



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών
—ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837—

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΟΞΕΙΑΣ ΜΥΕΛΟΓΕΝΟΥΣ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑΣ
ΚΑΙ ΤΩΝ ΜΔΣ ΣΥΝΔΡΟΜΩΝ ΜΕ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ
ΡΟΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Τζιότζιου Ειρήνη

Βιολόγος

ΑΘΗΝΑ 2019

Διατριβή για διδακτορία

ΑΘΗΝΑ 2019

Ημερομηνία αιτήσεως :30-07-2012

Ημερομηνία ορισμού 3μελούς Συμβουλευτικής επιτροπής: 13-12-2012

Ημερομηνία ορισμού του θέματος: 25-02-2013

Ημερομηνία αιτήσεως αλλαγής επιβλέπουσας καθηγήτριας λόγω αφυπηρέτησης: 05-10-16

Ημερομηνία Αιτήσεως παράτασης:31-10-18

Ορισμός επταμελούς εξεταστικής επιτροπής:09-12-19

Κατάθεση Διδακτορικής διατριβής:28-05-20

Βαθμός Διδακτορικής Διατριβής:Άριστα

Διατριβή για διδακτορία ΑΘΗΝΑ 2019

Τριμελή Συμβουλευτική Επιτροπή:

- Ρούσσου Παρασκευή, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια
- Καψιμάλη -Βαϊοπούλου Βιολέττα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιατρικής Σχολής-ΕΚΠΑ
Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Σεξουαλικά Μεταδιδόμενων Νοσημάτων & AIDS.
Νοσοκομείο "Ανδρέας Συγγρός"
- Κοντοπίδου Φλώρα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Αιματολογίας, Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών, ΙΠΠΟΚΡΑΤΕΙΟ

Προτεινόμενα Μέλη Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής:

- Κωνσταντόπουλος Κωνσταντίνος, Τακτικός Καθηγητής ΕΚΠΑ
- Κυρτσώνη Μαρία-Χριστίνα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΕΚΠΑ
- Βασιλακόπουλος Θεόδωρος, Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΚΠΑ
- Τσιριγώτης Παναγιώτης, Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΚΠΑ

Πρόεδρος της Ιατρικής Σχολής Αθηνών

Καθηγητής Πέτρος Π. Σφηκάκης



ΙΠΠΟΚΡΑΤΟΥΣ ΟΡΚΟΣ



Ὅμνυμι Ἀπόλλωνα ἰητρὸν, καὶ Ἄσκληπιόν, καὶ Ὑγίαν, καὶ Πανάκειαν, καὶ θεοὺς πάντας τε καὶ πάσας, ἵστορας ποιεύμενος, ἐπιτελεᾶ ποιήσεις κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμήν ὄρκον τόνδε καὶ ζυγγραφὴν τήνδε. ἠγέσασθαι μὲν τὸν διδάξαντά με τὴν τέχνην ταύτην ἴσα γενέτησιν ἑμοῖσι, καὶ βίου κοινώσασθαι, καὶ χρεῶν χρηρίζοντι μετάδοσιν ποιήσασθαι, καὶ γένος τὸ ἐξ αὐτέου ὀδελφοῖς ἴσον ἐπικρινέειν ἄρρῃσι, καὶ διδάσειν τὴν τέχνην ταύτην, ἣν χρηρίζωι μαθητέων, ὄνει μισθοῦ καὶ ζυγγραφῆς, παρατελείης τε καὶ ἰκροῦσιος καὶ τῆς λοιπῆς ὅπασης μαθησίος μετάδοσιν ποιήσασθαι γίοσι τε ἑμοῖσι, καὶ τοῖσι τοῦ ἐμῆ διδάξαντος, καὶ μαθηταῖσι συγγραμμένοισι τε καὶ ὠρκισμένοις νόμῳ ἰητρικῷ, ἄλλῳ δὲ οὐδενί. Διαιτήμασι τε χρῆσθαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμήν, ἐπὶ δαλήσει δὲ καὶ ἀδικίῃ εἴρειν. Οὐ δόσω δὲ οὐδὲ φάρμακον οὐδενὶ αἰτηθεὶς θανάσιμον, οὐδὲ ὑψηθήσομαι συμβουλίην τοιήνδε. ὁμοίως δὲ οὐδὲ γυναικὶ πρῆστον θοορίον δόσω. Ἄγνῶς δὲ καὶ ὄσιος διατηρήσω βίον τὸν ἐμὸν καὶ τέχνην τὴν ἐμήν. Οὐ τεμῶ δὲ οὐδὲ μὴν λιθιῶντας, ἐκκωρήσω δὲ ἐργάτησιν ἀνδράσι πρῆσιος τῆσδε. Ἐς οἰκίας δὲ ὀκόσας ὅν ἐσίω, ἐξελεύσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων, ἐκτός ἐών πάσης ἀδικίης ἐκούσιης καὶ θοορίης, τῆς τε ἄλλης καὶ ἀφορδισίων ἔργων ἐπὶ τε γυναικείων σωμαίων καὶ ἀνδρῶν, ἐλευθέρων τε καὶ δούλων. Ἄ δ' ὅν ἐν θεραπείῃ ἢ ἰδῶ, ἢ ὀκούσω, ἢ καὶ ὄνει θεραπείης κατὰ βίον ἀνθρώπων, ἃ μὴ κρῆ ποτε ἐρλαλέεσθαι ἔσω, σιγήσομαι, ἄρρητα ἠγεύμενος εἶναι τὰ τοιαῦτα. Ὅρκον μὲν οὖν μοι τόνδε ἐπιτελεᾶ ποιέοντι, καὶ μὴ συγκέοντι, εἴη ἐπαύρασθαι καὶ βίου καὶ τέχνης ἀσπασομένῳ παρὰ πῶσειν ἀνθρώποις ἐς τὸν αἰεὶ χρόνον. παραβαίνοντι δὲ καὶ ἐπιπροϋντι, τόναντία τοῦτέων

«Η έγκριση διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει την αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα»

(νόμος 5543/1032, άρθρον 202, παράγραφος 2)

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Σε νεοδιαγνωσμένους ασθενείς με ΟΜΛ είναι πολύ σημαντική η ταχεία διάγνωση του ακριβούς τύπου λευχαιμίας, καθώς και των μοριακών διαταραχών, ώστε να υπάρχει η προγνωστική πληροφορία και συζήτηση για τις θεραπευτικές επιλογές.

Σκοπός αυτής της μελέτης ήταν η διερεύνηση της προσφοράς από τον ανοσοφαινότυπο όσο το δυνατόν περισσότερης πληροφορίας στο εργαστήριο μοριακής βιολογίας που μελετά τις μεταλλάξεις που σχετίζονται με τις αιματολογικές κακοήθειες, καθώς και στον κλινικό γιατρό την στιγμή της διάγνωσης.

Για τον σκοπό αυτό, έγινε προσπάθεια να αναπτυχθεί μια κυτταρομετρική μέθοδος διερεύνησης της έκφρασης των πρωτεϊνών των μεταλλαγμένων γονιδίων, τόσο στην επιφάνεια όσο και στο κυτταρόπλασμα των αώρων κυττάρων της μυελικής σειράς.

Η έκφραση αυτή συγκρίθηκε με τα αντίστοιχα αποτελέσματα της μοριακής μελέτης.

Η μελέτη αυτή έγινε στο εργαστήριο Κυτταρομετρίας ροής του Τμήματος Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας, του ΓΝΑ «Ο Ευαγγελισμός», καθώς και στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας της Αιματολογικής-Λεμφωμάτων Κλινικής και Μονάδας Μεταμόσχευσης Μυελού των οστών του ΓΝΑ «Ο Ευαγγελισμός».

Αισθάνομαι την ανάγκη και την ηθική υποχρέωση να ευχαριστήσω θερμά όλους όσους βοήθησαν στην εκπόνηση αυτής της εργασίας.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα Ρούσσου Παρασκευή, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, αρχικά ως επιβλέπουσα και στη συνέχεια ως μέλος της τριμελούς επιτροπής λόγω αφυπηρέτησης. Επίσης, ευχαριστώ θερμά την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κα Καψιμάλη Βιολέτα για την αμέριστη εμπιστοσύνη και τη βοήθειά της σε ο,τιδήποτε χρειάστηκε.

Ευχαριστώ θερμά την κα Κοντοπίδου Φλώρα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, που με χαρά δέχτηκε να αναλάβει την επίβλεψη της εργασίας, αντικαθιστώντας την

κα Ρούσσου Παρασκευή λόγω αφυπηρέτησης. Την ευχαριστώ για την στήριξη και την ενθάρρυνση που μου προσέφερε καθ' όλη τη διάρκεια της προσπάθειας αυτής.

Θερμά ευχαριστώ τον τέως Διευθυντή της κλινικής κο Χαρχαλάκη Νικόλαο για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε από την πρώτη στιγμή.

Τον Συντονιστή Διευθυντή της κλινικής κο Καρμίρη Θεμιστοκλή για την στήριξη και την ευγενική του προσφορά.

Τις Διευθύντριες του Τμήματος Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας κα Παχούλα-Παπαστεριάδη Χρύσα και κα Τσιρογιάννη Αλεξάνδρα για την εμπιστοσύνη και την βοήθειά τους.

Ευχαριστώ θερμά τη φίλη και Διευθύντρια της Αιματολογικής Κλινικής κα Παγώνη Μαρία για τη βοήθεια, την στήριξη, αλλά –κυρίως– για το ζήλο που μου μετέδωσε για τη μελέτη των οξειών λευχαιμιών.

Μεγάλη ήταν η βοήθεια και η προσφορά του Αιματολόγου Καρακατσάνη Σταμάτη, τον οποίο ευχαριστώ θερμά και του εύχομαι πολλές επιτυχίες στην ζωή του, προσωπικές και επαγγελματικές.

Ευχαριστώ πολύ τις κα Ζαφείρη Μαρία και κα Νικολού Ευαγγελία για την εργαστηριακή βοήθεια που μου προσέφεραν.

Σημαντική ήταν η βοήθεια και η ενθάρρυνση της φίλης Βιολόγου, Κουνιάκη Διαμάντως, κυρίως στο τέλος αυτής της προσπάθειας.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα τη φίλη Αιματολόγο κα Γρηγορίου Ειρήνη, Επιμελήτρια του Τμήματος Ανοσολογίας –Ιστοσυμβατότητας, για το προσωπικό της ενδιαφέρον, τις συμβουλές και τις γνώσεις της.

Ιδιαίτερος ευχαριστώ τη φίλη Βιολόγο κα Γαροφαλάκη Μαρία, υπεύθυνη του εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας της Αιματολογικής κλινικής, για όλη τη γνώση, την εμπειρία, αλλά και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε τα 23 χρόνια που είμαι στο εργαστήριο μαζί της. Με στήριξε σε επαγγελματικό αλλά και σε προσωπικό επίπεδο. Την ευχαριστώ θερμά .

Αισθάνομαι πολύ τυχερή που στην ζωή μου γνώρισα την αγαπημένη μου φίλη Χημικό κα Ψαρρά Αικατερίνη και την ευχαριστώ για την αμέριστη εμπιστοσύνη, τις γνώσεις που μου μετέδωσε και για την πολύπλευρη βοήθεια της χωρίς την οποία δεν θα μπορούσα ποτέ να ολοκληρώσω την παρούσα εργασία. Η ευρύτερη βοήθεια και η

γενναιοδωρία της είναι γνωστή στους χώρους της Κυτταρομετρίας ροής και της Κλινικής Χημείας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου Χρήστο και Ευγενία καθώς και την αδερφή μου Αριστέα για την στήριξη τους.

