanja su izvršena u programu STATA 12 (StataCorp LP, SAD).

Deskriptivne statističke analize su prikazane u formi mera centralne tendencije (medijana i interkvartilni raspon) ili u formi relativnih brojeva (procenata). Vrednosti su prikazivane u formi 95% intervala poverenja (IP).

Potencijalne povezanosti prediktora sa ishodom su analizirane Wilcoxon-ovim testom sume rangova (Mann-Whitney test) za kontinuirane i ordinalne varijable, dok je za ostale varijable korišćen Pearson-ov χ^2 test ili Fisher-ov egzaktni test.

Selekcija varijabli i višestrukih modela je izvršena na osnovu testa odnosa verovatnoća. Testirane su sve klinički značajne dvosmerne interakcije u formi produkta nezavisnih varijabli.

Dijagnostika modela je uključivala testiranje link funkcije, transformacije varijabli, višestruke kolinearnosti i uticajnih opservacija. Potrebe za transformacijom nezavisnih varijabli su testirane Box-Tidwell metodom i metodom frakcionih polinoma. Varijable su kodirane referentno, osim u pojedinačnim slučajevima kada je korišćeno centriranje varijabli u cilju sprečavanja višestruke kolinearnosti.

Kvalitet klasifikacionih modela je procenjivan na osnovu kalibracionih i diskriminacionih kriterijuma.

Diskriminacija se odnosi na mogućnost modela da razlikuje pacijente koji će razviti ispitivani ishod, za razliku od onih koji to neće. Diskriminativna snaga modela je procenjivana na osnovu površine ispod tzv. ROK (eng. receiver operating characteristic) krive. ROK krive predstavljaju grafički prikaz odnosa senzitivnosti i lažno pozitivnih nalaza (1-specifičnost) rezultata modela.

Površina ispod ROK krive vrednosti 1 odgovara testu koji perfektno razlikuje populacije sa različitim ishodom, dok površina od 0,5 odgovara testu čiji rezultati predikcije nisu bolji od slučajne verovatnoće.

Kalibraciona sposobnost određuje stepen podudaranja između ishoda predviđenih modelom i stvarnih ishoda i testirana je Hosmer- Lemeshow-im testom.

Verovatnoća ispitivanog ishoda pre i nakon predikcije modela (pozitivne ili negativne) za tačku preseka od 0,5 je određivana upotrebom formula zasnovanih na Bayes-ovoj teoremi.

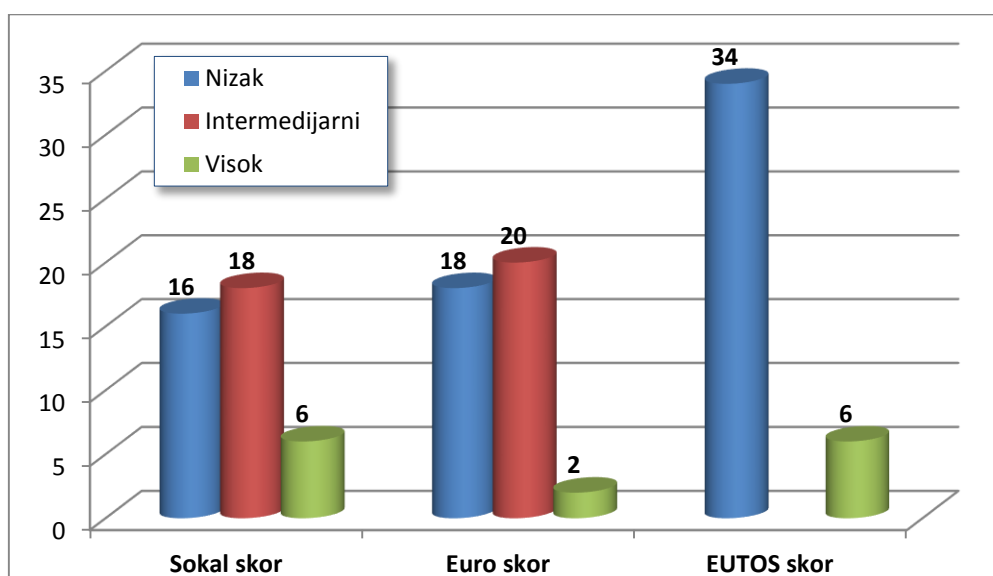
5. REZULTATI

5.1. Karakteristike pacijenata pre tretmana

Analizirano je 40 odraslih pacijenata sa hroničnom fazom hronične mijeloidne leukemije Filadelfija pozitivne, lečenih imatinib mesilatom. Glavne kliničke i hematološke karakteristike pri dijagnozi su prikazane u tabeli 6. Srednje vreme praćenja ispitivane grupe pacijenata od trenutka postavljanja dijagnoze do poslednje kontrole bilo je 43,25 meseci (raspon 7-66 meseci).

Prosečna starost ispitanika u trenutku postavljanja dijagnoze iznosila je 53,78 godina (raspon 29-75), od toga je 16 pacijenata (40%) bilo starosti 60 i više godina. Od ukupnog broja analiziranih pacijenata 18 (45%) su bili muškarci, a 22 (55%) su bile žene. Performans status 2 i više po WHO skali imalo je 8 (20%) ispitanika.

Kod svakog pacijenta sa hroničnom mijeloidnom leukemijom urađena je procena relativnog rizika od progresije bolesti i smrti primenom prognostičkih scoring sistema. Pacijenti su podeljeni u tri prognostičke kategorije definisane Sokal i Euro skorom, odnosno dve kategorije određene EUTOS skorom. Na grafikonu 1 prikazana je struktura pacijenata u zavisnosti od vrednosti Sokal skora, Euro skora i EUTOS skora.



Grafikon 1. Distribucija pacijenata unutar različitih prognostičkih scoring sistema

Od ukupnog broja ispitanika njih 60% su bili intermedijarnog i visokog Sokal skora i 55% intermedijarnog i visokog Euro skora, dok je 15% bilo visokog EUTOS skora.

Tabela 6. Karakteristike pacijenata i bolesti pre početka lečenja imatinib mesilatom

Bazični parametri		
Starost u vreme dg (god)		
Medijana (raspon)		53,78 (29-75)
60g ili stariji, n(%)		16 (40)
Pol, n(%)		
Muški		18 (45)
Ženski		22 (55)
Performans status po WHO, n(%)		
0-1		32 (80)
2		8 (20)
Splenomegalija, ≥5cm, n(%)		
Da		17 (42,5)
Ne		23 (57,5)
Leukociti (×10⁹/L)		
Medijana (raspon)		135,55 (20-483)
≥50×10 ⁹ /L, n (%)		30 (75)
Trombociti (×10⁹/L)		
Medijana (raspon)		430,98 (143-1165)
≥450×10 ⁹ /L, n (%)		16 (40)
Hemoglobin (g/L)		
Medijana (raspon)		107,70 (65-155)
≥120g/L, n (%)		12 (30)
Blasti u perifernoj krvi (%)		
Medijana (raspon)		1,96 (0-5,5)
≥3%, n (%)		8 (20)
Bazofili u perifernoj krvi (%)		
Medijana (raspon)		3,50 (0-7)
≥4%, n (%)		15 (37,5)
Eozinofili u perifernoj krvi (%)		
Medijana (raspon)		2,60 (0-7,5)
≥3%, n (%)		14 (35)
Blasti u koštanoj srži (%)		
Medijana (raspon)		3,15 (0-7)
≥5%, n (%)		11 (27,5)
Bazofili u koštanoj srži (%)		
Medijana (raspon)		2,68 (0-7)
≥4%, n (%)		13 (32,5)

5.2. Hematološki i citogenetski odgovor

Srednje vreme postizanja kompletne hematološke remisije bilo je 3,5 meseci (raspon 1-6 meseci), dok je 80% pacijenata postiglo kompletnu hematološku remisiju unutar 3 meseca, a 97,5% pacijenata unutar 6 meseci od početka lečenja imatinib mesilatom.

Rezultati lečenja imatinib mesilatom prikazani su u tabeli 7. Posle 6 meseci terapije broj pacijenata koji su postigli kompletan citogenetski odgovor bio je 25 (62,5%), dok je posle 12 meseci taj broj iznosio 29 (72,5%) pacijenata. Sa nastavkom terapije primećen je kontinuirani porasta kumulativne stope velikog i kompletnog citogenetskog odgovora čak i posle 2 godine lečenja.

Od ukupnog broja analiziranih pacijenata tokom praćenja njih 36 (90%) su postigli neki stepen citogenetskog odgovora, sa najboljom kumulativnom stopom velikog citogenetskog odgovora i kompletnog citogenetskog odgovora od 87,5% i 75%, respektivno. U ispitivanoj grupi 4/40 (10%) pacijenata je umrlo, dvoje u kompletnoj citogenetskoj remisiji zbog uzroka koji nije povezan sa osnovnom bolešću, a dvoje zbog progresije osnovne bolesti.

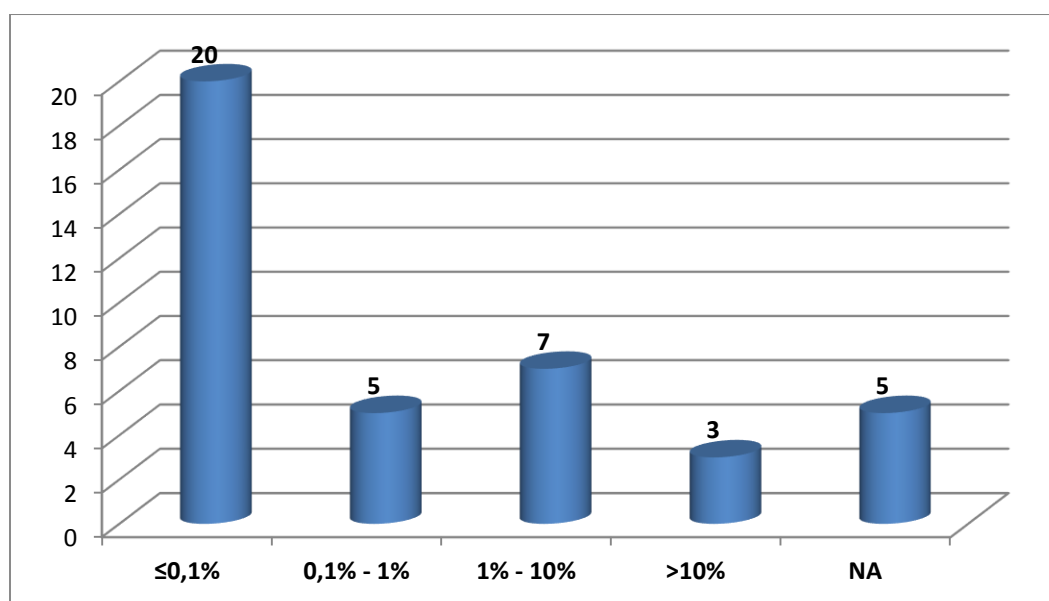
Tabela 7. Stepen citogenetskog odgovora u različitim vremenskim intervalima

Klinički ishod	Vreme postizanja citogenetske remisije							
	6 meseci		12 meseci		18 meseci		Poslednji CgR	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Kompletan CgR	25	62,5	29	72,5	32	80	30	75
Parcijalni CgR	7	17,5	5	12,5	3	7,5	5	12,5
Veliki CgR	32	80	34	85	35	87,5	35	87,5
Minor/Minimal CgR	3	7,5	2	5	0	0	1	2,5
Odsutan CgR	5	12,5	3	7,5	3	7,5	4	10
Smrtni ishod	0	0	1	2,5	2	5	1	2,5

Zbog neuspeha terapije imatinibom, pet pacijenata je prevedeno na terapiju inhibitorima tirozin kinaze druge generacije, od toga troje posle gubitka prethodno postignutog kompletnog citogenetskog odgovora, a dvoje zbog nepostizanja kompletnog citogenetskog odgovora u optimalnom vremenu. Od ukupnog broja analiziranih pacijenata 26/40 (65%) je i dalje sa neprekinutim odgovorom na terapiju imatinibom a posle srednjeg vremena praćenja od 36,68 meseci (raspon 6-60 meseci), sa srednjom dužinom trajanja kompletne citogenetske remisije od 25,5 meseci (raspon, 3-56 meseci).

5.3. Molekularni odgovor

Obzirom da je postizanje velikog molekularnog odgovora udruženo sa poboljšanom mogućnošću postizanja dugotrajne citogenetske remisije, analiziran je stepen molekularnog odgovora postignut tokom terapije inhibitorima tirozin kinaze. Grafikon 2 prikazuje distribuciju najboljeg molekularnog odgovora ispitivane grupe pacijenata tokom analiziranog perioda. U tom cilju pacijenti su podeljeni u grupe u odnosu na nivo BCR-ABL/ABL transkripta, pri čemu se velikim molekularnim odgovorom smatra nivo BCR-ABL/ABL $\leq 0,1\%$. U ispitivanoj grupi veliki molekularni odgovor postiglo je 20/35 (57,14%) pacijenata, 15/35 (42,86%) nije postiglo ovaj nivo odgovora, a kod pet pacijenata nivo molekularnog odgovora nije bio dostupan (smrtni ishod, progresija bolesti, neuspeh terapije). Srednje vreme praćenja molekularnog odgovora za celu ispitivanu grupu bio je 17,89 meseci (raspon 6-48 meseci), a za grupu sa velikim molekularnim odgovorom 21,45 meseci (raspon 6-48 meseci). Svi pacijenti kod kojih je praćen molekularni odgovor imali su najmanje dva PCR testiranja, a kod pacijenata koji su postigli veliki molekularni odgovor, on je morao biti potvrđen u dva uzastopna PCR testiranja.



Grafikon 2. Distribucija pacijenata prema stepenu molekularnog odgovora

U radu je razmatran dugoročni klinički značaj postizanja molekularnog odgovora. Zbog postojanja malog broja smrtnih ishoda i transformacije tokom terapije inhibitorima tirozin kinaze, analizirana je klinička implikacija molekularnog odgovora na dužinu kompletne citogenetske remisije. U tabeli 8 prikazan je stepen molekularnog odgovora kao i njegov značaj za postizanje kompletnog citogenetskog odgovora.

Tabela 8. Značaj postignutog molekularnog odgovora za održavanje kompletne citogenetske remisije

Vrednost BCR-ABL/ABL	Najbolji odnos BCR-ABL/ABL		Broj pacijenata koji nisu postigli ili su izgubili CCgR		Medijana praćenja za MR u mesecima	
	n	%	n	%	$\bar{x}$	raspon
≤ 0,1%	20	57,14	2	10	21,45	6-48
> 0,1%	15	42,86	6	40	13,57	6-24
> 0,1% do 1%	5	14,29	1	20	16	6-24
> 1% do 10%	7	20	3	42,85	10,71	6-30
> 10%	3	8,57	2	66,67	14	12-18

Od 20 pacijenata koji su imali najmanje jednu naknadnu citogenetsku analizu posle postizanja velikog molekularnog odgovora, 2/20 (10%) je izgubilo kompletnu citogenetsku remisiju u poređenju sa 6/15 (40%) pacijenta koji nisu postigli veliku molekularnu remisiju.

5.4. Podnošljivost imatinib mesilata

Iako se imatinib generalno dobro podnosi, njegova primena udružena je sa različitim neželjenim efektima, od kojih su većina blagog do umerenog intenziteta i opadaju posle prvih nekoliko meseci tretmana. Neželjeni efekti se rešavaju spontano ili posle prekida uzimanja leka ili redukcijom doze leka ako je to potrebno. U tabeli 9 prikazana je stopa neželjenih efekata koji su povezani sa terapijom imatinib mesilatom.

Tabela 9. Stopa lek-zavisnih hematoloških i nehematoloških neželjenih efekata

Neželjeni efekti	Lečeni pacijenti			
	Svi gradusi		Gradus 3&4	
	n	%	n	%
Hematološka toksičnost				
Anemija	5	12,5	2	5
Leukopenija	9	22,5	3	7,5
Trombocitopenija	4	10	1	2,5
Nehematološka toksičnost				
Retencija tečnosti	8	20	0	0
Mijalgija	2	5	0	0
Umor	5	12,5	0	0
Dijareja	1	2,5	0	0
Povraćanje	4	10	0	0
Raš	3	7,5	0	0
Glavobolja	6	15	0	0
Mučnina	12	30	0	0

Među nehematološkim neželjenim efektima na terapiji imatinibom koji su se desili u >10% pacijenata najzastupljeniji su bili mučnina, retencija tečnosti, glavobolja i osećaj umora. Od svih imatinib zavisnih nehematoloških neželjenih efekata nijedan nije bio gradusa 3&4, odnosno nije zahtevao prekid terapije. Od hematoloških neželjenih efekata najčešće je bila prisutna leukopenija kod 22,5%, dok je neutropenija gradusa 3&4 bila zastupljena kod 7,5% ispitivanih pacijenata. Stopa registrovane trombocitopenije koja je zahtevala prekid terapije ili redukciju doze, nađena je kod 2,5% ispitanika, dok je anemija gradusa 3&4 koja je zahtevala primenu transfuzije bila je prisutna kod 5% pacijenata.

5.5. Prognostički faktori koji utiču na postizanje kompletnog citogenetskog i velikog molekularnog odgovora

Povezanost između karakteristika pacijenata pre tretmana i kasnije mogućnosti za postizanje kompletnog citogenetskog odgovora prikazana je u tabeli 10. Statistička analiza je korišćena da se testira efekat više bazičnih varijabli na mogućnost postizanja kompletnog citogenetskog odgovora. Univarijantna analiza je pokazala da je od 13 bazičnih parametara njih 7 statistički značajno udruženo sa postizanjem ovog nivoa odgovora: manje od 3% blasta u perifernoj krvi, manje od 4% bazofila u perifernoj krvi, manje od 4% bazofila u koštanoj srži ($p<0,01$), kao i splenomegalija manja od 5 cm ispod rebarnog luka u nivou MKL, vrednost hemoglobina veća od 120g/L, manje od 5% blasta u koštanoj srži i nizak EUTOS skor ($p<0,05$).

Kod pacijenata koji su imali blaste u perifernoj krvi manje od 3%, njih 90% su postigli kompletan citogenetski odgovor, a kod pacijenata koji su imali viši nivo perifernih blasta njih 10% je postiglo isti nivo odgovora u analiziranom periodu. Postojao je značajno viši procenat pacijenata koji su postigli kompletan citogenetski odgovor od 76,67% u grupi koja je imala manje od 4% bazofila u perifernoj krvi, u odnosu na grupu pacijenata koja je imala više vrednosti bazofila u perifernoj krvi u kojoj je stopa ovog nivoa odgovora iznosila 23,33%. Slična situacija je bila i u grupi pacijenata koji su imali manje od 4% bazofila u koštanoj srži gde je stopa kompletnog citogenetskog odgovora iznosila 80%, dok je u grupi pacijenta sa višim procentom bazofila njih 20% postiglo ovaj nivo odgovora.

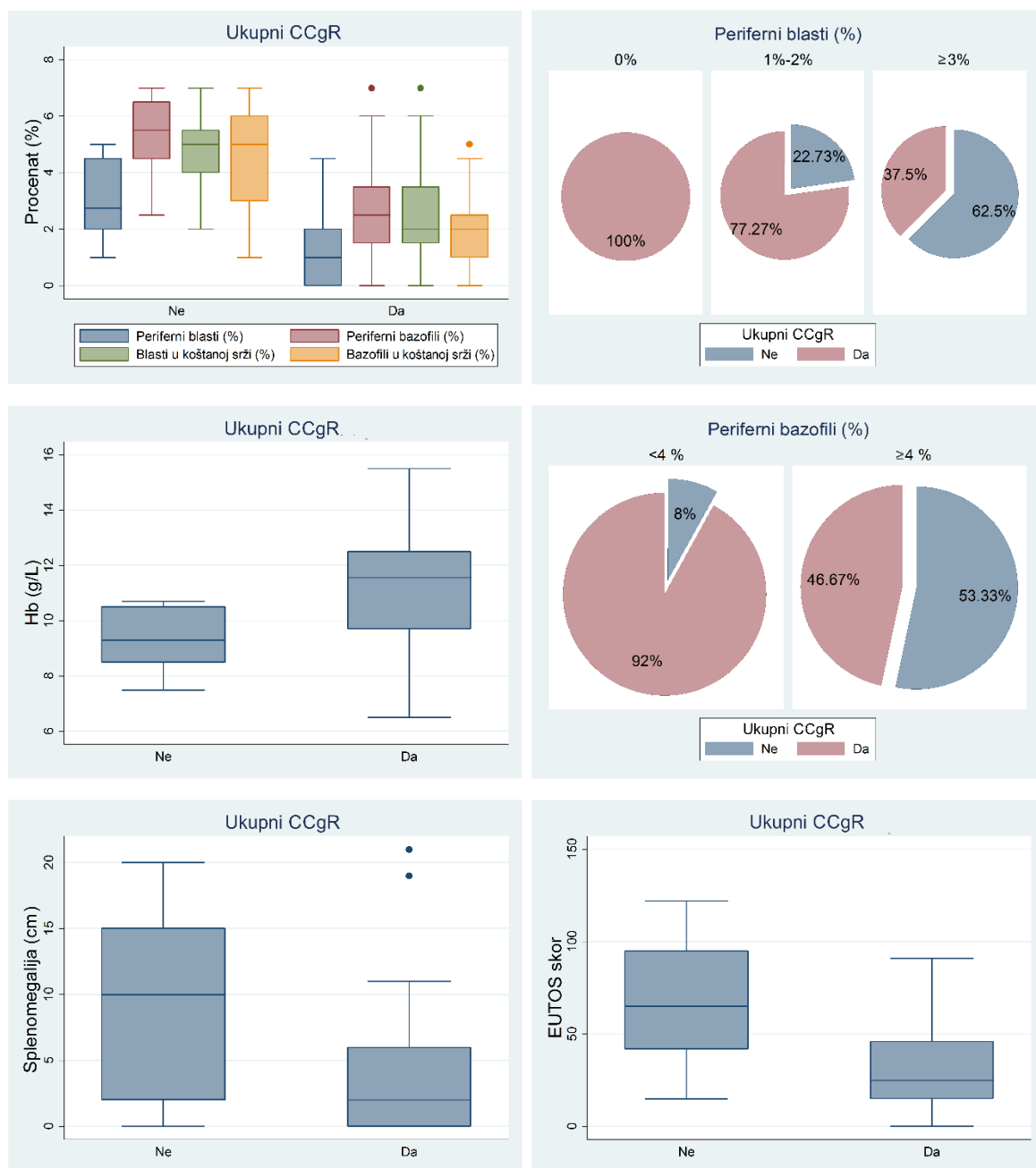
Analizirana je povezanost između bazičnih kliničkih karakteristika pacijenata udruženih sa postizanjem velikog molekularnog odgovora primenom univarijantne analize. U tabeli 11 prikazana je korelacija bazičnih karakteristika pacijenata i bolesti sa velikim molekularnim odgovorom. Prema univarijantnoj analizi karakteristike udružene sa većom mogućnošću postizanja velike molekularne remisije uključivale su 3 od 13 bazičnih varijabli: manje od 4% bazofila u perifernoj krvi, manje od 5% blasta u koštanoj srži i nizak Euro skor rizika ($p<0,05$).

Tabela 10. Prognostički faktori udruženi sa kompletnim citogenetskim odgovorom

		Ukupni CCgR			p
Bazični parametri		Ne (n=10)	Da (n=30)	Ukupno (n=40)	
Pol	Ženski	7 (70 %)	15 (50%)	22 (55%)	0,2330
	Muški	3 (30%)	15 (50%)	18 (45%)	
Starost u vreme dg (god)		60,5 (48-67)	54,5 (43-63)	55,5 (48-65)	0,2603
<60		5 (50%)	19(63,3%)	24 (60%)	0,351
≥60		5 (50%)	11 (36,7%)	16 (40%)	
Splenomegalija (cm)		10 (2-15)	2 (0-6)	3 (0-8,5)	0,0166
<5		3 (30%)	20 (66,7%)	23 (57,5%)	0,049
≥5		7 (70%)	10 (33,3%)	17 (42,5%)	
Leukociti (×10 ⁹ /L)		143 (91-226)	91,5 (48-170)	101,5 (54,5-176,5)	0,1337
<50		1 (10%)	9 (30%)	10 (25%)	0,204
≥50		9 (90%)	21 (70%)	30 (75%)	
Trombociti (×10 ⁹ /L)		307 (226-673)	384 (229-672)	362,5 (227,5-672,5)	0,7194
<450		7 (70%)	17(56,67%)	24 (60%)	0,360
≥450		3 (30%)	13 (43,3%)	16 (40%)	
Hemoglobin (g/L)		9,3 (8,5-10,5)	11,55 (9,7-12,5)	10,6 (9,1-12,5)	0,0068
<120		10 (100%)	18 (60%)	28 (70%)	0,015
≥120		0 (0%)	12 (40%)	12 (30%)	
Blasti u perifernoj krvi (%)		2,75 (2-4,5)	1 (0-2)	1,25 (0,5-2,25)	0,0009
0%		0 (0%)	10 (33,33%)	10 (25%)	0,007
1-2%		5 (50%)	17 (56,67%)	22 (55%)	
≥3%		5(50%)	3 (10%)	8 (20%)	
Bazofili u perifernoj krvi (%)		5,5 (4,5-6,5)	2 (1,5-3,5)	3 (2,25-5,5)	0,0007
<4%		2 (20%)	23 (76,67%)	25 (62,5%)	0,002
≥4%		8 (80%)	7 (23,33%)	15 (37,5%)	
Blasti u koštanoj srži (%)		5 (4-5,5)	2 (1,5-3,5)	2,5 (2-5)	0,0071
<5%		4 (40%)	25(83,33%)	29 (72,5%)	0,014
≥5%		6 (60%)	5 (16,67%)	11 (27,5%)	
Bazofili u koštanoj srži (%)		5 (3 - 6)	2 (1 - 2,5)	2 (1 - 4,5)	0,0007
<4%		3 (30%)	24 (80%)	27 (67,5%)	0,006
≥4%		7 (70%)	6 (20%)	13 (32,5%)	
Sokal skor		1,15 (0,89-1,35)	0,83 (0,72-1)	0,92 (0,76-1,14)	0,0199
Nizak		2 (20%)	14 (46,67%)	16 (40%)	0,174
Umeren		5 (50%)	13 (43,33%)	18 (45%)	
Visok		3 (30%)	3 (10%)	6 (15%)	
Euro skor		1128,75 (1057,8-1274,24)	769,85 (599,75-1021,84)	875,23 (660,3-1128,75)	0,0136
Nizak		2 (20%)	16 (53,33%)	18 (45%)	0,145
Umeren		7 (70%)	13(43,33%)	20 (50%)	
Visok		1 (10%)	1 (3,33%)	2 (5%)	
EUTOS skor		65 (42-95)	25 (15-46)	35 (20,5-62,5)	0,0051
Nizak		6 (60%)	28 (93,33%)	34 (85%)	0,026
Visok		4 (40%)	2 (6,67%)	6 (15%)	

Za sve kontinuirane varijable prikazani su medijana i interkvartni raspon (IQR). Za kategorijske varijable prikazan je broj i procenat. Statistički testovi: Mann-Whitney test za kontinuirane varijable, Fišerov test ili Pearson χ^2 test za druge varijable. U koloni p, prva vrednost se odnosi na: Mann-Whitney test, a druga na Fisher exact test. * p<0,05; ** p<0,01.

Na grafikonu 3 grafički su prikazane bazične vrednosti statistički najznačajnijih laboratorijskih parametara koji utiču na postizanje ukupnog kompletnog citogenetskog odgovora.



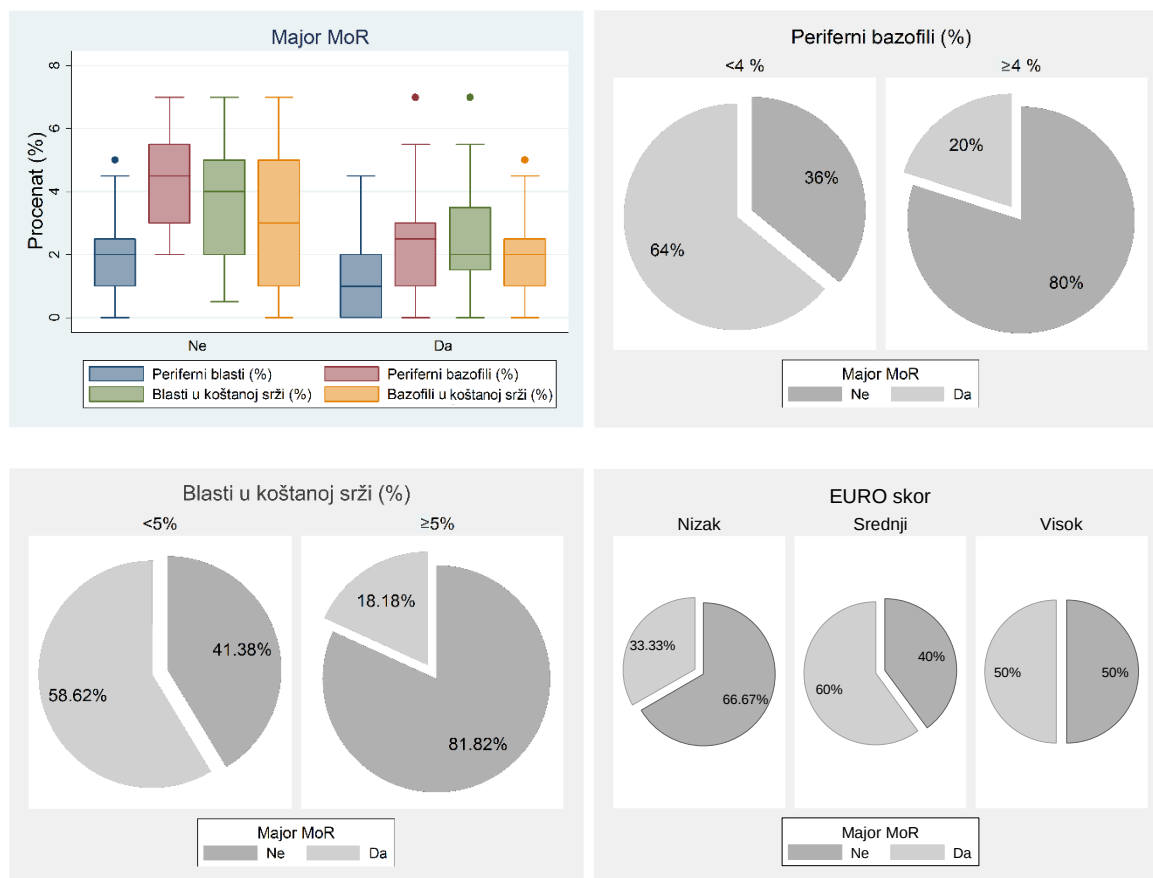
Grafikon 3. Vrednosti bazičnih laboratorijskih parametara koje su udružene sa postizanjem ukupnog kompletnog citogenetskog odgovora

Tabela 11. Prognostički faktori udruženi sa velikim molekularnim odgovorom

Bazični parametri		Ukupni MMR		Ukupno (n = 35)	p
		Ne (n = 15)	Da (n = 20)		
Pol	Ženski	7 (46,7%)	12 (60%)	19 (54,3%)	0,330
	Muški	8 (53,3%)	8 (40%)	16 (45,71%)	
Starost u vreme dg. (god)		60 (43-65)	53 (45,5-62,5)	55 (43-65)	0,4329
	<60	7 (46,7%)	14 (70%)	21 (60%)	0,148
	≥60	8 (53,3%)	6 (30%)	14 (40%)	
Splenomegalija (cm)		2 (0-6)	2 (0-7)	2 (0-7)	0,9446
	<5	10 (66,7%)	12 (60%)	22 (62,9%)	0,482
	≥5	5 (33,3%)	8 (40%)	13 (37,1%)	
Leukociti (×10 ⁹ /L)		103 (69-244)	88,5 (45-170)	100 (49-223)	0,2111
	<50	2 (13,33%)	7 (35%)	9 (25,71%)	0,144
	≥50	13 (86,67%)	13 (65%)	26(74,29%)	
Trombociti (×10 ⁹ /L)		272 (195-527)	384 (241,5-673)	383 (226-672)	0,4839
	<450	10 (66,7%)	11 (55%)	21 (60%)	0,365
	≥450	5 (33,3%)	9 (45%)	14 (40%)	
Hemoglobin (g/L)		10,5 (9,1-11,5)	11,7 (9,7-16,65)	11 (9,2-12,5)	0,1763
	<120	12 (80%)	11 (55%)	23 (65,71%)	0,118
	≥120	3 (20%)	9 (45%)	12 (34,29%)	
Blasti u perifernoj krvi (%)		2 (1-2)	1 (0-2)	1 (0-2)	0,3053
	0%	3 (20%)	7 (35%)	10 (28,57%)	0,712
	1-2%	10 (66,67%)	10 (50%)	20 (57,14%)	
	≥3%	2 (13,33%)	3 (15%)	5 (14,29%)	
Bazofili u perifernoj krvi (%)		4 (2,5-5,5)	2,5 (1,25-3,25)	2,5 (2-4,5)	0,0168
	<4%	7 (46,7%)	17 (85%)	24 (68,57%)	0,020
	≥4%	8 (53,3%)	3 (15%)	11 (31,43%)	
Blasti u koštanoj srži (%)		3 (1,5-5,5)	2 (1,75-3,5)	2,5 (1,5-4)	0,2262
	<5%	9 (60%)	18 (90%)	27 (77,14%)	0,046
	≥5%	6 (40%)	2 (10%)	8 (22,86%)	
Bazofili u koštanoj srži (%)		2,5 (0,65-4,5)	2 (1-2,5)	2 (1-4)	0,5556
	<4%	10 (66,7%)	16 (80%)	26 (74,29%)	0,306
	≥4%	5 (33,3%)	4 (20%)	9 (27,71%)	
Sokal skor		0,79 (0,75-1,13)	0,89 (0,74-1,06)	0,86 (0,75-1,12)	0,8938
	Nizak	8 (53,3%)	8 (40%)	16 (45,71%)	0,323
	Umeren	7 (46,7%)	9 (45%)	16 (45,71%)	
	Visok	0 (0%)	3 (15%)	3 (8,58%)	
Euro skor		676,57 (344,9- 1057,8)	934,675 (718,23- 1096,08)	769,85 (599,75- 1073,45)	0,1133
	Nizak	11 (73,33%)	7 (35%)	18 (51,43%)	0,041
	Umeren	4 (26,67%)	12 (60%)	16 (45,71%)	
	Visok	0 (0%)	1 (5%)	1 (2,86%)	
EUTOS skor		35 (27-48)	21,5 (14-48)	28 (15-48)	0,2492
	Nizak	14 (93,33%)	18 (90%)	32 (91,43%)	0,610
	Visok	1 (6,67%)	2 (10%)	3 (8,57%)	

Za sve kontinuirane varijable prikazani su medijana i interkvartni raspon (IQR). Za kategorijske varijable prikazan je broj i procenat. Statistički testovi: Mann-Whitney test za kontinuirane varijable, Fišerov test ili Pearson χ^2 test za druge varijable. U koloni p, prva vrednost se odnosi na: Mann-Whitney test, a druga na Fisher exact test. * p<0,05; ** p<0,01.

Na grafikonu 4 grafički su prikazane bazične vrednosti statistički najznačajnijih laboratorijskih parametara koji utiču na postizanje velikog molekularnog odgovora.



Grafikon 4. Vrednosti bazičnih laboratorijskih parametara koje su udružene sa postizanjem velikog molekularnog odgovora

Pacijenti koji su u vreme postavljanja dijagnoze imali bazofile u perifernoj krvi manje od 4%, njih 85% su postigli veliki molekularni odgovor tokom trajanja terapije, dok je kod pacijenata koji su imali viši nivo perifernih bazofila njih 15% postiglo isti nivo odgovora. Nađen je značajno viši procenat pacijenata koji su postigli veliki molekularni odgovor od 90% u grupi koja je imala manje od 5% blasta u koštanoj srži, u odnosu na grupu pacijenata koja je imala više vrednosti blasta u koštanoj srži u kojoj je stopa ovog nivoa odgovora iznosila 10%. Pacijenti sa niskim Euro skorom rizika postigli su veliki molekularni odgovor u 90% slučajeva.