Ολοκληρώνοντας, θα ήθελα να εκφράσω την αγάπη μου στην οικογένεια μου, τον σύζυγο μου Ανέστη, για την υπομονή και το κουράγιο που μου έδινε όλα αυτά τα χρόνια, αλλά κυρίως τα παιδιά μου Ευγενία και Σωτήρη που η αγάπη τους μου δίνει δύναμη για όλες τις δυσκολίες που εμφανίζονται. Εύχομαι να ανοίξουν τα φτερά τους και να κατακτήσουν τους στόχους τους.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Πίνακας Περιεχομένων.....	9
Κατάλογος Πινάκων.....	17
Κατάλογος Γραφημάτων.....	20
Κατάλογος Εικόνων.....	22
Κατάλογος Συντομογραφιών.....	24
Abbreviation List.....	25
Περίληψη.....	28
Abstract.....	30

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΜΕΡΟΣ Α΄: ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1ο

ΛΕΥΧΑΙΜΙΕΣ

1.1. Εισαγωγή.....	32
1.1.1. Λευχαιμίες Γενικά.....	32
1.1.2. Είδη Λευχαιμιών.....	32
1.2. Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία.....	33
1.2.1. Θεραπεία.....	45
1.3. Ελάχιστη Υπολειμματική Νόσος EYN (MRD).....	47

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2ο

ΜΥΕΛΟΔΥΣΠΛΑΣΤΙΚΑ ΣΥΝΔΡΟΜΑ (ΜΔΣ)

2.1. Εισαγωγή.....	49
2.2. Ταξινόμηση.....	50
2.2.1. Ταξινόμηση ΜΔΣ κατά FAB.....	50
2.2.2. Ταξινόμηση ΜΔΣ κατά WHO.....	51
2.3. Συστήματα Πρόγνωσης.....	55
2.3.1. Διεθνές Προγνωστικό Σύστημα Βαθμολόγησης (International Prognostic Scoring System, IPSS).....	55
2.3.2. Προγνωστικό σύστημα ταξινόμηση των ΜΔΣ κατά WHO (WHO classification-based prognostic scoring system, WPSS).....	57
2.3.3. Λοιπά Προγνωστικά Συστήματα Ταξινόμησης των ΜΔΣ.....	58
2.3.3.α. M.D. Anderson Lower-Risk MDS Prognostic Scoring System (MDA-LR).....	58
2.3.3.β. French Prognostic Scoring System (FPSS).....	59
2.3.4. Επιπλέον προγνωστικοί παράγοντες ταξινόμησης των ΜΔΣ	59
2.3.4.α. Κυτταρομετρία Ροής.....	59
2.3.4.β. Κυτταρογενετική.....	60
2.3.4.γ. Ανάλυση Gene Expression, microRNAs.....	61
2.3.4.δ. Γονιδιακές Μεταλλάξεις.....	62
2.4. Θεραπεία.....	63
2.4.1. Θεραπεία των χαμηλότερου κινδύνου ΜΔΣ.....	63
2.4.1.α. Παράγοντες Ερυθροποίησης (Erythropoiesis Stimulating Agents -ESAs).....	63
2.4.1.β. Υποστηρικτική Αγωγή.....	63
2.4.2. Θεραπεία με Ανοσοκατασταλτικά Φάρμακα.....	64
2.4.3. Θεραπεία με Λεναλιδομίδη.....	65
2.4.4. Θεραπεία των υψηλότερου κινδύνου ΜΔΣ.....	65

2.4.4.α. Χημειοθεραπεία.....	65
2.4.5. Θεραπεία με Παράγοντες Υπομεθυλίωσης (η 5-αζακυτιδίνη και η 5-αζα-2'-δεοξυκυτιδίνη-decitabine).....	65
2.4.6. Αλλογενής Μεταμόσχευση Αιμοποιητικών Κυττάρων.....	66

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3ο

FLT3 και *NPM1* Γονίδια

3.1. Γονίδιο <i>FLT3</i>	67
3.2. Μεταλλάξεις του Γονιδίου <i>FLT3</i>	68
3.3. Γονίδιο <i>NPM1</i>	70
3.4. Μεταλλάξεις του γονιδίου <i>NPM1</i>	72
3.5. Συσχέτιση των μεταλλάξεων <i>NPM1</i> και <i>FLT3</i> με τα ανοσοφαινοτυπικά χαρακτηριστικά τους.....	74

ΜΕΡΟΣ Β': ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ

Εισαγωγή

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4ο

ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟΥ ΕΡΓΟΥ

4.1. Δείγματα.....	78
4.2. Κυτταρομετρία Ροής.....	82
4.2.1. Υλικά και Μέθοδοι.....	82
4.2.1.1. Ανοσοφαινοτυπική Μελέτη.....	82
4.2.1.2. Αρχές Κυτταρομετρίας.....	82
4.2.1.3. Αρχή μεθόδου Κυτταρομετρίας Ροής.....	82
4.2.1.4. Μέρη Κυτταρομετρητή Ροής.....	83
4.2.1.4.α. Υδροδυναμικό σύστημα ή σύστημα ροής.....	84
4.2.1.4.β. Οπτικό σύστημα.....	85

4.2.1.4.γ. Ηλεκτρονικό σύστημα ανάλυσης.....	86
4.2.2. Έλεγχος καλής λειτουργίας του Κυτταρομετρητή Ροής.....	89
4.2.2.1. Τύποι σφαιριδίων.....	89
4.2.2.4.α. Σφαιρίδια οπτικής ευθυγράμμισης (τύπος I standards, alignment particles).....	89
4.2.2.4.β. Σφαιρίδια αναφοράς (τύπος II standards, reference particles).....	90
4.2.2.4.γ. Σφαιρίδια βαθμονόμησης (τύπος III standards, calibration particles).....	90
4.2.3. Πειραματική Πορεία Κυτταρομετρίας Ροής.....	90
4.2.3.1. Αναλώσιμα Υλικά.....	90
4.2.3.2. Όργανα Μελέτης.....	90
4.2.3.3. Διαλύματα.....	91
4.2.3.4. Μονοκλωνικά Αντισώματα.....	91
4.2.4. Αντιδραστήρια Λύσης Ερυθρών Αιμοσφαιρίων.....	93
4.2.4.1. Σύστημα αντιδραστηρίων ImmunoPREP™ της εταιρείας Beckman Coulter.....	93
4.2.4.2. Σύστημα αντιδραστηρίων IntraPREP™ Permeabilization της εταιρείας Beckman Coulter.....	94
4.2.5. Προετοιμασία δειγμάτων.....	94
4.2.5.1. Μελέτη Έκφρασης κυτταρικών δεικτών για τον προσδιορισμό ανοσοφαινοτύπου.....	95
4.2.5.1.α. Αντιγόνα επιφανείας.....	95
4.2.5.1.β. Κυτταροπλασματικά αντιγόνα (MPO, LF, NPM1).....	95
4.2.6. Μελέτη ανοσοφαινοτύπου.....	96
4.2.6.1. Μελέτη ΜΔΣ.....	97
4.2.6.2. Μελέτη ΟΜΛ.....	102
4.2.6.3. Μελέτη των NPM1 και FLT3 με κυτταρομετρία ροής.....	102

4.3. Μοριακή Μελέτη.....	104
4.3.1. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR).....	104
4.3.1.1. DNA DENATURATION (Αποδιάταξη).....	104
4.3.1.2. DNA ANNEALING (Επαναδιάταξη – Υβριδισμός Εκκινητών με τις Μονόκλωνες Αλυσίδες του DNA).....	105
4.3.1.3. DNA EXTENSION (Επιμήκυνση).....	105
4.3.2. Τριχοειδική Ηλεκτροφόρηση.....	106
4.3.3. Αναλώσιμα Υλικά.....	106
4.3.4. Όργανα Μελέτης.....	107
4.3.5. Χημικά – Αντιδραστήρια.....	107
4.3.6. Πειραματική Πορεία.....	108
4.3.6.1. Επεξεργασία δειγμάτων.....	108
4.3.6.2. Απομόνωση μονοπύρηνων κυττάρων με Ficoll-RaquePLUS.....	108
4.3.6.3. Μέτρηση συγκέντρωσης κυττάρων.....	109
4.3.6.4. Εκχύλιση RNA με TRIzol® Reagent.....	112
4.3.6.5. Εκχύλιση DNA.....	113
4.3.7. Ποιοτική ανίχνευση της μετάλλαξης του γονιδίου <i>NPM1</i>.....	114
4.3.8. Ποιοτική ανίχνευση μεταλλάξεων του γονιδίου <i>FLT3</i>.....	116
4.3.8.1. Ποιοτική ανίχνευση της μετάλλαξης του γονιδίου <i>FLT3/ITD</i>.....	116
4.3.8.2. Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της PCR για τη μετάλλαξη <i>FLT3/ITD</i>.....	116
4.3.8.3. Ποιοτική ανίχνευση της μετάλλαξης του γονιδίου <i>FLT3/TKD</i>.....	117
4.3.8.4. Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της PCR για τη μετάλλαξη <i>FLT3/TKD</i>.....	118

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5ο
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

5.1. Στατιστική ανάλυση.....	119
5.2. Στατιστικά αποτελέσματα ανοσοφαινότυπου.....	119
5.3. Στατιστικά στοιχεία της μοριακής μελέτης των δειγμάτων.....	122
5.4. Συσχέτιση της μοριακής μελέτης και του ανοσοφαινότυπου των ασθενών.....	124
5.4.1. Συσχέτιση της ανίχνευσης της μετάλλαξης <i>NPM1</i> με στοιχεία από την κυτταρομετρία, με δημογραφικά στοιχεία και με στοιχεία που αφορούν στην κατάσταση των ασθενών	124
5.4.2. Συσχέτιση της ανίχνευσης της μετάλλαξης <i>ITD</i> με στοιχεία από την κυτταρομετρία, με δημογραφικά στοιχεία και με στοιχεία που αφορούν στην κατάσταση των ασθενών.....	130
5.4.3. Συσχέτιση της ανίχνευσης της μετάλλαξης <i>TKD</i> με στοιχεία από την κυτταρομετρία, με δημογραφικά στοιχεία και με στοιχεία που αφορούν στην κατάσταση των ασθενών.....	135
5.4.4. Συσχέτιση της ανίχνευσης τουλάχιστον μιας μετάλλαξης (<i>NPM1</i> ή/και <i>ITD</i> ή/και <i>TKD</i>) με στοιχεία από την κυτταρομετρία, με δημογραφικά στοιχεία και με στοιχεία που αφορούν στην κατάσταση των ασθενών.....	139
5.4.5. Συσχέτιση της ανίχνευσης των μεταλλάξεων <i>ITD</i> ή/και <i>TKD</i> με στοιχεία από την κυτταρομετρία, με δημογραφικά στοιχεία και με στοιχεία που αφορούν στην κατάσταση των ασθενών.....	146
5.4.6. Συσχέτιση της ανίχνευσης των μεταλλάξεων <i>NPM1</i> και <i>ITD</i> με στοιχεία από την κυτταρομετρία, με δημογραφικά στοιχεία και με στοιχεία που αφορούν στην κατάσταση των ασθενών.....	151
5.4.7. Συσχέτιση της ανίχνευσης των μεταλλάξεων <i>NPM1</i> και <i>TKD</i> με στοιχεία από την κυτταρομετρία, με δημογραφικά στοιχεία και με στοιχεία που αφορούν στην κατάσταση των ασθενών.....	157
5.5. Συσχέτιση των στοιχείων της κυτταρομετρίας με τη νόσο των ασθενών <i>OMΛ/ΜΔ</i>	160

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6ο	162
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	165
Παραρτήματα	

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

<i>Πίνακας</i>		<i>σελ.</i>
1.1	FAB classification 1976.....	35
1.2	World Health Organization (WHO) classification of AML 2008.....	36
1.3	World Health Organization (WHO) classification of AML 2016.....	38
1.4	2017 ELN risk stratification by genetics.....	45
2.1	Ταξινόμηση ΜΔΣ κατά FAB.....	51
2.2	Ταξινόμηση ΜΔΣ κατά WHO 2001.....	52
2.3	Ταξινόμηση ΜΔΣ κατά WHO 2008.....	53
2.4	Ταξινόμηση ΜΔΣ κατά WHO 2016.....	54
2.5	Ταξινόμηση κριτηρίων του IPSS score για τα ΜΔΣ.....	55
2.6	Ταξινόμηση κριτηρίων του IPSS-R (IPSS-revised score) για τα ΜΔΣ...	56
2.7	Σύστημα Πρόγνωσης WPSS με βάση την ταξινόμηση WHO.....	57
2.8	Σύστημα Πρόγνωσης WPSS με βάση την ταξινόμηση WHO.....	62
3.1	Μεταλλάξεις NPM1.....	73
4.1	Δημογραφικά στοιχεία των ασθενών, καθώς και οι τιμές της αιμοσφαιρίνης, των λευκών αιμοσφαιρίων και των αιμοπεταλίων τους	78
4.2	Στοιχεία που αφορούν στο δείγμα των ασθενών.....	79
4.3	Φθορίζουσες ουσίες και τα φασματικά χαρακτηριστικά τους.....	92
4.4	Μονοκλωνικά αντισώματα επισημασμένα με φθορίζουσες ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη.....	92
4.5	Μονοκλωνικά αντισώματα μελέτης ανοσοφαινοτύπου.....	97
5.1	Σύγκριση του αριθμού και ποσοστού των ασθενών με θετική ή αρνητική έκφραση αντιγόνων με κυτταρομετρία ροής.....	119
5.2	Ποσοστά και ένταση έκφρασης των αντιγόνων στο σύνολο των ασθενών.....	120
5.3	Ένταση έκφρασης των αντιγόνων <i>NPM1</i> και <i>CD135</i> στους διαφορετικούς πληθυσμούς κυττάρων.....	121
5.4	Στοιχεία που αφορούν την μοριακή μελέτη των ασθενών.....	122