5.6. Komparacija angiogeneznih parametara između kontrolne i grupe sa hroničnom mijeloidnom leukemijom

U radu su bile procenjivane različite morfometrijske karakteristike malih krvnih sudova, koji su vizualizovani putem anti-CD34 imunohistohemijskog bojenja na uzorcima biopsije koštane srži 40 pacijenata sa hroničnom mijeloidnom leukemijom u hroničnoj fazi u trenutku postavljanja dijagnoze. Procenjivane su morfometrijske karakteristike angiogeneze i na materijalu biopsata koštane srži 20 ispitanika koji su činili kontrolnu grupu, 14 pacijenata sa ne-Hočkinovim limfomom i 6 pacijenata sa Hočkinovim limfomom, kod kojih nije bilo dokaza o postojanju infiltracije koštane srži limfomskim ćelijama. Mikrovaskularna gustina, pet veličina zavisnih i četiri oblik zavisnih morfometrijskih parametara su bili kvantifikovani u regionu najintenzivnije vaskularizacije uz korišćenje imidž analize. U tabeli 12 je prikazano poređenje morfometrijskih varijabli između kontrolne grupe i grupe sa hroničnom mijeloidnom leukemijom.

Tabela 12. Evaluacija vaskularnih morfometrijskih parametara u kontrolnoj i grupi pacijenata sa hroničnom mijeloidnom leukemijom

Morfometrijski parametri	Grupa sa HML (n=40) (medijana, IQR)	Kontrolna grupa (n=20) (medijana, IQR)	Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test	
Mikrovaskularna gustina (n/HPF)	8,7 (7-10,7)	3,5 (3-4,2)	z	p
Velika dužina ose (μm)	31,7 (27,4-39,7)	22,3 (20,1-23,3)	5,495	0,00
Mala dužina ose (μm)	9,8 (7,4-12,9)	5,2 (4,3-5,5)	5,818	0,00
Površina ($\mu^2\text{m}$)	258 (169,4-421,7)	90,5 (70,5-108,3)	5,567	0,00
Obim (μm)	84,9 (70,7-103,9)	57,9 (52,8-61,1)	4,375	0,00
Slučajni prečnik (μm)	34,6 (29,9-42,8)	25,3 (23,4-27,6)	3,920	0,00
Cirkularnost	0,48 (0,43-0,60)	0,37 (0,3-0,46)	3,748	0,00
Odnos oblika	3,7 (3-4,4)	5,04 (4,6-6,15)	-4,062	0,00
Zaobljenost	0,35 (0,3-0,43)	0,26 (0,22-0,34)	3,254	< 0,01
Punoća	0,81 (0,77-0,87)	0,79 (0,75-0,85)	2,933	<0,01

Mikrovaskularna gustina i veličina zavisni morfometrijski parametri velika i mala dužina ose, površina, obim i slučajni prečnik, su bili viši u hroničnoj fazi hronične mijeloidne leukemije nego u kontrolnoj grupi ($p < 0,01$). Kontrolna grupa je pokazala niže vrednosti oblik zavisnih morfometrijskih parametara cirkularnosti, odnosa oblika, zaobljenosti i punoće krvnog suda ($p < 0,01$). Razlike su se očitavale u povećanom broju krvnih sudova velikog kalibra i nepravilnog oblika u koštanoj srži hronične mijeloidne leukemije, nasuprot malom broju jednostavnih i pravih mikro sudova u kontrolnoj grupi. Nalazi ukazuju na signifikantno povišenu vaskularnost u hroničnoj mijeloidnoj leukemiji u poređenju sa kontrolnom grupom.

5.7. Korelacija parametara angiogeneze sa citogenetskim i molekularnim odgovorom

U ovom istraživanju je ispitivano da li angiogeneza koštane srži u trenutku postavljanja dijagnoze hronične mijeloidne leukemije može predvideti stepen terapijskog odgovora, odnosno mogućnost postizanja kompletnog citogenetskog i velikog molekularnog odgovora. U tabeli 13 prikazana je povezanost angiogeneznih parametara i stepena citogenetskog odgovora.

Tabela 13. Korelacija kompletnog citogenetskog odgovora i angiogeneznih parametara

Morfometrijski parametri	CCgR (1-da; 0-ne) n = 40	
	Spearmanovi korelacioni koeficijenti	P
Mikrovaskularna gustina (n/HPF)	-0,4560	0,0031
Velika dužina ose (μm)	-0,3301	0,0375
Mala dužina ose (μm)	-0,5952	0,0001
Površina (μm²)	-0,5202	0,0006
Obim (μm)	-0,3251	0,0407
Slučajni prečnik (μm)	-0,2751	0,0858
Cirkularnost	-0,5752	0,0001
Odnos oblika	0,5452	0,0003
Zaobljenost	-0,5302	0,0004
Punoća	-0,5652	0,0001

Statistički značajna negativna korelacija je nađena između postignutog kompletnog citogenetskog odgovora i vrednosti mikrovaskularne gustine kao i veličina zavisnih morfometrijskih parametara: dužine male ose i površine krvnoga suda ($p < 0,01$). Statistički značajna negativna korelacija je nađena između postignutog kompletnog citogenetskog odgovora i oblik zavisnih morfometrijskih parametara: cirkularnosti, zaobljenosti i punoće krvnoga suda, ali i statistički značajna pozitivna korelacija sa odnosom oblika ($p < 0,01$).

Odnos između evaluiranog stepena molekularnog odgovora i parametara angiogeneze dat je u tabeli 14. Statistički značajna negativna korelacija je nađena između postignutog velikog molekularnog odgovora i vrednosti mikrovaskularne gustine kao i veličina zavisnih morfometrijskih parametara: dužine male ose, površine i obima krvnoga suda ($p < 0,01$).

Tabela 14. Korelacija velikog molekularnog odgovora i angiogeneznih parametara

Morfometrijski parametri	MMoR (1-da; 0-ne) n = 35	
	Spearmanovi korelacioni koeficijenti	p
Mikrovaskularna gustina (n/HPF)	-0,5274	0,0011
Velika dužina ose (μm)	-0,4173	0,0126
Mala dužina ose (μm)	-0,5316	0,0010
Površina (μm^2)	-0,5431	0,0007
Obim (μm)	-0,4573	0,0057
Slučajni prečnik (μm)	-0,3887	0,0210
Cirkularnost	-0,2515	0,1450
Odnos oblika	0,2515	0,1450
Zaobljenost	-0,2744	0,1107
Punoća	-0,0743	0,6714

Međutim nije nađena statistički značajna korelacija između postignutog velikog molekularnog odgovora i analiziranih oblik zavisnih morfometrijskih parametara.

5.8. Prognostički angiogenezni parametri koji utiču na postizanje kompletnog citogenetskog i velikog molekularnog odgovora

Da bi se utvrdilo da li stepen angiogeneze koštane srži pri postavljanju dijagnoze može predvideti ishod lečenja pacijenata sa hroničnom mijeloidnom leukemijom, ispitivana je povezanost između morfometrijskih parametara i postizanja optimalnog terapijskog odgovora. Asocijacija između angiogeneznih parametara i kasnije mogućnosti postizanja kompletnog citogenetskog odgovora tokom tretmana je prikazana u tabeli 15.

U odnosu na postignut kompletan citogenetski odgovor, univarijantna analiza identifikovala je sledeće značajne morfometrijske parametre: vrednost mikrovaskularne gustine manju od 9/HPF, malu dužinu ose manju od 10 μm , površinu manju od 350 μm^2 , cirkularnost manju od 0,5, odnos oblika veći od 3,5 i zaobljenost krvnoga suda manju od 0,35, koji ukazuju na povećanu mogućnost postizanja ovog nivoa odgovora ($p < 0,01$). Sa nižim stepenom statističke značajnosti ($p < 0,05$) identifikovani su velika dužina ose manja od 35 μm , obim manji od 85 μm i punoća krvnoga suda manja od 0,77, kao značajni morfometrijski parametri za postizanje kompletnog citogenetskog odgovora.

Tabela 15. Angiogenezni parametri udruženi sa kompletnim citogenetskim odgovorom

	Ukupni CCgR			
Morfometrijski parametri	Ne (n=10)	Da (n=30)	Ukupno (n=40)	p
Mikrovaskularna gustina (n/HPF)	10,5 (9,3-12)	8,5 (5-9,67)	8,71 (7-10,67)	0,0044
<9	1 (10%)	20 (66,77%)	21 (52,5%)	
≥9	9 (90%)	10 (33,33%)	19 (47,5%)	0,002
Velika dužina ose (μm)	37,72 (33,6-42,2)	29,8 (26,9-37,01)	31,72 (27,4-39,7)	0,0393
<35	3 (30%)	20 (66,77%)	23 (57,5%)	
≥35	7 (70%)	10 (33,33%)	17 (42,5%)	0,049
Mala dužina ose (μm)	15,26 (13,06-16,95)	8,85 (7,37-10,46)	9,76 (7,44-12,89)	0,0002
<10	1 (10%)	20 (66,7%)	21 (52,5%)	
≥10	9 (90%)	10 (33,33%)	19 (47,5%)	0,002
Površina (μm ²)	437,8 (413,1-633,6)	213,8(159,9-348,5)	258 (169,4-421,7)	0,0012
<350	1 (10%)	23 (75,67%)	24 (60%)	
≥350	9 (90%)	7 (23,33%)	16 (40%)	0,000
Obim (μm)	100,8 (89,4-110,9)	76,5 (70-95,3)	84,9 (70,7-103,9)	0,0423
<85	2 (20%)	18 (60%)	20 (50%)	
≥85	8 (80%)	12 (40%)	20 (50%)	0,032
Slučajni prečnik (μm)	40,9 (35,4-47)	32,1 (29,4-41,4)	34,6 (29,9-42,8)	0,0858
<40	5 (50%)	22 (73,33%)	27 (67,5%)	
≥40	5 (50%)	8 (26,67%)	13 (32,5%)	0,165
Cirkularnost	0,61 (0,54-0,65)	0,45 (0,42-0,57)	0,48 (0,43-0,60)	0,0003
<0,5	1 (10%)	21 (70%)	22 (55%)	
≥0,5	9 (90%)	9 (30%)	18 (45%)	0,001
Odnos oblika	2,73 (2,64-3,15)	3,98 (3,45-4,53)	3,68 (2,95-4,36)	0,0007
<3,5	9 (90%)	9 (30%)	18 (45%)	
≥3,5	1 (10%)	21 (70%)	22 (65%)	0,001
Zaobljenost	0,43 (0,39-0,48)	0,32 (0,29-0,39)	0,35 (0,30-0,43)	0,0009
<0,35	0 (0%)	19 (63,33%)	19 (47,5%)	
≥0,35	10 (100%)	11 (36,67%)	21 (52,5%)	0,000
Punoća	0,89 (0,85-0,91)	0,79 (0,76-0,85)	0,80 (0,77-0,87)	0,0004
<0,77	0 (0%)	11 (36,67%)	11 (27,5%)	
≥0,77	10 (100%)	19 (63,33%)	29 (72,5%)	0,024

Za sve kontinirane varijable prikazani su medijana i interkvartni raspon (IQR). Za kategorijske varijable prikazan je broj i procenat. Statistički testovi: Mann-Whitney test za kontinuirane varijable, Fišerov test ili Pearson χ^2 test za druge varijable. * p<0,05; ** p<0,01.

U ovom istraživanju univarijantom analizom identifikovani su mikrovaskularna gustina, mala dužina ose i površina krvnoga suda kao faktori značajno udruženi sa postizanjem kompletnog citogenetskog odgovora. Kod pacijenata koji su imali vrednost mikrovaskularne gustine manju od 9/HPF i malu dužinu ose manju od 10 μm, njih 66,77% su postigli kompletan citogenetski odgovor, a kod pacijenata koji su imali viši nivo ovih varijabli njih

33,33% je postiglo isti nivo odgovora u analiziranom periodu. Postojao je značajno viši procenat pacijenata koji su postigli kompletan citogenetski odgovor od 75,67% u grupi koja je imala manju površinu krvnoga suda od 350 μm^2 , u odnosu na grupu pacijenata koja je imala više vrednosti ovog parametra, u kojoj je stopa ovog nivoa odgovora iznosila 23,33%. Pacijenti sa vrednostima cirkularnosti manjim od 0,5 i odnosom oblika većim od 3,5 su u 70% slučajeva postigli kompletnu citogenetsku remisiju, a sa zaobljenošću manjom od 0,35 u 63,33% slučajeva. Analizirana je povezanost između angiogeneznih parametara i kasnije mogućnosti da se postigne veliki molekularni odgovor što je prikazano u tabeli 16.

Tabela 16. Angiogenezni parametri udruženi sa velikim molekularnim odgovorom

Morfometrijski parametri	Ukupni MMR		Ukupno (n=35)	P
	Ne (n=15)	Da (n=20)		
Mikrovaskularna gustina (n/HPF)	10,67 (8,67-12)	7,67 (4,67-8,67)	8,67 (5,33-10,67)	0,0021
<9	4 (26,67%)	16 (80%)	20 (57,14%)	
≥9	11 (73,33%)	4 (20%)	15 (42,86%)	0,002
Velika dužina ose (μm)	35,6 (30,28-41,43)	28,39 (24,4-36,2)	30,9 (27,1-37,9)	0,0150
<35	7 (46,67%)	14 (70%)	21 (60%)	
≥35	8 (53,33%)	6 (30%)	14 (40%)	0,148
Mala dužina ose (μm)	10,8 (9,6-13,2)	7,8 (6,7-10)	9,6 (7,4-11,4)	0,0019
<10	5 (33,33%)	15 (75%)	20 (57,14%)	
≥10	10 (67,67%)	5 (25%)	15 (42,86%)	0,017
Površina (μm^2)	364,9 (235-434)	177,8 (127,9-304,1)	235 (161,4-401,2)	0,0015
<350	7 (46,67%)	16 (80%)	23 (65,71%)	
≥350	8 (53,33%)	4 (20%)	12 (34,29%)	0,045
Obim (μm)	91 (77,8-106,8)	71,7 (64,2-94,6)	77,8 (70-100,3)	0,0077
<85	5 (33,33%)	14 (70%)	19 (54,29%)	
≥85	10 (67,67%)	6 (30%)	16 (45,71%)	0,034
Slučajni prečnik (μm)	39,7 (33,7-45,9)	31,1 (27,7-39,6)	33,7 (29,6-41,5)	0,0234
<40	10 (67,67%)	15 (75%)	25 (71,43%)	
≥40	5 (33,33%)	5 (25%)	10 (28,57%)	0,433
Cirkularnost	0,51 (0,43-0,61)	0,46 (0,42-0,53)	0,47 (0,43-0,58)	0,1425
<0,5	7 (46,67%)	15 (75%)	22 (62,86%)	
≥0,5	8 (53,33%)	5 (25%)	13 (37,14%)	0,087
Odnos oblika	3,67 (2,73-4,27)	3,98 (3,47-4,58)	3,76 (3,11-4,41)	0,1425
<3,5	7 (46,67%)	6 (30%)	13 (37,14%)	
≥3,5	8 (53,33%)	14 (70%)	22 (62,86%)	0,255
Zaobljenost	0,39 (0,31-0,45)	0,33 (0,3-0,36)	0,34 (0,3-0,43)	0,1096
<0,35	5 (33,33%)	14 (70%)	19 (54,29%)	
≥0,35	10 (67,67%)	6 (30%)	16 (45,71%)	0,034
Punoća	0,81 (0,76-0,85)	0,79 (0,76-0,85)	0,80 (0,76-0,85)	0,6648
<0,77	5 (33,33%)	6 (30%)	11 (31,43%)	
≥0,77	10 (67,67%)	14 (70%)	24 (68,57%)	0,560

Za sve kontinuirane varijable prikazani su medijana i interkvartni raspon (IQR). Za kategorijske varijable prikazan je broj i procenat. Statistički testovi: Mann-Whitney test za kontinuirane varijable, Fišerov test ili Pearson χ^2 test za druge varijable. * p<0,05; ** p<0,01.

Prema statističkoj analizi između deset ispitivanih morfometrijskih parametara identifikovani su vrednost mikrovaskularne gustine manja od 9/HPF ($p<0,01$), kao i mala dužina ose manja od 10 μm , površina manja od 350 μm^2 , obim manji od 85 μm i zaobljenost krvnoga suda manja od 0,35 ($p<0,05$), kao značajni pokazatelji postizanja velikog molekularnog odgovora. Grupa ispitanika sa vrednošću mikrovaskularne gustine manjom od 9 je u 80% ispitanika postigla veliki molekularni odgovor.

5.9. Prognostički faktori koji utiču na postizanje kompletnog citogenetskog odgovora u različitim vremenskim intervalima

Obzirom da su pojedine studije pokazale da je rani kompletan citogenetski odgovor na imatinib imao značajnu povezanost sa preživljavanjem bez događaja i smanjenu mogućnost progresije u fazu akceleracije ili blastne krize, u ovom istraživanju su analizirani bazični faktori koji dovode do postizanja ranog kompletnog citogenetskog odgovora. U tabeli 17 prikazani su bazični parametri pacijenata koji su bili povezani sa postizanjem kompletnog citogenetskog odgovora posle 6, 12 i 18 meseci terapije.

Univarijantnom analizom su identifikovane varijable koje su bile povezane sa većom verovatnoćom postizanja kompletnog citogenetskog odgovora posle 6 meseci terapije: splenomegalija manja od 5 cm ispod rebarnog luka u nivou MKL, manje od 5% blasta u koštanoj srži ($p<0,01$), a sa nižim stepenom statističke značajnosti izdvojeni su još i manje od 3% blasta u perifernoj krvi, manje od 4% bazofila u perifernoj krvi, manje od 4% bazofila u koštanoj srži, kao i nizak Sokal, Euro i EUTOS skor rizika ($p<0,05$).

U radu je bila ispitivana udruženost između karakteristika pacijenata pre tretmana i kasnije mogućnosti da se postigne kompletan citogenetski odgovor posle 12 meseci terapije. Univarijantnom analizom su bili identifikovani sledeći nezavisni prognostički parametri: prisustvo manje od 3% blasta u perifernoj krvi, manje od 4% bazofila u perifernoj krvi, manje od 4% bazofila u koštanoj srži ($p<0,01$), a sa nižom statističkom značajnošću izdvojene su splenomegalija manja od 5 cm ispod rebarnog luka u nivou MKL, manje od 5% blasta u koštanoj srži i nizak Sokal i EUTOS skor rizika ($p<0,05$).

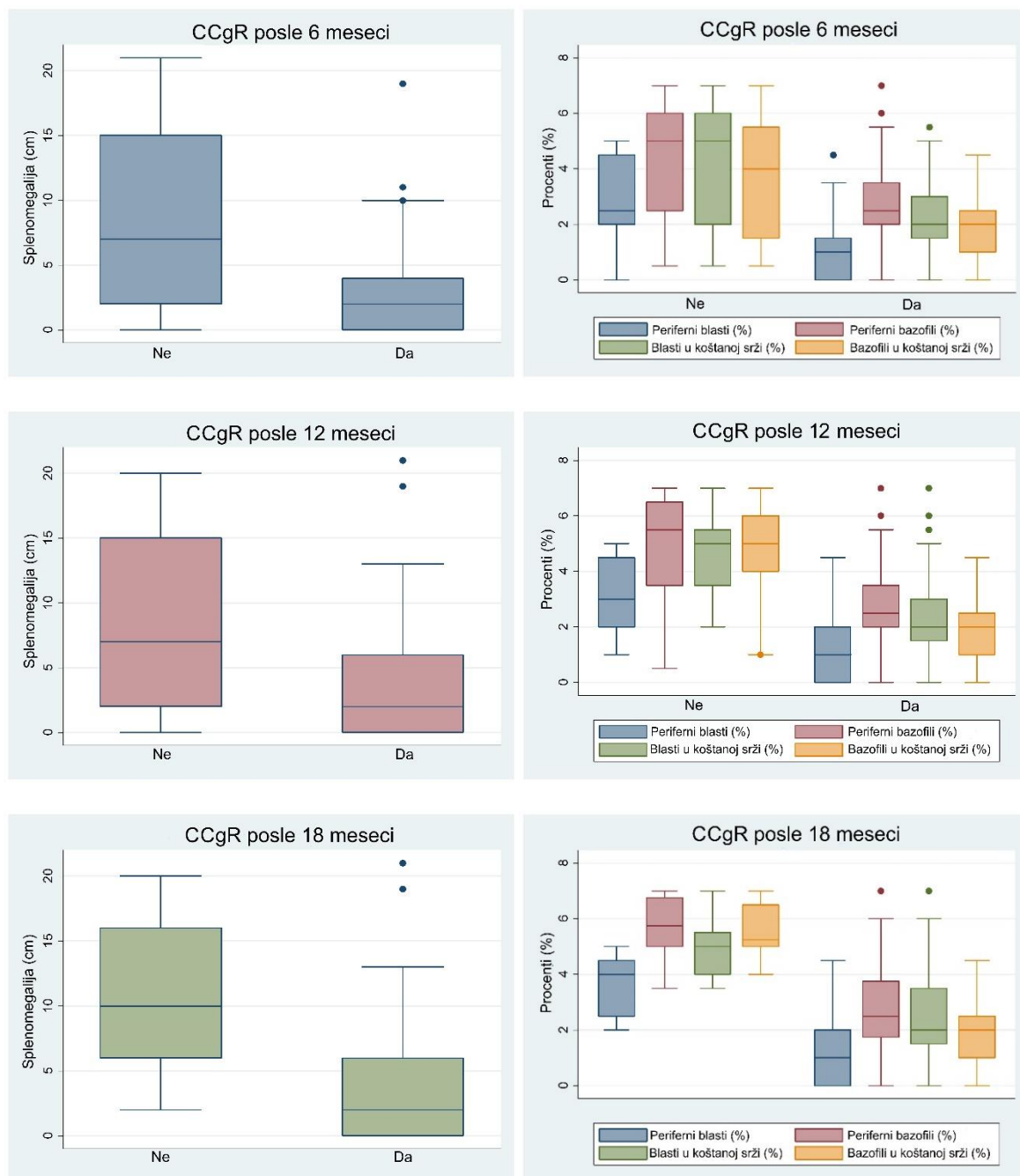
Kako je za postizanje kompletnog citogenetskog odgovora posle 18 meseci terapije bilo pokazano da je rani pokazatelj ishoda, u ovom istraživanju su analizirane bazne karakteristike pacijenata koje su udružene sa postizanjem tog stepena terapijskog odgovora. Tom prilikom su identifikovani sledeći nezavisni prognostički parametri udruženi sa većom mogućnošću postizanja kompletnog citogenetskog odgovora posle 18 meseci od početka lečenja: splenomegalija manja od 5 cm ispod rebarnog luka u nivou MKL, manje od 3% blasta u perifernoj krvi, manje od 4% bazofila u perifernoj krvi, manje od 4% bazofila u koštanoj srži i EUTOS skor rizika ($p<0,01$).

Tabela 17. Kliničke i laboratorijske karakteristike pacijenata u vreme dijagnoze prema kompletnom citogenetskom odgovoru posle 6, 12 i 18 meseci terapije

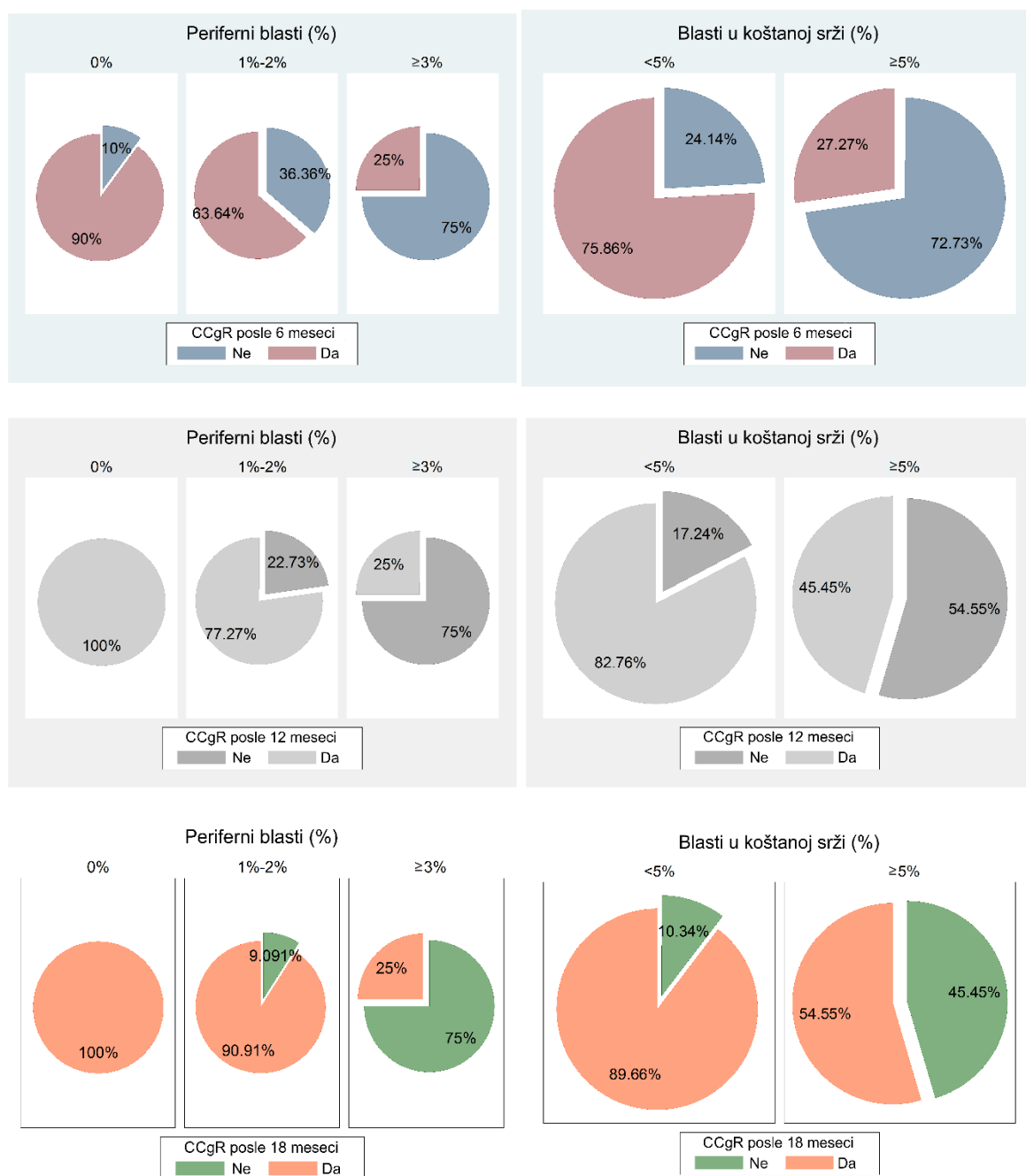
Bazični parametri			Klinički ishod					
			CCgR posle 6 meseci		CCgR posle 12 meseci		CCgR posle 18 meseci	
n			p*		p*		p*	
Pol	ženski	22	12 (54,55%)	0,251	16 (72,73%)	0,623	18 (81,82%)	0,528
	muški	18	13 (72,22%)		13 (72,22%)		14 (77,78%)	
Starost (godine)	<60	24	15 (62,5%)	1,000	16 (66,67%)	0,261	18 (75%)	0,292
	≥60	16	10 (62,5%)		13 (81,25%)		14 (87,5%)	
Splenomegalija (cm)	<5	23	19 (82,61%)	0,003	20 (86,96%)	0,021	22 (95,65%)	0,006
	≥5	17	6 (35,29%)		9 (52,94%)		10 (58,82%)	
Leukociti (×10⁹/L)	<50	10	8 (80%)	0,174	8 (80%)	0,432	8 (80%)	1,000
	≥50	30	17 (56,67%)		21 (70%)		24 (80%)	
Trombociti (×10⁹/L)	<450	24	17 (70,83%)	0,159	18 (75%)	0,467	19 (79,17%)	0,601
	≥450	16	8 (50%)		11 (68,75%)		13 (81,25%)	
Hemoglobin (g/L)	<120	28	16 (57,14%)	0,241	20 (71,43%)	0,570	21 (75%)	0,225
	≥120	12	9 (75%)		9 (75%)		11 (91,67%)	
Blasti u perifernoj krvi (%)	0%	10	9 (90%)	0,021	10 (100%)	0,001	10 (100%)	0,000
	1-2%	22	14 (63,64%)		17 (77,27%)		20 (90,91%)	
	≥3%	8	2 (25%)		2 (25%)		2 (25%)	
Bazofili u perifernoj krvi (%)	<4%	25	19 (76%)	0,026	22 (88%)	0,007	24 (96%)	0,002
	≥4%	15	6 (40%)		7 (46,67%)		8 (53,33%)	
Blasti u koštanoj srži (%)	<5%	29	22 (75,86%)	0,007	24 (82,76%)	0,027	26 (89,66%)	0,025
	≥5%	11	3 (27,27%)		5 (45,45%)		6 (54,55%)	
Bazofili u koštanoj srži (%)	<4%	27	20 (74,07%)	0,034	25 (92,59%)	0,000	27 (100%)	0,000
	≥4%	13	5 (38,46%)		4 (30,77%)		5 (38,46%)	
Sokal skor	nizak	16	13 (81,25%)	0,025	14 (87,50%)	0,047	15 (93,75%)	0,015
	umeren	18	11 (61,11%)		13 (72,22%)		15 (83,33%)	
	visok	6	1 (16,67%)		2 (33,33%)		2 (33,33%)	
Euro skor	nizak	18	15 (83,33%)	0,029	16 (88,89%)	0,077	17 (94,44%)	0,095
	umeren	20	9 (45%)		12 (60%)		14 (70%)	
	visok	2	1 (50%)		1 (50%)		1 (50%)	
EUTOS skor	nizak	34	24 (70,59%)	0,021	27 (79,41%)	0,039	30 (88,24%)	0,010
	visok	6	1 (16,67%)		2 (33,33%)		2 (33,33%)	

Podaci prikazuju broj (n) i procenat (%); * p vrednost za Pearson χ^2 ili Fišerov test

Na ovaj stepen citogenetskog odgovora utiče manje od 5% blasta u koštanoj srži i nizak Sokal skor rizika ali sa nižim stepenom statističke značajnosti ($p < 0,05$). Distribucija vrednosti statistički najznačajnijih bazičnih kliničkih i laboratorijskih parametara koji utiču na postizanje kompletnog citogenetskog odgovora posle 6, 12 i 18 meseci terapije prikazana je na grafikonima 5, 6 i 7.

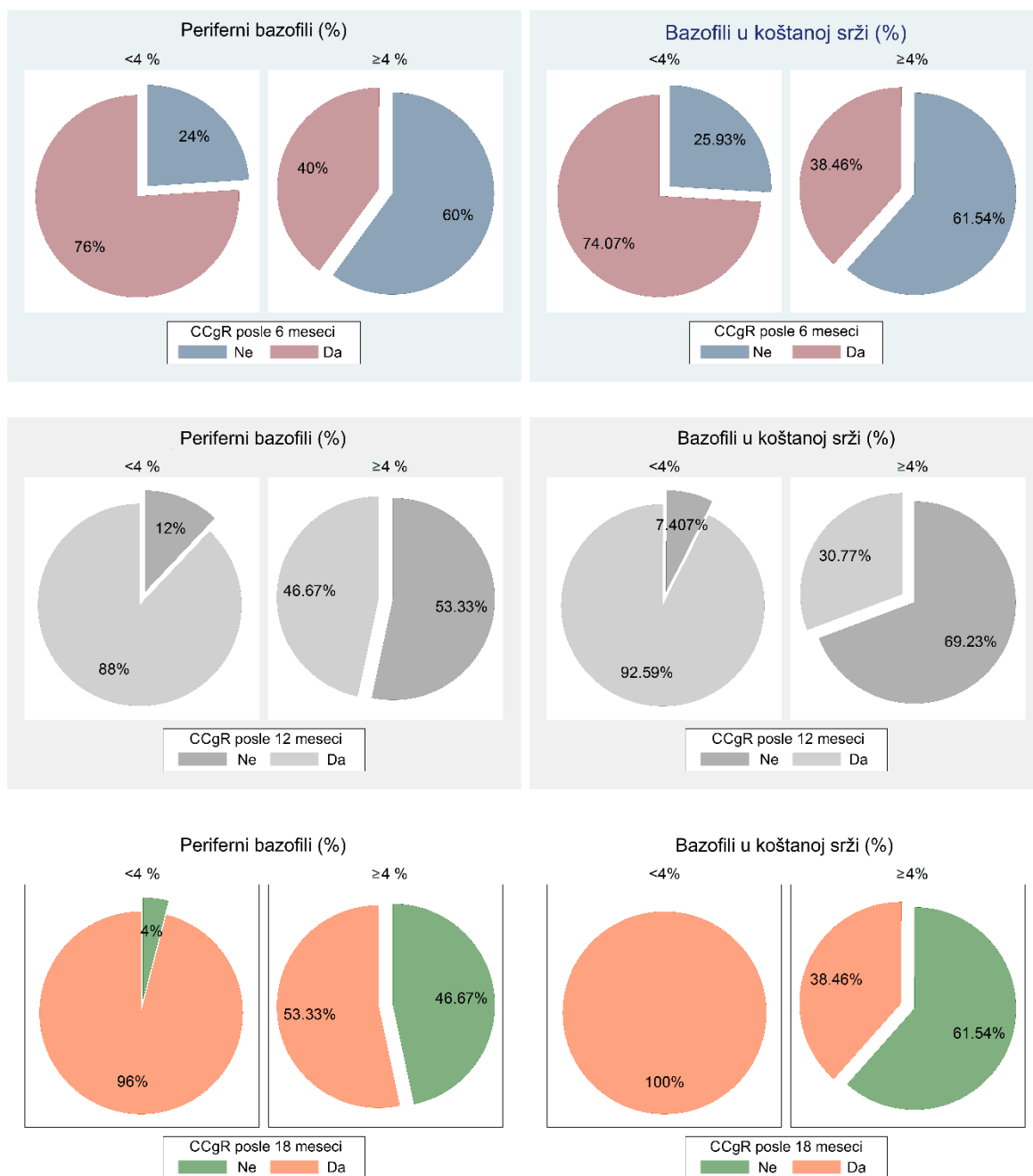


Grafikon 5. Vrednosti bazičnih laboratorijskih parametara i splenomegalije u odnosu na postizanje kompletnog citogenetskog odgovora u različitim vremenskim intervalima



Grafikon 6. Distribucija pacijenata sa i bez kompletnog citogenetskog odgovora u odnosu na bazični procenat blasta u različitim vremenskim intervalima

Sa visokim stepenom značajnosti utvrđeno je da pacijenti koji su imali splenomegaliju manju od 5 cm ispod rebarnog luka u nivou MKL su u 82,61% postigli kompletan citogenetski odgovor posle 6 meseci terapije, nasuprot pacijentima sa splenomegalijom većom od 5cm koji su ovaj nivo odgovora postigli u svega 35,29%. Sa istim stepenom značajnosti utvrđeno je da grupa pacijenata sa manje od 5% blasta u koštanoj srži u 75,86% slučajeva postigla kompletan citogenetski odgovor posle 6 meseci, a grupa sa višim procentom blasta u koštanoj srži u 27,27%.



Grafikon 7. Distribucija pacijenata sa i bez kompletnog citogenetskog odgovora u odnosu na bazični procenat bazofila u različitim vremenskim intervalima

Svi pacijenti kod kojih nisu bili prisutni blasti u perifernoj krvi postigli su kompletan citogenetski odgovor posle 12 meseci terapije. Pored toga pacijenti koji su imali manje od 4% perifernih bazofila su u 88% slučajeva postigli kompletan citogenetski odgovor posle 12 meseci terapije, dok je 46,67% pacijenata sa više od 4% bazofila u perifernoj krvi postiglo ovaj nivo odgovora. Grupa ispitanika sa manje od 4% bazofila u koštanoj srži postigla je 92,59% slučajeva isti nivo odgovora posle 12 meseci terapije, nasuprot 30,77% ispitanika sa više od 4% bazofila u koštanoj srži.

Ispitivanjem bazičnih parametara koji utiču na postizanje kompletnog citogenetskog odgovora posle 18 meseci terapije utvrđeno je da su svi pacijenti bez prisutnih blasta u perifernoj krvi i sa manje od 4% bazofila u koštanoj srži postigli ovaj stepen odgovora u analiziranom periodu. Grupa pacijenata sa manje od 4% perifernih bazofila u 96% je postigla kompletan citogenetski odgovor posle 18 meseci terapije, a grupa sa više od 4% bazofila u perifernoj krvi je taj nivo odgovor postigla u 53,33% slučajeva. Ispitanici sa splenomegalijom manjom od 5 cm ispod rebarnog luka u nivou MKL su 95,65% postigli kompletan citogenetski odgovor u analiziranom periodu, nasuprot onima sa splenomegalijom većom od 5 cm koji su ovaj nivo odgovora posle 18 meseci imali u 58,82% slučajeva. Konačno pacijenti sa niskim EUTOS skorom rizika su 88,24% postigli kompletan citogenetski odgovor posle 18 meseci terapije.

5.10. Prognostički angiogenezni faktori koji utiču na postizanje kompletnog citogenetskog odgovora u različitim vremenskim intervalima

U ovom istraživanju ispitivan je prognostički značaj morfometrijskih varijabli u hroničnoj mijeloidnoj leukemiji u odnosu na kompletan citogenetski odgovor posle 6, 12 i 18 meseci terapije. U tabeli 18 prikazani su prognostički angiogenezni parametri koji utiču na postizanje kompletnog citogenetskog odgovora u različitim vremenskim intervalima.

U radu su analizirani parametri angiogeneze u vreme postavljanja dijagnoze udruženi sa postizanjem kompletnog citogenetskog odgovora posle 6 meseci terapije. Morfometrijske karakteristike udružene sa većom mogućnošću postizanja kompletnog citogenetskog odgovora u ovom vremenskom intervalu uključivale su: površinu krvnoga suda manju od $350 \mu\text{m}^2$, cirkularnost manju od 0,5 kao i zaobljenost krvnoga suda manju od 0,35 ($p < 0,01$). Sa manjim stepenom značajnosti statistička analiza izdvojila je i malu dužinu ose krvnoga suda manju od $10 \mu\text{m}$, kao i odnos oblika veći od 3,5 kao morfometrijske parametre koji dovode do postizanja kompletnog citogenetskog odgovora u ispitivanom vremenskom intervalu ($p < 0,05$).

Ispitivani su i morfometrijski prediktivni faktori za postizanje kompletnog citogenetskog odgovora posle 12 meseci terapije. Univarijantna analiza je identifikovala sledeće veličina i oblik zavisne morfometrijske parametre: veliku dužinu ose manju od $35 \mu\text{m}$, malu dužinu ose manju od $10 \mu\text{m}$, površinu manju od $350 \mu\text{m}^2$, obim manji od $85 \mu\text{m}$, cirkularnost manju od 0,5, odnos oblika veći od 3,5 i zaobljenost krvnoga suda manju od 0,35, kao faktore značajno udružene sa postizanjem ovog stepena odgovora posle 12 meseci terapije ($p < 0,01$).

Analiza prognostičkog značaja morfometrijskih varijabli za postizanje kompletnog citogenetskog odgovora posle 18 meseci terapije izdvojila je: površinu manju od $350 \mu\text{m}^2$, cirkularnost manju od 0,5, odnos oblika veći od 3,5 i zaobljenost krvnoga suda manju od

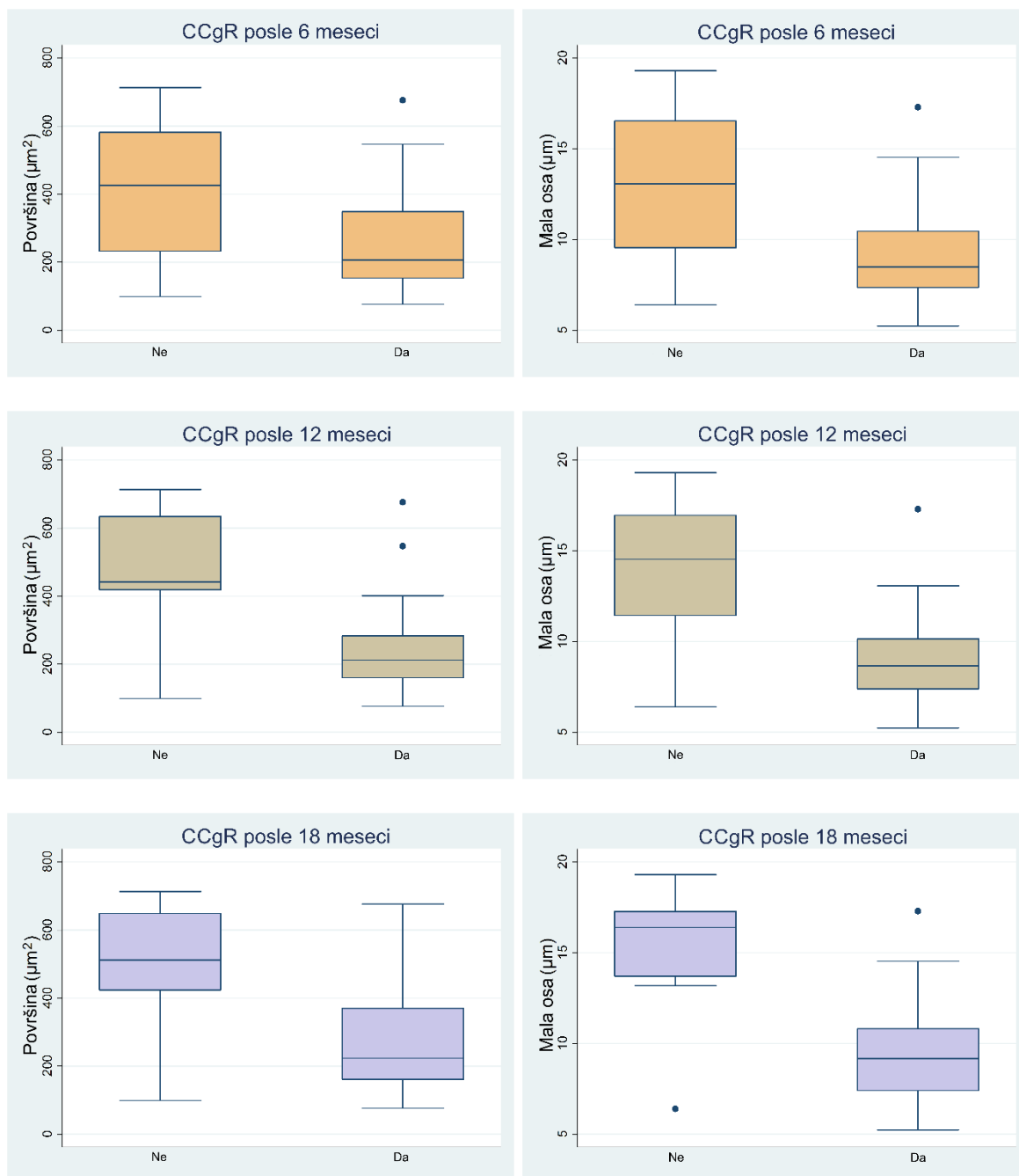
0,35 ($p < 0,01$), ali i veliku dužinu ose manju od 35 μm , malu dužinu ose manju od 10 μm i obim manji od 85 μm ($p < 0,05$), kao faktore značajno udružene sa postizanjem ovog stepena odgovora posle 18 meseci terapije.

Tabela 18. Morfometrijski parametri angiogeneze u vreme dijagnoze prema kompletnom citogenetskom odgovoru posle 6, 12 i 18 meseci terapije

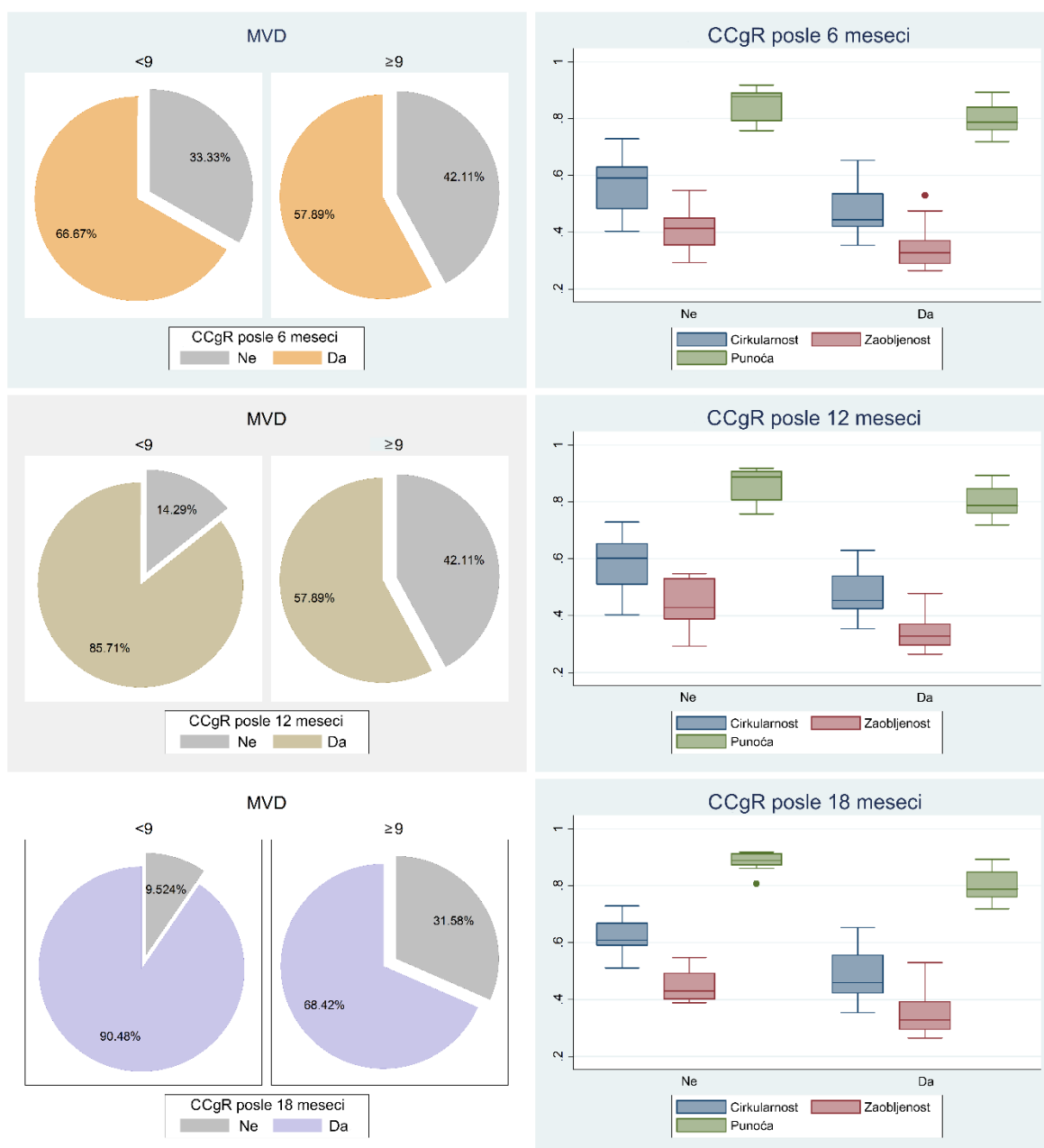
Morfometrijski parametri	n	Klinički ishod					
		CCgR posle 6 meseci		CCgR posle 12 meseci		CCgR posle 18 meseci	
		n (%)	P*	n (%)	P*	n (%)	P*
Mikrovaskularna gustina (n/HPF)							
<9	21	14 (66,67%)	0,403	18 (85,71%)	0,053	19 (90,48%)	0,089
≥9	19	11 (57,89%)		11 (57,89%)		13 (68,42%)	
Velika dužina ose (μm)							
<35	23	17 (73,91%)	0,080	21 (91,30%)	0,003	21 (91,30%)	0,047
≥35	17	8 (47,06%)		8 (47,06%)		11 (64,71%)	
Mala dužina ose (μm)							
<10	21	17 (80,95%)	0,013	20 (95,24%)	0,001	20 (95,24%)	0,015
≥10	19	8 (42,11%)		9 (47,37%)		12 (63,16%)	
Površina (μm^2)							
<350	24	19 (79,17%)	0,010	23 (95,83%)	0,000	23 (95,83%)	0,004
≥350	16	6 (37,5%)		6 (37,5%)		9 (56,25%)	
Obim (μm)							
<85	20	15 (75%)	0,095	19 (95%)	0,002	19 (95%)	0,022
≥85	20	10 (50%)		10 (50%)		13 (65%)	
Slučajni prečnik (μm)							
<40	27	19 (70,37%)	0,138	22 (81,48%)	0,075	23 (85,19%)	0,221
≥40	13	6 (46,15%)		7 (58,85%)		9 (69,23%)	
Cirkularnost							
<0,5	22	18 (81,82%)	0,007	20 (90,91%)	0,005	22 (100%)	0,001
≥0,5	18	7 (38,89%)		9 (50%)		10 (55,56%)	
Odnos oblika							
<3,5	18	8 (44,44%)	0,033	9 (50%)	0,005	10 (55,56%)	0,001
≥3,5	22	17 (77,27%)		20 (90,91%)		22 (100%)	
Zaobljenost							
<0,35	19	16 (84,21%)	0,008	18 (94,74%)	0,003	19 (100%)	0,003
≥0,35	21	9 (42,86%)		11 (52,38%)		13 (61,90%)	
Punoća							
<0,77	11	9 (81,82%)	0,116	10 (90,91%)	0,110	11 (100%)	0,056
≥0,77	29	16 (55,17%)		19 (65,52%)		21 (72,41%)	

* p vrednost za Pearson χ^2 ili Fišerov test. Podaci prikazuju broj (n) i procenat (%).

Distribucija statistički najznačajnijih bazičnih morfometrijskih parametara koji utiču na postizanje kompletnog citogenetskog odgovora posle 6, 12 i 18 meseci terapije prikazana je na grafikonima 8 i 9.



Grafikon 8. Vrednosti bazičnih parametra površine i dužine male ose u odnosu na postizanje kompletnog citogenetskog odgovora u različitim vremenskim intervalima



Grafikon 9. Vrednosti bazičnih parametra mikrovaskularne gustine i faktora oblika u odnosu na postizanje kompletnog citogenetskog odgovora u različitim vremenskim intervalima

Grupa pacijenata koja je u vreme postavljanja dijagnoze imala površinu krvnoga suda manju od $350 \mu\text{m}^2$ u 79,17% slučajeva je postigla kompletan citogenetski odgovor posle 6 meseci terapije, nasuprot grupi sa površinom većom od $350 \mu\text{m}^2$ gde je ta stopa iznosila 37,5%. Pacijenti sa vrednostima cirkularnosti manjim od 0,5 su u 81,82% postigli kompletan citogenetski odgovor u analiziranom periodu, dok su pacijenti sa višim vrednostima cirkularnosti u 38,89% slučajeva postigli ovaj stepen odgovora posle 6 meseci terapije. Slični rezultati dobijeni su analizom zaobljenosti krvnoga suda, pacijenti sa vrednostima manjim od 0,35 su u 84,12% slučajeva dostigli kompletan citogenetski odgovor posle 6 meseci, a oni sa višim vrednostima zaobljenosti krvnoga suda u 42,86%.

Ispitivanjem morfometrijskih parametara koji utiču na postizanje potpunog citogenetskog odgovora posle 12 meseci terapije utvrđeno je da pacijenti koji su inicijalno imali veliku dužinu ose manju od 35 μm , malu dužinu ose manju od 10 μm , površinu manju od 350 μm^2 i obim manji od 85 μm su imali visoku verovatnoću postizanja potpunog citogenetskog odgovora u analiziranom periodu od 91,30%, 95,24%, 95,83% i 95%. Istovremeno pacijenti koji su imali više vrednosti ovih parametara su u značajno nižem procentu postigli ovaj stepen odgovora posle 12 meseci terapije u 47,06%, 47,37%, 37,5% i 50% slučajeva.

Što se tiče postizanja potpunog citogenetskog odgovora posle 18 meseci lečenja svi pacijenti koji su pri dijagnozi imali cirkularnost manju od 0,5, odnos oblika veći od 3,5 i zaobljenost krvnoga suda manju od 0,35 su postigli ovaj nivo odgovora. Pacijenti koji su imali površinu krvnoga suda manju od 350 μm^2 u 95,83% postigli su kompletnu citogenetsku remisiju posle 18 meseci lečenja, a ispitanici koji su imali više vrednosti površine krvnoga suda su ovaj stepen odgovora postigli u 56,25%. Ispitanici sa vrednostima velike dužine ose manjim od 35 μm postigli su ovaj nivo odgovora posle 18 meseci terapije u 91,30%, nasuprot onima sa višim vrednostima velike dužine ose kod kojih je stopa tog odgovora iznosila 64,71%.

5.11. Značaj morfometrijskih parametara za predviđanje potpunog citogenetskog odgovora u različitim vremenskim intervalima

U cilju predviđanja postizanja potpunog citogenetskog odgovora posle 6, 12 i 18 meseci terapije primenjeni su modeli logističke regresije. U modelima je korišćen najnoviji prognostički scoring sistem, EUTOS skor, koji obuhvata stepen splenomegalije i procenat bazofila u perifernoj krvi i koji je razvijen na pacijentima koji su lečeni imatinib mesilatom. U cilju poboljšanja prediktivne moći u modele logističke regresije dodati su morfometrijski parametri angiogeneze u trenutku postavljanja dijagnoze. Analiza je izvršena posebno za svaki vremenski interval i prikazani su pojedinačni modeli logističke regresije u kojima je pored EUTOS skora dodavan još po jedan morfometrijski parametar angiogeneze, prema stepenu statističke značajnosti i kliničkom iskustvu. Zatim je urađeno poređenje dobijenih prediktivnih modela za predikciju potpunog citogenetskog odgovora u različitim vremenskim intervalima i rezultati su prikazani tabelarno, pojedinačno i zbirno. Prikazano je poređenje ROK kriva svih analiziranih modela logističke regresije za predviđanje postizanja potpunog citogenetskog odgovora u analiziranim vremenskim intervalima.

Tabela 19 i tabela 20 prikazuju višestruke LR modele razvijene na ispitivanoj grupi pacijenata sa ciljem predviđanja potpunog citogenetskog odgovora posle 6 meseci terapije.

Tabela 19. Predviđanje kompletnog citogenetskog odgovora posle 6 meseci terapije upotrebom različitih LR skorova u vreme dijagnoze

MODEL 0 (Ishod CCgR 6m)

Varijabla	Koef.	SG	OŠ	(95 % IP)	z	p
EUTOS skor	-0,039	0,014	0,677*	(0,511; 0,897)*	-2,72	0,007
_konstanta	2,206	0,723	/	/	3,05	0,002

Logaritamska verodostojnost = -21.503

Koef. = Procenjeni koeficijenti za logistički regresioni model; SG = Procenjena standardna greška procenjenih koeficijenata; OŠ = Procenjeni odnos šansi ; 95% IP = 95% interval poverenja za odnos šansi. z = Wald test; * OŠ za povećanje 10 jedinica EUTOS skora.

MODEL 1 (Ishod CCgR 6m)

Varijabla	Koef.	SG	OŠ	(95 % IP)	z	p
EUTOS skor	-0,039	0,014	0,679*	(0,512; 0,899)*	-2,70	0,007
Mikrovaskularna gustina	-0,054	0,119	0,947	(0,75; 1,197)	-0,45	0,650
_konstanta	2,675	1,290	/	/	2,07	0,038

Logaritamska verodostojnost = -21.4

Koef. = Procenjeni koeficijenti za logistički regresioni model; SG = Procenjena standardna greška procenjenih koeficijenata; OŠ = Procenjeni odnos šansi; 95% IP = 95% interval poverenja za odnos šansi. z = Wald test; * OŠ za povećanje 10 jedinica EUTOS skora.

MODEL 2 (Ishod CCgR 6m)

Varijabla	Koef.	SG	OŠ	(95 % IP)	z	p
EUTOS skor	-0,033	0,017	0,719*	(0,518; 0,998)*	-1,97	0,048
Mala dužina ose (μm)	-0,282	0,135	0,754	(0,578; 0,984)	-2,08	0,037
_konstanta	4,900	1,656	/	/	2,96	0,003

Logaritamska verodostojnost = -18.936

Koef. = Procenjeni koeficijenti za logistički regresioni model; SG = Procenjena standardna greška procenjenih koeficijenata; OŠ = Procenjeni odnos šansi ; 95% IP = 95% interval poverenja za odnos šansi. z = Wald test; * OŠ za povećanje 10 jedinica EUTOS skora.

MODEL 3 (Ishod CCgR 6m)

Varijabla	Koef.	SG	OŠ	(95 % IP)	z	p
EUTOS skor	-0,035	0,016	0,703*	(0,512; 0,965)*	-2,15	0,029
Površina (μm ²)	-0,005	0,002	0,632 [#]	(0,388; 1,029) [#]	-1,84	0,065
_konstanta	3,476	1,121	/	/	3,10	0,002

Logaritamska verodostojnost = -19.616

Koef. = Procenjeni koeficijenti za logistički regresioni model; SG = Procenjena standardna greška procenjenih koeficijenata; OŠ = Procenjeni odnos šansi ; 95% IP = 95% interval poverenja za odnos šansi. z = Wald test; * OŠ za povećanje 10 jedinica EUTOS skora. [#] OŠ za povećanje 100 jedinica površine.

MODEL 4 (Ishod CCgR 6m)

Varijabla	Koef.	SG	OŠ	(95 % IP)	z	p
EUTOS skor	-0,032	0,016	0,726*	(0,532; 0,990)*	-2,02	0,043
Cirkularnost	-9,924	4,767	0,371 ^{\$}	(0,146; 0,944) ^{\$}	-2,08	0,037
_konstanta	7,053	2,600	/	/	2,71	0,007

Logaritamska verodostojnost = -19.132

Koef. = Procenjeni koeficijenti za logistički regresioni model; SG = Procenjena standardna greška procenjenih koeficijenata; OŠ = Procenjeni odnos šansi ; 95% IP = 95% interval poverenja za odnos šansi. z = Wald test; * OŠ za povećanje 10 jedinica EUTOS skora. ^{\$} OŠ za povećanje 0,1 jedinica cirkularnosti.

Tabela 20. Poređenje prediktivnih modela za predviđanje kompletnog citogenetskog odgovora posle 6 meseci terapije

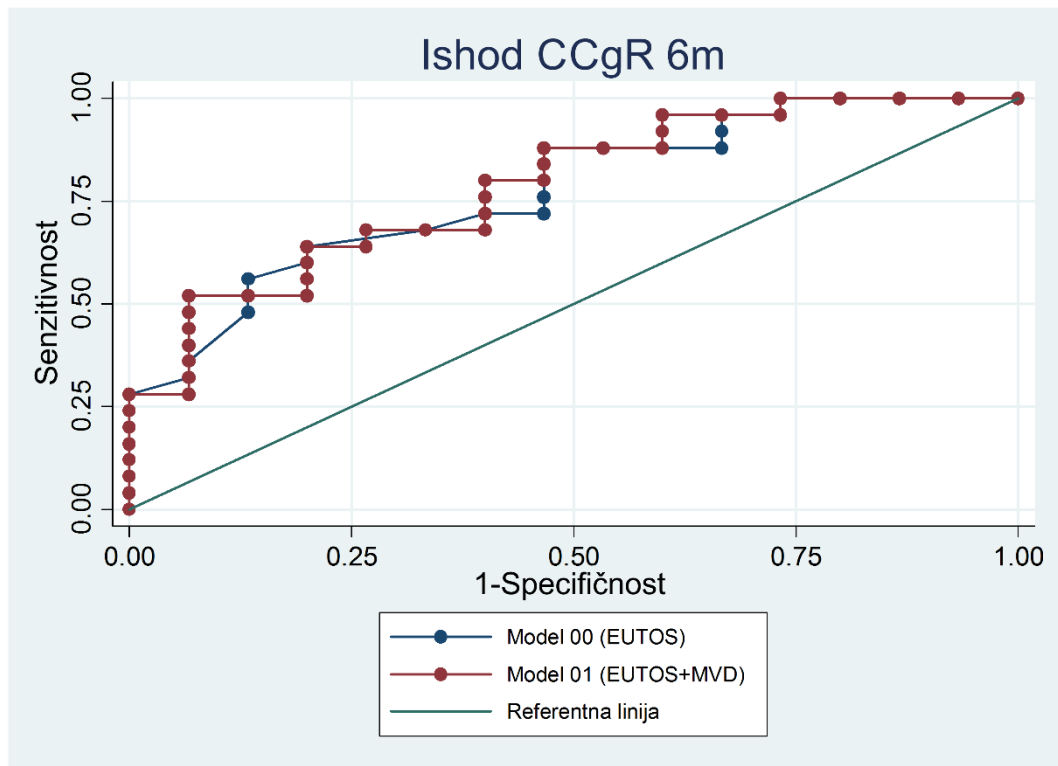
Predikcioni model za kompletan CgR posle 6 meseci terapije		LR test		Sn.	Sp.	PPV	NPV	Ukupno korektno klasifikovani	PIK	P vrednost za Hosmer Lemeshow stepen kalibracije modela
Oznaka Modela	Varijabla	χ^2 (s.s.1)	p							
Model 0	EUTOS skor	-	-	88%	53,33%	75,86%	72,73%	75%	0,776	0,4919
Model 1	EUTOS skor + Mikrovaskularna gustina	0,21	0,650	88%	53,33%	75,86%	72,73%	75%	0,787	0,8225
Model 2	EUTOS skor + Mala dužina ose	5,13	0,024	88%	53,33%	75,86%	72,73%	75%	0,829	0,8685
Model 3	EUTOS skor + Površina	3,77	0,052	88%	46,67%	73,33%	70%	72,5%	0,824	0,9739
Model 4	EUTOS skor + Cirkularnost	4,74	0,029	84%	60%	77,78%	69,23%	75%	0,824	0,1283

LR test-Test odnosa verodostojnosti za poređenje sa standardnim modelom (Model 0); χ^2 - Hi kvadrat test; s.s.- Stepen slobode; Sn - Senzitivnost, Sp - Specifičnost, PPV - Pozitivna prediktivna vrednost, NPV - Negativna prediktivna vrednost; PIK - Površina ispod ROK krive.

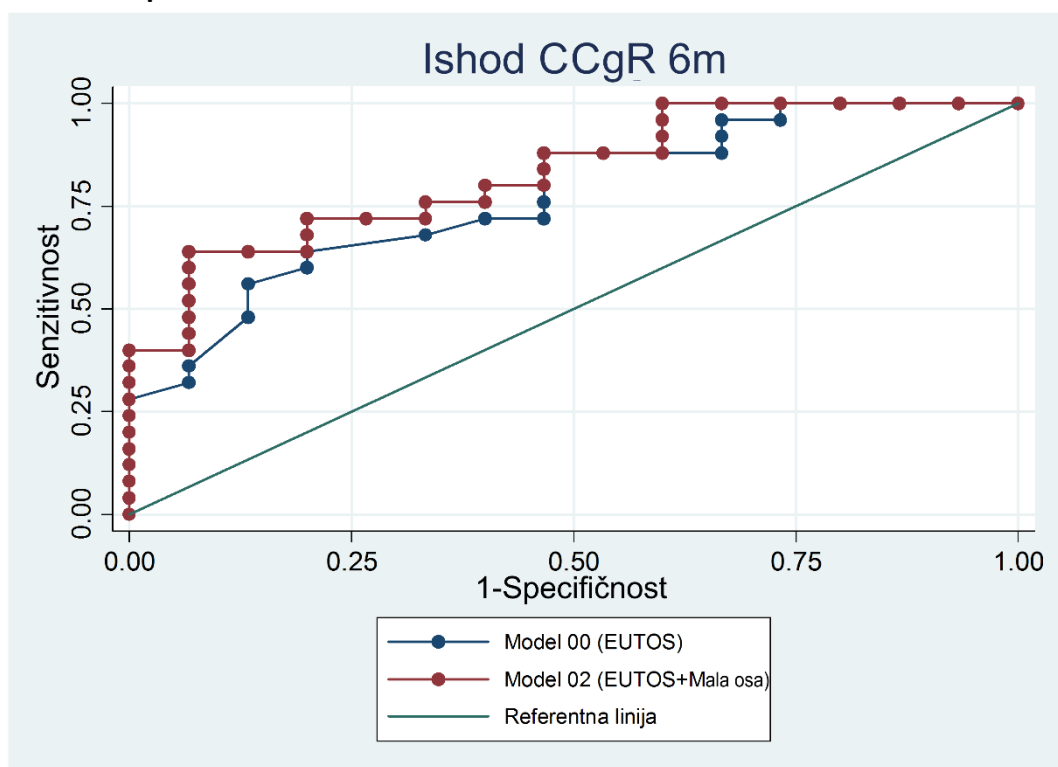
Na celokupnom uzorku, za tačku preseka od 0,5, Model 0 je zasnovan samo na EUTOS skoru, Model 1 koji se bazira na EUTOS skoru i mikrovaskularnoj gustini, kao i Model 2 koji se zasniva na EUTOS skoru i maloj dužini ose krvnoga suda su korektno klasifikovali 75% pacijenta u odnosu na posmatrani ishod, odnosno postizanje kompletnog citogenetskog odgovora posle 6 meseci terapije, sa pozitivnom prediktivnom vrednošću od 75,86% i negativnom prediktivnom vrednošću od 72,73%. Površina ispod ROK krive za Model 1 i Model 2 iznosi 0,787 i 0,829, što pokazuje superiornost modela sa morfometrijskim parametrima u odnosu na model koji koristi samo EUTOS skor.

Za razliku od prethodnih modela, Model 3 koji se bazira na EUTOS skoru i površini krvnoga suda imao je najniži procenat korektno klasifikovanih pacijenata od 72,5% u odnosu na postizanje kompletnog citogenetskog odgovora u analiziranom vremenskom periodu sa pozitivnom prediktivnom vrednošću od 73,33% i negativnom prediktivnom vrednošću od 70%. I konačno Model 4 koji se zasniva na EUTOS skoru i cirkularnosti je korektno klasifikovao klinički ishod u smislu postizanja kompletnog citogenetskog odgovora posle 6 meseci u 75% slučajeva, sa pozitivnom prediktivnom vrednošću od 77,78% i negativnom prediktivnom vrednošću od 69,23%. Površina ispod ROK krive za Model 3 i Model 4 iznosi 0,824 po modelu, što pokazuje da modeli kojima su pridodati morfometrijski parametri imaju bolju predikciju u odnosu na model koji koristi samo EUTOS skor. Na grafikonu 10 data je komparacija ROK kriva analiziranih modela za predikciju postizanja kompletnog citogenetskog odgovora posle 6 meseci terapije.

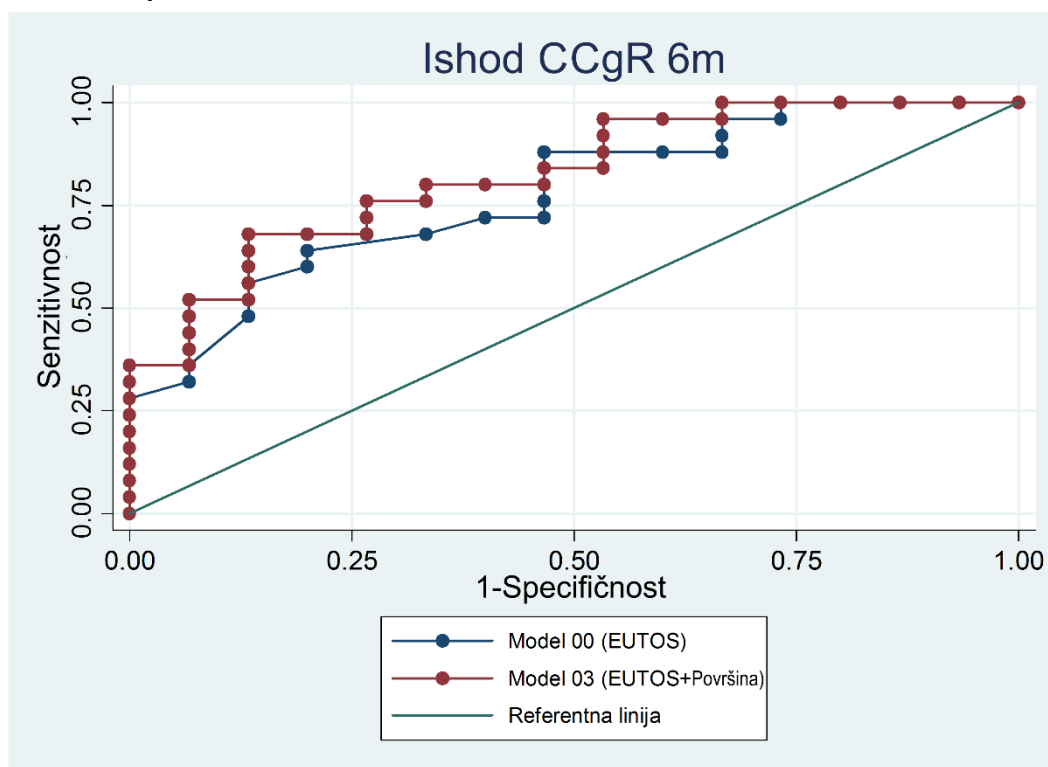
A. Model 1 protiv EUTOS skora



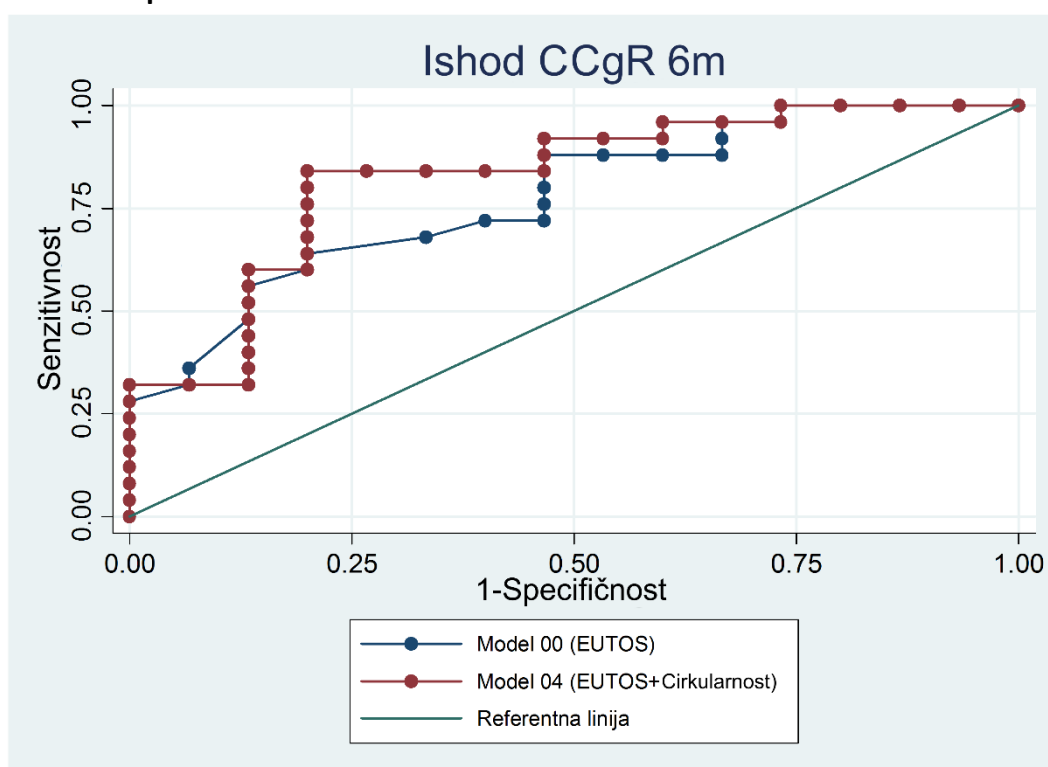
B. Model 2 protiv EUTOS skora



C. Model 3 protiv EUTOS skora



D. Model 4 protiv EUTOS skora



Grafikon 10. Poređenje ROK kriva modela za predviđanje kompletnog citogenetskog odgovora posle 6 meseci terapije A. Model 1, B. Model 2, C. Model 3, D. Model 4

Tabela 21 i tabela 22 prikazuju višestruke LR modele razvijene na ispitivanoj grupi pacijenata sa ciljem predviđanja kompletnog citogenetskog odgovora posle 12 meseci terapije.