5.5	Δημογραφικά στοιχεία, αιμοσφαιρίνη, λευκά αιμοσφαίρια, αιμοπετάλια, κατάταξη και ο καρυότυπος των ασθενών, ανάλογα με την ύπαρξη ή μη της μετάλλαξης <i>NPM1</i>	124
5.6	Σύγκριση της έκφρασης των αντιγόνων, σε σχέση με την ανίχνευση ή όχι της μετάλλαξης <i>NPM1</i>	125
5.7	Ποσοτικά στοιχεία έκφρασης των αντιγόνων με κυτταρομετρία ροής, ανάλογα με την ύπαρξη ή μη της μετάλλαξης <i>NPM1</i>	127
5.8	Δημογραφικά στοιχεία, αιμοσφαιρίνη, λευκά αιμοσφαίρια, αιμοπετάλια, κατάταξη και καρυότυπος των ασθενών, ανάλογα με την ύπαρξη ή μη της μετάλλαξης <i>ITD</i>	130
5.9	Σύγκριση της έκφρασης των αντιγόνων, σε σχέση με την ανίχνευση ή όχι της μετάλλαξης <i>ITD</i>	131
5.10	Ποσοτικά στοιχεία έκφρασης των αντιγόνων με κυτταρομετρία ροής, ανάλογα με την ύπαρξη ή μη της μετάλλαξης <i>ITD</i>	132
5.11	Δημογραφικά στοιχεία, αιμοσφαιρίνη, λευκά αιμοσφαίρια, αιμοπετάλια, κατάταξη και καρυότυπος των ασθενών, ανάλογα με την ύπαρξη ή μη της μετάλλαξης <i>TKD</i>	135
5.12	Σύγκριση της έκφρασης των αντιγόνων, σε σχέση με την ανίχνευση ή όχι της μετάλλαξης <i>TKD</i>	136
5.13	Ποσοτικά στοιχεία έκφρασης των αντιγόνων με κυτταρομετρία ροής, ανάλογα με την ύπαρξη ή μη της μετάλλαξης <i>TKD</i>	137
5.14	Δημογραφικά στοιχεία, αιμοσφαιρίνη, λευκά αιμοσφαίρια, αιμοπετάλια, κατάταξη και καρυότυπος των ασθενών, ανάλογα με την ύπαρξη ή μη τουλάχιστον μίας μετάλλαξης.....	139
5.15	Σύγκριση της έκφρασης των αντιγόνων, σε σχέση με την ανίχνευση ή όχι τουλάχιστον μίας μετάλλαξης.....	140
5.16	Ποσοτικά στοιχεία έκφρασης των αντιγόνων με κυτταρομετρία ροής, σε σχέση με την ανίχνευση ή όχι τουλάχιστον μίας μετάλλαξης.....	143
5.17	Δημογραφικά στοιχεία, αιμοσφαιρίνη, λευκά αιμοσφαίρια, αιμοπετάλια, κατάταξη και καρυότυπος των ασθενών, ανάλογα με την ύπαρξη ή μη των μεταλλάξεων <i>ITD</i> ή/και <i>TKD</i>	146
5.18	Σύγκριση της έκφρασης των αντιγόνων, σε σχέση με την ανίχνευση ή όχι των μεταλλάξεων <i>ITD</i> ή/και <i>TKD</i>	147
5.19	Ποσοτικά στοιχεία έκφρασης των αντιγόνων με κυτταρομετρία ροής, σε σχέση με την ανίχνευση ή όχι των μεταλλάξεων <i>ITD</i> ή/και <i>TKD</i>	148

5.20	Δημογραφικά στοιχεία, αιμοσφαιρίνη, λευκά αιμοσφαίρια, αιμοπετάλια, κατάταξη και καρυότυπος των ασθενών, ανάλογα με την ύπαρξη ή μη των μεταλλάξεων <i>NPM1</i> και <i>ITD</i>	151
5.21	Σύγκριση της έκφρασης των αντιγόνων, σε σχέση με την ανίχνευση ή όχι των μεταλλάξεων <i>NPM1</i> και <i>ITD</i>	152
5.22	Ποσοτικά στοιχεία της έκφρασης των αντιγόνων με στοιχεία της κυτταρομετρίας, ανάλογα με την ανίχνευση ή όχι των μεταλλάξεων <i>NPM1</i> και <i>ITD</i>	154
5.23	Δημογραφικά στοιχεία, αιμοσφαιρίνη, λευκά αιμοσφαίρια, αιμοπετάλια, κατάταξη και καρυότυπος των ασθενών, ανάλογα με την ύπαρξη ή μη των μεταλλάξεων <i>NPM1</i> και <i>TKD</i>	157
5.24	Σύγκριση της έκφρασης των αντιγόνων, σε σχέση με την ανίχνευση ή όχι των μεταλλάξεων <i>NPM1</i> και <i>TKD</i>	158
5.25	Ποσοτικά στοιχεία της έκφρασης των αντιγόνων με στοιχεία της κυτταρομετρίας, ανάλογα με την ανίχνευση ή όχι των μεταλλάξεων <i>NPM1</i> και <i>TKD</i>	159
5.26	Σύγκριση της έκφρασης των αντιγόνων, ανάλογα με τη νόσο των ασθενών.....	160
5.27	Ποσοτικά στοιχεία της έκφρασης των αντιγόνων, ανάλογα με τη νόσο των ασθενών.....	161

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ

<i>Γράφημα</i>	<i>σελ.</i>
4.1 Ταξινόμηση των ασθενών.....	80
4.2 Καρυότυπος των ασθενών.....	81
5.1 Ποσοστά ύπαρξης των διαφόρων μεταλλάξεων των ασθενών.....	123
5.2 Ποσοστά των ασθενών που ήταν θετικοί ή αρνητικοί στα CD34, ανάλογα με το αν είχαν ή όχι την μετάλλαξη <i>NPM1</i>	126
5.3 Ποσοστά των ασθενών που ήταν θετικοί ή αρνητικοί στα CD64, ανάλογα με το αν είχαν ή όχι την μετάλλαξη <i>NPM1</i>	126
5.4 Τιμές <i>NPM1 POLY</i> των ασθενών, ανάλογα με την ύπαρξη ή μη μετάλλαξης <i>NPM1</i>	128
5.5 Τιμές του λόγου <i>NPM1 BLAST/POLY</i> των ασθενών, ανάλογα με την ύπαρξη ή μη μίας μετάλλαξης <i>NPM1</i>	129
5.6 Τιμές του αριθμού βλαστικών κυττάρων των ασθενών, ανάλογα με την ύπαρξη ή μη μίας μετάλλαξης <i>ITD</i>	133
5.7 Τιμές <i>CD117 MFI</i> των ασθενών, ανάλογα με την ύπαρξη ή μη μίας μετάλλαξης <i>ITD</i>	134
5.8 Τιμές <i>MPO MFI</i> των ασθενών, ανάλογα με την ύπαρξη ή μη μίας μετάλλαξης <i>ITD</i>	138
5.9 Ποσοστά των ασθενών που ήταν θετικοί ή αρνητικοί στα <i>CD33</i> , ανάλογα με το αν είχαν ή όχι τουλάχιστον μία μετάλλαξη.....	141
5.10 Ποσοστά των ασθενών που ήταν θετικοί ή αρνητικοί στο <i>CD11b</i> , ανάλογα με το αν είχαν ή όχι τουλάχιστον μία μετάλλαξη.....	142
5.11 Τιμές του αριθμού κυττάρων των ασθενών, ανάλογα με την ύπαρξη ή μη μίας τουλάχιστον μετάλλαξης.....	144
5.12 Τιμές έκφρασης <i>CD33 MFI</i> των ασθενών, ανάλογα με την ύπαρξη ή μη μίας τουλάχιστον μετάλλαξης.....	145
5.13 Ποσοστά των ασθενών που ήταν θετικοί ή αρνητικοί στο <i>CD11b</i> , ανάλογα με το αν είχαν ή όχι τουλάχιστον μία μετάλλαξη.....	149
5.14 Τιμές των <i>CD34 MFI</i> των ασθενών, ανάλογα με την ύπαρξη ή μη των μεταλλάξεων <i>ITD</i> ή/και <i>TKD</i>	150

5.15	Ποσοστά των ασθενών που ήταν θετικοί ή αρνητικοί ως προς τα HLADR, ανάλογα με το αν είχαν ή όχι τις μεταλλάξεις <i>NPM1</i> και <i>ITD</i>	153
5.16	Τιμές του CD117 MFI των ασθενών, ανάλογα με την ύπαρξη ή μη των μεταλλάξεων <i>NPM1</i> και <i>ITD</i>	155
5.17	Τιμές των <i>NPM1</i> BLASTS κυττάρων των ασθενών, ανάλογα με την ύπαρξη ή μη των μεταλλάξεων <i>NPM1</i> και <i>ITD</i>	156

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

<i>Εικόνα</i>		<i>σελ.</i>
4.1	Principle of flow cytometric analysis and sorting© B. Fuchs/ MPI-MM.....	83
4.2	Flow Cytometry Fundamental Principle, How FACS Works Boster..	84
4.3	Διάταξη κυψελίδας σε κυτταρομετρητή ροής. Διακρίνεται η κεντρική ροή του δείγματος, η περιβάλλουσα ροή (sheath), η προερχόμενη από laser φωτεινή.....	84
4.4	Σχηματική απεικόνιση των επικαλυμμένων περιοχών εκπομπής.....	85
4.5	Σχηματική απεικόνιση των επικαλυμμένων περιοχών εκπομπής.....	86
4.6	Ιστόγραμμα των χαρακτηριστικών σκέδασης των κυττάρων.....	87
4.7	Στικτόγραμμα (dot plot).....	87
4.8	Ιστόγραμμα κατανομής συχνοτήτων.....	88
4.9	Διαγράμματα τριών διαστάσεων.....	88
4.10	Διάγραμμα FSTOF-FS.....	98
4.11	Διάγραμμα FSC-SSC (οριοθέτηση).....	99
4.12	Density plot CD45/ SS.....	99
4.13	Στικτόγραμμα CD45-SSC.....	100
4.14	Ιστόγραμμα CD117. Η κατανομή των CD117+ κυττάρων αφορά την περιοχή του βλαστικού παραθύρου. Φαίνεται η τιμή του ποσοστού και του MFI των CD117+ κυττάρων.....	101
4.15	Στικτόγραμμα HLA-DR/CD33.....	101
4.16	Συγκριτικό ιστόγραμμα έκφρασης των πρωτεϊνών των γονιδίων <i>NPM1</i> και <i>FLT3</i> (CD135) στους πληθυσμούς των βλαστών, των πολυμορφοκυττάρων και των λεμφοκυττάρων.....	103
4.17	Συνήθειες συνθήκες 94-96°C για 20-60 sec.....	104
4.18	Συνήθειες συνθήκες 50-60°C για 20-60 sec.....	105
4.19	Συνήθειες συνθήκες 72°C για 30sec-2min.....	105
4.20	Πλάκα Neubauer για τη συγκέντρωση των απομονωμένων κυττάρων.	109
4.21	Περιοχή μέτρησης λευκών αιμοσφαιρίων.....	111

4.22	Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR για την μετάλλαξη <i>NPM1</i>	115
4.23	Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR για την μετάλλαξη <i>FLT3/ITD</i>	116
4.24	Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR για την μετάλλαξη <i>FLT3/TKD</i> μετά από επώαση με την περιοριστική ενδονουκλεάση <i>EcoRV</i>	118

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ

ΟΜΛ	Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία
ΟΛΛ	Οξεία Λεμφογενή Λευχαιμία
ΧΜΛ	Χρόνια Μυελογενή Λευχαιμία
ΧΛΛ	Χρόνια Λεμφογενή Λευχαιμία
ΜΟ	Μυελό των Οστών
ΟΛ	Οξεία Λευχαιμία
ΠΑ	Περιφερικό Αίμα
Α/Φ	Ανοσοφαινότυπος
ΠΟΥ	Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας
ΧΜΘ	Χημειοθεραπεία
ΕΥΝ	Ελάχιστη Υπολειμματική Νόσος
ΜΔΣ	Μυελοδυσπλαστικό Σύνδρομο
ΚΡ	Κυτταρομετρία Ροής
Άλλο-ΜΑΚ	Άλλογενή Μεταμόχευση Αιμοποιητικών Κυττάρων

Abbreviation List

MPO	Μυελούπεροξειδάση
CD	Cluster of Differentiation
FAB	French-American-British
WHO	World Health Organization
APL	Acute promyelocytic leukemia
AML	Acute myeloid leukemia
CR	Complete remission
FISH	Fluorescence In Situ Hybridization
MPAL	mixed phenotype acute leukemias
<i>FLT3</i>	Fms-like tyrosine kinase 3
ITD	Internal tandem duplications
TKD	Tyrosine kinase domain
<i>NPM1</i>	Nucleophosmin
CN-AML	Cytogenetically normal AML
STAT3	Signal Transducer and Activator of Transcription 3
IL-6	Interleukin 6
CBF	Common Binding Factor
ELN	European Leukemia Net
MFC	Multiparameter Flow Cytometry
MFI	Mean Fluorescence Intensity
MRD	Minimal Residual Disease
VLA-4	very late antigen-4
OS	Overall Survival
Ara-C	Cytosine arabinoside
IDA	Idarubicin
SEER	Surveillance Epidemiology End Results
MRD	Minimal Residual Disease
RT-qPC	Real-Time quantitative PCR
NGS	Next-Generation Sequencing
LAPs	Leukemia-Associated Phenotypes

MDS	Myelodysplastic Syndromes
sMDS	secondary MDS
tMDS	therapy-related MDS
RA	Refractory anemia
RARS	Refractory anemia with ringed sideroblasts
RAEB	Refractory anemia with excess blasts
RAEB-t	Refractory anemia with excess blasts in transformation
CMML	Chronic myelomonocytic leukemia
MDS-U	Myelodysplastic Syndrome, Unclassifiable
CAC	Clinical Advisory Committee
IPSS	International Prognostic Scoring System
WPSS	WHO classification-based prognostic scoring system
BM	Bone Marrow
NCCN	National Comprehensive Cancer Network
MDA-LR	M.D. Anderson Lower-Risk MDS Prognostic Scoring System
FPSS	French Prognostic Scoring System
AZA	5-azacitidine
FCSS	Cytometric Scoring System
MC	Metaphase Cytogenetics
SNP-A	Single-nucleotide polymorphism array
aCGH	comparative genomic hybridization array
GEP	Microarray-based gene expression profiling
miR	microRNA
ESAs	Erythropoiesis Stimulating Agents
FLK-2 Val	Fetal liver kinase 2
JM	Juxtamembran
AR	Allele Ratio
FLT3-PM	FLT3-Point mutation
NES	Nuclear export signal
NoLS	Nucleolar localization signal
NPMc+	NPM-cytoplasmic
wt	wild type

mut	Mutant
mAb	monoclonal antibody
SSc	Side Scatter
FSc	Forward Scatter
PCR	Polymerase chain reaction
CE	Capillary Electrophoresis
SD	Standard Deviation

Περίληψη

Η διάγνωση της ΟΜΛ και των ΜΔΣ βασίζεται στον συνδυασμό των μορφολογικών, ανοσοφαινοτυπικών, κυτταρογενετικών και μοριακών ευρημάτων. Σε αρκετές μελέτες, ο ανοσοφαινότυπος έχει συσχετιστεί τόσο με τη μοριακή εκτροπή όσο και με την πρόγνωση, ωστόσο τα αποτελέσματα παραμένουν αμφιλεγόμενα. Επιπλέον, έχουν αναφερθεί ορισμένες προσπάθειες για τον προσδιορισμό ορισμένων μοριακών διαταραχών, μέσω ανοσοφαινοτυπικών δεικτών, αλλά με αμφιλεγόμενη επιτυχία. Ο σκοπός αυτής της μελέτης ήταν η συσχέτιση των ανοσοφαινοτυπικών χαρακτηριστικών και μοριακών μεταλλάξεων στους ασθενείς με ΟΜΛ και ΜΔΣ καθώς και η και σύγκριση σχετικών προγνωστικών παραγόντων. Επιπλέον, διεξήχθη μια προσπάθεια να αναπτυχθεί μια κυτταρομετρική μέθοδος διερεύνησης της έκφρασης των πρωτεϊνών των μεταλλαγμένων γονιδίων *NPM1* και *FLT3* τόσο στην επιφάνεια όσο και στο κυτταρόπλασμα των άωρων κυττάρων της μυελικής σειράς.

Στη μελέτη αυτή, συμπεριλήφθηκαν 94 ασθενείς με νεοδιαγνωσθέντα μυελοειδή νεοπλάσματα (ΟΜΛ-ΜΔΣ). Επισημαίνεται ότι οι ασθενείς με οξεία προμυελοκυτταρική λευχαιμία αποκλείστηκαν από την μελέτη. Οι μεταλλάξεις *FLT3* και *NPM1* ανιχνεύθηκαν με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και τριχοειδική ηλεκτροφόρηση. Η ανοσοφαινοτυπική ανάλυση διεξήχθη με πολυπαραμετρική κυτταρομετρία ροής με καθορισμένο πάνελ μονοκλωνικών αντισωμάτων, σε δείγματα περιφερικού αίματος ή μυελού των οστών. Το αντίσωμα νουκλεοφωσμίνης (*NPM1*) και *FLT3* (CD135) χρησιμοποιήθηκαν για τις ανοσοφαινοτυπική ανιχνεύση των μεταλλάξεων.

Από τη μελέτη αυτή, βρέθηκε ότι ασθενείς με χαμηλή έκφραση ή χωρίς έκφραση άωρων κυτταρικών δεικτών, όπως τα CD34, CD117, HLADR, και υψηλή έκφραση πιο ώριμων δεικτών, όπως το CD11b, βρέθηκαν θετικοί για την μετάλλαξη *NPM1*.

Σε ασθενείς με χαμηλή ή καθόλου έκφραση των CD34, CD117, HLADR βρέθηκαν, επιπλέον, μεταλλάξεις του *FLT3*. Η υψηλή έκφραση του CD11b έχει συσχετιστεί με κακή πρόγνωση σε ομάδα ασθενών χωρίς κυτταρογενετικές και μοριακές διαταραχές και ο συνδυασμός των τριών μεταλλάξεων συσχετίζεται, επίσης, με κακή πρόγνωση. Η παρουσία της έκτοπης έκφρασης του CD7 βρέθηκε σε ασθενείς

με *FLT3* αλλά όχι *NPM1* μετάλλαξη. Οι ασθενείς με μυελοδυσπλασικό σύνδρομο είχαν σημαντικά υψηλότερο CD34 MFI, σημαντικά υψηλότερο ποσοστό των διπλά θετικών CD34/117 καθώς και σημαντικά υψηλότερη τιμή στα CD13, σε σύγκριση με τους ασθενείς με οξεία μυελογενή λευχαιμία.

Συμπερασματικά, η κυτταρομετρική ανίχνευση κοινών φαινοτυπικών δεικτών στην ΟΜΛ και στα ΜΔΣ προσφέρει ενδείξεις σχετικά με την παρουσία *NPM1* και *FLT3* μεταλλάξεων, που συνδέονται με την πρόγνωση. Επίσης η θετικότητα κάποιων έκτοπων λεμφικών δεικτών φαίνεται να συσχετίζεται με την παρουσία ή την απουσία αυτών των μεταλλάξεων.

ΛΕΞΕΙΣ-ΚΛΕΙΔΙΑ: ΟΜΛ, ΜΔΣ, *NPM1*, *FLT3* μεταλλάξεις, CD135, ανοσοφαινότυπος

Abstract

Objective: Immunophenotype has been correlated with molecular aberrations in several studies. The aim of this study was the discovery of immunophenotypic features related to mutations in AML and MDS patients connected to prognostic factors. Moreover, an effort to evaluate a method for the detection of the most common *NPM1* mutations of exon12 and Internal Tandem Duplications (ITD) mutations of *FLT3* gene by flow cytometry was performed.

Method: Patients with de novo myeloid neoplasms [AML and MDS (AML-M3 patients were excluded)] were included. *FLT3*/ITD/TKD and *NPM1* mutations were detected by PCR and fragment analysis. The immunophenotypic analysis was performed by multi-dimensional flow cytometry (FC) with a standardized panel of monoclonal antibodies on peripheral blood or bone marrow samples. *Nucleophosmin* Antibody and CD135 were used for the mutations immunophenotypic detection.

Results: *NPM1* and/or *FLT3* mutations correlated with low or no expression of more immature cells markers such as CD34, CD117, HLADR, as well as higher expression of more mature markers such as CD11b. The higher expression of CD33 should be mentioned as well. The presence of *NPM1*mut and *FLT3*/ITD does not seem to be detectable by FC at least using these two monoclonal antibodies. The presence of CD7 aberrant lymphoid marker's expression was associated with *FLT3*mut, *NPM1*_{wt} genotype. CD56 or CD2 positivity was found only in patients' samples negative for *NPM1* and/or *FLT3* mutations.

Conclusions: Certain immunophenotype findings including the presence of aberrant lymphoid markers may be indicative of the presence of mutations in *NPM1* and *FLT3* linked to prognosis.

Keywords: AML, MDS, *NPM1*, *FLT3* expression, CD135, immunophenotype

ΜΕΡΟΣ Α΄: ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1ο

ΛΕΥΧΑΙΜΙΕΣ

1.1. Εισαγωγή

1.1.1. Λευχαιμίες Γενικά

Οι λευχαιμίες είναι νεοπλασματικές διαταραχές του αιμοποιητικού ιστού άγνωστης αιτιολογίας, που χαρακτηρίζονται από την υπερβολική αύξηση παθολογικών λευκών αιμοσφαιρίων.

Αποτελούν μια ετερογενή ομάδα κακοήθων αιματολογικών νοσημάτων, στα οποία ο μυελός των οστών διηθείται από ανώριμα, πρόδρομα κύτταρα που ονομάζονται βλάστες. Εκτός του μυελού, διηθούν διάφορα άλλα όργανα, όπως το ήπαρ, το σπλήνα, τους λεμφαδένες κτλ.

Παράλληλα με την αλλαγή του αριθμού των λευκών αιμοσφαιρίων, παρατηρούνται, επίσης, αλλαγές τόσο στη δομή όσο και στη λειτουργία τους. Ο ακριβής παθογενετικός μηχανισμός δεν έχει πλήρως διευκρινισθεί, πιθανά οφείλεται σε γενετική βλάβη του πολυδύναμου αιμοποιητικού προγονικού κυττάρου, που οδηγεί σε κλωνική εξάπλωση και αναστολή της διαφοροποίησής του σε κάποιο στάδιο της ωρίμανσής του (Mehranfar et al., 2017).

1.1.2. Είδη Λευχαιμιών

Οι λευχαιμίες διακρίνονται σε *οξείες* και *χρόνιες*. Ανάλογα την προέλευσή τους, χωρίζονται σε *Μυελογενή ή Μυελοβλαστική* και *Λεμφοκυτταρική ή Λεμφογενή*.

Στις οξείες λευχαιμίες, κυριαρχούν τα βλαστικά κύτταρα κυρίως σε ποσοστό μεγαλύτερο του 20%, ενώ απωθείται η παραγωγή των ώριμων φυσιολογικών κυττάρων. Η εξέλιξη της νόσου είναι ταχεία. Διακρίνονται σε Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία (ΟΜΛ) και Οξεία Λεμφογενή Λευχαιμία (ΟΛΛ).