Tabela 21. Predviđanje kompletnog citogenetskog odgovora posle 12 meseci terapije upotrebom različitih LR skorova u vreme dijagnoze

MODEL 0 (Ishod CCgR 12m)

Varijabla	Koef.	SG	OŠ	(95 % IP)	z	p
EUTOS skor	-0,035	0,014	0,704*	(0,538; 0,920)*	-2,57	0,010
_konstanta	2,62	0,792	/	/	3,31	0,001

Logaritamska verodostojnost = -19.49

Koef. = Procenjeni koeficijenti za logistički regresioni model; SG = Procenjena standardna greška procenjenih koeficijenata; OŠ = Procenjeni odnos šansi ; 95% IP = 95% interval poverenja za odnos šansi. z = Wald test; * OŠ za povećanje 10 jedinica EUTOS skora.

MODEL 1 (Ishod CCgR 12m)

Varijabla	Koef.	SG	OŠ	(95 % IP)	z	p
EUTOS skor	-0,041	0,016	0,662*	(0,423; 0,908)*	-2,56	0,010
Mikrovaskularna gustina	-0,392	0,170	0,675	(0,484; 0,943)	-2,31	0,021
_konstanta	6,678	2,178	/	/	3,07	0,002

Logaritamska verodostojnost = -15.94

Koef. = Procenjeni koeficijenti za logistički regresioni model; SG = Procenjena standardna greška procenjenih koeficijenata; OŠ = Procenjeni odnos šansi ; 95% IP = 95% interval poverenja za odnos šansi. z = Wald test; * OŠ za povećanje 10 jedinica EUTOS skora.

MODEL 2 (Ishod CCgR 12m)

Varijabla	Koef.	SG	OŠ	(95 % IP)	z	p
EUTOS skor	-0,023	0,019	0,792*	(0,547; 1,147)*	-1,23	0,218
Mala dužina ose (μm)	-0,474	0,172	0,622	(0,444; 0,872)	-2,76	0,006
_konstanta	7,356	2,230	/	/	3,30	0,001

Logaritamska verodostojnost = -13.743

Koef. = Procenjeni koeficijenti za logistički regresioni model; SG = Procenjena standardna greška procenjenih koeficijenata; OŠ = Procenjeni odnos šansi ; 95% IP = 95% interval poverenja za odnos šansi. z = Wald test; * OŠ za povećanje 10 jedinica EUTOS skora.

MODEL 3 (Ishod CCgR 12m)

Varijabla	Koef.	SG	OŠ	(95 % IP)	z	p
EUTOS skor	-0,027	0,017	0,762*	(0,544; 1,067)*	-1,58	0,144
Površina (μm^2)	-0,008	0,003	0,432#	(0,232; 0,803)#	-2,65	0,008
_konstanta	5,145	1,495	/	/	3,44	0,001

Logaritamska verodostojnost = -14.55

Koef. = Procenjeni koeficijenti za logistički regresioni model; SG = Procenjena standardna greška procenjenih koeficijenata; OŠ = Procenjeni odnos šansi ; 95% IP = 95% interval poverenja za odnos šansi. z = Wald test; * OŠ za povećanje 10 jedinica EUTOS skora. # OŠ za povećanje 100 jedinica površine.

MODEL 4 (Ishod CCgR 12m)

Varijabla	Koef.	SG	OŠ	(95 % IP)	z	p
EUTOS skor	-0,026	0,016	0,773*	(0,562; 1,063)*	-1,58	0,113
Cirkularnost	-12,712	5,521	0,281\$	(0,095; 0,828)\$	-2,30	0,021
_konstanta	8,961	3,134	/	/	2,86	0,004

Logaritamska verodostojnost = -16.29

Koef. = Procenjeni koeficijenti za logistički regresioni model; SG = Procenjena standardna greška procenjenih koeficijenata; OŠ = Procenjeni odnos šansi ; 95% IP = 95% interval poverenja za odnos šansi. z = Wald test; * OŠ za povećanje 10 jedinica EUTOS skora. \$ OŠ za povećanje 0,1 jedinica cirkularnosti.

Tabela 22. Poređenje prediktivnih modela za predviđanje kompletnog citogenetskog odgovora posle 12 meseci terapije

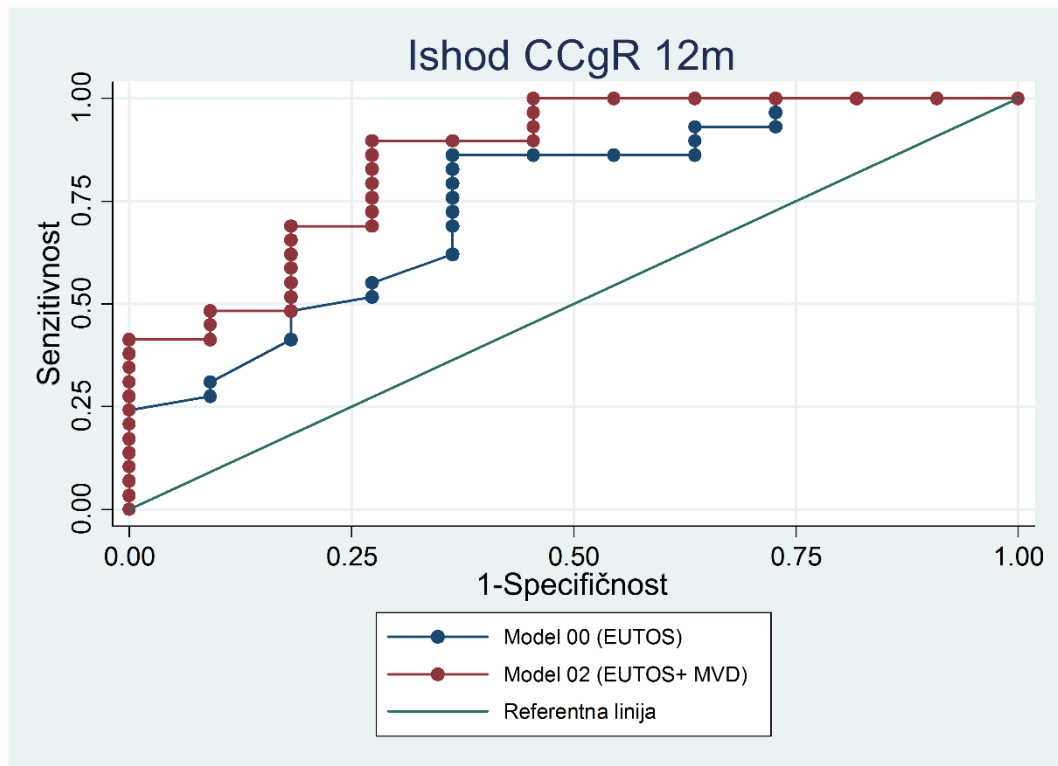
Predikcioni model za kompletan CgR posle 12 meseci terapije		LR test		Sn.	Sp.	PPV	NPV	Ukupno korektno klasifikovani	PIK	P vrednost za Hosmer Lemeshow stepen kalibracije modela
Oznaka Modela	Varijabla	χ^2 (s.s.1)	p							
Model 0	EUTOS skor	-	-	93,1%	36,36%	79,41%	66,67%	77,5%	0,747	0,6489
Model 1	EUTOS skor + Mikrovaskularna gustina	7,1	0,008	89,66%	63,64%	86,67%	70%	82,5%	0,853	0,3168
Model 2	EUTOS skor + Mala dužina ose	11,5	0,001	96,55%	63,64%	87,5%	87,5%	87,5%	0,891	0,7318
Model 3	EUTOS skor + Površina	9,88	0,002	89,66%	54,55%	83,87%	66,67%	80%	0,881	0,3695
Model 4	EUTOS skor + Cirkularnost	6,40	0,011	89,66%	54,55%	83,87%	66,67%	80%	0,837	0,6773

LR test-Test odnosa verodostojnosti za poređenje sa standardnim modelom (Model 0); χ^2 - Hi kvadrat test; s.s.- Stepen slobode; Sn - Senzitivnost, Sp - Specifičnost, PPV - Pozitivna prediktivna vrednost, NPV - Negativna prediktivna vrednost; PIK - Površina ispod ROK krive.

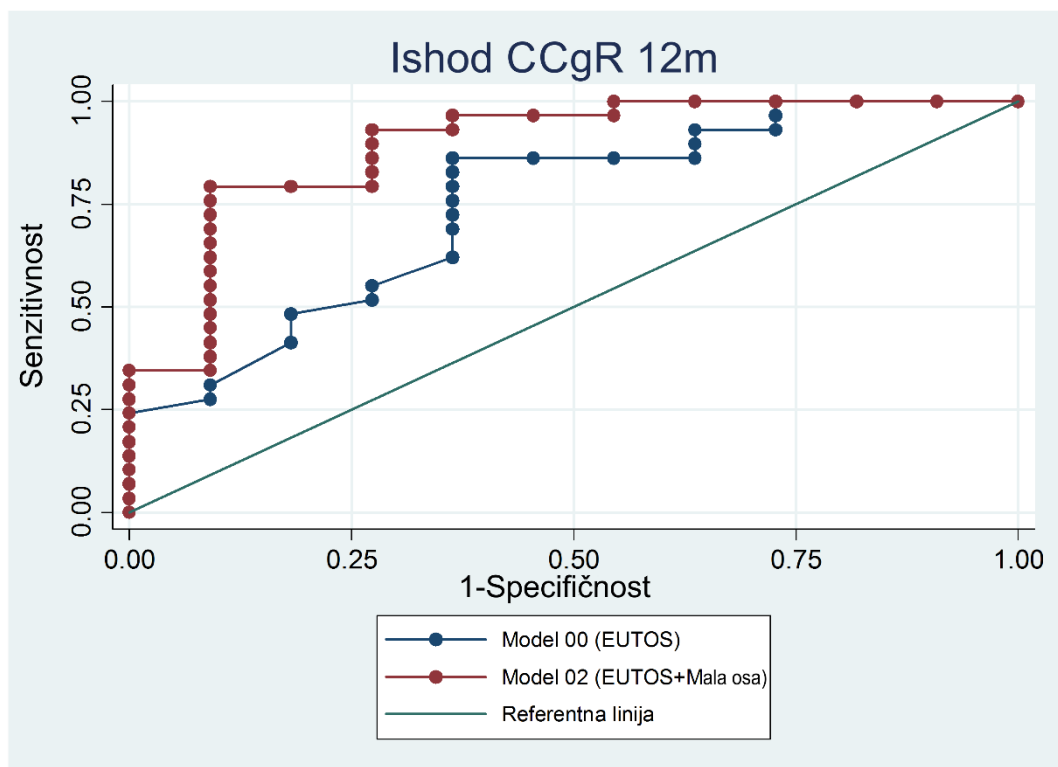
Na celokupnom uzorku, za tačku preseka od 0,5, Model 0 koji je zasnovan samo na EUTOS skoru je korektno klasifikovao 77,5% pacijenata u odnosu na posmatrani ishod, postizanje kompletnog citogenetskog odgovora posle 12 meseci terapije, sa pozitivnom prediktivnom vrednošću od 79,41% i negativnom prediktivnom vrednošću od 66,67%. Model 1 koji se bazira na EUTOS skoru i mikrovaskularnoj gustini je u odnosu na postizanje kompletnog citogenetskog odgovora u analiziranom periodu korektno klasifikovao 82,5% ispitanika sa pozitivnom prediktivnom vrednošću od 86,67% i negativnom prediktivnom vrednošću od 70%. Najviši procenat korektno klasifikovanih pacijenata u odnosu na postizanje kompletnog citogenetskog odgovora posle 12 meseci terapije od 87,5% pokazao je Model 2 koji se zasniva na EUTOS skoru i maloj dužini ose krvnoga suda, sa istim stepenom pozitivne prediktivne vrednosti i negativne prediktivne vrednosti od 87,5%. Površina ispod ROK krive za Model 1 i Model 2 iznosi 0,853 i 0,891, što pokazuje superiornost modela sa morfometrijskim parametrima u odnosu na model koji koristi samo EUTOS skor.

Model 3 koji se zasniva na EUTOS skoru i površini krvnoga suda i Model 4 koji se bazira na EUTOS skoru i cirkularnosti imali su po 80% korektno klasifikovanih pacijenata u smislu postizanja kompletnog citogenetskog odgovora u analiziranom periodu, sa pozitivnom prediktivnom vrednošću od 83,87% i negativnom prediktivnom vrednošću od 66,67%. Površina ispod ROK krive za Model 3 i Model 4 iznosi 0,881 i 0,837, što pokazuje bolju prediktivnu moć modela sa morfometrijskim parametrima u odnosu na model koji koristi samo EUTOS skor. Na grafikonu 11 prikazana je komparacija ROK kriva modela koji predviđaju kompletan citogenetski odgovora posle 12 meseci terapije.

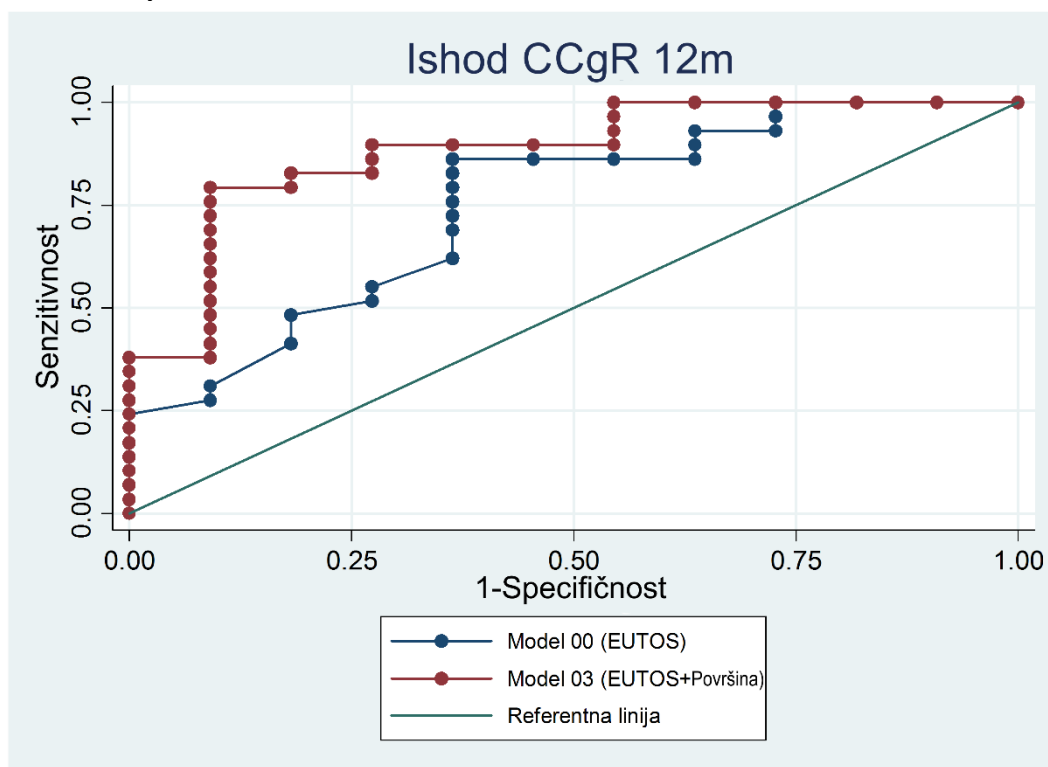
A. Model 1 protiv EUTOS skora



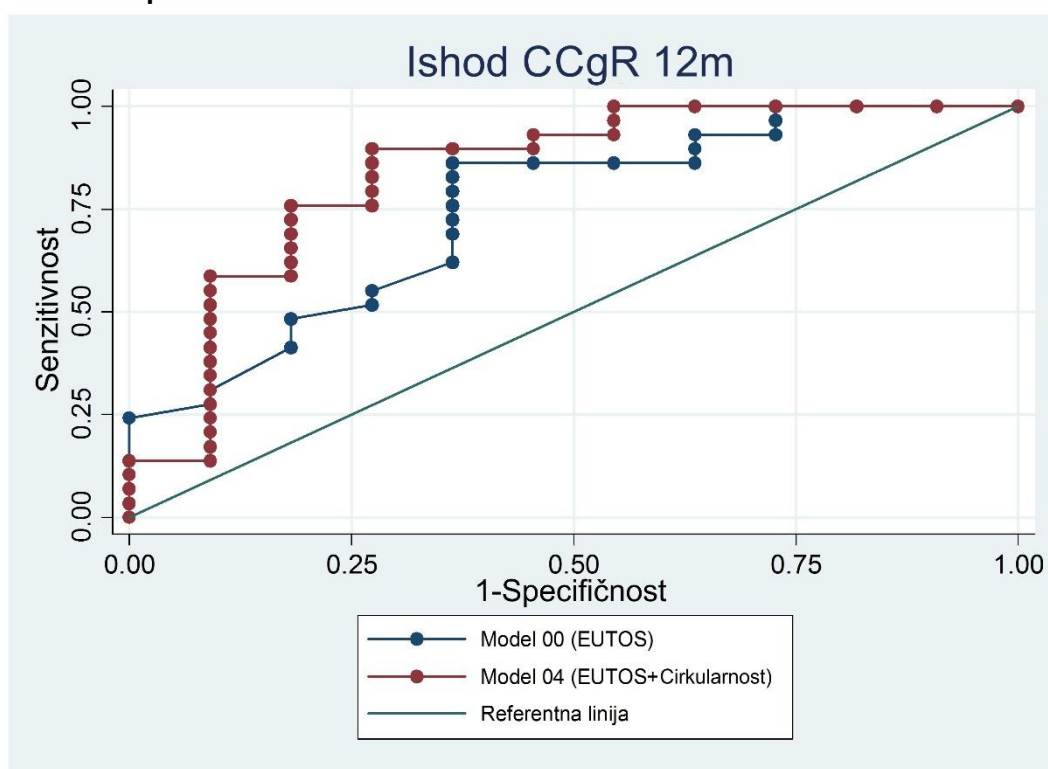
B. Model 2 protiv EUTOS skora



C. Model 3 protiv EUTOS skora



D. Model 4 protiv EUTOS skora



Grafikon 11. Poređenje ROK kriva modela za predviđanje kompletnog citogenetskog odgovora posle 12 meseci terapije A. Model 1, B. Model 2, C. Model 3, D. Model 4

Tabela 23 i tabela 24 prikazuju višestruke LR modele razvijene na ispitivanoj grupi pacijenata sa ciljem predviđanja kompletnog citogenetskog odgovora posle 18 meseci terapije.

Tabela 23. Predviđanje kompletnog citogenetskog odgovora posle 18 meseci terapije upotrebom različitih LR skorova u vreme dijagnoze

MODEL 0 (Ishod CCgR 18m)

Varijabla	Koef.	SG	OŠ	(95 % IP)	z	p
EUTOS skor	-0,055	0,018	0,579*	(0,405; 0,829)*	-2,98	0,003
_konstanta	4,282	1,212	/	/	3,53	0,000

Logaritamska verodostojnost = -13.15

Koef. = Procenjeni koeficijenti za logistički regresioni model; SG = Procenjena standardna greška procenjenih koeficijenata; OŠ = Procenjeni odnos šansi ; 95% IP = 95% interval poverenja za odnos šansi. z = Wald test; * OŠ za povećanje 10 jedinica EUTOS skora.

MODEL 1 (Ishod CCgR 18m)

Varijabla	Koef.	SG	OŠ	(95 % IP)	z	p
EUTOS skor	-0,071	0,026	0,489*	(0,294; 0,811)*	-2,77	0,006
Mikrovaskularna gustina	-0,521	0,242	0,594	(0,369; 0,955)	-2,15	0,032
_konstanta	10,45	3,787	/	/	2,76	0,006

Logaritamska verodostojnost = -9.918

Koef. = Procenjeni koeficijenti za logistički regresioni model; SG = Procenjena standardna greška procenjenih koeficijenata; OŠ = Procenjeni odnos šansi ; 95% IP = 95% interval poverenja za odnos šansi. z = Wald test; * OŠ za povećanje 10 jedinica EUTOS skora.

MODEL 2 (Ishod CCgR 18m)

Varijabla	Koef.	SG	OŠ	(95 % IP)	z	p
EUTOS skor	-0,046	0,022	0,633*	(0,406; 0,987)*	-2,02	0,044
Mala dužina ose (μm)	-0,439	0,194	0,644	(0,440; 0,943)	-2,26	0,024
_konstanta	8,861	2,902	/	/	3,05	0,002

Logaritamska verodostojnost = -9.58

Koef. = Procenjeni koeficijenti za logistički regresioni model; SG = Procenjena standardna greška procenjenih koeficijenata; OŠ = Procenjeni odnos šansi ; 95% IP = 95% interval poverenja za odnos šansi. z = Wald test; * OŠ za povećanje 10 jedinica EUTOS skora.

MODEL 3 (Ishod CCgR 18m)

Varijabla	Koef.	SG	OŠ	(95 % IP)	z	p
EUTOS skor	-0,047	0,020	0,627*	(0,425; 0,925)*	-2,35	0,019
Površina (μm^2)	-0,006	0,003	0,524#	(0,272; 1,009)#	-1,93	0,053
_konstanta	6,144	1,824	/	/	3,37	0,001

Logaritamska verodostojnost = -10.92

Koef. = Procenjeni koeficijenti za logistički regresioni model; SG = Procenjena standardna greška procenjenih koeficijenata; OŠ = Procenjeni odnos šansi ; 95% IP = 95% interval poverenja za odnos šansi. z = Wald test; * OŠ za povećanje 10 jedinica EUTOS skora. # OŠ za povećanje 100 jedinica površine.

MODEL 4 (Ishod CCgR 18m)

Varijabla	Koef.	SG	OŠ	(95 % IP)	z	p
EUTOS skor	-0,059	0,028	0,553*	(0,318; 0,961)*	-2,10	0,036
Cirkularnost	-24,144	11,567	0,089\$	(0,009; 0,863)\$	-2,09	0,037
_konstanta	17,97	7,589	/	/	2,37	0,018

Logaritamska verodostojnost = -8.82

Koef. = Procenjeni koeficijenti za logistički regresioni model; SG = Procenjena standardna greška procenjenih koeficijenata; OŠ = Procenjeni odnos šansi ; 95% IP = 95% interval poverenja za odnos šansi. z = Wald test; * OŠ za povećanje 10 jedinica EUTOS skora. \$ OŠ za povećanje 0,1 jedinica cirkularnosti.

Tabela 24. Poređenje prediktivnih modela za predviđanje kompletnog citogenetskog odgovora posle 18 meseci terapije

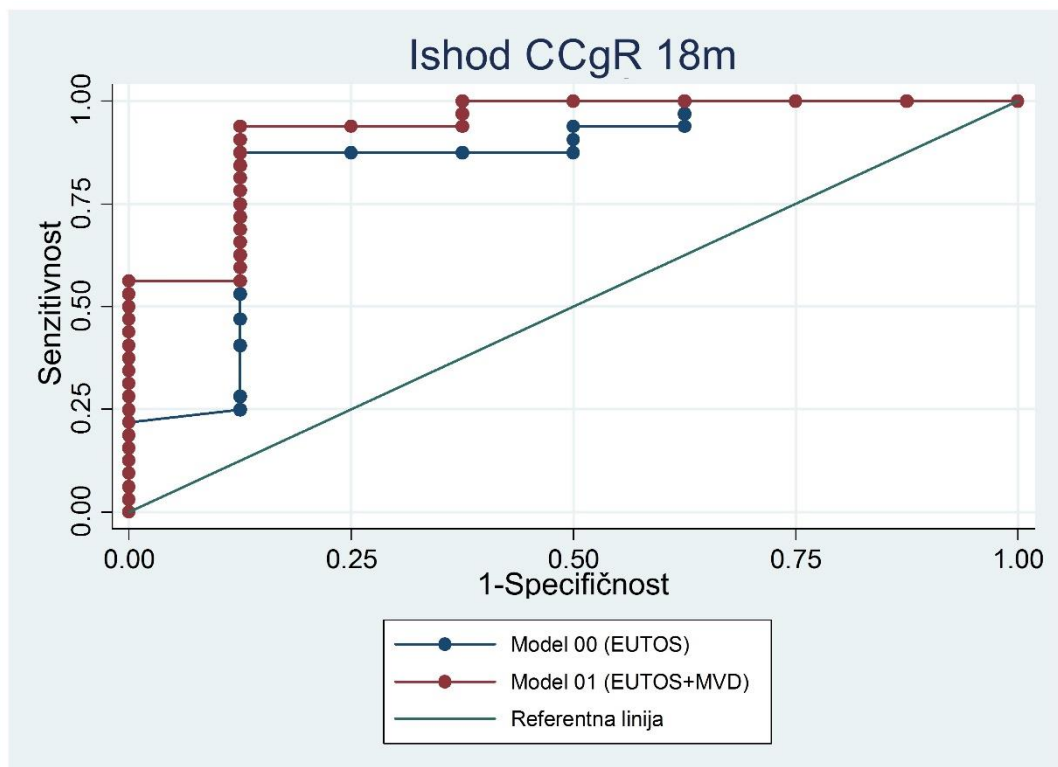
Predikcioni model za kompletan CgR posle 18 meseci terapije		LR test		Sn.	Sp.	PPV	NPV	Ukupno korektno klasifikovani	PIK	P vrednost za Hosmer Lemeshow stepen kalibracije modela
Oznaka Modela	Varijabla	χ^2 (s.s.1)	p							
Model 0	EUTOS skor	-	-	93,5%	50%	88,24%	66,67%	85%	0,8496	0,1133
Model 1	EUTOS skor + Mikrovaskularna gustina	6,46	0,011	93,65%	62,5%	90,91%	71,43%	87,5%	0,9297	0,6489
Model 2	EUTOS skor + Mala dužina ose	7,13	0,008	100%	62,5%	91,43%	100%	92,5%	0,9141	0,7622
Model 3	EUTOS skor + Površina	4,45	0,035	96,88%	62,5%	91,18%	83,33	90%	0,9102	0,1660
Model 4	EUTOS skor + Cirkularnost	8,66	0,003	96,88%	62,5%	91,18%	83,33	90%	0,9414	0,9997

LR test-Test odnosa verodostojnosti za poređenje sa standardnim modelom (Model 0); χ^2 - Hi kvadrat test; s.s.- Stepen slobode; Sn - Senzitivnost, Sp - Specifičnost, PPV - Pozitivna prediktivna vrednost, NPV - Negativna prediktivna vrednost; PIK - Površina ispod ROK krive.

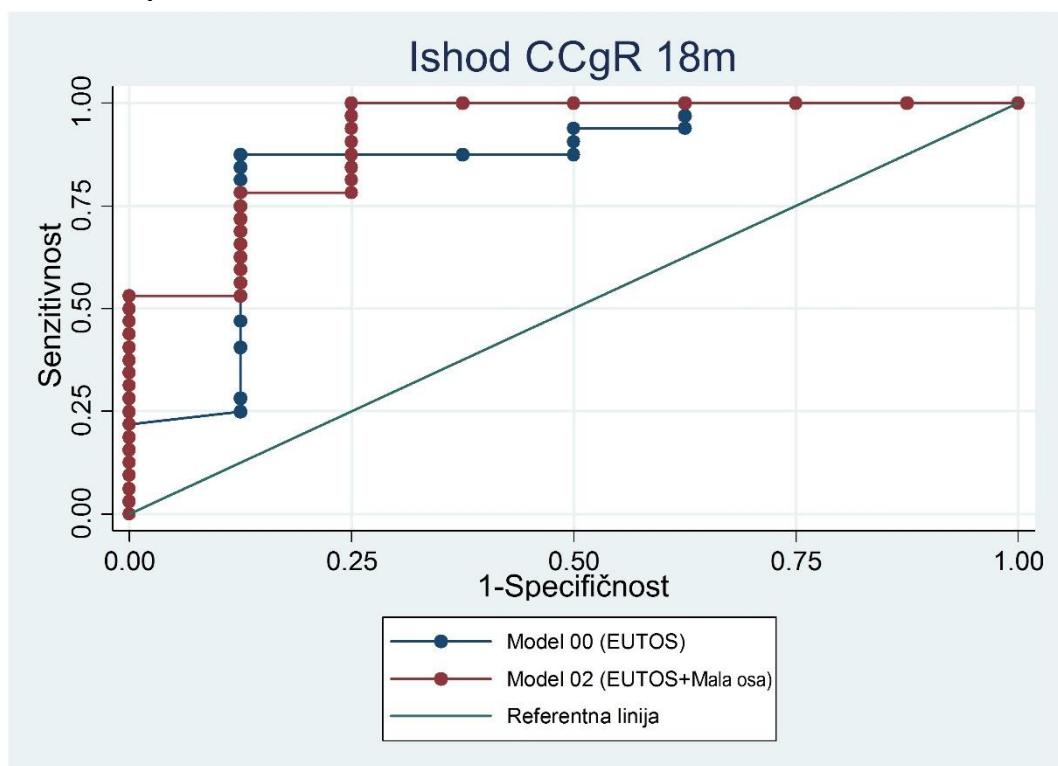
Na celokupnom uzorku, za tačku preseka od 0,5, Model 0 koji se bazira samo na EUTOS skoru je korektno klasifikovao 85% pacijenata u odnosu na posmatrani ishod, postizanje kompletnog citogenetskog odgovora posle 18 meseci terapije, sa pozitivnom prediktivnom vrednošću od 88,24% i negativnom prediktivnom vrednošću od 66,67%. Model 1 koji je zasnovan na EUTOS skoru i mikrovaskularnoj gustini u odnosu na postizanje kompletnog citogenetskog odgovora u analiziranom periodu korektno je klasifikovao 87,5% ispitanika sa pozitivnom prediktivnom vrednošću od 90,91% i negativnom prediktivnom vrednošću od 71,43%. Najviši procenat korektno klasifikovanih pacijenata u odnosu na postizanje kompletnog citogenetskog odgovora posle 18 meseci terapije od 92,5% pokazao je Model 2 koji se bazira na EUTOS skoru i maloj dužini ose krvnoga suda, sa stepenom pozitivne prediktivne vrednosti od 91,43% i negativne prediktivne vrednosti od 100%. Površina ispod ROK krive za Model 1 i Model 2 iznosi 0,9297 i 0,9141, što pokazuje bolju moć predviđanja modela koji pored EUTOS skora koriste morfometrijske parametre.

Model 3 koji se zasniva na EUTOS skoru i površini krvnoga suda i Model 4 koji se bazira na EUTOS skoru i cirkularnosti imali su po 90% korektno klasifikovanih pacijenata u smislu postizanja kompletnog citogenetskog odgovora u analiziranom periodu, sa pozitivnom prediktivnom vrednošću od 91,18% i negativnom prediktivnom vrednošću od 83,33%. Površina ispod ROK krive za Model 3 i Model 4 iznosi 0,9102 i 0,9414, što pokazuje superiornost modela kome su pridodati morfometrijski parametri u odnosu na model koji koristi samo EUTOS skor. Na grafikonu 12 prikazano je poređenje ROK kriva modela za predikciju kompletnog citogenetskog odgovora posle 18 meseci terapije.

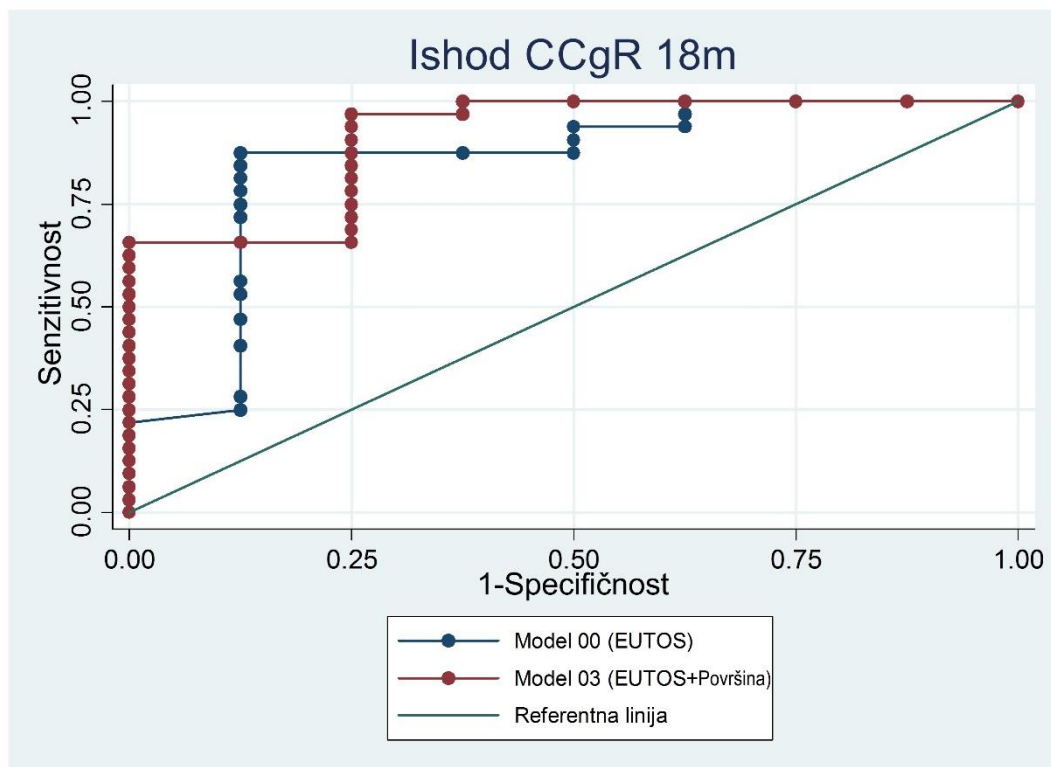
A. Model 1 protiv EUTOS skora



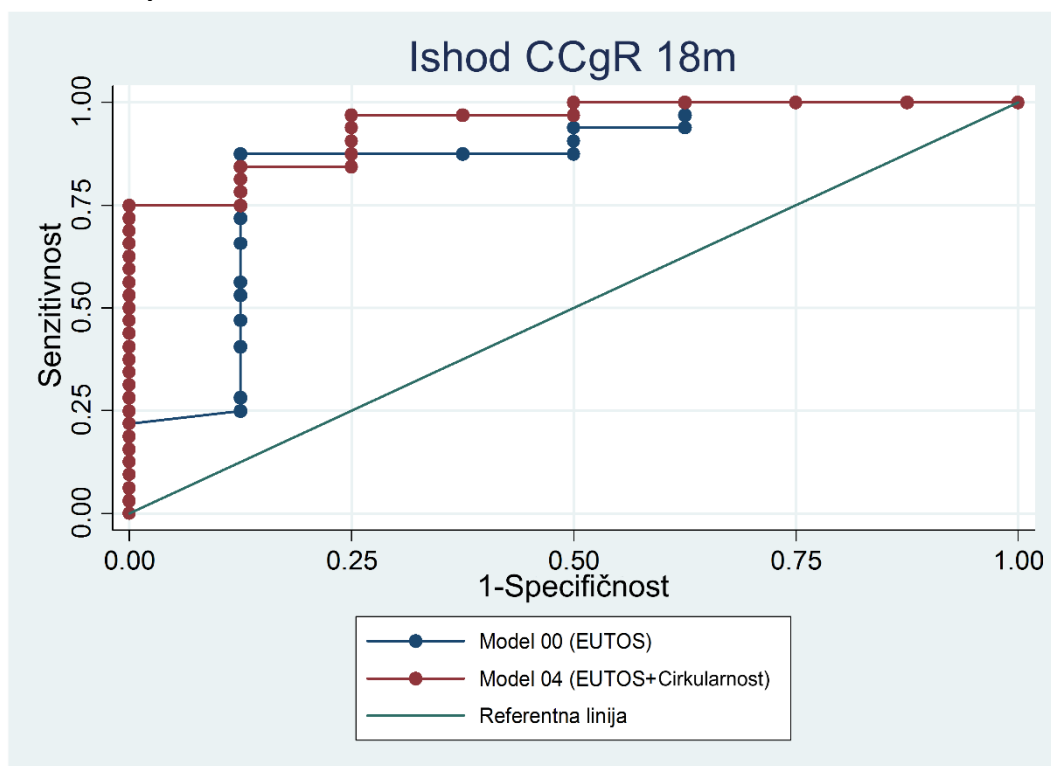
B. Model 2 protiv EUTOS skora



C. Model 3 protiv EUTOS skora



D. Model 4 protiv EUTOS skora



Grafikon 12. Poređenje ROK kriva modela za predviđanje kompletnog citogenetskog odgovora posle 18 meseci terapije A. Model 1, B. Model 2, C. Model 3, D. Model 4

Predviđanje postizanja potpunog citogenetskog odgovora posle 6 meseci terapije, metodom maksimalne verovatnoće utvrđeno je da su model koji uključuje morfometrijski parametar malu dužinu ose krvnoga suda zajedno sa EUTOS skorom i model koji uključuje morfometrijski parametar cirkularnost krvnoga suda pored EUTOS skora superiorni u odnosu na model koji uključuje samo EUTOS skor ($p=0,024$; $p=0,029$).