Στις χρόνιες λευχαιμίες, κυριαρχούν τα ώριμα ή καλά διαφοροποιημένα μη φυσιολογικά κύτταρα. Η εξέλιξη της νόσου είναι αργή και συνήθως εκδηλώνεται

μετά από χρόνια. Διακρίνονται σε Χρόνια Μυελογενή Λευχαιμία (ΧΜΛ) και Χρόνια Λεμφογενή Λευχαιμία (ΧΛΛ).

1.2. Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία

Η οξεία μυελογενής λευχαιμία (ΟΜΛ) είναι μια επιθετική κακοήθεια των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων στο μυελό των οστών (ΜΟ) και η πλέον κοινή μορφή οξείας λευχαιμίας (ΟΛ) στους ενήλικες, αποτελώντας το 80% των περιπτώσεων σε αυτή την ηλικιακή ομάδα (Yamamoto & Goodman, 2008). Μόνο το έτος 2015, διαγνώστηκαν περίπου 20.830 νέες περιπτώσεις και περισσότεροι από 10.000 ασθενείς κατέληξαν από το νόσημα αυτό (Siegel et al., 2016). Η επίπτωση της ΟΜΛ αυξάνεται παράλληλα με την αύξηση της ηλικίας, από 1,3 περιπτώσεις ανά 100.000 κατοίκους ηλικίας <65 ετών σε 12,2 περιπτώσεις ανά 100.000 κατοίκους >65 ετών (Dores et al., 2012· Ries et al., 2003), με μια διάμεση ηλικία διάγνωσης τα 70 έτη και περίπου το 1/3 των ασθενών να είναι 75 ετών κατά τη διάγνωση (Howlader et al., 2013· Klepin, 2015· Ossenkoppele & Löwenberg, 2015).

Οι περισσότερες κλινικές εκδηλώσεις της ΟΜΛ οφείλονται στη συσσώρευση κακοήθων, πτωχά διαφοροποιημένων κυττάρων (βλαστικά κύτταρα) μυελικής προέλευσης στον μυελό των οστών, στο περιφερικό αίμα και λιγότερο συχνά σε άλλα όργανα, με πιο επικίνδυνα τη διήθηση του κεντρικού νευρικού συστήματος και των πνευμόνων. Η πλειοψηφία των ασθενών εμφανίζουν λευκοκυττάρωση και σημεία μυελικής ανεπάρκειας (η πλέον κοινή αιτία θανάτου), όπως αναιμία και θρομβοπενία, αφού τα λευχαιμικά κύτταρα επηρεάζουν τη φυσιολογική αιμοποίηση. Η κόπωση, η ανορεξία και η απώλεια σωματικού βάρους είναι συχνές εκδηλώσεις, ενώ λεμφαδενοπάθεια και οργανομεγαλία δεν παρατηρούνται συχνά. Επί μη θεραπευτικής αντιμετώπισης ή αστοχίας της, οι ασθενείς καταλήγουν εντός μηνών από τη διάγνωση λόγω λοίμωξης ή αιμορραγίας.

Η διάγνωση της ΟΛ στηρίζεται κυρίως στην παρουσία βλαστικών κυττάρων σε ποσοστό τουλάχιστον 20% στο ΜΟ ή το ΠΑ (Döhner et al., 2010). Η ΟΜΛ επιβεβαιώνεται στη συνέχεια με την αναγνώριση στο οπτικό μικροσκόπιο και εντός των λευχαιμικών κυττάρων των ραβδίων Auer (οξύφιλοι), συχνά μακρόστενοι ενδοκυττάριοι σχηματισμοί που αναγνωρίζονται κυρίως στην οξεία προμυελοκυτταρική και μυελομονοκυτταρική λευχαιμία, αλλά και στην πλειοψηφία

των ασθενών με τη διαμετάθεση (8;21) και την ανάδειξη της θετικότητας των βλαστικών κυττάρων στην μυελοϋπεροξειδάση (MPO) μέσω της κυτταροχημείας, αλλά και αντιγόνων επιφανείας (Cluster of Differentiation, CD) όπως τα CD33 και CD13 μέσω της κυτταρομετρίας ροής ή ανοσοφαινότυπου (A/Φ), η οποία ωστόσο δεν πρέπει να υποκαθιστά τη μορφολογική εκτίμηση των λευχαιμικών κυττάρων. Η διάγνωση της ΟΜΛ μπορεί να στηριχθεί επιπλέον στην αναγνώριση εξωμυελικής εντόπισης, ή στην αναγνώριση διαμεταθέσεων, όπως οι t(8;21), t(15;17) ή της αναστροφής inv(16) σε συνδυασμό με τα κλινικά στοιχεία, ανεξάρτητα από το ποσοστό των βλαστικών κυττάρων (Vardiman et al., 2009).

Υπάρχουν κυρίως δυο συστήματα κατάταξης των ΟΜΛ. Το πρώτο σύστημα, το οποίο αρχικά χρησιμοποιήθηκε το 1970 από μια ομάδα Αμερικανών, Γάλλων και Άγγλων επιστημόνων είναι το French-American-British (FAB), το οποίο βασίστηκε κυρίως στην μορφολογία, στο στάδιο ωρίμανσης των κυττάρων και στην κυτταροχημεία. Χωρίζει την ΟΜΛ σε 7 υπότυπους M0-M7 (Πίνακας 1.1). Στις M0-M5 υπερτερούν πρώιμα κύτταρα λευκών αιμοσφαιρίων, στις M6 κυριαρχούν πρώιμα κύτταρα της ερυθράς σειράς και στις M7 των αιμοπεταλίων. Στο σύστημα ταξινόμησης FAB οι υπότυποι μπορούν να καθορίσουν την πρόγνωση αλλά και την θεραπεία, όπως για παράδειγμα στις M3 (οξεία προμυελοκυτταρική λευχαιμία) που ανταποκρίνεται στην χορήγηση ρετινοϊκού οξέος. Το σύστημα κατάταξης κατά FAB με την πάροδο των χρόνων δεν μπορούσε να δώσει αρκετές πληροφορίες για την πρόγνωση, καθώς δεν λάμβανε υπόψη παράγοντες που καθορίζουν την πρόγνωση και την πορεία της νόσου. Το 1999, η Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας (ΠΟΥ, World Health Organization, WHO) πρότεινε αναθεώρηση της FAB ταξινόμησης ενσωματώνοντας περισσότερα χαρακτηριστικά. Έχουν περιγραφεί διάφορες κατηγορίες (Πίνακας 1.2). Το σύστημα κατάταξης WHO ανανεώθηκε το 2016, ενσωματώνοντας μορφολογικά, ανοσοφαινοτυπικά, γενετικά και κλινικά χαρακτηριστικά (Πίνακας 1.3) (WHO, 2016).

Η ΟΜΛ μπορεί να αναπτυχθεί σε έδαφος μιας προϋπάρχουσας αιματολογικής νόσου ή ως αποτέλεσμα προηγούμενης ΧΜΘ με αναστολείς της τοποϊσομεράσης II ή αλκυλιούντες παράγοντες, ή ακτινοθεραπείας (Sill et al., 2011). Ωστόσο, στην πλειοψηφία των περιπτώσεων, εμφανίζεται πρωτοπαθώς (de novo) σε προηγουμένως υγιή άτομα.

Πίνακας 1.1.

FAB classification 1976

FAB subtype	Name	% of adult AML patients	Prognosis compared to average for AML
M0	Undifferentiated acute myeloblastic	5%	Worse
M1	Acute myeloblastic leukemia with minimal maturation	25%	Average AverageAverage
M2	Acute myeloblastic leukemia with maturation	15%	Better
M3	Acute promyelocytic leukemia (APL)	10%	Best
M4	Acute myelomonocytic leukemia	20%	Average
M4 eos	Acute myelomonocytic leukemia with eosinophilia	5%	Better
M5	Acute monocytic leukemia	10%	Average
M6	Acute erythroid leukemia	5%	Worse
M7	Acute megakaryoblastic leukemia	5%	Worse

News –Medical.net

Ανεξάρτητα της αιτιολογίας, η παθογένεση της ΟΜΛ αφορά τον ανώμαλο πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση ενός κλωνικού πληθυσμού πρόδρομων κυττάρων μυελικής σειράς. Η ΟΜΛ είναι ένα περίπλοκο νόσημα με έντονη δυναμική εξέλιξης και χαρακτηρίζεται από πολλαπλές επίκτητες μεταλλάξεις, συνυπάρχοντες, αμοιβαίως ανταγωνιζόμενους κλώνους και προοδευτική επιδείνωση με την πάροδο του χρόνου. Καλά χαρακτηρισμένες χρωμοσωμικές διαμεταθέσεις, όπως οι t(8:21) και t(15:17), οδηγούν στην παραγωγή παθολογικών, χημαιρικών πρωτεϊνών, οι οποίες με τη σειρά τους επηρεάζουν δυσμενώς τη φυσιολογική ωρίμανση των μυελικών προγονικών κυττάρων.

Πίνακας 1.2.

World Health Organization (WHO) classification of AML 2008

World Health Organisation (WHO) ²³⁶	Incidence	FAB type ^{237,238}	Incidence
1 AML with recurrent genetic abnormalities t(8;21)(q22;q22) inv(16)(p13q22) or t(16;16)(p13;q22) t(15;17)(q22;q12), (PML/RAR α) and variants 11q23 (MLL) abnormalities	30-40%	M2 M4eo M3	25-30% 5-15% 5-10%
2 AML with multilineage dysplasia Following MDS or MDS/MPD Without antecedent MDS or MPD, with dysplasia in at least 50% of cells in 2 or more myeloid lineages	10-15%		
3 AML and MDS, therapy related Alkylating agents/radiation-related Topoisomerase 2 inhibitor-related Others	5-10%		
4 AML, not otherwise categorised	30-40%		
Minimally differentiated		M1	10-15%
Without maturation		M0	2-5%
With maturation			
Acute myelomonocytic leukemia		M4	5-15%
Acute monoblastic/monocytic leukemia		M5	15-25%
Acute erythroid leukemia		M6	-3%
Acute megakaryblastic leukemia		M7	5-10%
Acute basophilic leukemia			
Acute panmyelosis with myelofibrosis			
Myeloid sarcoma			

MDS indicates myelodysplastic syndrome; MPD myeloproliferative syndrome

Christian Michel Zwaan

Οι κυτταρογενετικές αλλοιώσεις σχετίζονται με την πιθανότητα επίτευξης CR και τη συνολική επιβίωση (Grimwade et al., 2001). Από αυτές, ο καρυότυπος των λευχαιμικών κυττάρων είναι ο πλέον σημαντικός προγνωστικός παράγοντας της ανταπόκρισης στη θεραπεία εφόδου και της επιβίωσης των ασθενών (Grimwade, 2001· Mrózek et al., 2004).

Οι χρωμοσωμικές διαμεταθέσεις t(8;21), t(15;17) και η αναστροφή inv(16) σχετίζονται με ευνοϊκή πρόγνωση, δηλαδή με 3/ετή συνολική επιβίωση 66% και 33% σε ασθενείς μικρότερους και μεγαλύτερους των 60 ετών, αντίστοιχα (Döhner et al., 2010· Estey, 2014· Mrózek et al., 2012). Αντίθετα, χρωμοσωμικές ανωμαλίες, όπως ο σύνθετος καρυότυπος [με τουλάχιστον 3 χρωμοσωμικές ανωμαλίες χωρίς την

συνύπαρξη χαρακτηριστικών επαναλαμβανόμενων ανωμαλιών, που έχουν ήδη αναγνωριστεί στην ταξινόμηση του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (ΠΟΥ) του 2008], η μονοσωμία 5 ή 7, η διαμετάθεση t(6;9), η αναστροφή inv(3) και ανωμαλίες που περιλαμβάνουν το μακρό σκέλος του χρωμοσώματος 11 [εκτός από τη διαμετάθεση t(9;11)] έχουν συσχετιστεί με σημαντικό υψηλότερο κίνδυνο θεραπευτικής αστοχίας και θανάτου (Mrózek et al., 2012). Μια σημαντική παρατήρηση είναι ότι η επίπτωση των δυσμενούς έναντι των ευνοϊκής πρόγνωσης χρωμοσωμικών ανωμαλιών αυξάνεται με την αύξηση της ηλικίας, γεγονός που σε ένα βαθμό εξηγεί τα πτωχότερα θεραπευτικά αποτελέσματα στους μεγαλύτερης ηλικίας ασθενείς με OML (Appelbaum et al., 2006· Bacher et al., 2005· Leith et al., 1997).