Bolji rezultati dobijeni su poređenjem prediktivnih modela za predviđanje potpunog citogenetskog odgovora posle 12 meseci terapije. Metodom maksimalne verovatnoće utvrđeno je da su svi analizirani modeli koji pored EUTOS skora uključuju morfometrijske parametre mikrovaskularnu gustinu, malu dužinu ose, površinu i cirkularnost krvnoga suda, pokazali superiornost u odnosu na model koji sadrži samo EUTOS skor ($p=0,008$; $p=0,001$; $p=0,002$; $p=0,011$).

Rezultati dobijeni analizom prediktivnih modela za predikciju potpunog citogenetskog odgovora posle 18 meseci terapije su pokazali da primenjenom metodom maksimalne verovatnoće svi modeli koji pored EUTOS skora uključuju morfometrijske parametre mikrovaskularnu gustinu, malu dužinu ose, površinu i cirkularnost krvnoga suda, su superiorni u odnosu na model samo sa EUTOS skorom ($p=0,011$; $p=0,008$; $p=0,035$; $p=0,003$).

5.12. Značaj morfometrijskih parametara za predviđanje ukupnog potpunog citogenetskog odgovora i velikog molekularnog odgovora

U radu je analizirano predviđanje postizanja kumulativne incidence potpunog citogenetskog odgovora i velikog molekularnog odgovora na primenjenu terapiju korišćenjem modela logističke regresije. U cilju poboljšanja prediktivne moći u modele logističke regresije pored EUTOS skora dodati su morfometrijski parametri angiogeneze u trenutku postavljanja dijagnoze. Analiza je izvršena odvojeno za ukupni kompletan citogenetski odgovor i ukupni veliki molekularni odgovor. Prikazani su pojedinačni modeli logističke regresije u kojima je pored EUTOS skora dodavan još po jedan morfometrijski parametar angiogeneze, prema stepenu statističke značajnosti i kliničkom iskustvu. Zatim je urađeno poređenje dobijenih prediktivnih modela za predviđanje ukupnog potpunog citogenetskog odgovora i ukupnog velikog molekularnog odgovora i rezultati su prikazani u zbirnoj tabeli. Odvojeno je prikazano poređenje ROK kriva svih ispitivanih modela logističke regresije za predviđanje postizanja ukupnog potpunog citogenetskog odgovora kao i za postizanje ukupnog velikog molekularnog odgovora u analiziranom periodu.

Tabela 25 i tabela 26 prikazuju višestruke LR modele razvijene na ispitivanoj grupi pacijenata sa ciljem predviđanja ukupnog potpunog citogenetskog odgovora i velikog molekularnog odgovora na terapiju.

Tabela 25. Predviđanje ukupnog kompletnog citogenetskog odgovora upotrebom različitih LR skorova u vreme dijagnoze

MODEL 0 (Ishod ukupni CCgR)

Varijable	Koef.	SG	OŠ	(95 % IP)	z	p
EUTOS skor	-0,040	0,015	0,670*	(0,503; 0,893)*	-2,74	0,006
_konstanta	3,038	0,878	/	/	3,46	0,001

Logaritamska verodostojnost = - 17.68

Koef. = Procenjeni koeficijenti za logistički regresioni model; SG = Procenjena standardna greška procenjenih koeficijenata; OŠ = Procenjeni odnos šansi ; 95% IP = 95% interval poverenja za odnos šansi. z = Wald test; * OŠ za povećanje 10 jedinica EUTOS skora.

MODEL 1 (Ishod ukupni CCgR)

Varijable	Koef.	SG	OŠ	(95 % IP)	z	p
EUTOS skor	-0,055	0,020	0,577*	(0,388; 0,858)*	-2,71	0,007
Mikrovaskularna gustina	-0,580	0,230	0,560	(0,357; 0,879)	-2,52	0,012
_konstanta	9,55	3,125	/	/	3,06	0,002

Logaritamska verodostojnost = - 12.29

Koef. = Procenjeni koeficijenti za logistički regresioni model; SG = Procenjena standardna greška procenjenih koeficijenata; OŠ = Procenjeni odnos šansi ; 95% IP = 95% interval poverenja za odnos šansi. z = Wald test; * OŠ za povećanje 10 jedinica EUTOS skora.

MODEL 2 (Ishod ukupni CCgR)

Varijable	Koef.	SG	OŠ	(95 % IP)	z	p
EUTOS skor	-0,030	0,020	0,743*	(0,503; 1,099)*	-1,49	0,137
Mala dužina ose (μm)	-0,478	0,180	0,620	(0,435; 0,882)	-2,65	0,008
_konstanta	7,94	2,45	/	/	3,24	0,001

Logaritamska verodostojnost = - 12.356

Koef. = Procenjeni koeficijenti za logistički regresioni model; SG = Procenjena standardna greška procenjenih koeficijenata; OŠ = Procenjeni odnos šansi ; 95% IP = 95% interval poverenja za odnos šansi. z = Wald test; * OŠ za povećanje 10 jedinica EUTOS skora.

MODEL 3 (Ishod ukupni CCgR)

Varijable	Koef.	SG	OŠ	(95 % IP)	z	p
EUTOS skor	-0,032	0,017	0,723*	(0,517; 1,012)*	-1,89	0,059
Površina (μm^2)	-0,007	0,003	0,492 [#]	(0,273; 0,887) [#]	-2,36	0,018
_konstanta	5,130	1,486	/	/	3,45	0,001

Logaritamska verodostojnost = - 14.182

Koef. = Procenjeni koeficijenti za logistički regresioni model; SG = Procenjena standardna greška procenjenih koeficijenata; OŠ = Procenjeni odnos šansi ; 95% IP = 95% interval poverenja za odnos šansi. z = Wald test; * OŠ za povećanje 10 jedinica EUTOS skora. [#] OŠ za povećanje 100 jedinica površine.

MODEL 4 (Ishod ukupni CCgR)

Varijable	Koef.	SG	OŠ	(95 % IP)	z	p
EUTOS skor	-0,032	0,018	0,723*	(0,504; 1,037)*	-1,76	0,078
Cirkularnost	-16,008	6,673	0,202 [§]	(0,055; 0,746) [§]	-2,40	0,016
_konstanta	11,34	3,999	/	/	2,84	0,005

Logaritamska verodostojnost = -13.687

Koef. = Procenjeni koeficijenti za logistički regresioni model; SG = Procenjena standardna greška procenjenih koeficijenata; OŠ = Procenjeni odnos šansi ; 95% IP = 95% interval poverenja za odnos šansi. z = Wald test; * OŠ za povećanje 10 jedinica EUTOS skora. [§] OŠ za povećanje 0,1 jedinica cirkularnosti.

Tabela 26. Poređenje prediktivnih modela za predviđanje ukupnog kompletnog citogenetskog odgovora

Predikcioni model za ukupni kompletn CgR		LR test		Sn.	Sp.	PPV	NPV	Ukupno korektno klasifikovani	PIK	P vrednost za Hosmer Lemeshow stepen kalibracije modela
Oznaka Modela	Varijable	χ^2 (s.s.1)	p							
Model 0	EUTOS skor	-	-	93,33%	40%	82,35%	66,67%	80%	0,7983	0,6807
Model 1	EUTOS skor + Mikrovaskularna gustina	10,79	0,001	90%	70%	90%	70%	85%	0,920	0,9896
Model 2	EUTOS skor+ Mala dužina ose	10,65	0,001	96,67%	60%	87,88%	85,71%	87,5%	0,900	0,8672
Model 3	EUTOS skor+ Površina	7,00	0,008	93,33%	50%	84,85%	71,43%	82,5%	0,8533	0,9290
Model 4	EUTOS skor+ Cirkularnost	7,99	0,005	90%	60%	87,1%	66,67%	82,5%	0,890	0,9672

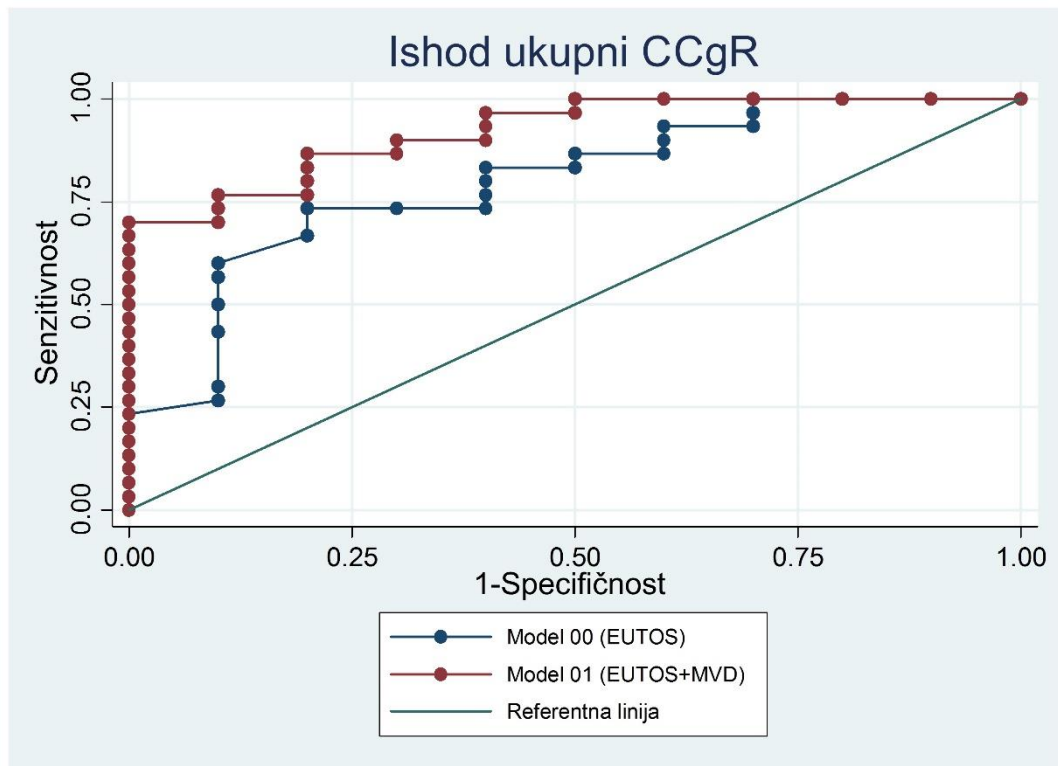
LR test-Test odnosa verodostojnosti za poređenje sa standardnim modelom (Model 0); χ^2 - Hi kvadrat test; s.s.- Stepen slobode; Sn - Sensitivnost, Sp - Specifičnost, PPV - Pozitivna prediktivna vrednost, NPV - Negativna prediktivna vrednost; PIK - Površina ispod ROK krive.

Na celokupnom uzorku, za tačku preseka od 0,5 Model 0 koji je zasnovan samo na EUTOS skoru je korektno klasifikovao 80% pacijenata u odnosu na posmatrani ishod, postizanje ukupnog kompletnog citogenetskog odgovora na terapiju, sa pozitivnom prediktivnom vrednošću od 82,35% i negativnom prediktivnom vrednošću od 66,67%. Model 1 koji se bazira na EUTOS skoru i mikrovaskularnoj gustini je u odnosu na postizanje ukupnog kompletnog citogenetskog odgovora u analiziranom periodu korektno klasifikovao 85% ispitanika sa pozitivnom prediktivnom vrednošću od 90% i negativnom prediktivnom vrednošću od 70%.

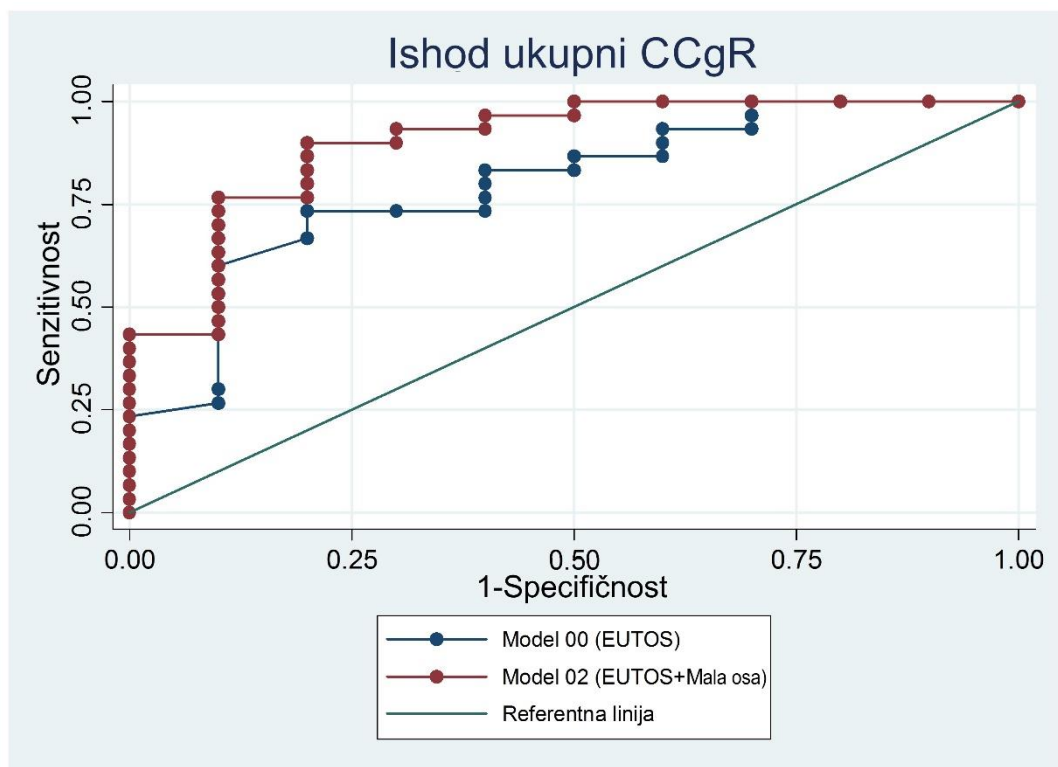
Najviši procenat korektno klasifikovanih pacijenata u odnosu na postizanje ukupnog kompletnog citogenetskog odgovora na terapiju od 87,5% pokazao je Model 2 koji se zasniva na EUTOS skoru i maloj dužini ose krvnoga suda, sa pozitivnom prediktivnom vrednošću od 87,88% i negativnom prediktivnom vrednošću od 85,71%. Površina ispod ROK krive za Model 1 i Model 2 iznosi 0,920 i 0,900 što pokazuje superiornost modela sa morfometrijskim parametrima u odnosu na model koji koristi samo EUTOS skor.

Model 3 koji se zasniva na EUTOS skoru i površini krvnoga suda i Model 4 koji se bazira na EUTOS skoru i cirkularnosti imali su po 82,5% korektno klasifikovanih pacijenata u smislu postizanja kompletnog citogenetskog odgovora u analiziranom periodu, sa pozitivnom prediktivnom vrednošću od 84,85% odnosno 87,1% i negativnom prediktivnom vrednošću od 71,43% odnosno 66,67%. Površina ispod ROK krive za Model 3 i Model 4 iznosi 0,853 i 0,890 i pokazuje bolju moć predviđanja modela sa morfometrijskim parametrima u odnosu na model koji koristi samo EUTOS skor. Na grafikonu 13 prikazana je komparacija ROK kriva modela koji predviđaju ukupni kompletn citogenetski odgovora na terapiju.

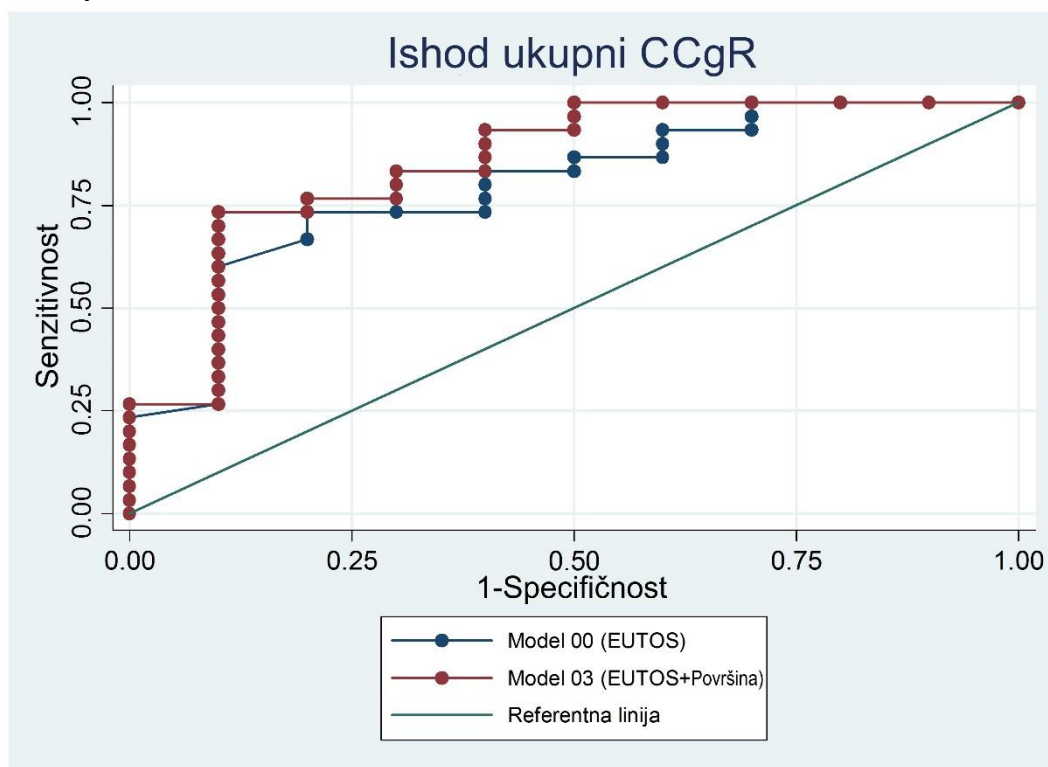
A. Model 1 protiv EUTOS skora



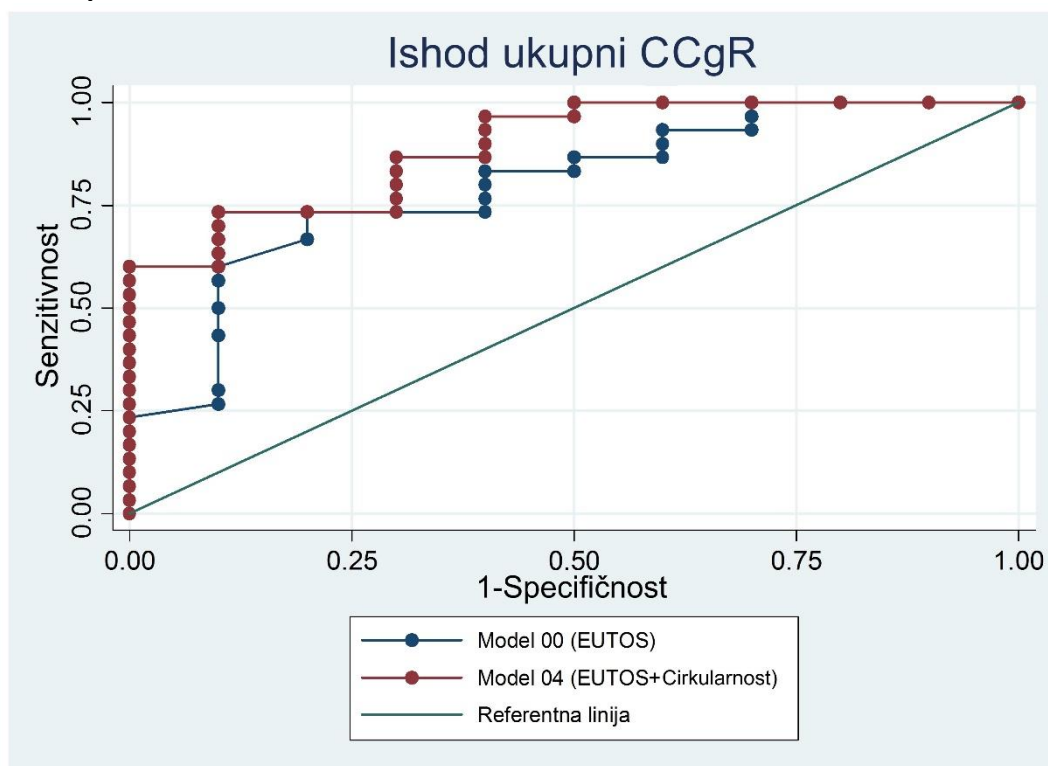
B. Model 2 protiv EUTOS skora



C. Model 3 protiv EUTOS skora



D. Model 4 protiv EUTOS skora



Grafikon 13. Poređenje ROK kriva modela za predviđanje ukupnog kompletnog citogenetskog odgovora na terapiju A. Model 1, B. Model 2, C. Model 3, D. Model 4

Tabela 27 i tabela 28 prikazuju višestruke LR modele razvijene na ispitivanoj grupi pacijenata sa ciljem predviđanja velikog molekularnog odgovora na terapiju.

Tabela 27. Predviđanje velikog molekularnog odgovora upotrebom različitih LR skorova u vreme dijagnoze

MODEL 0 (Ishod MMoR)

Varijable	Koef.	SG	OŠ	(95 % IP)	z	p
EUTOS skor	-0,018	0,011	0,835*	(0,662; 1,054)*	-1,51	0,130
_konstanta	0,634	0,571	/	/	1,11	0,267

Logaritamska verodostojnost = -26.405

Koef. = Procenjeni koeficijenti za logistički regresioni model; SG = Procenjena standardna greška procenjenih koeficijenata; OŠ = Procenjeni odnos šansi ; 95% IP = 95% interval poverenja za odnos šansi. z = Wald test; * OŠ za povećanje 10 jedinica EUTOS skora.

MODEL 1 (Ishod MMoR)

Varijable	Koef.	SG	OŠ	(95 % IP)	z	p
EUTOS skor	-0,020	0,015	0,816*	(0,607; 1,097)*	-1,34	0,179
Mikrovaskularna gustina	-0,590	0,120	0,554	(0,375; 0,820)	-2,96	0,003
_konstanta	5,911	1,972	/	/	3,00	0,003

Logaritamska verodostojnost = -18.126

Koef. = Procenjeni koeficijenti za logistički regresioni model; SG = Procenjena standardna greška procenjenih koeficijenata; OŠ = Procenjeni odnos šansi ; 95% IP = 95% interval poverenja za odnos šansi. z = Wald test; * OŠ za povećanje 10 jedinica EUTOS skora.

MODEL 2 (Ishod MMoR)

Varijable	Koef.	SG	OŠ	(95 % IP)	z	p
EUTOS skor	-0,001	0,018	0,996*	(0,703; 1,413)*	-0,02	0,984
Mala dužina ose (μm)	-0,630	0,209	0,533	(0,354; 0,802)	-3,02	0,003
_konstanta	6,132	2,043	/	/	3,00	0,003

Logaritamska verodostojnost = -17.46

Koef. = Procenjeni koeficijenti za logistički regresioni model; SG = Procenjena standardna greška procenjenih koeficijenata; OŠ = Procenjeni odnos šansi ; 95% IP = 95% interval poverenja za odnos šansi. z = Wald test; * OŠ za povećanje 10 jedinica EUTOS skora.

MODEL 3 (Ishod MMoR)

Varijable	Koef.	SG	OŠ	(95 % IP)	z	p
EUTOS skor	-0,007	0,016	0,931*	(0,686; 1,264)*	-0,46	0,648
Površina (μm ²)	-0,009	0,003	0,419#	(0,229; 0,765)#	-2,83	0,005
_konstanta	2,713	2,713	/	/	2,64	0,008

Logaritamska verodostojnost = -20.417

Koef. = Procenjeni koeficijenti za logistički regresioni model; SG = Procenjena standardna greška procenjenih koeficijenata; OŠ = Procenjeni odnos šansi ; 95% IP = 95% interval poverenja za odnos šansi. z = Wald test; * OŠ za povećanje 10 jedinica EUTOS skora. # OŠ za povećanje 100 jedinica površine.

MODEL 4 (Ishod MMoR)

Varijable	Koef.	SG	OŠ	(95 % IP)	z	p
EUTOS skor	-0,006	0,014	0,941*	(0,714; 1,239)*	-0,43	0,664
Cirkularnost	-9,982	4,455	0,369 ^{\$}	(0,154; 0,882) ^{\$}	-2,24	0,025
_konstanta	5,200	2,137	/	/	2,43	0,015

Logaritamska verodostojnost = -23.516

Koef. = Procenjeni koeficijenti za logistički regresioni model; SG = Procenjena standardna greška procenjenih koeficijenata; OŠ = Procenjeni odnos šansi ; 95% IP = 95% interval poverenja za odnos šansi. z = Wald test; * OŠ za povećanje 10 jedinica EUTOS skora. ^{\$} OŠ za povećanje 0,1 jedinica cirkularnosti.

Tabela 28. Poređenje prediktivnih modela za predviđanje velikog molekularnog odgovora

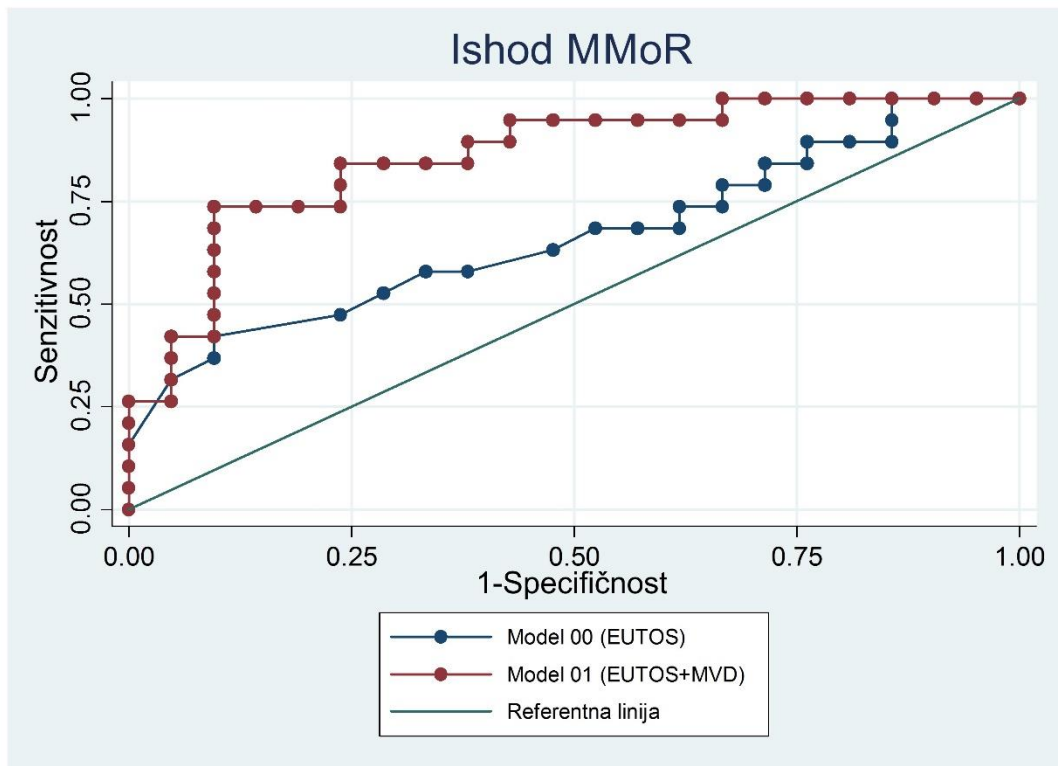
Predikcioni model za MMR		LR test		Sn.	Sp.	PPV	NPV	Ukupno korektno klasifikovani	PIK	P vrednost za Hosmer Lemeshow stepen kalibracije modela
Oznaka Modela	Varijable	χ^2 (s.s.1)	p							
Model 0	EUTOS skor	-	-	63,16%	52,39%	54,55%	61,11%	57,5%	0,664	0,8374
Model 1	EUTOS skor + Mikrovaskularna gustina	16,56	0,000	73,68%	80,95%	77,78%	77,27%	77,5%	0,860	0,7129
Model 2	EUTOS skor + Mala dužina ose	17,89	0,000	73,68%	71,43%	70%	75%	72,5%	0,867	0,7048
Model 3	EUTOS skor + Površina	11,98	0,001	78,95%	66,67%	68,18%	77,78%	72,5%	0,832	0,7174
Model 4	EUTOS skor + Cirkularnost	5,78	0,016	73,68%	66,67%	66,67%	73,68%	80%	0,757	0,2497

LR test-Test odnosa verodostojnosti za poređenje sa standardnim modelom (Model 0); χ^2 - Hi kvadrat test; s.s.- Stepen slobode; Sn - Sensitivnost, Sp - Specifičnost, PPV - Pozitivna prediktivna vrednost, NPV - Negativna prediktivna vrednost; PIK - Površina ispod ROK krive.

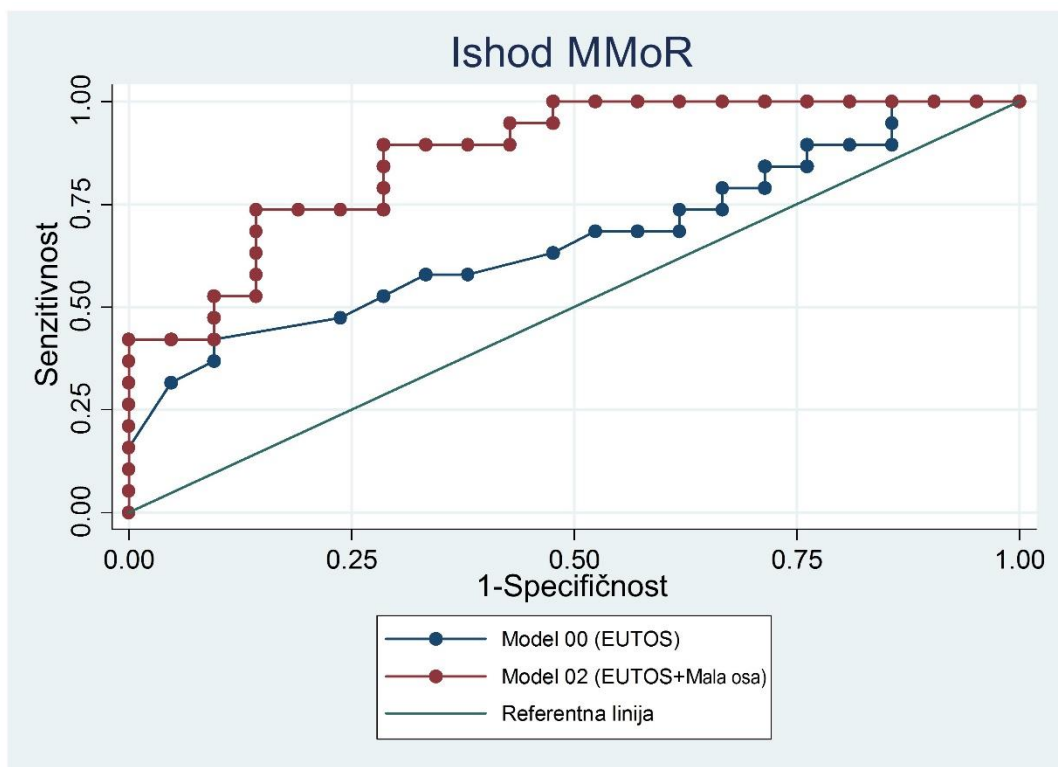
Na celokupnom uzorku, za tačku preseka od 0,5 Model 0 koji se bazira samo na EUTOS skoru je korektno klasifikovao 57,5% pacijenata u odnosu na posmatrani ishod, postizanje velikog molekularnog odgovora na terapiju, sa pozitivnom prediktivnom vrednošću od 54,55% i negativnom prediktivnom vrednošću od 61,11%. Model 1 koji je zasnovan na EUTOS skoru i mikrovaskularnoj gustini u odnosu na postizanje velikog molekularnog odgovora u analiziranom periodu korektno je klasifikovao 77,5% ispitanika sa pozitivnom prediktivnom vrednošću od 77,78% i negativnom prediktivnom vrednošću od 77,27%. Model 2 koji se zasniva na EUTOS skoru maloj dužini ose krvnoga suda i Model 3 koji se bazira na EUTOS skoru i površini krvnoga suda imali su po 72,5% korektno klasifikovanih pacijenata u smislu postizanja velikog molekularnog odgovora u analiziranom periodu, sa pozitivnom prediktivnom vrednošću od 70% odnosno 68,18% i negativnom prediktivnom vrednošću od 75% odnosno 77,78%. Površina ispod ROK krive za Model 1, Model 2 i Model 3 iznosi 0,860, 0,867 i 0,832 respektivno, što pokazuje bolju moć predviđanja modela koji pored EUTOS skora koriste morfometrijske parametre.

Najviši procenat korektno klasifikovanih pacijenata u odnosu na postizanje velikog molekularnog odgovora na terapiju od 80% pokazao je Model 4 koji se bazira na EUTOS skoru i cirkularnosti krvnoga suda, sa stepenom pozitivne prediktivne vrednosti od 66,67% i negativne prediktivne vrednosti od 73,68%. Površina ispod ROK krive za Model 4 iznosi 0,757, što pokazuje superiornost modela kome su pridodati morfometrijski parametri u odnosu na model koji koristi samo EUTOS skor. Na grafikonu 14 prikazano je poređenje ROK kriva modela za predikciju velikog molekularnog odgovora na terapiju.