Στην ταξινόμηση του ΠΟΥ και στην κατηγορία «OML με επαναλαμβανόμενες γενετικές ανωμαλίες» περιλαμβάνονται 8 ισοζυγισμένες διαμεταθέσεις και αναστροφές και οι παραλλαγές τους (Arber et al., 2016· Swerdlow et al., 2017). Εννέα ισοζυγισμένες διαμεταθέσεις και πολλαπλές μη ισοζυγισμένες ανωμαλίες υποστηρίζουν τη διάγνωση της «OML με σχετιζόμενες με μυελοδυσπλασία αλλοιώσεις», όταν το ποσοστό των βλαστικών κυττάρων στο ΜΟ ή το ΠΑ είναι 20% ή μεγαλύτερο. Επίσης, αναγνωρίζονται άλλες, σπάνιες ισοζυγισμένες αναδιατάξεις (Grimwade et al., 2010, 2016). Αν και αναγνωρίζονται ως εναρκτήρια γεγονότα της ανάπτυξης OML, δεν συνιστούν επίσημα συγκεκριμένες νοσολογικές οντότητες. Περιλαμβάνουν γονίδια που κωδικοποιούν για παράδειγμα επιγενετικούς ρυθμιστές [π.χ., KMT2A (MLL), CREBBP και NSD1) ή συστατικά του συμπλέγματος πυρηνικών πόρων (nuclear pore complex, NUP98 και NUP214). Κάποιες αναδιατάξεις δεν γίνονται φανερές με τον καρυότυπο, όπως η t(5;11)(q35.2;p15.4), η οποία έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό NUP98-NSD1 μεταγράφων, παρατηρείται στο ~1% των νεότερων σε ηλικία ασθενών με OML και σχετίζεται με χειρότερη πρόγνωση (Gough et al., 2011· Hollink et al., 2011· Thol et al., 2013).

Οι γονιδιακές αναδιατάξεις μπορεί να φανερωθούν με ανοσοφθορισμό *in situ* (Fluorescence In Situ Hybridization, FISH) επί αποτυχίας της κλασικής κυτταρογενετικής ανάλυσης. Παράδειγμα τέτοιων γονιδιακών αναδιατάξεων είναι οι RUNX1-RUNX1T1, CBFB-MYH11, KMT2A (MLL) και MECOM (EVI1), ή οι απώλειες των μακρών σκελών των χρωμοσωμάτων 5 και 7 ή τμήματος του βραχέος σκέλους του χρωμοσώματος 17.

Πίνακας 1.3.

World Health Organization (WHO) classification of AML 2016

- **AML with genetic abnormalities**

AML with a translocation between chromosomes 8 and 21 [t(8;21)]
AML with a translocation or inversion in chromosome 16 [t(16;16) or inv(16)]
APL with the <i>PML-RARA</i> fusion gene
AML with a translocation between chromosomes 9 and 11 [t(9;11)]
AML with a translocation between chromosomes 6 and 9 [t(6;9)]
AML with a translocation or inversion in chromosome 3 [t(3;3) or inv(3)]
AML (megakaryoblastic) with a translocation between chromosomes 1 and 22
AML with the <i>BCR-ABL1</i> (<i>BCR-ABL</i>) fusion gene*
AML with mutated <i>NPM1</i> gene
AML with biallelic mutations of the <i>CEBPA</i> gene
AML with mutated <i>RUNX1</i> gene*

*προσωρινή κατάταξη

- **AML with myelodysplasia-related changes**
- **Therapy related acute myeloid leukemia**
 - Alkylating agent related
 - Topoisomerase II inhibitor related
- **Acute myeloid leukemia not otherwise categorized:**
Περιλαμβάνει περιπτώσεις AML που δεν εμπίπτουν σε καμία από τις παραπάνω ομάδες.
 - AML minimally differentiated (M0)
 - AML without maturation (M1)
 - AML with maturation (M2)
 - Acute myelomonocytic leukemia (M4)
 - Acute monoblastic and monocytic leukemia (M5a, M5b)
 - Acute erythroid leukemia (M6)
 - Acute megakaryoblastic leukemia (M7)
 - Acute basophilic leukemia
 - Acute panmyelosis with myelofibrosis
- **Myeloid Sarcoma**
- **Myeloid proliferations related to Down syndrome:**
 - Transient abnormal myelopoiesis
 - Myeloid leukemia associated with Down syndrome
- **Undifferentiated and biphenotypic acute leukemias** (εμφανίζουν μυελοκυτταρικά και λεμφοκυτταρικά χαρακτηριστικά, αναφέρονται και ως μικτές φαινοτυπικές οξείες λευχαιμίες, **mixed phenotype acute leukemias MPALs**).

Στην ανάπτυξη της ΟΜΛ, εκτός από μεγάλες χρωμοσωμικές αναδιατάξεις, εμπλέκονται και μοριακές αλλοιώσεις οι οποίες αναγνωρίζονται και σε περισσότερο από 97% των περιπτώσεων ΟΜΛ, και μάλιστα συχνά χωρίς να αναγνωρίζονται μεγάλες χρωμοσωμικές ανωμαλίες (Cancer Genome Atlas Research Network, 2013· Patel et al., 2012).

Το τμήμα του The Cancer Genome Atlas που αφορούσε τους ασθενείς με ΟΜΛ (συνολικά 200) ανίχνευσε 23 γονίδια που ήταν συχνά μεταλλαγμένα και άλλα 237 μεταλλαγμένα σε τουλάχιστον 2 ασθενείς, μη τυχαία συσχετιζόμενα και αμοιβαίως αποκλειόμενα. Τα μεταλλαγμένα γονίδια διακρίνονται σε 9 λειτουργικές κατηγορίες, όπως αυτά που οδηγούν σε σύντηξη μεταγραφικών παραγόντων, αυτά που αφορούν μεταλλάξεις του *NPM1* γονιδίου, τα ογκοκατασταλτικά γονίδια, τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για τη μεθυλίωση του DNA, σηματοδοτικά γονίδια, γονίδια που είναι υπεύθυνα για την τροποποίηση της χρωματίνης και τους μυελικούς μεταγραφικούς παράγοντες, myeloid transcription factor genes, τα γονίδια του συμπλέγματος της cohesin και τα γονίδια του συμπλέγματος του spliceosome (Cancer Genome Atlas Research Network, 2013).

Μελέτες με ζωικά μοντέλα στις αρχές του αιώνα οδήγησαν στην ανάπτυξη του «μοντέλου των 2 χτυπημάτων» (Gilliland & Griffin, 2002), σύμφωνα με το οποίο οι μεταλλάξεις τάξεως I (οι οποίες οδηγούν σε ενεργοποίηση μονοπατιών πολλαπλασιασμού) πρέπει να συνδυαστούν με μεταλλάξεις τάξεως II (οι οποίες επηρεάζουν τη φυσιολογική διαφοροποίηση των φυσιολογικών κυττάρων) για να ξεκινήσει η λευχαιμογένεση (Kihara et al., 2014· Takahashi, 2011). Συχνές μεταλλάξεις τάξης I, όπως οι fms-like tyrosine kinase 3 (*FLT3*) internal tandem duplications (ITD) και tyrosine kinase domain mutations (TKD), K/NRAS, TP53 και c-KIT διαγιγνώσκονται σε ~28%, 12%, 8% και 4% των ασθενών αντίστοιχα (Cancer Genome Atlas Research Network, 2013). Σημαντικές μεταλλάξεις τάξης II περιλαμβάνουν αυτές στο γονίδιο της νουκλεοφוסμίνης (*NPM1*) και το *CEBPA* γονίδιο, οι οποίες και ανευρίσκονται σε ~27% και 6% των ασθενών αντίστοιχα, και οι οποίες σχετίζονται με καλύτερη πρόγνωση (Cancer Genome Atlas Research Network, 2013). Πρόσφατα, ανακαλύφθηκαν και τρίτης τάξης μεταλλάξεις σε γονίδια που αφορούν την επιγενετική ρύθμιση και επηρεάζουν την κυτταρική διαφοροποίηση και

τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Αυτές οι μεταλλάξεις ανευρίσκονται σε γονίδια που αφορούν την μεθυλίωση του DNA, όπως τα DNMT3A, TET2 και IDH-1 και -2, οι οποίες και ανευρίσκονται σε περισσότερους από το 40% των ασθενών με ΟΜΛ (Cancer Genome Atlas Research Network, 2013· Patel et al., 2012).

Οι γονιδιακές ανωμαλίες έχουν ισχυρή προγνωστική ισχύ (Metzeler et al., 2016· Paraemmanuil et al., 2016· Patel et al., 2012). Ανάμεσα σε αυτές η *FLT3-ITD* είναι δυσμενούς πρόγνωσης (Schnittger et al., 2002· Thiede et al., 2002· Whitman et al., 2010), ενώ η μετάλλαξη του *NPM* γονιδίου με ταυτόχρονη απουσία *FLT3-ITD* μετάλλαξης είναι ευνοϊκής πρόγνωσης (Becker et al., 2010· Döhner et al., 2005· Schnittger et al., 2005· Thiede et al., 2006) σε ασθενείς με κυτταρογενετικά φυσιολογική ΟΜΛ (cytogenetically normal AML, CN-AML). Σε ασθενείς με CN-AML έχει, επίσης, συσχετισθεί η μετάλλαξη στο γονίδιο *CEBPA* (με ταυτόχρονη απουσία της *FLT3-ITD* μετάλλαξης) με βελτιωμένη επιβίωση (Döhner et al., 2005, 2010). Αυτή η ευνοϊκή επίδραση έχει βρεθεί να αφορά μόνο περιπτώσεις ασθενών με διαλληλικές μεταλλάξεις στο *CEBPA* γονίδιο (Li et al., 2015).

Οι μεταλλάξεις στο *RUNX1* γονίδιο ανευρίσκονται σε ασθενείς με δυσμενείς χαρακτήρες, όπως η μεγάλη ηλικία, προϋπάρχουσα μυελική διαταραχή και συνυπάρχουσες μεταλλάξεις γονιδίων όπως στα γονίδια *SRSF2* και *ASXL1*, και σχετίζονται με δυσμενή πρόγνωση (Gaidzik et al., 2016· Mendler et al., 2012· Metzeler et al., 2016· Paraemmanuil et al., 2016· Tsai et al., 2016). Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *ASXL1* ανευρίσκονται επίσης σε μεγαλύτερης ηλικίας ασθενείς και σχετίζονται με δυσμενή πρόγνωση (Devillier et al., 2015· Paschka et al., 2015· Pratorcorona et al., 2012· Schnittger et al., 2013· Tsai et al., 2016). Οι μεταλλάξεις στο ογκοκατασταλτικό γονίδιο *p53* (*TP53*) συνδέονται με σύνθετο ή μονοσωμικό καρυότυπο αλλά και συγκεκριμένες χρωμοσωμικές ανευλοειδίες (π.χ., 25/5q2, 27/7q2), επίσης σχετίζονται με δυσμενή πρόγνωση. Η *TP53* και ο σύνθετος καρυότυπος προσδίδουν ανεξάρτητες προγνωστικές πληροφορίες, ενώ ο συνδυασμός τους σχετίζεται με τη χειρότερη δυνατή πρόγνωση (Metzeler et al., 2016· Paraemmanuil et al., 2016· Tsai et al., 2016).

Από άλλες μελέτες έχει διαφανεί και ο ρόλος του μεταγραφικού παράγοντα STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3) στη διέγερση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της επιβίωσής τους (Cook et al., 2014· Ghoshal et

al., 2008· Yamada & Kawachi, 2013). Μέχρι και 50% των ασθενών με ΟΜΛ εμφανίζουν αυξημένη φωσφορυλίωση του STAT3 είτε λόγω αυξημένης παραγωγής κυτταροκινών, όπως η IL-6, είτε λόγω μεταλλάξεων στους υποδοχείς με δραστηριότητα τυροσινικής κινάσης (όπως αναδιπλασιασμοί του *FLT3* ή λιγότερο συχνά στο *JAK2*), η οποία και σχετίζεται με χειρότερη επιβίωση (Schuringa et al., 2000· Spiekermann et al., 2003· Steensma et al., 2006).