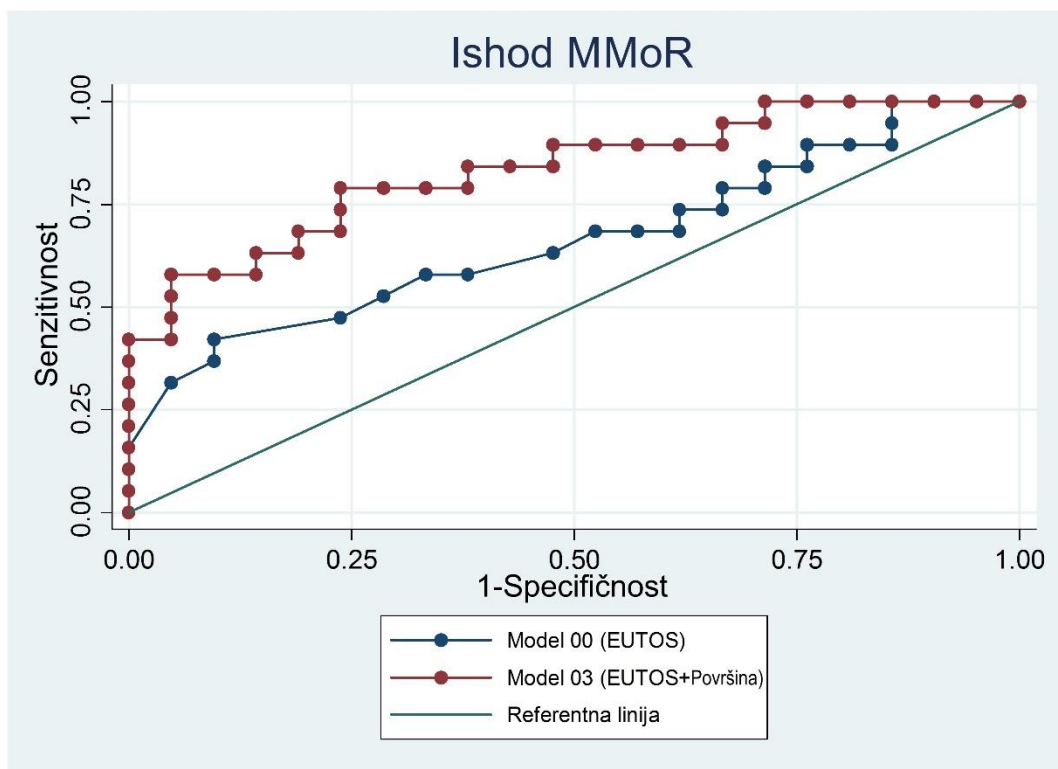
A. Model 1 protiv EUTOS skora



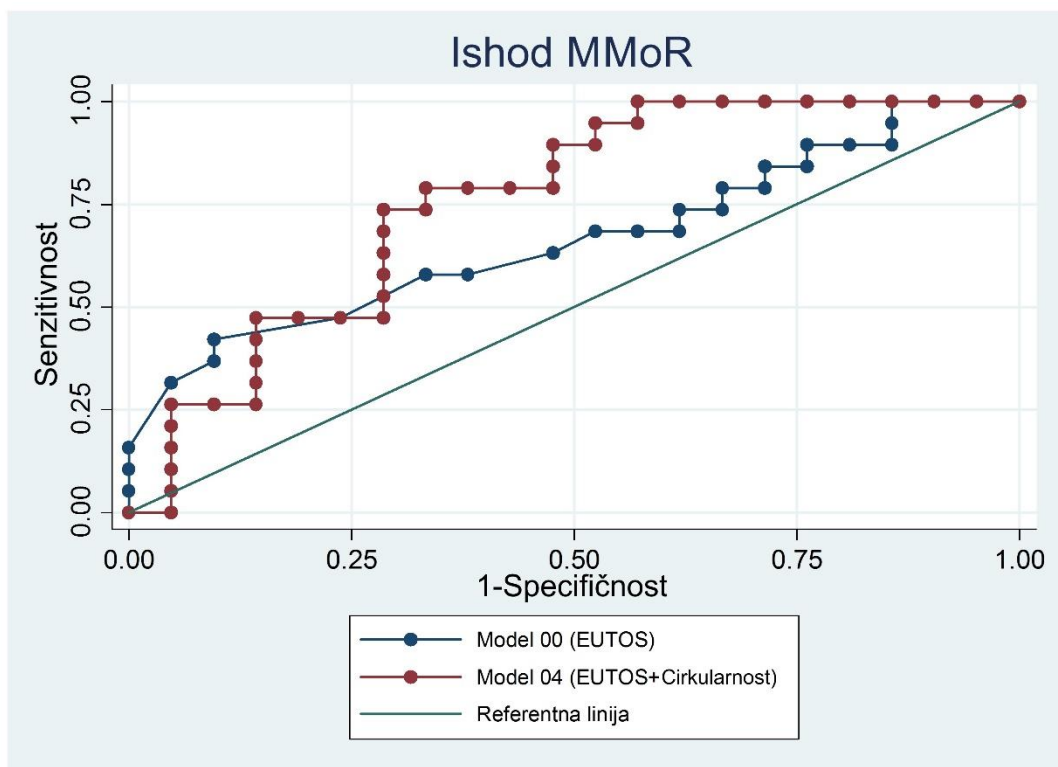
B. Model 2 protiv EUTOS skora



C. Model 3 protiv EUTOS skora



D. Model 4 protiv EUTOS skora



Grafikon 14. Poređenje ROK kriva modela za predviđanje velikog molekularnog odgovora na terapiju A. Model 1, B. Model 2, C. Model 3, D. Model 4

U cilju predviđanja ukupnog kompletnog citogenetskog odgovora na terapiju, metodom maksimalne verovatnoće utvrđeno je da su svi modeli koji pored EUTOS skora uključuju morfometrijske parametre (mikrovaskularnu gustinu, malu dužinu ose, površinu i cirkularnost krvnoga suda), pokazali superiornost u odnosu na model koji sadrži samo EUTOS skor ($p=0,001$; $p=0,001$; $p=0,008$; $p=0,005$).

Slični rezultati su dobijeni analizom prediktivnih modela za predikciju velikog molekularnog odgovora na terapiju. Primenjenom metodom maksimalne verovatnoće utvrđeno je da su svi modeli koji pored EUTOS skora uključuju morfometrijske parametre (mikrovaskularnu gustinu, malu dužinu ose, površinu i cirkularnost krvnoga suda), su superiorni u odnosu na model samo sa EUTOS skorom ($p=0,000$; $p=0,000$; $p=0,001$; $p=0,016$).

6. DISKUSIJA

Hronična mijeloidna leukemija je klonalna maligna bolest koja se karakteriše prisustvom ekspanzivne mijelopoeze i prisustvom Filadelfija hromozoma, koji je rezultat recipročne translokacije između dugih krakova hromozoma 9 i 22, t(9; 22)(q34;q11). Molekularna posledica ove translokacije je nastanak novog BCR-ABL fuzionog gena i posledična ekspresija BCR-ABL fuzionog proteina što dovodi do povišene aktivnosti tirozin kinaze.

U ovom istraživanju utvrđena je veća učestanost hronične mijeloidne leukemije kod osoba ženskog pola što nije u saglasnosti sa podacima iz literature. Nasuprot tome, prosečna starost ispitanika u trenutku postavljanja dijagnoze bila 53,75 godina što je u skladu sa literaturnim podacima.

U jednoj od najvećih studija, Hasford J. i sar. (28) u istraživanju sprovedenom na više od 2000 pacijenata sa hroničnom mijeloidnom leukemijom, utvrdili su da je 60% ispitanika bilo muškog pola dok je prosečna starost iznosila 52 godine. U toj studiji prema Sokal skoru identifikovano je 39% pacijenata sa niskim rizikom, 37% sa intermedijarnim rizikom i 24% sa visokim rizikom. Prema Euro skoru bilo je 38%, 51% i 11% pacijenata sa niskim, intermedijarnim i visokim rizikom. U ovom istraživanju prema Sokal skoru kategorisano je 40% pacijenata sa niskim rizikom, 45% sa intermedijarnim rizikom i 15% sa visokim rizikom, a odgovarajuće vrednosti za Euro skor su bile 45%, 50% i 5%. U studiji Hasford J. i sar. (28) je prema EUTOS skoru 90% pacijenata bilo kategorisano kao pacijenti sa niskim rizikom, dok je 10% pacijenata bilo sa visokim rizikom. Slično tome, u ovom istraživanju je 85% pacijenata pripadalo kategoriji niskog rizika dok je 15% pacijenata bilo u kategoriji visokog rizika.

Imatinib je izuzetno efikasna terapija za novo dijagnostikovane pacijente sa hroničnom mijeloidnom leukemijom u hroničnoj fazi. Prednost imatiniba je definitivno pokazana u Internacionalnoj Randomiziranoj studiji Interferona i STI571 (IRIS), koja je upoređivala prethodno nelečene pacijente sa hroničnom fazom HML koji su lečeni ili imatinibom ili interferonom- α plus citarabinom. Šestogodišnje ažuriranje IRIS studije bilo je fokusirano na pacijente koji su dobijali imatinib kao prvu liniju terapije i pokazano je da je najbolja kumulativna stopa kompletnog citogenetskog odgovora bila 82%. Ukupna stopa preživljavanja bez događaja posle 6 godina bila je 83%, procenjena stopa preživljavanja bez progresije u fazu akceleracije ili blastnu transformaciju bila je 93%, dok je procenjeno ukupno preživljavanje bilo 88%-95%. Rezultati 6-godišnjeg ažuriranja IRIS studije potvrdili su efikasnost i bezbednost imatiniba kao prve terapijske linije za pacijente sa HML. Uprkos

uspehu imatiniba u lečenju pacijenata sa hroničnom fazom HML, posle 6 godina 34% pacijenata nisu bili više na ispitivanom leku, zbog nedostatka efikasnosti (12%) ili pojave neželjenih događaja (4%) (117).

Lavallade H. i sar. (7) su izneli iskustvo jednog centra u lečenju pacijenata sa novodijagnostikovanom HML primenom imatiniba. Posle prve godine lečenja kumulativna učestalost kompletnog hematološkog odgovora bila je 97,1%, velikog citogenetskog odgovora 71,1%, kompletnog citogenetskog odgovora 57,4% i velikog molekularnog odgovora 12,3%. Posle 5 godina terapije imatinibom rezultati su bili značajno bolji, kumulativna učestalost kompletnog hematološkog odgovora bila je 98,5%, velikog citogenetskog odgovora 85,1%, kompletnog citogenetskog odgovora 82,7% i velikog molekularnog odgovora 50,1%. Postizanje kompletnog citogenetskog odgovora bilo je u korelaciji sa preživljavanjem bez progresije i ukupnim preživljavanjem, ali postizanje velikog molekularnog odgovora nije imao dalju predikativnu vrednost.

Rezultati lečenja pacijenata sa hroničnom fazom HML primenom imatiniba koji su dobijeni u ovom istraživanju bili su slični sa rezultatima drugih istraživača, kumulativna stopa kompletne hematološke remisije bila je 97,5%, kompletne citogenetske remisije 75%, velike citogenetske remisije 87,5% i velike molekularne remisije 57,1%. Stopa postignutog kompletnog citogenetskog odgovora imala je stalni trend rasta od 62,5% posle 6 meseci, preko 72,5% posle 12 meseci do 80% nakon 18 meseci terapije. Slični rezultati dobijeni su i u studiji Hasford J. i sar. (28) u kojoj je proporcija pacijenta koji su postigli kompletan citogenetski odgovor rasla tokom vremena od 31% posle 6 meseci, preko 74% posle 12 meseci do 82% posle 18 meseci terapije.

Lavallade H. i sar. (7) su u svom radu pokazali rezultate izvršene univarijantne i multivarijantne analize da bi identifikovali prognostičke faktore za postizanje kompletnog citogenetskog odgovora. Sokal skor rizika, nivo hemoglobina veći od 120g/l i broj leukocita manji od $140 \times 10^9/L$ pri dijagnozi su bili prediktivni u univarijantnoj analizi za postizanje kompletnog citogenetskog odgovora. Kumulativna učestalost kompletnog citogenetskog odgovora bila je 88,1% kod pacijenata sa nivoom hemoglobina od 120 g/L ili višim u odnosu na 80,1% za one sa nižim nivoom hemoglobina. Učestalost kompletnog citogenetskog odgovora bila je 89,2% u odnosu na 75,3% za pacijente sa brojem leukocita nižim odnosno višim od $140 \times 10^9/L$. Samo je nivo hemoglobina bio zadržao značaj u multivarijantnoj analizi.

Rezultati ovog istraživanja o povezanosti između baznih karakteristika pacijenata i kasnije mogućnosti postizanja kompletnog citogenetskog odgovora su bili donekle različiti u poređenju sa onima koji su bili identifikovani u studiji Lavallade H. i sar. Identifikovane su sledeće varijable kao značajni pokazatelji postizanja kompletnog citogenetskog odgovora: prisustvo manje od 3% blasta u perifernoj krvi, manje od 4% bazofila u koštanoj srži, manje od 4% bazofila u perifernoj krvi ($p < 0,01$), kao i splenomegalija manja od 5 cm ispod rebarnog luka u nivou MKL, vrednost hemoglobina veća od 120g/L, prisustvo manje od 5% blasta u koštanoj srži i nizak EUTOS skor rizika ($p < 0,05$). Kumulativna učestalost kompletnog

citogenetskog odgovora bila je 90% kod pacijenata sa prisustvom manje od 3% blasta u perifernoj krvi u odnosu na 10% za one sa višim procentom blasta. Učestalost kompletnog citogenetskog odgovora bila je 76,67% i 80% za pacijente sa manje od 4% bazofila u perifernoj krvi i koštanoj srži, u odnosu na 23,33% i 20% za pacijente sa višim procentom bazofila.

Dubina odgovora postignuta kod pacijenata sa HML tokom terapije imatinibom je kritična sa prognostičkog stanovišta. Prvi izveštaji su ukazali da je vreme postizanja odgovora u korelaciji sa ishodom, tako da su pacijenti koji su postigli kompletan citogenetski ili čak veliki citogenetski odgovor rano tokom terapije imali najbolji dugoročni ishod.

Rezultati istraživanja Quantis-Cardema A. i sar. (106) su pokazali da pacijenti koji nisu bili postigli kompletan citogenetski odgovor posle 6 meseci, su imali 57% verovatnoće da taj odgovor postignu tokom vremena sa nastavkom terapije. Međutim, rizik od događaja kasnije tokom vremena za takve pacijente bio je 34%. Posle 12 meseci neprekidne terapije imatinibom bez kompletnog citogenetskog odgovora, rizik od razvijanja nekog događaja se povećavao na 38%, dok se verovatnoća postizanja ovog odgovora smanjivala na 42%.

Obzirom da je nepostizanje kompletnog citogenetskog odgovora u ranim vremenskim intervalima koreliralo ili sa verovatnoćom eventualnog postizanja kompletnog citogenetskog odgovora ili verovatnoćom eventualnog neuspeha terapije, Quantis-Cardema A. i sar. (106) su tada analizirali faktore koji su bili povezani sa postizanjem ranog odgovora. Univarijantnom analizom su identifikovane varijable koje su bile povezane sa nižom verovatnoćom postizanja kompletnog citogenetskog odgovora posle 3 meseca: nizak hemoglobin, visok procenat blasta u perifernoj krvi i koštanoj srži, splenomegalija i terapija imatinibom u standardnoj dozi. Multivarijantna analiza je izdvojila nizak hemoglobin, veći procenat blasta u perifernoj krvi i terapiju standardnom dozom imatiniba kao pokazatelje smanjene verovatnoće postizanja kompletnog citogenetskog odgovora posle 3 meseca terapije.

U ovom istraživanju analiza povezanosti između karakteristika pacijenata pre tretmana i kasnije mogućnosti za postizanje ranog kompletnog citogenetskog odgovora posle 6 meseci terapije imatinibom, izdvojila je sledeće nezavisne prognostičke faktore: splenomegaliju manju od 5 cm ispod rebarnog luka u nivou MKL, manje od 5% blasta u koštanoj srži ($p<0,01$), kao i prisustvo manje od 3 % blasta u perifernoj krvi, manje od 4% bazofila u perifernoj krvi i koštanoj srži i nizak Sokal, Euro i EUTOS skor rizika ($p<0,05$).

Međutim, 5-godišnje ažuriranje IRIS studije je ukazalo da pacijenti koji su postigli kompletan citogenetski odgovor posle 12 meseci terapije su imali procenjenu stopu od 97% da neće progredirati u fazu akceleracije ili blastne transformacije posle 60 meseci praćenja (5). Slično tome, rezultati analize Iacobucci I. i sar. (118) su pokazali da grupa pacijenata koji su postigli kompletan citogenetski odgovor unutar 12 meseci terapije u 81% slučajeva i dalje ispoljavaju stabilnu kompletnu citogenetsku remisiju bez podataka o klonalnoj progresiji na poslednjoj

kontroli, dok je 19% pacijenata iz ove grupe pokazalo gubitak ovog nivoa odgovora. U grupi pacijenata koji su postigli kompletnu citogenetsku remisiju posle 12 meseci terapije imatinibom, njih 81% su zadržali stabilnu kompletnu citogenetsku remisiju posle 48 meseci terapije. Podaci iz iste studije su pokazali da je molekularni odgovor posle 12, 18 i 24 meseca bio signifikantno bolji u grupi sa ranim kompletnim citogenetskim odgovorom, ali nije bilo nikakvih dokaza da je posle 3 ili 4 godine lečenja molekularni odgovor u grupi sa kasnim citogenetskim odgovorom bio lošiji nego u grupi sa ranim citogenetskim odgovorom.

Kantarjian HM. i sar. (119) su analizirali efikasnost terapije imatinibom koja je primenjena posle neuspeha terapije interferonom- α . Sa srednjom medijanom praćenja od 45 meseci stopa kompletne hematološke remisije bila je 96%, dok je kumulativna stopa velikog citogenetskog odgovora bila 73%, a kompletnog citogenetskog odgovora bila je 63%. Pacijenti sa parcijalnim citogenetskim odgovorom posle 12 meseci terapije imali su učestalost kasnijeg postizanja kompletnog citogenetskog odgovora od 73%, dok je ta stopa bila svega 10% kod pacijenata koji su bili postigli samo mali citogenetski odgovor posle 12 meseci terapije. Isti autori su ispitivali udruženost karakteristika pacijenata pre tretmana i kasnije mogućnosti da se postigne kompletni citogenetski odgovor. Univarijantnom analizom su bili identifikovani sledeći nezavisni negativni prognostički faktori za postizanje kompletnog citogenetskog odgovora: prisustvo blasta i bazofila u perifernoj krvi, prisustvo više od 5% blasta u koštanoj srži, broj leukocita viši od $50 \times 10^9/L$ i broj trombocita viši od $450 \times 10^9/L$. Multivarijantna analiza je bila izdvojila visok broj trombocita i Ph pozitivnost višu od 90% pre početka terapije imatinibom kao važne negativne prognostičke faktore za postizanje kompletnog citogenetskog odgovora.

U ovom istraživanju analizirane su bazne karakteristike pacijenata koje su udružene sa postizanjem kompletnog citogenetskog odgovora posle 12 meseci tretmana. Tom prilikom su identifikovani sledeći nezavisni prognostički parametri udruženi sa većom mogućnošću postizanja ovog nivoa odgovora posle 12 meseci od početka lečenja: odsustvo perifernih blasta, prisustvo manje od 4% bazofila u perifernoj krvi, prisustvo manje od 4% bazofila u koštanoj srži ($p < 0,01$), kao i splenomegalija manja od 5 cm ispod rebarnog luka u nivou MKL, prisustvo manje od 5% blasta u koštanoj srži i nizak Sokal i EUTOS skor rizika ($p < 0,05$).

U ovom istraživanju je bila ispitivana udruženost između karakteristika pacijenata pre tretmana i mogućnosti da se postigne kompletni citogenetski odgovor posle 18 meseci od početka lečenja. Univarijantnom analizom su bili izdvojeni sledeći prognostički faktori za postizanje ovog nivoa odgovora posle 18 meseci terapije: splenomegalija manja od 5 cm ispod rebarnog luka u nivou MKL, odsustvo perifernih blasta, prisustvo manje od 4% bazofila u perifernoj krvi, prisustvo manje od 4% bazofila u koštanoj srži, nizak EUTOS skor rizika ($p < 0,01$), dok su sa nižom statističkom značajnošću izdvojeni prisustvo manje od 5% blasta u koštanoj srži i nizak Sokal skor rizika ($p < 0,05$).

Značaj prognostičkih faktora na tok bolesti može drastično biti promenjen uvođenjem novih terapija koje značajno menjaju prognozu. Cortes J. i sar. (120) su identifikovali značajne loše

prognostičke faktore za postizanje velikog citogenetskog odgovora a da tom prilikom nisu uključili prisustvo citogenetske klonalne evolucije. Univarijantnom analizom dobijeni su sledeći prognostički faktori: splenomegalija, prisustvo perifernih blasta i bazofila, prisustvo više od 5% blasta i bazofila u koštanoj srži, broj leukocita viši od $50 \times 10^9/L$, viši procenat Ph-pozitivnih ćelija na početku terapije i hematološka rezistencija. Dok su multivarijantnom analizom identifikovani sledeći nezavisni loši prognostički faktori: viši procenat blasta u koštanoj srži, duže vreme od dijagnoze do terapije, viši procenat Ph-pozitivnih ćelija na početku terapije i hematološka rezistencija. Ponovljena multivarijantna analiza za određivanje prediktivnih faktora za postizanje kompletnog umesto velikog citogenetskog odgovora pokazala je slične rezultate. Isti autori su zaključili da citogenetska klonalna evolucija nije značajan faktor za postizanje velike ili kompletne citogenetske remisije sa primenom imatinib mesilata, ali je nezavistan loš prognostički faktor za preživljavanje u hroničnoj fazi HML.

U radu Ćojbašić I. i sar. (121) analizirane su bazične kliničke karakteristike pacijenata udružene sa postizanjem kompletnog citogenetskog odgovora kod pacijenata u hroničnoj fazi HML lečenih imatinib mesilatom. Multivarijantnom analizom identifikovane su nezavisne bazične karakteristike koje predviđaju postizanje kompletnog citogenetskog odgovora: odsustvo blasta i bazofila u perifernoj krvi, prisustvo manje od 5% blasta u koštanoj srži, broj leukocita manji od $10 \times 10^9/L$ i odsustvo splenomegalije. U svojim kasnijim radovima Ćojbašić I. i sar. (122) su određivali prognostičke faktore za postizanje velikog citogenetskog odgovora. Bazične karakteristike udružene sa većom mogućnošću postizanja velikog citogenetskog odgovora uključivale su: odsustvo splenomegalije, broj leukocita manji od $10 \times 10^9/L$, broj trombocita manji od $450 \times 10^9/L$, prisustvo manje od 5% blasta i bazofila u koštanoj srži, odsustvo blasta u perifernoj krvi i prisustvo manje od 7% bazofila u perifernoj krvi.

Kantarjian HM. i sar. su kasnije pokazali (123) da je stopa procenjenog 3-godišnjeg preživljavanja pacijenata koji su na terapiji imatinibom iznosila 96% i identifikovali su određene bazne karakteristike pacijenata koje su udružene sa preživljavanjem. Univarijantnom analizom su izabrani sledeći loši prognostički faktori: stariji uzrast, splenomegalija, leukocitoza, viši procenat blasta, viši procenat bazofila, Sokal skor rizika, duže trajanje HML. Multivarijantna analiza je izdvojila sledeće varijable da budu nezavisni loši prognostički faktori: stariji uzrast, viši procenat perifernih blasta, povišen procenat bazofila u koštanoj srži i duže trajanje HML. Multivarijantnom analizom, imatinib mesilat je bio identifikovan kao nezavisni povoljan prognostički faktor, posle uzimanja u obzir uticaja faktora pre tretmana.

Do objavljivanja rezultata studije Hehlmann R. i sar. (108) veliki molekularni odgovor nije bio potvrđen kao marker koji zamenjuje ukupno preživljavanje. To je bila prva studija koja je pokazala značajnu prednost u ukupnom preživljavanju za pacijente koji su postigli veliki molekularni odgovor posle 12 meseci terapije. Ovo je važno za pacijente, jer se veliki

molekularni odgovor može odrediti PCR testiranjem na uzorku periferne krvi i na taj način se izbegava potreba za punkcijom koštane srži. Pored toga, ako se obavlja na standardizovan način u standardizovanim laboratorijama, molekularno praćenje bi trebalo da bude pouzdanije od citogenetskog praćenja. Iako izgleda da prognostička moć velikog molekularnog odgovora posle 12 meseci nije bolja od kompletne citogenetske remisije posle 12 meseci, noviji podaci pokazuju da veliki molekularni odgovor i molekularni odgovor od 0,1% do 1% na međunarodnoj skali mogu da se koriste u budućnosti, kao markeri koji zamenjuju preživljavanje kod pacijenata koji se prate.

Palandri F. i sar. (124) su analizirali stepen molekularnog odgovora pacijenata koji su postigli i održali stabilan kompletan citogenetski odgovor tokom terapije. Od ukupnog broja analiziranih pacijenata njih 78% su ostvarili veliki molekularni odgovor, koji je bio stabilan u 38% pacijenata, dok je varirao od velikog do manje od velikog u 17% i od velikog do nedetektabilnog u 23% pacijenata. Procenat pacijenata koji su postigli veliki molekularni odgovor se stalno povećavao od 3 meseca (29%) do 36 meseci (70%) i dostigao plato posle toga (68%). Isti autori su zaključili da su skoro svi pacijenti koji nikada nisu ostvarili veliki molekularni odgovor tokom vremena izgubili kompletan citogenetski odgovor i na taj način su podržali prethodne izveštaje i koncept da bolja molekularna remisija dovodi do boljeg ishoda bolesti. Međutim, Palandri F. i sar. su primetili da znatan deo pacijenata od 21% sa stabilnim kompletnim citogenetskim odgovorom nikada nisu bili postigli veliki molekularni odgovor. S druge strane, u 24% pacijenata sa stabilnim kompletnim citogenetskim odgovorom, molekularni odgovor je postajao povremeno nedetektabilan na RQ-PCR. Iako ovi rezultati ne osporavaju indikacije za praćenje i prognostičku vrednost molekularnog odgovora, oni upozoravaju da molekularni odgovor može oscilirati tokom vremena i da su za njegovo praćenje potrebne standardizovane laboratorijske procedure.

Rezultati studije Cortes J. i sar. (125) imali su za cilj da odrede stopu i postojanost molekularnog odgovora na imatinib kao i njegov prognostički značaj. Veliki molekularni odgovor je bio postignut kod 62%, a transkripti su bili postali nedetektabilni najmanje jednom kod 34% pacijenata. Veliki molekularni odgovor se održavao kod 72% pacijenata, dok se kompletan molekularni odgovor održavao u gotovo polovine pacijenata. U skoro trećine ovih pacijenata, uzrok za gubitak molekularnog odgovora je bio prekid terapije. Kod većine pacijenata gubitak molekularnog odgovora nije značio i gubitak citogenetske remisije. U grupi pacijenata koji su postigli veliki molekularni odgovor, samo je 5% izgubilo kompletnu citogenetsku remisiju, u poređenju sa 37% pacijenata koji nisu bili postigli taj nivo molekularnog odgovora. Pacijenti koji su postigli veliki molekularni odgovor posle 12 meseci od početka terapije imali su signifikantno duže trajanje citogenetske remisije nego oni bez ovog stepena molekularnog odgovora. Isti autori su pokazali da je postojao visok rizik od gubitka citogenetske remisije sa većim povećanjem merljive molekularne bolesti (tj., >2 -log povećanja ili apsolutnog povećanja >1), ali je rizik posebno bio visok za pacijente koji nisu postigli veliku molekularnu remisiju.

U ovom istraživanju analiziran je molekularni monitoring pacijenta sa ciljem da se odredi stepen molekularnog odgovora na imatinib i njegov uticaj na trajanje kompletnog citogenetskog odgovora. U ispitivanoj grupi pacijenata veliki molekularni odgovor postiglo je 57,14% dok 42,86% pacijenta nije postiglo ovaj nivo odgovora. U grupi pacijenata koji su postigli veliki molekularni odgovor 10% je izgubilo kompletnu citogenetsku remisiju tokom praćenja, u odnosu na gubitak kompletnog citogenetskog odgovora od 40% u grupi pacijenata koji nisu postigli taj nivo molekularnog odgovora.

U studiji Cortes J. i sar. (125) analizirane su kliničke karakteristike pacijenata pre tretmana udružene sa postizanjem molekularnog odgovora. Karakteristike udružene sa većom mogućnošću postizanja velikog molekularnog odgovora uključivale su: niži procenat perifernih blasta, manje od 5% blasta u koštanoj srži, nizak Sokal skor rizik, lečenje sa višim dozama imatiniba i lečenje u ranoj hroničnoj fazi. Multivarijantna analiza je utvrdila da je jedino lečenje visokim dozama imatiniba bilo udruženo sa povećanom mogućnošću postizanja velikog molekularnog odgovora. Univarijantna i multivarijantna analiza su identifikovale niži procenat Ph-pozitivnih metafaza $\leq 90\%$ na početku terapije kao jedinu varijablu udruženu sa kompletnim molekularnim odgovorom. Međutim, ukupna stopa velikog i kompletnog molekularnog odgovora nije se razlikovala između pacijenata lečenih standardnim naspram visokim dozama imatiniba. Obzirom da se pacijenti sa standardnim dozama duže prate i da oni poboljšavaju svoj citogenetski i molekularni odgovor sa nastavkom terapije, potrebne su dalje analize da se utvrdi da li postoji apsolutna razlika u molekularnom odgovoru u odnosu na visoke doze imatiniba.

U ovom istraživanju je analizirana povezanost karakteristika pacijenata pre tretmana i kasnije mogućnosti za postizanje velikog molekularnog odgovora tokom terapije inhibitorima tirozin kinaze ali su rezultati bili nešto drugačiji. Primenjena je univarijantna analiza i izdvojeni su sledeći nezavisni prognostički faktori koji dovode do postizanja velikog molekularnog odgovora: manje od 4% bazofila u perifernoj krvi, manje od 5% blasta u koštanoj srži kao i nizak Euro skor rizika ($p < 0,05$).

Analizom stepena molekularnog odgovora u različitim vremenskim intervalima kao i faktora koji predviđaju postizanje različitih nivoa molekularnog odgovora bavila se studija Hughes T. i sar. (126). Po rezultatima ove studije veliki molekularni odgovor je postiglo 45% pacijenata posle 12 meseci, a 64% pacijenata posle 24 meseca terapije imatinibom. Oni su još ispitivali koji su prediktivni faktori za postizanje molekularnog odgovora posle 24 meseca terapije. Univarijantna analiza je identifikovala: Sokal skor rizika, Hasford skor rizika, veličinu slezine, procenat Ph-pozitivnih ćelija, kao i dozu imatiniba tokom prvih 12 meseci terapije, kao faktore značajno udružene sa postizanjem velikog molekularnog odgovora. U multivarijantnoj analizi veličina slezine i doza imatiniba su bili značajno udruženi sa postizanjem velikog molekularnog odgovora. Kod pacijenata koji su imali slezinu manju od 5 cm ispod rebarnog luka u nivou MKL, 78% je postiglo veliki molekularni odgovor posle 24 meseca, a kod pacijenata koji su imali veću slezinu njih 46% je postiglo isti nivo odgovora u

analiziranom periodu. Postojao je znatno viši procenat pacijenata koji su postigli veliki molekularni odgovor posle 24 meseca u grupi koja je lečena sa 600mg/800mg imatiniba od 82% u odnosu na grupu pacijenata koja je lečena standardnom dozom imatiniba u kojoj je stopa ovog nivoa odgovora iznosila 33%.

U ovom istraživanju univarijantom analizom identifikovani su bazofili u perifernoj krvi, blasti u koštanoj srži i Euro skor rizika kao faktori značajno udruženi sa postizanjem velikog molekularnog odgovora. Kod pacijenata koji su imali bazofile u perifernoj krvi manje od 4%, njih 85% su postigli veliki molekularni odgovor, a kod pacijenata koji su imali viši nivo perifernih bazofila njih 15% je postiglo isti nivo odgovora u analiziranom periodu. Postojao je značajno viši procenat pacijenata koji su postigli veliki molekularni odgovor od 90% u grupi koja je imala manje od 5% blasta u koštanoj srži, u odnosu na grupu pacijenata koja je imala više vrednosti blasta u koštanoj srži i u kojoj je stopa ovog nivoa molekularnog odgovora iznosila 10%. Pacijenti sa visokim Euro skorom rizika postigli su veliki molekularni odgovor samo u 5% slučajeva.

Press RD. i sar. (127) su izvestili o rezultatima molekularnog monitoringa posle postizanja kompletnog citogenetskog odgovora kod pacijenata lečenih imatinibom: 42% pacijenata su postigli najmanje redukciju od 2-loga u trenutku prvog postizanja kompletnog citogenetskog odgovora. Nakon što je bio postignut kompletan citogenetski odgovor, nivoi BCR-ABL transkripta su progresivno opadali, tokom minimum narednih 15 meseci, dok je 49% pacijenata konačno postiglo najmanje 3-log redukciju. Postizanje ili molekularnog odgovora sa 2-log redukcije u vreme kompletnog citogenetskog odgovora ili odgovora sa 3-log redukcije bilo kada tokom tretmana je značajan i nezavistan prognostički marker kasnijeg preživljavanja bez progresije. U njihovoj seriji pacijenata bio je sproveden regularni PCR monitoring, a rezultati su pokazali da u periodu posle 12 meseci terapije njih 29% je postiglo veliku molekularnu remisiju koja je porasla na 64% posle 24 meseca. Od ukupnog broja pacijenata sa velikim molekularnim odgovorom 16% je kasnije relapsiralo, u poređenju sa 57% relapsa u grupi pacijenata koji nikada nisu postigli veliki molekularni odgovor.

U svojim daljim radovima Press RD. i sar. (128) su pokazali da je veliki molekularni odgovor bio postignut kod 84% pacijenata, od toga je 16% relapsiralo i ovaj odgovor je bio značajan pokazatelj prolongiranog preživljavanja bez progresije. Gubitak velikog molekularnog odgovora koji se dogodio kod 43% pacijenata od čega je relapsiralo 14%, bio je pokazatelj kraćeg preživljavanja bez recidiva. Kod pacijenata sa hroničnom mijeloidnom leukemijom koji su na terapiji imatinibom postigli kompletan citogenetski odgovor, porast 0,5-log BCR-ABL transkripta uključujući i gubitak velikog molekularnog odgovora, je značajan faktor rizika za budući recidiv.

Međutim nisu sve studije u saglasnosti sa izveštajima da postizanje velikog molekularnog odgovora doprinosi poboljšanju preživljavanja bez progresije. Marin D. i sar. (129) su retrospektivno primenili kriterijume European LeukemiaNet-a iz 2006. godine u grupi pacijenata sa HML lečenih imatinibom ali nisu uspeali da potvrde ulogu velikog molekularnog

odgovora posle 12 ili 18 meseci terapije kao pozitivnog prognostičkog indikatora za 5-godišnje preživljavanje bez progresije. Kod pacijenata sa kompletnim citogenetskim odgovorom koji nisu uspeali da postignu veliki molekularni odgovor posle 12 ili 18 meseci terapije bilo je izglednije da će izgubiti svoj kompletan citogenetski odgovor nego pacijenti koji su postigli veliki molekularni odgovor 23,6% naspram 2,6%.

Molekularni monitoring obezbeđuje vrednu informaciju za praćenje pacijenata sa HML u hroničnoj fazi lečenih imatinibom. Postizanje velikog molekularnog odgovora korelira sa poboljšanom mogućnošću dugotrajne citogenetske remisije, posebno kada je postignut rano tokom terapije. Većina velikih molekularnih remisija su dugotrajne i porast BCR-ABL transkripta ne mora da znači gubitak citogenetske remisije za većinu pacijenta sa molekularnim odgovorom. Tako da najvažniji cilj terapije imatinibom treba da bude postizanje ranog velikog molekularnog odgovora.