Η αναγνώριση και χρήση στην κλινική πράξη γενετικών δεδομένων που σχετίζονται με την ταξινόμηση και θεραπεία της ΟΜΛ συνιστά ένα πολύ ενεργό πεδίο έρευνας. Σε μία πρόσφατη μελέτη αναλύθηκε γενετικό υλικό από 1540 ασθενείς που είχαν ενταχθεί σε προοπτικές μελέτες χορήγησης εντατικής θεραπείας, τόσο με μοριακές μεθόδους (111 ογκογονίδια μυελικής σειράς) όσο και με κυτταρογενετικές (Paraemmanuil et al., 2016). Από την ανάλυση των δεδομένων φάνηκε η συνύπαρξη μεταλλάξεων σε 11 διαφορετικές και μη επικαλυπτόμενες μεταξύ τους τάξεις, η κάθε μία με διαφορετικό φαινότυπο και πρόγνωση. Εκτός από τις ήδη γνωστές αναδείχθηκαν 3 επιπλέον: οι μεταλλάξεις σε ρυθμιστές του ματίσματος της χρωματίνης και του RNA, οι *TP53* μεταλλάξεις, χρωμοσωμικές ανευπλοειδίες και (προσωρινά προς το παρόν) οι *IDH2^{R172}* μεταλλάξεις.

Μελέτες κλωνικής εξέλιξης σε ασθενείς και μοντέλα ξενομοσχεύματος έχουν φανερώσει ότι μεταλλάξεις σε γονίδια που είναι υπεύθυνα για τη ρύθμιση της τροποποίησης του DNA και την κατάσταση της χρωματίνης, όπως τα *DNMT3A*, *TET2* και *ASXL1*, είναι συχνά ήδη παρούσες σε προλευχαιμικά αρχέγονα ή προγονικά κύτταρα και συμβαίνουν πρώιμα στη λευχαιμογένεση (Corces-Zimmerman et al., 2014· Jan et al., 2012· Krönke et al., 2013· Shlush et al., 2014). Αυτές οι μεταλλάξεις είναι παρούσες σε αρχέγονα, πολυδύναμα κύτταρα, τα οποία μπορεί να είναι ανθεκτικά στην εντατική ΧΜΘ και να οδηγήσουν σε κλωνική εξέλιξη κατά τη διάρκεια της κλινικής ύφεσης και τελικά στην υποτροπή του νοσήματος.

Σύμφωνα με το «μοντέλο των 2 χτυπημάτων», η παθογένεση και βιολογική συμπεριφορά της ΟΜΛ εξαρτάται σε πολύ μεγάλο βαθμό από την αλληλεπίδραση μεταξύ των διάφορων σωματικών μεταλλάξεων μεταξύ τους αλλά και με χρωμοσωμικές αναδιατάξεις (Paraemmanuil et al., 2016). Απτά παραδείγματα τέτοιων αλληλεπιδράσεων είναι η ευνοϊκής πρόγνωσης μετάλλαξη του *NPM1* γονιδίου όταν αυτή δε συνοδεύεται από συνυπάρχουσα *FLT3*-ITD μετάλλαξη (ή, αν

υπάρχει, τα *FLT3*-ITD μετάγραφα να είναι λίγα σε αριθμό) (Becker et al., 2010· Döhner et al., 2005· Ho et al., 2016· Pratorcorona et al., 2013· Schnittger et al., 2005· Schlenk et al., 2014· Thiede et al., 2006), ενώ η συνύπαρξη μεταλλάξεων τόσο στο *ASXL1* όσο και στο *RUNX1* γονίδιο σχετίζονται με ιδιαίτερα πτωχή πρόγνωση (Paraemmanuil et al., 2016· Paschka et al., 2015). Στις CBF (Common Binding Factor) OMA [και κυρίως στην OMA με την t(8;21) διαμετάθεση], η παρουσία μεταλλάξεων στο γονίδιο *KIT*, ειδικά όταν τα μεταλλαγμένα μετάγραφα ανευρίσκονται σε υψηλό αριθμό, φαίνεται να σχετίζονται με χειρότερη πρόγνωση (Duployez et al., 2016· Jourdan et al., 2013· Paschka et al., 2013). Τέλος, ακόμα και αν μια γονιδιακή βλάβη δεν φαίνεται να έχει προγνωστικό χαρακτήρα, μπορεί, ωστόσο, να αποτελέσει θεραπευτικό στόχο, όπως νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις που αφορούν τα γονίδια *IDH1*, *IDH2* και *KMT2A (MLL)* (Döhner et al., 2015).

Όλα τα παραπάνω, βοηθούν στη βελτίωση των προγνωστικών συστημάτων σε ασθενείς με OMA, ειδικά σε ασθενείς με φυσιολογικό καρυότυπο και οι οποίοι αποτελούν σχεδόν το 50% των ασθενών με OMA. Έτσι, έχει προκύψει το ευρέως υιοθετημένο European Leukemia Net (ELN) σύστημα ταξινόμησης, το οποίο αρχικά περιλάμβανε 4 διαφορετικές ομάδες κινδύνου (Döhner et al., 2010). Η ομάδα ευνοϊκής πρόγνωσης περιλάμβανε ασθενείς με *inv (16)*, t(8;21), μετάλλαξη του *NPM1* γονιδίου χωρίς *FLT3*-ITD μετάλλαξη (*NPM1+/FLT3*-ITD-) ή διαλληλικές μεταλλάξεις του *CEBPA*. Στην ομάδα δυσμενούς πρόγνωσης περιλαμβάνονταν ασθενείς με μονοσωμία 7 ή 5, έλλειψη του μακρού σκέλους του χρωμοσώματος 7, ανωμαλίες του μακρού σκέλους του χρωμοσώματος 3, του βραχέος σκέλους του χρωμοσώματος 17 ή του μακρού σκέλους του χρωμοσώματος 11 [εκτός από τη διαμετάθεση t(9;11)], t(6;9) διαμετάθεση ή σύνθετο ή μονοσωμικό καρυότυπο (Medeiros et al., 2010) και πιθανώς ασθενείς στους οποίους ο κυτταρογενετικός έλεγχος δεν ήταν δυνατός (Medeiros et al., 2014). Στην ομάδα ενδιάμεσου-1 κινδύνου ανήκαν ασθενείς με φυσιολογικό καρυότυπο και αρνητικοί για την μετάλλαξη *FLT3*-ITD, ενώ όλοι οι υπόλοιποι ασθενείς συμπεριλαμβάνονταν στην ενδιάμεσου-2 κινδύνου ομάδα. Το παραπάνω προγνωστικό σύστημα ταξινόμησης αναθεωρήθηκε πρόσφατα και πλέον οι ασθενείς διακρίνονται σε 3 ομάδες κινδύνου (ευνοϊκής, ενδιάμεσης και δυσμενούς πρόγνωσης), ενώ υπάρχουν και κάποιες ακόμα αλλαγές (Döhner et al., 2017).

Η πολυπαραμετρική κυτταρομετρία ροής (Multiparameter Flow Cytometry, MFC) ή Α/Φ των λευχαιμικών κυττάρων είναι ακόμα ένα πολύτιμο βοήθημα στη διάγνωση, πρόγνωση και επανέλεγχο ασθενών με ΟΜΛ. Η τεχνική αυτή στηρίζεται στην ανίχνευση παθολογικών αντιγόνων επιφανείας στην επιφάνεια των λευχαιμικών κυττάρων, είτε κυτταροπλασματικών στο κυτταρόπλασμα τους (Grimwade et al., 2014· Jaso et al., 2014). Η ευαισθησία της μεθόδου υπολογίζεται σε 10^{-4} αλλά εξαρτάται και από διάφορους παράγοντες (Grimwade et al., 2014· Jaso et al., 2014) και υπολογίζεται ότι είναι 10 φορές μεγαλύτερη χρησιμοποιώντας δείγμα μυελού από ότι χρησιμοποιώντας περιφερικό αίμα. Ο Α/Φ των λευχαιμικών κυττάρων προσδιοριζόμενος με την MFC τεχνική (συχνά χρησιμοποιώντας τουλάχιστον 5-7 χρώματα) χρησιμεύει στην επιβεβαίωση της σειράς προέλευσης των λευχαιμικών κυττάρων, συνηθέστερα είτε μέσω της ανίχνευσης δεικτών επιφανείας που φυσιολογικά ανιχνεύονται μόνο σε άωρα κύτταρα είτε μέσω της συνέκφρασης αντιγόνων και της λεμφικής σειράς στους μυελοβλάστες.

Ο Α/Φ είναι απαραίτητος για την τεκμηρίωση της διάγνωσης της ΟΜΛ με ελάχιστη διαφοροποίηση, της οξείας μεγακαρυοβλαστικής λευχαιμίας και της οξείας λευχαιμίας αμφίβολης προέλευσης. Η ΟΜΛ με ελάχιστη διαφοροποίηση δε διαθέτει μορφολογικά ή κυτταροχημικά χαρακτηριστικά μυελικής προέλευσης. Στους περισσότερους ασθενείς τα βλαστικά κύτταρα εκφράζουν αντιγόνα που φυσιολογικά αναγνωρίζονται πρώιμα στην αιμοποίηση (π.χ., CD34, CD38 και HLA-DR) και υπολείπονται στους περισσότερους δείκτες μυελικής και μονοκυτταρικής διαφοροποίησης, ενώ η μη αναγνωριζόμενη με την κυτταροχημεία ενδοκυττάρια MPO μπορεί να ανιχνευθεί μέσω της MFC, τουλάχιστον σε ένα ποσοστό των βλαστικών κυττάρων. Η οξεία μεγακαρυοβλαστική λευχαιμία χαρακτηρίζεται από τουλάχιστον 20% βλαστικά κύτταρα εκ των οποίων το 50% ή περισσότερα είναι μεγακαρυοκυτταρικής προέλευσης. Στην επιφάνεια των μεγακαρυοβλαστών ανιχνεύεται χαρακτηριστικά μία ή περισσότερες γλυκοπρωτεΐνες των αιμοπεταλίων όπως η CD41 και/ή η CD61 και λιγότερο συχνά η CD42. Η οξεία λευχαιμία αμφίβολης προέλευσης είναι σπάνια και περιλαμβάνει περιπτώσεις στις οποίες δεν αναγνωρίζεται κανένας δείκτης διαφοροποίησης (οξεία αδιαφοροποίητη λευχαιμία) ή εκφράζονται δείκτες τόσο της μυελικής όσο και της λεμφικής ή άλλης σειράς (οξεία διφαινοτυπική λευχαιμία). Στην οξεία αδιαφοροποίητη λευχαιμία εκφράζονται συχνά δείκτες όπως οι HLA-DR, CD34 και/ή CD38 αλλά εξ ορισμού δε διαθέτουν κανένα

αντιγόνο επιφανείας το οποίο να σχετίζεται με συγκεκριμένη σειρά προέλευσης. Η οξεία διφαινοτυπική λευχαιμία μπορεί να αποτελείται από λευχαιμικά κύτταρα διαφορετικής σειράς προέλευσης ή από ένα κυτταρικό πληθυσμό στην επιφάνεια του οποίου εκφράζονται δείκτες διαφόρων κυτταρικών σειρών, ή ακόμα και από τον συνδυασμό τους.

Δεν υπάρχει καθολική συμφωνία σχετικά με το ποσοστό έκφρασης πάνω από το οποίο μία ΟΛ θεωρείται θετική για ένα δείκτη. Ένα συχνά χρησιμοποιούμενο κριτήριο για τους περισσότερους δείκτες είναι το όριο του 20% του συνολικού πληθυσμού των βλαστικών κυττάρων, ενώ για συγκεκριμένους δείκτες (π.χ., κυτταροπλασματικό CD3, MPO, TdT, CD34, CD117) εφαρμόζεται ένα χαμηλότερο ποσοστό (10%) (Bene et al., 1995). Η ποσοτικοποίηση της έκφρασης διαφόρων αντιγόνων επιφανείας και κυτταροπλασματικών δεικτών είναι απαραίτητη για την επιβεβαίωση της σειράς προέλευσης, τη διάγνωση της οξείας διφαινοτυπικής λευχαιμίας και την ανίχνευση της παθολογικής έκφρασης ανοσοφαινοτυπικών δεικτών που επιτρέπουν τον προσδιορισμό της ελάχιστης υπολειμματικής νόσου (Minimal Residual Disease, MRD) (Vardiman et al., 2009).