Angiogeneza ima važnu ulogu u rastu tumora, širenju i metastazama solidnih tumora. Angiogenezni faktori i angiogeneza igraju značajnu ulogu u nastanku i toku nekih leukemija, akutne mijeloidne i limfoblastne leukemije, hronične mijeloidne leukemije, kao i mijelodisplastičnog sindroma. Detekcija angiogeneznih receptora u leukemijskim ćelijskim linijama sugerše da angiogenezni faktori mogu imati direktan uticaj na vaskularnost koštane srži kao i na ćelije leukemije.

Studija Aguayo A. i sar. (22) je ispitivala vaskularnost i nivoe angiogeneznih faktora (VEGF, bFGF, TNF- α , TGF- α i HGF) kod pacijenata sa akutnim i hroničnim leukemijama i mijelodisplastičnim sindromom, pokazavši da je prokrvljenost bila značajno viša u ovim bolestima u poređenju sa kontrolnom grupom. Najveći broj krvnih sudova i najveća vaskularna površina pronađeni su u hroničnoj mijeloidnoj leukemiji. Ovi rezultati pokazuju složenu prirodu interakcije između angiogeneznih faktora i strome koštane srži u leukemijskom procesu. Isti autori nisu dokazali direktnu korelaciju između nivoa jednog pojedinačnog angiogeneznog faktora i broja krvnih sudova. To pokazuje da i drugi faktori strome koštane srži ili leukemijskog procesa mogu biti važni u određivanju nivoa vaskularnosti u ovim bolestima ili da kombinacija dva ili više faktora može biti odgovorna za ukupnu vaskularnost.

Druga grupa autora Lundberg LG. i sar. (130) su objavili rezultate svog istraživanja u kome su pokazali da su hronična mijeloidna leukemija i mijelofibroza povezane sa povećanom gustinom krvnih sudova u koštanoj srži u odnosu na koštane srži zdravih ispitanika. Oni su pokazali da postoji izrazito povećanje broja ćelija sa pozitivnim bojenjem na VEGF u ovim bolestima, sugeršući da bi VEGF mogao biti važan signalni molekul za angiogenezu. Štaviše, arhitektura vaskulature se jasno razlikovala od normalne arhitekture jer je bila izrazito vijugava i razgranata.

Istraživanje Korkolopoulou P. i sar. (67) je prvo u literaturi analiziralo više morfometrijskih mikrovaskularnih karakteristika pored mikrovaskularne gustine kod pacijenata sa HML u

odnosu na kliničko-patološke parametre i preživljavanje. Istraživanje je značajno u razjašnjavanju određenih aspekata evolucije bolesti i razumevanju kliničkog značaja angiogeneze kod pacijenata sa HML. Komparacija morfolometrijskih varijabli između ispitivanih grupa pacijenata pokazala je da su vrednosti MVD i veličina povezanih parametara (površina, obim, mala i velika dužina ose, TVA i slučajni prečnik) bili viši u hroničnoj fazi HML nego u kontrolnoj grupi. Kontrolna grupa je pokazala manji stepen grananja krvnih sudova u poređenju sa HML. Neželjeni efekat povećanog kalibra krvnih sudova i MVD je agresivni brzi rast neoplastične populacije koji dovodi do hipoksije. Hipoksija je važan podsticaj za proizvodnju VEGF što dovodi do prekomerne angiogeneze u smislu veličine i broja krvnih sudova da bi se povratila koncentracija kiseonika u tkivu.

Isti rezultati dobijeni su i u ovom istraživanju posle izvršene evaluacije morfolometrijskih parametara angiogeneze između grupe pacijenata sa hroničnom mijeloidnom leukemijom i kontrolne grupe. Mikrovaskularna gustina i veličina zavisni morfolometrijski parametri, velika i mala dužina ose, površina, obim i slučajni prečnik bili su značajno viši kod pacijenata sa hroničnom fazom HML. Pored toga, i oblik zavisni parametri cirkularnost, odnos oblika, zaobljenost i punoća krvnoga suda su bili značajno viši u grupi pacijenata sa HML. Uočene su značajne razlike u vaskulaturi koštane srži, sa povećanjem broja krvnih sudova velikog kalibra i nepravilnog oblika u grupi sa HML, nasuprot malom broju jednostavnih i pravih mikrosudova u kontrolnoj grupi.

Analiza Korkolopoulou P. i sar. (67) koja je proučavala udruženost morfolometrijskih varijabli sa kliničko-patološkim karakteristikama pacijenata sa hroničnom fazom HML pokazala je da nijedna od morfolometrijskih varijabli nije bila povezana sa starošću, polom, veličinom slezine, kariotipom, citogenetskim odgovorom, nivoom hemoglobina i brojem trombocita, procentom blasta, eozinofila ili bazofila. Broj belih krvnih zrnaca je pozitivno korelirao sa faktorom oblika a negativno sa kompaktnošću. Ekstenzivna fibroza koštane srži je bila praćena većom MVD. Korelacija između različitih morfolometrijskih varijabli u HML je pokazala da postoji slaba negativna korelacija između broja krvnih sudova i veličina zavisnih parametara (površina, obim, mala i velika dužina ose, slučajni prečnik). Vrednost granjanja je pozitivno korelirala sa MVD i TVA.

Nasuprot tome, rezultati ovog istraživanja su pokazali da postoji značajna negativna korelacija između postignutog kompletnog citogenetskog odgovora i vrednosti mikrovaskularne gustine, dužine male ose i površine krvnoga suda. Analiza je pokazala da postoji značajna negativna korelacija između kompletnog citogenetskog odgovora i cirkularnosti, zaobljenosti i punoće krvnoga suda, ali i značajna pozitivna korelacija sa odnosom oblika. Ispitivanje odnosa velikog molekularnog odgovora i angiogeneznih parametara ukazalo je na postojanje značajne negativne korelacije između vrednosti mikrovaskularne gustine, dužine male ose i obima krvnoga suda i ispitivanog nivoa molekularnog odgovora. Nije nađena statistički značajna korelacija između postignutog

velikog molekularnog odgovora i analiziranih oblik zavisnih morfometrijskih parametara angiogeneze.

U istom radu Korkolopoulou P. i sar. (67) su ispitivali prognostički značaj morfometrijskih varijabli u HML u odnosu na progresiju bolesti i preživljavanje. Univarijantna analiza je identifikovala da su starost pacijenta preko 70 godina, veličina slezine preko 3cm ispod rebarnog luka u nivou MKL, MVD, mala dužina ose, površina, TVA i broj trombocita bili jedini parametri koji negativno utiču na vreme do progresije, dok je fibroza koštane srži dostigla granični značaj u tom pogledu. Multivarijantna analiza je ukazala da je trajanje hronične faze nezavisno od broja trombocita, starosti pacijenta, kariotipa i površine. Što se tiče preživljavanja, univarijantna analiza je identifikovala sedam značajnih parametara: MVD, malu dužinu ose, površinu, TVA, broj trombocita, starost pacijenta i veličinu slezine. Pacijenti stariji od 70 godina pri dijagnozi sa splenomegalijom, trombocitozom i povišenim vrednostima angiogeneznih parametara su pokazali tendenciju ka lošijem ishodu.

U ovom istraživanju ispitivan je prognostički značaj morfometrijskih varijabli kod pacijenata sa HML u odnosu na postignut ukupan kompletan citogenetski i veliki molekularni odgovor. Univarijantna analiza je izdvojila vrednost mikrovaskularne gustine manju od 9/HPF, malu dužinu ose manju od 10 μm , površinu manju od 350 μm^2 , cirkularnost manju od 0,5, odnos oblika manji od 3,5 i zaobljenost krvnoga suda manju od 0,35 kao značajne morfometrijske parametre za postizanje ukupnog kompletnog citogenetskog odgovora. Što se tiče mogućnosti postizanja velikog molekularnog odgovora univarijantna analiza je identifikovala jedino vrednost mikrovaskularne gustine manju od 9/HPF, kao morfometrijski parametar sa značajnom statističkom značajnošću za postizanje ovog nivoa odgovora. Identifikovani su i morfometrijski prediktivni faktori za postizanje kompletnog citogenetskog odgovora u različitim vremenskim intervalima. Sa visokim stepenom statističke značajnosti izdvojeni su pozitivni prognostički faktori posle 6 i 18 meseci terapije, površina krvnoga suda manja od 350 μm^2 , cirkularnost manja od 0,5 i zaobljenost krvnoga suda manja od 0,35, dok su posle 12 meseci terapije osim ovih prognostičkih faktora izdvojeni i velika dužina ose manja od 35 μm , mala dužina ose manja od 10 μm , obim manji od 85 μm i odnos oblika veći od 3,5.

Izneti rezultati Korkolopoulou P. i sar. (67) jasno potvrđuju da postoji povišen broj malih krvnih sudova, više vrednosti veličina zavisnih parametara i da postoje morfološke varijabilnosti vaskularne mreže, kod pacijenata sa HML u poređenju sa kontrolnom grupom. Ovi nalazi pokazuju da je angiogeneza najizraženija u hroničnoj fazi HML kao rezultat formiranja širokih sinusoidnih prostora. Rezultati istraživanja ovih autora podržavaju hipotezu da stvaranje novih krvnih sudova može biti od suštinske važnosti za konverziju normalne koštane srži u HML i na kraju do razvoja blastne krize. Po prvi put je bilo pokazano da se prognostički značaj angiogeneze u HML bolje procenjuje veličinom malih krvnih sudova, dok MVD bila uticajna samo u pogledu preživljavanja.

Istraživanja su pokazala da je nivo serumskog VEGF bio mnogo viši u HML nego u bilo kojoj drugoj vrsti leukemije i da je ekspresija VEGF naročito bila izražena u megakariocitima kod

HML. S druge strane, poznato je da mijeloidni blasti i druge nezrele mijeloidne ćelije generišu proizvodnju VEGF putem parakrinih ili autokrinih mehanizma (22, 141). Mehanizam angiogeneze u ovoj bolesti zasniva se na podacima koji ukazuju da su endotelne ćelije u HML klonske i da se umnožavaju brže i imaju produžen životni vek zahvaljujući suzbijanju apoptoze. Mehanizam angiogeneze koštane srži u HML je složen i nije još u potpunosti razjašnjen fenomen (132).

U literaturi su dostupni podaci o promenama u koštanoj srži posle primene terapije imatinibom, koji pokazuju da dolazi do kvantitativne normalizacije celularnosti i eritrocitopoeze sa izraženim smanjenjem neutrofilnih granulocita, sa značajnim smanjenjem broja megakariocita i upečatljivom regresijom sadržaja fibrinskih vlakana, kao i Ph pozitivne hematopoeze (73, 133, 134). Istraživanje Thiele J. i sar. (135) je bilo fokusirano na proceni koštane srži u različitim fazama HML tokom dugoročnog tretmana imatinibom. Kod pacijenata sa hroničnom fazom HML terapija dovodi do značajnog smanjenja celularnosti, neutrofilnih granulocita i broja megakariocita, dok su promene u eritrocitopoezi bile manje upadljive. Značajne su bile promene morfologije megakariocita u skladu sa značajnim smanjenjem defekata u sazrevanju što je podrazumevalo manju količinu atipičnih mikromegakariocita i pronalaženje srednjih i velikih megakariocita tokom terapije. Štaviše, detektovano je smanjenje početne mikrovaskularne gustine koje je bilo udruženo sa smanjenjem distenzije vaskularnog lumena.

Studija Kvasnicka HM. i sar. (68) koja je ispitivala efekat terapije imatinibom na angiogenezu i mijelofibrozu kod pacijenata sa HML u hroničnoj fazi bez drugog pretretmana, pokazala je značajno smanjenje mikrovaskularne gustine, odnosno normalizaciju u poređenju sa kontrolama, što je bilo povezano sa kompletnim citogenetskim odgovorom. Shodno tome, kod pacijenata sa kompletnim molekularnim odgovorom bila je otkrivena normalizacija mikrovaskularne gustine. Značajna regresija fibroze koštane srži, zajedno sa izraženim smanjenjem megakariocita bila je zabeležena u većini pacijenata koji su lečeni imatinibom. Pošto imatinib utiče na aktivnost receptora za trombocitni-izvedeni faktor rasta, normalizacija vaskularnih struktura i gustine vlakana mogu biti pod uticajem efekta izvršenim na megakariocitopoezu neutralizacijom njenih stimulativnih funkcija na stromu koštane srži (73, 135).

U studiji Ebos JM. i sar. (72) je ubedljivo bilo pokazano da imatinib smanjuje BCR-ABL-posredovanu sekreciju VEGF, koji je uglavnom odgovoran za angiogenezne efekte ovog leka. Značajna korelacija između broja VEGF+ ćelija koštane srži i MVD je bila podržana od strane odgovarajućeg pada nivoa VEGF u plazmi pacijenata sa smanjenjem vaskularnosti. Rezultati eksperimentalnih studija potvrđuju pretpostavku da imatinib selektivno inhibira rast ili senzitiviranje BCR/ABL pozitivnih ćelija na apoptozu i da izaziva dalju diferencijaciju leukemijskih prekursora (136). Smatra se da je ovaj mehanizam odgovoran za hematološki i citogenetski efekat ovog leka. Posle terapije imatinibom primećeno je značajno smanjenje proliferativne aktivnosti i tendencija ka višoj stopi apoptoze samo kod pacijenata koji

reaguju na terapiju. Konačno, broj nezrelih ćelija, uključujući i CD34+ progenitore i mijeloblaste opada brzo kod pacijenata u fazi akceleracije i blastne transformacije kao i kod pacijenata koji su doživeli relaps leukemije tokom tretmana imatinibom (137).

Prognoza zasnovana na ranom odgovoru na terapiju inhibitorima tirozin kinaze je izdvojila kompletan citogenetski odgovor i veliki molekularni odgovor posle 6, 12 i 18 meseci terapije kao prognostičke indikatore koji koreliraju sa kliničkim ishodom. Studija Cardema A. i sar. (106) je procenjivala da li postizanje ranog odgovora pruža prognostičku prednost. Njihovi rezultati su ukazali da je neuspeh da se postigne kompletan citogenetski odgovor u prvih 12 meseci terapije imatinibom bio povezan sa višim stopama progresije bolesti i da je ovaj rizik bio zapažen rano u toku terapije imatinibom. Verovatnoća postizanja kompletnog citogenetskog odgovora polako se smanjivala ako ovaj odgovor još uvek nije bio postignut posle 3, 6 i 12 meseci terapije imatinibom, sa sličnim smanjenjem verovatnoće postizanja velikog molekularnog odgovora. Druker BJ. i sar. (5) su pokazali da je rani odgovor na imatinib imao značajnu povezanost sa preživljavanjem bez događaja i smanjenu mogućnost progresije u fazu akceleracije ili blastne krize. Pacijenti koji su imali kompletan citogenetski odgovor posle 12 meseci od početka terapije imatinibom, posle 60 meseci praćenja u 97% slučajeva nisu bili progredirali u fazu akceleracije ili blastne krize. U radu Hasford J. i sar. (28) bilo je pokazano da je postizanje kompletnog citogenetskog odgovora unutar 18 meseci osnovni rani pokazatelj ishoda. Među pacijentima koji su bili praćeni najmanje 36 meseci i kod kojih je procenjivan kompletan citogenetski odgovor, procenat pacijenata koji su bili postigli kompletnu citogenetsku remisiju je rastao tokom vremena: od 7% posle 3 meseca do 31% posle 6 meseci, 65% posle 9 meseci, 74% posle 12 meseci, 82% posle 15 meseci do postizanja 85% posle 18 meseci.

Zbog razlika u kliničkoj agresivnosti između početne hronične faze i uznapredovale faze HML i zbog toga što prognoza HML može značajno varirati čak i među pacijentima u istoj fazi bolesti, razvijeno je nekoliko prognostičkih pokazatelja u pokušaju da se predvidi ishod bolesti i da se napravi plan za individualno lečenje pacijenata sa HML. Kao prognostički pokazatelji pri dijagnozi, uobičajeno se koriste neki od dostupnih prognostičkih scoring sistema kao što su Sokal, Euro ili nedavno razvijen EUTOS skor. Prognostički uticaj dodatnih citogenetskih aberacija i varijantna translokacija, kao i farmakokinetika imatiniba, uzimaju se u obzir.

Pre trideset godina Sokal skor je izveden iz rezultata lečenja pacijenata sa HML, primenom konvencionalne hemioterapije koja više nije u upotrebi. Ovaj scoring sistem je ustanovio tri prognostičke grupe, od kojih je svaka bila sa signifikantno različitim predviđenim dugoročnim ishodom. Nisko rizična grupa pacijenata imala je stopu 2-godišnjeg preživljavanja od 90% i prosečnu stopu smrtnosti tokom narednih 5 godina od 19% po godini. Visoko rizična grupa imala je 2-godišnje preživljavanje od 65%, praćeno prosečnom stopom smrtnosti od 35% godišnje (3).

Hasford J. i sar. (27) su razvili prognostički scoring sistem koji odražava procenjeno preživljavanje pacijenata sa HML lečenih interferonom- α . Među analiziranim pacijentima, tri različite rizične grupe su bile identifikovane: grupa niskog, intermedijarnog i visokog rizika, sa srednjom medijanom preživljavanja od 98 meseci, 65 meseci i 42 meseca. Stopa 5-godišnjeg preživljavanja u grupi niskog rizika bila je 73%, u intermedijarnoj grupi iznosila je 55%, dok je u grupi pacijenata visokog rizika bila 37%.

Rezultati lečenja hronične mijeloidne leukemije su se značajno promenili uvođenjem inhibitora tirozin kinaze u terapiju, što je dovelo do potrebe razvoja novih prognostičkih sistema. Hasford J. i sar. (28) su 2011. godine izveli novi prognostički scoring sistem koji je superiorniji od Sokal i Euro skora u prognostičkim mogućnostima i u jednostavnosti. EUTOS skor predviđa da će 34% visoko rizičnih pacijenata postići kompletnu citogenetsku remisiju posle 18 meseci terapije. On predviđa preživljavanje bez progresije posle 5 godina, koje iznosi 82% u visoko rizičnoj grupi i 90% u nisko rizičnoj grupi (28).

Međutim, nisu sve studije bile u mogućnosti da dokažu vrednost EUTOS skora. Najpre je studija Marin D. i sar. (138) pokazala da na njihovoj grupi pacijenata novo razvijeni EUTOS skor nije predvideo ishod, ukupno preživljavanje i preživljavanje bez progresije kao ni kumulativnu incidencu kompletnog citogenetskog odgovora i velikog molekularnog odgovora (naime: OS $p=0,1$; PFS $p=0,24$; CCgR $p=0,35$; i MMoR $p=0,15$). U isto vreme, Sokal skor je signifikantno predvideo sve ove ishode (OS $p=0,001$; PFS $p=0,002$; CCgR $p=0,001$; i MMoR $p=0,05$). Drugu negativnu proveru vrednosti su objavili Jabbour E. i sar. (139) koju su sprovedi na svojoj grupi pacijenata lečenih prvom i drugom generacijom inhibitora tirozin kinaze. Autori su bili zaključili da nije bilo razlike u stopama velikog molekularnog odgovora (85% naspram 81% $p=0,48$), preživljavanju bez transformacije ($p=0,49$), preživljavanju bez događaja ($p=0,71$) ili ukupnom preživljavanju ($p=0,88$) između pacijenata sa niskim i visokim EUTOS skorom. Konačno, Yamamoto E. i sar. (140) su sprovedi multicentričnu studiju da bi potvrdili efikasnost EUTOS skora. U grupama pacijenata sa niskim i visokim rizikom, kumulativna incidence kompletnog citogenetskog odgovora posle 18 meseci bila je 86,9% i 87,5% ($p=0,797$), a 5-godišnja stopa ukupnog preživljavanja bila je 92,6% i 93,3% ($p=0,871$). Kumulativna incidence kompletnog citogenetskog odgovora posle 12 meseci, 5-godišnje preživljavanje bez transformacije i 5-godišnje preživljavanje bez događaja nisu bili predviđeni korišćenjem EUTOS scoring sistema.

Na osnovu iznetih podataka može se zaključiti da je korist od prognostičkih scoring sistema ograničena, jer su oni bazirani na kliničkim pokazateljima i nisu udruženi sa molekularnim i genetskim karakteristikama. Sweet K. i sar. (141) analizirali su prognostičke indikatore pri dijagnozi i indikatore posle prvobitnog tretmana i zaključeno je da su kliničke karakteristike pri dijagnozi, dubina ranog citogenetskog i molekularnog odgovora, kao i prisustvo mutacija kinaznog domena i farmakokinetički markeri značajni za odluku o individualnom optimalnom terapijskom pristupu.

U kontekstu hematoloških maligniteta povećanje angiogeneze koštane srži je dokazano u multiplom mijelomu, hroničnoj mijeloidnoj leukemiji, akutnoj mijeloidnoj i limfoblastnoj leukemiji, kao i u mijelodisplastičnom sindromu i nađeno je da ima prognostičku vrednost. Istraživanja Aguayo A. i sar. i Lundberg LG. i sar. (22, 140) jasno potvrđuju da postoji povišen broj krvnih sudova koštane srži kod pacijenta sa hroničnom mijeloidnom leukemijom u odnosu na normalne kontrole. Istraživanje Korkolopoulou i sar. (67) je prvo u literaturi demonstriralo prognostički značaj angiogeneze u HML sa akcentom na potencijalne vrednosti anti-angiogenezne terapije u odlaganju ili čak sprečavanju progresije bolesti.

U skladu sa osnovnim istraživačkim ciljevima disertacije, razmatran je značaj uključivanja morfometrijskih parametara u prognostičke modele bazirane na dokazano uticajnim kliničkim parametrima pacijenata, u cilju predviđanja dostizanja optimalnih terapijskih odgovora. S obzirom da su klinički značajni ishodi odnosno optimalni terapijski odgovori kod hronične mijeloidne leukemije definisani kao binomne varijable (odsustvo ili prisustvo kompletnog citogenetskog i velikog molekularnog odgovora), korišćeni su modeli logističke regresije. U cilju poboljšanja prediktivne moći logističkih regresionih modela, morfometrijski parametri angiogeneze u vreme postavljanja dijagnoze su dodati EUTOS skor. Analiza je izvršena za kompletan citogenetski i veliki molekularni odgovor, tako što je EUTOS skor dodavan po jedan morfometrijski parametar izabran na osnovu stepena statističke značajnosti i kliničkog iskustva.

U cilju predviđanja kompletnog citogenetskog odgovora posle 6 meseci terapije, metodom maksimalne verovatnoće utvrđeno je da model koji uključuje morfometrijski parametar malu dužinu ose krvnoga suda zajedno sa EUTOS skorom je superioran u odnosu na model koji uključuje samo EUTOS skor, (χ^2 -test, s.s.1=5,13; $p=0,024$). Model koji uključuje morfometrijski parametar cirkularnost krvnoga suda pored EUTOS skora je superioran u predviđanju kompletnog citogenetskog odgovora posle 6 meseci terapije imatinibom u odnosu na model koji sadrži samo EUTOS skor (χ^2 -test, s.s.1=4,74; $p=0,029$).

Urađeno je poređenje prediktivnih modela za predviđanje kompletnog citogenetskog odgovora posle 12 meseci terapije imatinibom. Metodom maksimalne verovatnoće utvrđeno je da su svi modeli koji pored EUTOS skora uključuju morfometrijske parametre mikrovaskularnu gustinu, dužinu male ose, površinu i cirkularnosti krvnoga suda su nadmoćni u odnosu na model samo sa EUTOS skorom (χ^2 -test, s.s.1=7,1; $p=0,008$; s.s.1=11,5; $p=0,001$; s.s.1=9,88; $p=0,002$; s.s.1=6,4; $p=0,011$).

Slični rezultati dobijeni su i analizom prediktivnih modela za predviđanje kompletnog citogenetskog odgovora posle 18 meseci terapije imatinibom. Primenjenom metodom maksimalne verovatnoće utvrđeno je da su svi modeli koji pored EUTOS skora uključuju morfometrijske parametre mikrovaskularnu gustinu, dužinu male ose, površinu i cirkularnost krvnoga suda, su bolji u odnosu na model samo sa EUTOS skorom (χ^2 -test, s.s.1=6,46; $p=0,011$; s.s.1=7,13; $p=0,008$; s.s.1=4,45; $p=0,035$; s.s.1=8,66; $p=0,003$).

Posle toga je u ovom istraživanju urađeno poređenje prediktivnih modela za predviđanje ukupnog kompletnog citogenetskog odgovora na terapiju. Metodom maksimalne verovatnoće utvrđeno je da su svi modeli koji pored EUTOS skora uključuju morfometrijske parametre mikrovaskularnu gustinu, dužinu male ose, površinu i cirkularnost krvnoga suda, su superiorni u odnosu na model koji sadrži samo EUTOS skor (χ^2 -test, s.s.1=10,79; p=0,001; s.s.1=10,65; p=0,001; s.s.1=7,00; p=0,008; s.s.1=7,99; p=0,005).

Konačno izvršena je analiza prediktivnih modela za predviđanje velikog molekularnog odgovora na terapiju. Primenjenom metodom maksimalne verovatnoće utvrđeno je da su svi modeli koji pored EUTOS skora uključuju morfometrijske parametre mikrovaskularnu gustinu, dužinu male ose, površinu i cirkularnost krvnoga suda, su superiorni u odnosu na model samo sa EUTOS skorom (χ^2 -test, s.s.1=16,56; p=0,000; s.s.1=17,89; p=0,000; s.s.1=11,98; p=0,001; s.s.1=5,78; p=0,016).

Ovo istraživanje pokazalo je da se korišćenjem morfometrijskih parametara koji su dostupni u trenutku postavljanja dijagnoze hronične faze HML može poboljšati predviđanje kompletnog citogenetskog odgovora i velikog molekularnog odgovora na terapiju imatinibom, u odnosu na standardni prognostički scoring sistem - EUTOS skor. U ovom istraživanju EUTOS skor je pokazao očekivanu prednost nad drugim kliničkim i laboratorijskim parametrima i prognostičkim scoring sistemima. Odnos pacijenata koji su postigli kompletan citogenetski odgovor posle 12 i 18 meseci terapije imatinibom u ovoj studiji bio je sličan (72,5% i 80%) kao i u EUTOS populaciji, kao i prediktivna vrednost EUTOS skora (33,33% u ovom istraživanju naspram 34% u EUTOS studiji). Međutim, rezultati postignuti u ovom istraživanju ukazuju da dodavanje pojedinačnih morfometrijskih parametara angiogeneze EUTOS skorom povećava tačnost predviđanja kompletnog citogenetskog i velikog molekularnog odgovora.

Ostvareni rezultati su povezani sa opservacijom prognostičkog značaja morfometrijskih parametara kod hronične mijeloidne leukemije a u vezi sa progresijom bolesti i preživljavanjem. Arhitektura vaskularne mreže kod hroničnih mijeloproliferativnih bolesti je jasno različita od normalne, a angiogeneza je posebno izražena u hroničnoj fazi hronične mijeloidne leukemije kao rezultat formiranja širokih sinusoidnih prostora. Uzgredni efekti povećanja kalibra krvnih sudova i mikrovaskularne gustine je brz i agresivan porast neoplastične populacije što dovodi do hipoksije. Hipoksija je značajan stimulans za produkciju vaskularnog endotelnog faktora rasta što dalje dovodi do ekcesivne angiogeneze u smislu povećanja veličine i broja krvnih sudova u cilju održanja količine kiseonika u tkivima. Stoga, uključivanje morfometrijskih parametara u prognostičke modele ima svoje biološko utemeljenje.

Postignuta mogućnost da se predvidi ishod pacijenta u pogledu postizanja kompletnog citogenetskog odgovora i velikog molekularnog odgovora na terapiju imatinibom bila je mnogo bolja od postignute mogućnosti da se identifikuju pacijenti koji neće postići ove nivoe odgovora. Drugim rečima, mnogo je veća senzitivnost nego specifičnost za sve

usvojene modele. Pomenuti rezultat zapravo odražava dokazanu visoku efikasnost imatiniba u ovoj grupi pacijenata, ali može ukazati i da su potrebni bolji markeri za nepostizanje kompletnog citogenetskog i velikog molekularnog odgovora kod pacijenata sa hroničnom mijeloidnom leukemijom.

7. ZAKLJUČAK

Rezultati istraživanja u okviru ove doktorske disertacije mogu se sublimirati kroz sledeće zaključke:

1. U analiziranoj grupi pacijenata sa hroničnom mijeloidnom leukemijom, stopa intermedijarnog i visokog Sokal i Euro skora bila je 60% odnosno 55%, dok je stopa visokog EUTOS skora bila 15%.
2. U ispitivanoj grupi pacijenata utvrđena je visoka kumulativna stopa kompletnog hematološkog odgovora u analiziranom periodu od 97,5%, kompletnog citogenetskog odgovora od 75% i velikog citogenetskog odgovora od 87,5%.
3. Ustanovljeno je da je od ukupnog broja pacijenata veliki molekularni odgovor postiglo 57,14%, a od toga je samo 10% izgubilo kompletnu citogenetsku remisiju tokom praćenja.
4. Registrovano je da su najznačajniji nehematološki neželjeni efekti na terapiju imatinibom koji su se desili u preko 10% slučajeva bili mučnina, retencija tečnosti, glavobolja i osećaj umora, a od hematoloških leukopenija i anemija.
5. Utvrđena je povezanost između karakteristika pacijenata pre tretmana i kasnije mogućnosti za postizanje kompletnog citogenetskog odgovora. Analiza je pokazala postojanje sledećih statistički značajnih pozitivnih prognostičkih faktora: prisustvo manje od 3% blasta u perifernoj krvi, manje od 4% bazofila u koštanoj srži, manje od 4% bazofila u perifernoj krvi.
6. Analizirana je udruženost bazičnih karakteristika pacijenata i bolesti sa velikim molekularnim odgovorom. Sa visokim stepenom statističke značajnosti identifikovano je prisustvo manje od 4% bazofila u perifernoj krvi kao pozitivan prognostički parametar za postizanje ovog nivoa molekularnog odgovora.
7. Komparacija morfometrijskih parametara između ispitivanih grupa pacijenata pokazala je da su mikrovaskularna gustina i svi ispitivani parametri veličine i oblika krvnih sudova bili viši u hroničnoj fazi hronične mijeloidne leukemije nego u kontrolnoj grupi.
8. Ispitivanje povezanosti angiogeneznih parametara i kompletnog citogenetskog odgovora pokazalo je da postoji statistički značajna negativna korelacija između

vrednosti mikrovaskularne gustine, dužine male ose, površine krvnoga suda, cirkularnosti, zaobljenosti i punoće krvnoga suda, ali i značajna pozitivna korelacija sa odnosom oblika i evaluiranog stepena citogenetskog odgovora.

9. Analizom odnosa između angiogeneznih parametara i velikog molekularnog odgovora, nađena je statistički značajna negativna korelacija između vrednosti mikrovaskularne gustine, dužine male ose, površine i obima krvnoga suda i evaluiranog stepena molekularnog odgovora.
10. Ispitivan je prognostički značaj angiogeneznih parametara u odnosu na postignut kompletan citogenetski odgovor. Analiza je identifikovala sledeće statistički značajne pozitivne prognostičke faktore za postizanje ovog nivoa odgovora: vrednost mikrovaskularne gustine manju od 9/HPF, dužinu male ose manju od 10 μm , površinu manju od 350 μm^2 , cirkularnost manju od 0,5, odnos oblika veći od 3,5 i zaobljenost krvnoga suda manju od 0,35.
11. U ovom istraživanju između angiogeneznih parametara identifikovana je vrednost mikrovaskularne gustine manja od 9/HPF kao pozitivan prognostički faktor za postizanje velikog molekularnog odgovora sa značajnom statističkom značajnošću.
12. Analizom bazičnih parametara identifikovani su faktori koji dovode do postizanja kompletnog citogenetskog odgovora u različitim vremenskim intervalima. Sa visokim stepenom statističke značajnosti izdvojeni su pozitivni prognostički faktori posle 6 meseci terapije (splenomegalija manja od 5 cm i manje od 5% blasta u koštanoj srži) i posle 12 i 18 meseci terapije (prisustvo manje od 3% perifernih blasta, manje od 4% perifernih bazofila i manje od 4% bazofila u koštanoj srži), kao i specifični prognostički faktori posle 18 meseci terapije (splenomegalija manja od 5 cm i nizak EUTOS skor rizika).
13. Identifikovani su morfometrijski prediktivni faktori za postizanje kompletnog citogenetskog odgovora. Sa visokim stepenom statističke značajnosti izdvojeni su pozitivni prognostički faktori posle 6 i 18 meseci terapije, površina krvnoga suda manja od 350 μm^2 , cirkularnost manja od 0,5 kao i zaobljenost krvnoga suda manja od 0,35, dok su posle 12 meseci terapije osim ovih prognostičkih faktora izdvojeni i velika dužina ose manja od 35 μm , mala dužina ose manja od 10 μm , obim manji od 85 μm i odnos oblika veći od 3,5.
14. Na ispitivanoj grupi pacijenata razvijeni su višestruki modeli logističke regresije sa ciljem predviđanja kompletnog citogenetskog odgovora posle 6, 12 i 18 meseci terapije, kao i za postizanje ukupnog kompletnog citogenetskog i velikog molekularnog odgovora. Za razliku od osnovnog modela koji se bazirao samo na EUTOS skoru, modeli kojima su pridodati morfometrijski parametri angiogeneze imali su superiornu predikciju terapijskog odgovora.

15. Uključivanje morfometrijskih parametra krvnih sudova zajedno sa kliničkim i laboratorijskim parametrima može poboljšati prognostičke modele za predviđanje postizanja kompletnog citogenetskog i velikog molekularnog odgovora na terapiju imatinibom.
16. Poboljšanje prognostičkih sistema značajno je jer rana identifikacija pacijenata koji neće postići kompletan citogenetski odnosno veliki molekularni odgovor, ukazuje na pacijente sa znatno većim rizikom od progresije bolesti i kraćim preživljavanjem, što može biti upozorenje za ordinirajućeg lekara na neophodnost pažljivijeg praćenja i ranije terapijske intervencije.

8. LITERATURA

1. Goldman JM, Mejo JV. Chronic myeloid leukemia-advances in biology and new approaches to treatment. *N Engl J Med* 2003; 349: 1451-64.
2. Sattler M, Griffin JD. Molecular mechanisms of transformation by the BCR-ABL oncogene. *Semin Hematol* 2003; 40: 4-10.
3. Donato NJ, Wu JY, Stapley J, Gallick G, Lin H, Arlinghaus R, et al. BCR-ABL independence and LYN kinase over expression in chronic myelogenous leukemia cells selected for resistance to STI571. *Blood* 2003; 101: 690-8.
4. Deininger M, Buchdunger E, Druker BJ. The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia. *Blood* 2005; 105: 2640-53.
5. Druker BJ, Guilhot F, O'Brien S, Gathmann I, Kantarjian H, Gattermann N, et al. Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2006; 355: 2408-17.
6. Kantarjian H, O'Brien S, Shan I, Huang X, Garcia-Manero G, Faderl S, et al. Cytogenetic and molecular response and outcome in chronic myeloid leukemia: need for new response definitions? *Cancer* 2008; 115: 837-45.
7. de Lavallade H, Apperley JF, Khorashad JS, Milojković D, Reid A, Bua M, et al. Imatinib for newly diagnosed patients with chronic myeloid leukemia: incidence of sustained responses in an intention to treat analysis. *J Clin Oncol* 2008; 26: 3358-63.
8. Hughes TP, Kaeda J, Branford S, Rudzki Z, Hochhaus A, Hensley M, et al. Frequency of major molecular responses to imatinib or interferon alpha plus cytarabine in newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2003; 349: 1423-32.
9. Kvasnicka HM, Thiele J. Bone marrow angiogenesis: methods of quantification and changes evolving in chronic myeloproliferative disorders. *Histol Histopathol* 2004; 19: 1245-60.
10. Geary CG. The story of chronic myeloid leukemia. *Br J Haematol* 2000; 100: 2-11.
11. Nowell PC, Hungerford DA. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science* 1960; 132: 1497.

12. Rowley JD. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 1973; 243: 290-3.
13. Shtivelman E, Lifshitz B, Gale RP, Canaani E. Fused transcript of abl and bcr genes in chronic myelogenous leukemia. *Nature* 1985; 315: 550-4.
14. Kantarjian HM, Smith TL, McCredie KB, Keating MJ, Walters RS, Talpaz M, et al. Chronic myelogenous leukemia: a multivariate analysis of the association of patient characteristics and therapy with survival. *Blood* 1985; 66: 1326-35.
15. Kantarjian HM, Dixon D, Keating MJ, Talpaz M, Walter R, Kenneth B, et al. Characteristics of accelerated disease in chronic myelogenous leukemia. *Cancer* 1988; 61: 1441-6.
16. Cortes JE, Talpaz M, O'Brien S, Faderl S, Garcia-Monero, Ferrajoli A, et al. Staging of chronic myeloid leukemia in the imatinib era: an evaluation of the World Health Organization proposal. *Cancer* 2006; 106: 1306-15.
17. Cortes J, Kantarjian HM. Advanced-phase chronic myeloid leukemia. *Semin Hematol* 2003; 40: 79-86.
18. Baccarani M, Saglio J, Goldman J, Hochhaus A, Simonsson B, Appelbaum F et al. Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* 2006; 108: 1809-20.
19. Strife A, Clarkison B. Biology of chronic myelogenous leukemia: is disordered maturation the primary defect? *Semin Hematol* 1988; 15: 1-19.
20. Cramer E, Auclair C, Hakim J, Feliu E, Boucherot J, Troube H, et al. Metabolic activity of phagocytosing granulocytes in chronic granulocytic leukemia: ultra structural observation of degranulation defect. *Blood* 1977; 50: 93-106.
21. Castro-Malaspina H, More MA. Pathophysiological mechanisms operating in the development of myelofibrosis: role of megakaryocytes. *Nouv Rev Fr hematol* 1982; 24: 221-6.
22. Aguayo A, Kantarjian HM, Manshouri T, Gidel C, Estey E, Thomas D et al. Angiogenesis in acute and chronic leukaemia's and myelodysplastic syndromes. *Blood* 2000; 96: 2240-5.
23. Derderian PM, Kantarjian HM, Talpaz M, O'Brien S, Cork A, Estey E, et al. Chronic myelogenous leukemia in the lymphoid blastic phase: characteristics, treatment response and prognosis. *Am J Med* 1993; 94: 69-74.
24. Sokal JE, Cox EB, Baccarani M, Tura S, Gomez GA, Robertson JE, et al. Prognostic discrimination in „good risk“ chronic granulocytic leukemia. *Blood* 1984; 63: 798-9.

25. Silver RT, Peterson BL, Szatrowski TP, Powell BL, Stock W, Carroll AJ, et al. Treatment of the chronic phase of chronic myeloid leukemia with an intermittent schedule of recombinant interferon alfa-2b and cytarabine: results from CALGB study 9013. *Leuk Lymphoma* 2003; 44: 39-48.
26. Quintas-Cardema A, Kantarjian HM, Talpaz M, O'Brien S, Garcia-Manero G, Verstovsek V, et al. Imatinib mesylate therapy may overcome the poor prognostic significance of deletions of derivative chromosome 9 in patients with chronic myelogenous leukemia. *Blood* 2005; 105: 2281-6.
27. Hasford J, Pfirmann M, Hehlmann R, Alann NC, Baccarani M, Kluin-Nelemans JC, et al. A new prognostic score for survival of patients with chronic myeloid leukemia treated with interferon alpha. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 850-8.
28. Hasford J, Baccarani M, Hoffmann V, Guilhot J, Saussele S, Rosti G, et al. Predicting complete cytogenetic response and subsequent progression-free survival in 2060 patients with CML on imatinib treatment: the EUTOS score. *Blood* 2011; 118 (3): 686-92.
29. El-zimaity MM, Kantarjian HM, Talpaz M, O'Brien S, Giles F, Garcia-Manero G, et al. Results of imatinib mesylate therapy in chronic myelogenous leukemia with variant Philadelphia chromosome. *Br J Haematol* 2004; 125: 187-95.
30. Kurzrock R, Kantarjian HM, Shtalrid M, Gutterman JU, Talpaz M. Philadelphia chromosome-negative chronic myelogenous leukemia without breakpoint cluster region rearrangement: a chronic myeloid leukemia with a distinct clinical course. *Blood* 1990; 75: 445-52.
31. Calabretta B, Perrotti D. The biology of CML blast crisis. *Blood* 2004; 103: 4010-22.
32. Jamieson CH, Ailles LE, Dylla SJ, Muijtjens M, Jones C, Zehnder JL, et al. Granulocyte-macrophage progenitors as candidate leukemic stem cell in blast-crisis CML. *N Engl J Med* 2004; 351: 657-67.
33. Loriaux M, Deininger M. Clonal cytogenetic abnormalities in Philadelphia chromosome negative cells in chronic myeloid leukemia patients treated with imatinib. *Leuk Lymphoma* 2004; 45: 2197-203.
34. Medina J, Kantarjian HM, Talpaz M, O'Brien S, Garcia-Manero G, Giles F, et al. Chromosomal abnormalities in Philadelphia chromosome-negative metaphases appearing during imatinib mesylate therapy in patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia in chronic phase. *Cancer* 2003; 98: 1905-11.
35. Bumm T, Muller C, Al-Ali HK, Krohn K, Shepherd P, Schmidt E, et al. Emergence of clonal cytogenetic abnormalities in Ph-cells in some CML patients in cytogenetic remission to imatinib but restoration of polyclonal haematopoiesis in the majority. *Blood* 2003; 101: 1941-9.

36. Cox MC, Maffei L, Buffolino S, Del Poeta G, Venditti A, Cantonetti M, et al. A comparative analysis of FISH, RT-PCR, and cytogenetic for the diagnosis of bcr-abl-positive leukemias. *Am J Clin Pathol* 1998; 109: 24-33.
37. Schoch C, Schnittger S, Bursch S, Gerstner D, Hochhaus A, Berger, et al. Comparison of chromosome banding analysis, interphase and hyper metaphase FISH, qualitative and quantitative PCR for diagnosis and for follow-up in chronic myeloid leukemia: a study on 350 cases. *Leukemia* 2002; 16: 53-66.
38. Yanagi M, Shinjo K, Takeshita A, Tobita T, Yano K, Kobayashi M, et al. Simple and reliably sensitive diagnosis and monitoring of Philadelphia chromosome-positive cells in chronic myeloid leukemia by interphase fluorescence in situ hybridization of peripheral blood cells. *Leukemia* 1999; 13: 542-53.
39. Pelz AF, Kroning H, Franke A, Wieacker P. High reliability and sensitivity of the BCR/ABL D-FISH test for the detection of BCR/ABL rearrangements. *Ann Hematol* 2002; 81: 147-53.
40. Melo JV. The diversity of BCR-ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype. *Blood* 1996; 88: 2375-84.
41. Federl S, Talpaz M, Estrov Z, O'Brien S, Kurzrock R, Kantarjian HM. The biology of chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 1999; 341: 164-72.
42. Sawyers CL. Chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 1999; 340: 1330-40.
43. Pane F, Frigeri F, Sindona M, Luciano, Ferrara F, Cimino R, et al. Neutrophilic-chronic myeloid leukemia: a distinct disease with a specific molecular marker. *Blood* 1996; 88: 2410-4.
44. Bose S, Deininger M, Gora-Tybor J, Goldman JM, Melo JV. The presence of typical and atypical BCR-ABL fusion genes in leucocytes of normal individuals: biologic significance and implications for the assessment of minimal residual disease. *Blood* 98; 92: 3362-7.
45. Deininger MW, Goldman JM, Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood* 2000; 96: 3343-56.
46. Barnes DJ, Melo JV. Cytogenetic and molecular genetic aspects of chronic myeloid leukemia. *Acta haematol* 2002; 108: 180-202.
47. Zhang X, Subrahmanyam R, Wong R, Gross AW, Ren R. the NH2 terminal coiled-coil domain and tyrosine 177 play important roles in induction of a myeloproliferative disease in mice by Bcr-Abl. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 840-53.
48. Skorski T, Nieborowska-Skorska M, Szczylik C, Kanakaraj P, Perroti D, Zon G, et al. C-RAF-1 serine/threonine kinase is required in BCR/ABL-dependent and normal haematopoiesis. *Cancer Res* 1995; 55: 2275-8.
49. Goga A, McLaughlin J, Afar DE, Saffran DC, Witte ON. Alternative signals to RAS for hematopoietic transformation by the BCR-ABL oncogene. *Cell* 1995; 82: 981-8.

50. Salgia R, Uemura N, Okuda K, Li JL, Pisick E, Sattler M, et al. CRKL links p210BCR/ABL with paxillin in chronic myelogenous leukemia cells. *J Biol Chem* 1995; 270: 29145-50.
51. Reuther JY, Reuther GW, Cortez D, Pendergast AM, Baldwin AS. A requirement for NF kappa B activation in BCR/ABL-mediated transformation. *Genes Dev* 1998; 12: 968-81.
52. Chai SK, Nichols GL, Rothman P. Constitutive activation of JAKs and STATs in BCR-abl-expressing cell lines and peripheral blood cells derived from leukemic patients. *J Immunol* 1997; 159: 4720-8.
53. Largaespada DA, Brannan CI, Jenkins NA, Copeland NG. NF1 deficiency causes Ras-mediated granulocyte/macrophage colony stimulating factor hypersensitivity and chronic myeloid leukaemia. *Nat Genet* 1996; 12: 137-43.
54. Bedi A, Barber JP, Bedi GC, el-Deiry WS, Sidransky D, Vala MS, et al. BCR-ABL-mediated inhibition of apoptosis with delay of G2/M transition after DNA damage: A mechanism of resistance to multiple anticancer agents. *Blood* 1995; 86: 1148-58.
55. Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, et al. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* 1998; 91: 3527-61.
56. Bussolino F, Albin A, Camussi G, Presta M, Viqlietto G, Ziche M, et al. Role of soluble mediators in angiogenesis. *Eur J Cancer* 1996; 32: 2401-12.
57. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1995; 1: 27-31.
58. Mangi MH. Angiogenesis and angiogenic mediators in haematological malignancies. *Br J Haematol* 2000; 111: 43-51.
59. Padro T, Ruiz S, Bieker R, Burger H, Steins M, Kienast J, et al. Increased angiogenesis in the bone marrow of patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2000; 95: 2637-44.
60. Aguayo A, O'Brien S, Keating M, Manshour T, Gidel C, Barlogie B, et al. Clinical relevance of intracellular vascular endothelial growth factor levels in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2000; 96: 768-70.
61. Salven P, Orpana A, Teerenhovi L, Joensuu H. Simultaneous elevation in the serum concentrations of the angiogenic growth factors VEGF and FGF is an independent predictor of poor prognosis in non-Hodgkin's lymphoma: a single-institution study of 200 patients. *Blood* 2000; 96: 3712-8.
62. Lundberg LG, Lerner R, Sundelin P, Rogers R, Folkman J, Palmblad J. Bone marrow in polycythemia vera, chronic myelocytic leukemia and myelofibrosis has an increased vascularity. *Am J Pathol* 2000; 157: 15-9.

63. Verstovsek S, Kantarjian HM, Manshouri T, O'Brien S, Faderl S, Talpaz M, et al. Prognostic significance of Tie-1 protein expression in patients with early chronic phase chronic myeloid leukemia. *Cancer* 2002; 94: 1517-21.
64. Kvasnicka HM, Thiele J. Quantification and morphometric analysis of vascular structures in the bone marrow. *Pathologie* 2002; 23: 472-9.
65. Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, Toi M, Martin L, McCulloch P, et al. Quantification of angiogenesis in solid human tumours: an international consensus on the methodology and criteria of evaluation. *Eur J Cancer* 1996; 32: 2474-84.
66. Aguayo A, Giles F, Albitar M. Vascularity, angiogenesis and angiogenic factors in leukaemia's and myelodysplastic syndromes. *Leuk Lymphoma* 2003; 44: 213-22.
67. Korkolopoulou P, Viniou N, Kavantzias N, Patsouris E, Thymara I, Pavlopoulos PM et al. Clinicopathologic correlations of bone marrow angiogenesis in chronic myeloid leukemia: a morphometric study. *Leukemia* 2003; 17: 89-97.
68. Kvasnicka HM, Thiele J, Staib P, Schmitt-Graeff A, Griesshammer M, Klose J, et al. Reversal of bone marrow angiogenesis in chronic myeloid leukemia following imatinib mesylate (STI571) therapy. *Blood* 2004; 103: 3549-51.
69. Kantarjian H, Sawyers C, Hochhaus A, Guilhot F, Schiffer C, Gambacorti-Passerini C, et al. Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia. *N Engl J* 2002; 346: 645-52.
70. Thiele J, Kvasnicka HM, Beelen DW, Leder LD, Schaefer UW. Bone marrow engraftment: histopathology of hematopoietic reconstitution following allogeneic transplantation in CML patients. *Histol Histopathol* 2001; 16: 213-26.
71. Kumar S, Litzow MR, Rajkumar SV. Effect of allogeneic stem cell transplantation on bone marrow angiogenesis in chronic myelogenous leukemia. *Bone Marrow Transplant* 2003; 32: 1065-9.
72. Ebos JM, Tran J, Master Z, Dumont D, Melo JV, Buchdunger E, et al. Imatinib mesylate (STI-571) reduces Bcr-Abl-mediated vascular endothelial growth factor secretion in chronic myelogenous leukemia. *Mol. Cancer Res* 2002; 1: 89-95.
73. Beham-Schmid C, Apfelbeck U, Sill H, Tsybrovsky O, Hofler G, Haas OA, et al. Treatment of chronic myelogenous leukemia with the tyrosine kinase inhibitor STI571 results in marked regression of bone marrow fibrosis. *Blood* 2002; 99: 381-3.
74. Baccarani M, Rosti G, de Vivo A, Bonifazi F, Russo D, Martinelli G, et al. A randomized study of interferon-alpha versus interferon-alpha and low-dose arabinosyl cytosine in chronic myeloid leukemia. *Blood* 2002; 99: 1527-35.

75. Kantarjian HM, O'Brien S, Cortes JE, Shan J, Giles FJ, Rios MB, et al. Complete cytogenetic and molecular responses to interferon-alpha-based therapy for chronic myelogenous leukemia are associated with excellent long-term prognosis. *Cancer* 2003; 97: 1033-41.
76. Hochhaus A, Reiter A, Saussele S, Reichert A, Emig M, Kaeda J, et al. German CML Study Group and the UK MRC CML Study Group. Molecular heterogeneity in complete cytogenetic responders after interferon-alpha therapy for chronic myelogenous leukemia: low levels of minimal residual disease are associated with continuing remission. *Blood* 2000; 95: 62-6.
77. Molldrem J, Lee P, Wang C, Felio K, Kantarjian HM, Champlin RE, et al. Evidence that specific T lymphocytes may participate in the elimination of chronic myelogenous leukemia. *Nat Med* 2000; 6: 1018-23.
78. Kiss TL, Abdoell M, Jamal N, Minden MD, Lipton JH, Messner HA. Long-term medical outcomes and quality-of-life assessment of patients with chronic myeloid leukemia followed at least 10 years after allogeneic bone marrow transplantation. *J Clin Oncol* 2002; 20: 2334-43.
79. Radich JP, Gooley T, Bensinger W, Chauncey T, Clift R, Flowers M, et al. HLA-matched related hematopoietic cell transplantation for chronic-phase CML using a targeted busulfan and cyclophosphamide preparative regimen. *Blood* 2003; 102: 31-5.
80. Or R, Shapira MY, Resnick I, Amar A, Ackerstein A, Samuel S, et al. Nonmyeloablative allogeneic stem cell transplantation for the treatment of chronic myeloid leukemia in first chronic phase. *Blood* 2003; 101: 441-5.
81. Crawley C, Szydlo R, Lalancette M, Bacigalupo A, Lange A, Brune M, et al. Outcomes of reduced-intensity transplantation for chronic myeloid leukemia: an analysis of prognostic factors from the Chronic Leukemia Working Party of the EBMT. *Blood* 2005; 106: 2969-76.
82. Olavarria E, Craddock C, Dazzi F, Marin D, Marktel S, Apperley JF, et al. Imatinib mesylate (STI571) in the treatment of relapse of chronic myeloid leukemia after allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 2002; 99: 3861-2.
83. Saussele S, Lauseker M, Gratwohl A, Beelen DW, Bunjes D, Schwerdtfeger R, et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia in the imatinib era: evaluation of its impact within a subgroup of the randomized German CML Study IV. *Blood* 2010; 115 (10): 1880-5.
84. Warlick E, Ahn KW, Pedersen TL, Artz A, de Lima M, Pulsipher M, et al. Reduced intensity conditioning is superior to nonmyeloablative conditioning for older chronic myelogenous leukemia patients undergoing hematopoietic cell transplant during the tyrosine kinase inhibitor era. *Blood* 2012; 119 (17): 4083-90.

85. Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, Peng B, Buchdunger E, Ford JM, et al. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2001; 344: 1031-7.
86. Deininger M, O'Brien SG, Guilhot F, Goldman JM, Hochhaus A, Hughes TP, et al. International randomized study of interferon vs STI571 (IRIS) 8-year follow up: sustained survival and low risk for progression or events in patients with newly diagnosed chronic myeloid leukemia in chronic phase (CML-CP) treated with imatinib. *Blood* 2009; 114: 1126-7.
87. Baccarani M, Rosti G, Castagnetti F, Haznedaroglu I, Porkka K, Abruzzese E, et al. Comparison of imatinib 400 mg and 800 mg daily in the front-line treatment of high-risk, Philadelphia positive chronic myeloid leukemia: a European LeukemiaNet Study. *Blood* 2009; 113 (19): 4497-504.
88. Cortes JE, Kantarjian HM, Goldberg SL, Powell BL, Wetzler M, et al. High-dose imatinib in newly diagnosed chronic phase chronic myeloid leukemia: high rates of rapid cytogenetic and molecular responses. *J Clin Oncol* 2009; 27 (28): 4754-9.
89. Hehlmann R, Lauseker M, Jung-Munkwitz S, Leitner A, Muller M, Pletsch N, et al. Tolerability-adapted imatinib 800 mg/d versus 400 mg/d versus 400 mg/d plus interferon alpha in newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2011; 29 (12): 1634-42.
90. Simonsson B, Gedde-Dahl T, Markevarn B, Remes K, Stenfort J, Almqvist A, et al. Combination of pegylated IFN- α 2b with imatinib increases molecular response rates in patients with low- or intermediate-risk chronic myeloid leukemia. *Blood* 2011; 118 (12): 3228-35.
91. Cortes J, Quintas-Cardama A, Jones D, Ravandi F, Garcia-Manero G, Verstovsek S, et al. A randomized trial of front-line high dose imatinib mesylate with or without pegylated interferon alpha-2b and granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *Cancer* 2011; 117 (3): 572-80.
92. Saglio G, Kim DW, Issaragrisil S, le Coutre P, Etienne G, Lobo C, et al. Nilotinib versus imatinib for newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2010; 362 (24): 2251-9.
93. Kantarjian HM, Hochhaus A, Saglio G, De Souza C, Flinn IW, Stenk L, et al. Nilotinib versus imatinib for the treatment of patients with newly diagnosed chronic phase, Philadelphia chromosome-positive, chronic myeloid leukaemia: 24-month minimum follow-up of the phase 3 randomised ENESTnd trial. *Lancet Oncol* 2011; 12 (9): 841-51.
94. Kantarjian HM, Shah NP, Cortes JE, Baccarani M, Agurwal M, Underraga MS, et al. Dasatinib or imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia: 2-year follow-up from a randomized phase 3 trial DASISION. *Blood* 2012; 119(5): 1123-9.

95. Kantarjian HM, Shah NP, Hochhaus A, Cortes J, Shah S, Ayala M, et al. Dasatinib versus imatinib in newly diagnosed chronic phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2010; 362 (24): 2260-70.
96. Cortes JE, Kim DW, Kantarjian HM, Brummendorf TH, Dyagil I, Griskevicius L, et al. Bosutinib versus imatinib in newly diagnosed chronic phase chronic myeloid leukemia: results from the BELA trial. *J Clin Oncol* 2012; 30 (28): 3486-92.
97. Giles FJ, le Coutre PD, Pinilla-Ibartz J, Larson RA, Gattermann N, Ottmann OG, et al. Nilotinib in imatinib-resistant or imatinib-intolerant patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase: 48-month follow-up results of a phase II study. *Leukemia* 2013; 27 (1): 107-12.
98. Shah NP, Kim DW, Kantarjian HM, Rousselot P, Liacer PE, Enrico A, et al. Potent, transient inhibition of BCR-ABL with dasatinib 100mg daily achieves rapid and durable cytogenetic responses and high transformation-free survival rates in chronic phase chronic myeloid leukemia patients with resistance, suboptimal response or intolerance to imatinib. *Haematologica* 2010; 95 (2): 232-40.
99. Khoury HJ, Cortes JE, Kantarjian HM, Gambacorti-Passerini C, Baccarani M, Kim DW, et al. Bosutinib is active in chronic phase chronic myeloid leukemia after imatinib and dasatinib and/or nilotinib therapy failure. *Blood* 2012; 119 (15): 3403-12.
100. Cortes JE, Kantarjian HM, Brummendorf TK, Kim DW, Turkina AG, Shen ZX, et al. Safety and efficacy of bosutinib (SKI-606) in chronic phase Philadelphia-chromosome positive chronic myeloid leukemia patients with resistance or intolerance to imatinib. *Blood* 2011; 118 (17): 4567-76.
101. Cortes JE, Kantarjian H, Shah NP, Bixby D, Mauro MJ, Flinn I, et al. Ponatinib in refractory chromosome-positive leukemias. *N Engl J Med* 2012; 367 (22): 2075-88.
102. Baccarani M, Cortes J, Pane FD, Niederwieser D, Saglio D, Apperley J, et al. Chronic myeloid leukemia. An update of concepts and management Recommendations of the European LeukemiaNet. *J Clin Oncol* 2009; 27 (2): 6041-51.
103. Baccarani M, Deininger MW, Rosti G, Hochhaus A, Soverini S, Apperley JF, et al. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. *Blood* 2013; 122 (6): 872-84.
104. Soverini S, Hochhaus A, Nicolini FE, Gruber F, Lange T, Saglio G, et al. BCR-ABL kinase domain mutations analysis in chronic myeloid leukemia patients treated with tyrosine kinase inhibitors. Recommendations from an expert panel on behalf of European LeukemiaNet. *Blood* 2011; 118 (5): 1208-15.
105. Nicolini FE, Basak GW, Soverini S, Martinelli G, Mauro MJ, Muller MC, et al. Allogeneic stem cell transplantation for patients harbouring T315I BCR-ABL mutated leukaemia's. *Blood* 2011; 118 (20): 5697-700.

106. Quintas-Cardema A, Kantarjian H, Jones D, Shan J, Borthakur G, Thomas D, et al. Delayed achievement of cytogenetic and molecular response is associated with increased risk of progression among patients with chronic myeloid leukemia in early chronic phase receiving high-dose or standard dose imatinib therapy. *Blood* 2009; 113 (25): 6315-21.
107. Cortes J, Baccarani M, Guilhot F, Druker B, Branford S, Kim DW, et al. A phase III, randomized, open-label study of 400 mg versus 800 mg of imatinib mesylate in patients with newly diagnosed, previously untreated chronic myeloid leukemia in chronic phase using molecular end points: Tyrosine Kinase Inhibitor Optimization and Selectivity study. *J Clin Oncol* 2010; 28 (3): 424-30.
108. Hehlmann R, Lausker M, Jung-Munkwitz S, Leitner A, Muller M, Pletsch N, et al. Tolerability adapted imatinib 800mg/d versus 400mg/d versus 400mg/d plus Interferon- α in newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2011; 29 (12): 1634-42.
109. Palandri F, Iacobucci I, Soverini S, Castagnetti F, Poerio A, Testoni N, et al. Treatment of Philadelphia-positive chronic myeloid leukemia with imatinib: importance of a stable molecular response. *Clin Cancer Res* 2009; (15): 1059-63.
110. Gil TM. The central role of prognosis in clinical decision making. *JAMA* 2012; 11; 307: 199-200.
111. Steyerberg E. Clinical prediction models: A practical approach to development, validation, and updating. Springer Science Business Media, New York, 2009.
112. Reilly BM, Evans AT. Translating clinical research into clinical practice: impact of using prediction rules to make decisions. *Ann Intern Med* 2006; 144: 201-9.
113. Lukić S. Predikcija klinički značajnih ishoda kod neuroloških bolesti primenom metoda veštačkih neuronskih mreža i regresione analize, doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, 2013.
114. Erić-Marinković J, Dotlić R, Janošević S, i sar. Statistika za istraživače u oblasti medicinskih nauka. Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu, 2008.
115. Riffenburg RH, Statistics in Medicine, Edition 3, Academic Press, 2012.
116. Kleinbaum DG, Klein M. Logistic Regression: A self-learning text 3rd edition, Springer Science Business Media LLC, 2010.
117. Hochhaus A, O'Brien SG, Guilhot F, Druker BJ, Branford S, Foroni L, et al. Six year follow-up of patients receiving imatinib for the first-line treatment of chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 2009; 23 (6): 1054-61.

118. Iacobucci I, Rosti G, Amabile M, Poerio A, Soverini S, Cilloni D, et al. Comparison between patients with Philadelphia-positive chronic phase chronic myeloid leukemia who obtained a complete cytogenetic response within 1 year of imatinib therapy and those who achieved such a response after 12 months of treatment. *J Clin Oncol* 2006; 24 (3): 454-9.
119. Kantarjian HM, Cortes J, O'Brien, Luthra R, Gilese F, Verstovsek S, et al. Long-term survival benefit and improved complete cytogenetic and molecular response rates with imatinib mesylate in Philadelphia chromosome-positive chronic-phase chronic myeloid leukemia after failure of interferon- α . *Blood* 2004; 104 (7): 1979-88.
120. Cortes J, Talpaz M, Giles F, O'Brien, Rios M, Shan J, et al. Prognostic significance of cytogenetic clonal evolution in patients with chronic myelogenous leukemia on imatinib mesylate therapy. *Blood* 2003; 101 (10): 3794-800.
121. Čojbašić I, Mačukanović-Golubović L. Prognostic factors associated with complete cytogenetic response in patients with chronic myelogenous leukemia on imatinib mesylate therapy. *Srp Arh Celok Lek* 2010; 138(5-6): 305-8.
122. Čojbašić I, Mačukanović-Golubović L. Faktori koji utiču na postizanje i postojanost citogenetskog odgovora kod pacijenata sa hroničnom mijeloidnom leukemijom na terapiji imatinibom. *Vojnosanit pregl* 2011; 68(11): 911-7.
123. Kantarjian HM, Tapaz M, O'Brien, Jones D, Giles F, Garcio-Manero G, et al. Survival benefit with imatinib mesylate versus interferon- α -based regimens in newly diagnosed chronic-phase chronic myelogenous leukemia. *Blood* 2006; 108 (6): 1835-40.
124. Palandri F, Iacobucci I, Martinelli G, Amabile M, Poerio A, Testoni N, et al. Long-term outcome of complete cytogenetic responders after imatinib 400mg in late chronic phase, Philadelphia-positive chronic myeloid leukemia: The GIMEMA working party on CML. *J Clin Oncol* 2008; 28 (1): 106-11.
125. Cortes J, Talpaz M, O'Brien, Jones D, Luthra R, Shan J, et al. Molecular responses in patients with chronic myelogenous leukemia in chronic phase treated with imatinib mesylate. *Clin Cancer Res* 2005; 11 (9): 3425-32.
126. Hughes T, Branford S, White D, Reynolds J, Koelmeyer R, Seymour J, et al. Impact of early dose intensity on cytogenetic and molecular response in chronic phase CML patients receiving 600mg/day of imatinib as initial therapy. *Blood* 2008; 112 (10): 3965-75.
127. Press RD, Love Z, Tronnes AA, Yang R, Tran T, Mongoue-Tchokote S, et al. BCR-ABL mRNA levels at and after the time of a complete cytogenetic response (CCR) predict the duration of CCR in imatinib mesylate-treated patients with CML. *Blood* 2006; 107: 4250-6.

128. Press RD, Galderisi C, Yang R, Rempfer C, Willis S, Mauro M, et al. A half-log increase in BCR-ABL RNA predicts a higher risk of relapse in patients with chronic myeloid leukemia with an imatinib-induced complete cytogenetic response. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 6136-43.
129. Marin D, Milojkovic D, Olavarria E, Khorashad J, de Lavallade H, Reidet A, et al. European LeukemiaNet criteria for failure or suboptimal response reliably identify patients with CML in early chronic phase treated with imatinib whose eventual outcome is poor. *Blood* 2008; (112): 4437-44.
130. Lundberg LG, Lerner R, Sundelin P, Rogers R, Folkman J, Palmblad J. Bone marrow in polycythemia vera, chronic myelocytic leukemia and myelofibrosis has an increased vascularity. *Am J Pathol* 2000; 157: 15–9.
131. Frutiger Y, Grogan TM, List AF. VEGF is an autocrine promoter of abnormal localized immature myeloid precursors and leukemic progenitor formation in myelodysplastic syndromes. *Blood* 2001; 97: 1427–34.
132. Green AR. Hemangioblast origin of chronic myeloid leukaemia? *Lancet* 2000; 355: 1659–60.
133. Frater JL, Tallman MS, Variakojis D, Druker BJ, Resta D, Riley MB, et al. Chronic myeloid leukemia following therapy with imatinib mesylate. Bone marrow histopathology and correlation with genetic status. *Am J Clin Pathol* 2003; 119: 833-41.
134. Hasserjian RP, Boecklin F, Parker S, Chase A, Dhar S, Zaiac M, et al. ST1571 (imatinib mesylate) reduces bone marrow cellularity and normalizes morphologic features irrespective of cytogenetic response. *Am J Clin Pathol* 2002; 117: 360-7.
135. Thiele J, Kvasnicka HM, Schmitt-Graeff A, Kriener S, Engels K, Staib B, et al. Effects of the tyrosine kinase inhibitor Imatinib mesylate (STI571) on bone marrow features in patients with chronic myelogenous leukemia. *Histol Histopathol* 2004; 19: 1277-88.
136. Fang G, Kim CN, Perkins CL, Ramadevi N, Winton E, Wittmann S, et al. CGP57148B (STI-571) induces differentiation and apoptosis and sensitizes Bcr-Abl-positive human leukemia cells to apoptosis due to antileukemic drugs. *Blood* 2000; 96: 2246-53.
137. Holtz MS, Slovak ML, Zhang F, Sawyers CL, Forman SJ, Bhatia R. Imatinib mesylate (STI571) inhibits growth of primitive malignant progenitors in chronic myelogenous leukemia through reversal of abnormally increased proliferation. *Blood* 2002; 99: 3792-800.
138. Marin D, Ibrahim AR, Goldman JM. European treatment and outcome study (EUTOS) score for chronic myeloid leukemia still require more confirmation. *J Clin Oncol* 2011; 29: 3944–5.

139. Jabbour E, Cortes J, Nazha A, O'Brien S, Quintas-Cardama A, Pierce S, et al. EUTOS score is not predictive for survival and outcome in patients with early chronic phase chronic myeloid leukemia treated with tyrosine kinase inhibitors: a single institution experience. *Blood* 2012; 119: 4524–6.
140. Yamamoto E, Fujisawa S, Hagihara M, Tanaka M, Fujimaki K, Kishimoto K, et al. European treatment and outcome study score does not predict imatinib treatment response and outcome in chronic myeloid leukemia patients. *Cancer Sci* 2014; 105: 105-9.
141. Sweet K, Zhang L, Pinilla-Ibarz J. Biomarkers for determining the prognosis in chronic myelogenous leukemia. *Journal of Hematology & Oncology* 2013; 6: 54-63.

Biografija autora

Dr Irena Ćojbašić rođena je 12.07.1970. godine u Nišu, udata je, majka jednog deteta, sa stalnim boravkom u Nišu.

Osnovnu školu i gimnaziju „Svetozar Marković” završila je u Nišu sa odličnim uspehom i kao nosilac diplome „Vuk Karadžić”. Medicinski fakultet u Nišu završila je 1996. godine sa prosečnom ocenom 9,63. U toku studija bila je stipendista Republičke fondacije za razvoj naučnog i umetničkog podmlatka i Ministarstva za nauku i tehnologiju Republike Srbije.

Specijalizaciju iz interne medicine završila je na Medicinskom fakultetu u Nišu 2004. godine, položivši ispit sa odličnim uspehom. Uže specijalističke studije iz oblasti hematologije na Medicinskom fakultetu u Nišu završila je 2013. godine odbranivši rad pod naslovom „Citogenetski odgovor pacijenata sa hroničnom mijeloidnom leukemijom”. Školske 2007/2008. godine upisala se na doktorske studije kliničke medicine na Medicinskom fakultetu u Nišu i položila sve ispite sa prosečnom ocenom 9,88.

U periodu od 1997-2000. godine bila je u radnom odnosu na Klinici za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma Kliničkog centra u Nišu. Od 2000. godine nalazi se u stalnom radnom odnosu na Klinici za hematologiju i kliničku imunologiju Kliničkog centra u Nišu. Od 2013. godine član je Komisije RFZO za odobrenje upotrebe lekova nilotinib i bortezomib. Odlukom Ministarstva zdravlja Republike Srbije 2013. godine dodeljen joj je počasni naziv Primarijus.

Autor je i koautor 60 naučnih radova iz oblasti hematologije, objavljenih u međunarodnim ili nacionalnim časopisima sa recenzijom. Od ukupnog broja radova 9 je objavljeno u celini a 51 u izvodu.

Aktivni je član hematološke sekcije SLD, član srpske Grupe za hroničnu mijeloidnu leukemiju, član Udruženja internista Srbije, član Evropske asocijacije hematologa EHA.

Aktivno se služi engleskim jezikom.



ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом

Клинички и морфометријски показатељи терапијског одговора код хроничне

мијелоидне леукемије

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација, ни у целини, ни у деловима, није била предложена за добијање било које дипломе, према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права, нити злоупотребио/ла интелектуалну својину других лица.

У Нишу, 22.05.2014.године

Аутор дисертације: **Ирена Ћојбашић**

Потпис докторанда:

Ирена Ћојбашић



ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Име и презиме аутора:

Ирена Ћојбашић

Студијски програм:

Клиничка медицина

Наслов рада:

Клинички и морфометријски показатељи терапијског
одговора код хроничне мијелоидне леукемије

Ментор:

Проф. др Лана Мачукановић-Голубовић

Изјављујем да је штампана верзија моје докторске дисертације истоветна електронској верзији, коју сам предао/ла за уношење у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Нишу, 22.05.2014.године

Аутор дисертације: Ирена Ћојбашић

Потпис докторанда:

Ирена Ћојбашић



ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да, у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, унесе моју докторску дисертацију, под насловом:

Клинички и морфометријски показатељи терапијског одговора код
хроничне мијелоидне леукемије

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату, погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons), за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство – некомерцијално
- ☒ 3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да подвучете само једну од шест понуђених лиценци; кратак опис лиценци је у наставку текста).

У Нишу, 22.05.2014.године

Аутор дисертације: **Ирена Ђојбашић**

Потпис докторанда:

Ирена Ђојбашић