Ορισμένες ΟΜΛ με επαναλαμβανόμενες γενετικές ανωμαλίες σχετίζονται με χαρακτηριστικούς ανοσοφαινοτυπικούς δείκτες. Για παράδειγμα, ασθενείς με ΟΜΛ και διαμετάθεση t(8;21) συχνά εκφράζουν τους λεμφικής σειράς δείκτες CD19 ή λιγότερο συχνά το CD7 ή τον δείκτη CD56 (Baer et al., 1997· Kita et al., 1992). Στα βλαστικά κύτταρα ασθενών με ΟΜΛ και inv(16) ανευρίσκεται συχνά ο σχετιζόμενος με την T λεμφική σειρά δείκτης CD214, ενώ σε ασθενείς με ΟΜΛ και μετάλλαξη στο *NPM1* το αντιγόνο επιφανείας CD33 έχει υψηλή έκφραση ενώ το CD34 χαμηλή ή και μηδενική (Falini et al., 2005).

Ο υποδοχέας χυμοκινών CXCR4 εκφράζεται και είναι λειτουργικά ενεργός στην ΟΜΛ, και η έντονη έκφρασή του στον Α/Φ σχετίζεται με δυσμενή πρόγνωση σε αναδρομικές μελέτες (Sproo et al., 2007). Πιθανώς, αποτελεί και έναν ελκυστικό θεραπευτικό στόχο, μετά και από την ανάπτυξη μικρών μορίων και εξανθρωποποιημένων μονοκλωνικών αντισωμάτων που στοχεύουν ειδικά τον υποδοχέα CXCR4, ενώ αναμένονται και τα αποτελέσματα κλινικών δοκιμών στις οποίες χορηγούνται είτε μόνα τους είτε σε συνδυασμό με κλασική ΧΜΘ. Αντίθετα, η έκφραση του “very late antigen-4” (VLA-4) στους μυελοβλάστες δεν έχει προγνωστική αξία, αλλά όταν ανιχνεύεται συνδεδεμένο με τον υποδοχέα του (διαλυτό

VCAM-1) σχετίζεται με στατιστικά σημαντικά αυξημένη συνολική επιβίωση (Becker et al., 2009). Η παρατήρηση αυτή έχει ιδιαίτερο βιολογικό ενδιαφέρον και υπονοεί ότι και το VLA-4 μπορεί να αποτελεί πιθανό θεραπευτικό στόχο.

1.2.1. Θεραπεία

Τα θεραπευτικά σχήματα για την αντιμετώπιση της ΟΜΛ ποικίλουν ανάλογα με την προγνωστική ταξινόμηση των ασθενών καθώς και την ηλικία. Στον Πίνακα 1.4 που ακολουθεί, φαίνεται η κατάταξη των ασθενών με βάση τις τελευταίες οδηγίες της ELN.

Πίνακας 1.4.
2017 ELN risk stratification by genetics

Risk category	Genetic abnormality
Favorable	t (8;21) (q22; q22.1); <i>RUNX1-RUNX1T1</i>
	inv (16) (p13.1q22) or t (16;16) (p13.1; q22); <i>CBFB-MYH11</i>
	Mutated <i>NPM1</i> without <i>FLT3-ITD</i> or with <i>FLT3-ITD</i>
	Biallelic mutated <i>CEBPA</i>
Intermediate	Mutated <i>NPM1</i> and <i>FLT3-ITD</i>
	Wild-type <i>NPM1</i> without <i>FLT3-ITD</i> or with <i>FLT3-ITD</i> (without adverse-risk genetic lesions)
	t (9;11) (p21.3; q23.3); <i>MLLT3-KMT2A</i>
	Cytogenetic abnormalities not classified as favorable or adverse
	t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i>
	t(v;11q23.3); <i>KMT2A</i> rearranged
Adverse	t(9;22)(q34.1;q11.2); <i>BCR-ABL1</i>
	inv (3) (q21.3q26.2) or t (3;3) (q21.3; q26.2); <i>GATA2, MECOM(EV11)</i>
	-5 or del(5q); -7; -17/abn(17p)
	Complex karyotype, [§] monosomal karyotype
	Wild-type <i>NPM1</i> and <i>FLT3-ITD</i>
	Mutated <i>RUNX1</i>
	Mutated <i>ASXL1</i>
Mutated <i>TP53</i>	

Στόχος της θεραπείας είναι η πλήρης ύφεση (Complete Remission, CR). Για τον σκοπό αυτό, έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορα θεραπευτικά σχήματα και το ιδανικότερο είναι αυτό που μπορεί να επιτύχει CR από τον πρώτο κύκλο.

Η έναρξη της θεραπείας πρέπει να είναι έγκαιρη –ιδίως στους νέους ασθενείς– γιατί η καθυστέρησή της μπορεί να επιφέρει μειωμένη ανταπόκριση και μείωση της συνολικής επιβίωσης (Overall Survival, OS). Βασικά, η χημειοθεραπεία στις ΟΜΛ χωρίζεται κυρίως σε δυο φάσεις, στην θεραπεία εφόδου και θεραπεία σταθεροποίησης. Στις Μ3 τα θεραπευτικά πρωτόκολλα είναι διαφορετικά.

Η θεραπεία εφόδου (Induction Therapy) είναι γνωστή σαν “7+3” και περιλαμβάνει: Cytarabine, cytosine arabinoside (Ara-C) 100 ή 200mg/m² που δίνεται σε συνεχή έγχυση για 7 μέρες σε συνδυασμό με Idarubicin, (IDA) χορηγούνται σε 12mg/m την μέρα για 3 μέρες. Στους ασθενείς που ανιχνεύεται η μετάλλαξη *FLT3* συμπληρωματικά χορηγείται Midostaurin 50mg x2 την ημέρα, τις μέρες 8-21 του κύκλου. Ο αριθμός των κύκλων εφόδου εξαρτάται από την ανταπόκριση του ασθενούς, συνήθως 1-2 κύκλους.

Στους ασθενείς με ΟΜΛ, η εντατική χημειοθεραπεία (ΧΜΘ) εφόδου με συνδυασμούς διάφορων δόσεων κυταραβίνης και ανθρακυκλίνης ή και με άλλα χημειοθεραπευτικά φάρμακα οδηγεί σε πλήρη ύφεση (Complete Response, CR) το 40%-80% αυτών ενώ η πιθανότητα ίασης ανέρχεται σε 5%-60%, ανάλογα με χαρακτηριστικά τόσο του ασθενή όσο και της νόσου, όπως η ηλικία, η κατάσταση ικανότητας, οι κυτταρογενετικές ανωμαλίες και μοριακές διαταραχές στα λευχαιμικά κύτταρα και η λειτουργικότητα ζωτικών οργάνων (Bishop et al., 1998· Grimwade et al., 1998· Lowenberg et al., 1999· Mayer et al., 1994· Wahlin et al., 1991). Ενώ η 5/ετής συνολική επιβίωση των ασθενών με ΟΜΛ έχει βελτιωθεί τις 4 τελευταίες δεκαετίες, παραμένει γενικά μη ικανοποιητική αφού από 39% σε ηλικίες <65 ετών μειώνεται σε 8,5% στις ηλικίες 65–74 ετών και <2% σε ασθενείς 75 ετών ή μεγαλύτερους (Klerin, 2015). Γενικά, σε ασθενείς 60 ετών ή μεγαλύτερους η διάμεση συνολική επιβίωση είναι μικρότερη του 1 έτους, ο κίνδυνος πρώιμου θανάτου σε ασθενείς με ΟΜΛ μεγαλύτερους των 60 ετών που έλαβαν εντατική εισαγωγική ΧΜΘ πολύ μεγαλύτερος από ότι σε ασθενείς μικρότερους των 60 ετών, και το ποσοστό CR μόλις 50% σε αντίθεση με το 70% που παρατηρείται σε νεότερους ασθενείς

(Anderson et al., 2002· Büchner et al., 2006· Goldstone et al., 2001· Kantarjian et al., 2006· Rowe et al., 2004).

Τα στατιστικά στοιχεία που προκύπτουν από τη μελέτη μεγάλων πληθυσμών στις ΗΠΑ (Surveillance Epidemiology End Results, SEER) επιβεβαιώνουν αυτή τη διαφορά (National Cancer Institute, 2012). Λαμβάνοντας υπόψη ότι υγιή άτομα ηλικίας 65 ετών στον Δυτικό Κόσμο έχουν ένα προσδόκιμο επιβίωσης περίπου 20 επιπλέον έτη και ότι ακόμα και άτομα στις αρχές της 9^{ης} δεκαετίας της ζωής τους αναμένεται να επιβιώσουν για ακόμα 3 χρόνια, είναι φανερό ότι η διάγνωση με ΟΜΛ έχει εξαιρετικά δυσμενή επίδραση σε αυτή την ηλικιακή ομάδα (WHO, 2016).

Επειδή υπάρχει μεγάλος κίνδυνος υποτροπής, μετά τη θεραπεία εφόδου ακολουθεί θεραπεία σταθεροποίησης (Consolidation). Στη θεραπεία σταθεροποίησης ή εδραίωσης συνιστάται η χορήγηση υψηλής δόσης κυταραβίνης cytarabine 1.5-3.0 gr/m² x2 την ημέρα ,τις ημέρες 1,3,5 του κύκλου. Ο αριθμός των κύκλων εδραίωσης μπορεί να είναι 2-4.Στους ασθενείς με ενδιάμεση ή δυσμενή πρόγνωση η θεραπεία επιλογής μετά την 1^η πλήρη ύφεση είναι η αλλογενής μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων.

1.3. Ελάχιστη Υπολειμματική Νόσος EYN (MRD)

Ο προσδιορισμός της ανταπόκρισης στη θεραπεία (μέσω του ελέγχου της MRD) με την MFC (ο οποίος και είναι δυνατός σε >90% των ασθενών με ΟΜΛ) δίνει περισσότερες προγνωστικές πληροφορίες από ό,τι η αξιολόγηση της ύφεσης με βάση τη μορφολογία. Η MRD μπορεί να προσδιοριστεί και με μοριακές τεχνικές, όπως η Real-Time quantitative PCR (RT-qPCR), η digital PCR και οι επόμενης γενιάς τεχνικές αλληλούχισης [Next-Generation Sequencing (NGS)-based technologies]. Η κάθε μέθοδος διαφέρει ως προς το ποσοστό των ασθενών στο οποίο μπορεί να εφαρμοστεί και ως προς την ευαισθησία τους να ανιχνεύουν την MRD (Grimwade & Freeman, 2014· Ossenkoppele & Schuurhuis, 2014). Το μεγάλο πλεονέκτημα, ωστόσο, του προσδιορισμού της MRD μέσω της κυτταρομετρίας ροής είναι ότι μπορεί να εφαρμοστεί σχεδόν σε όλους τους ασθενείς. Αν και η ευαισθησία της είναι τουλάχιστον 10 φορές μικρότερη από αυτή της RQ-PCR, αυτή αναμένεται να βελτιωθεί με τη χρήση τεχνολογίας που στηρίζεται στην ανίχνευση 8 ή 10 χρωμάτων.

Η MRD μπορεί να προσδιοριστεί (1) πρώιμα, μετά την εισαγωγική ΧΜΘ και μετά τις θεραπείες σταθεροποίησης ώστε να προσδιοριστεί η κατάσταση ύφεσης και η κινητική της, και (2) σε διαδοχικές χρονικές στιγμές, μετά τη σταθεροποίηση, για την ανίχνευση μίας επικείμενης μορφολογικής υποτροπής. Η εκτίμηση του βάθους της ανταπόκρισης με την MFC έχει δειχθεί σε πολλές μελέτες ότι προσφέρει ανεξάρτητες προγνωστικές πληροφορίες και μπορεί να συμβάλει στη διαστρωμάτωση του κινδύνου, ωστόσο θα πρέπει η εκτίμηση αυτή να γίνεται σε εξειδικευμένα εργαστήρια και σύμφωνα με τα ήδη καθιερωμένα, αναλυτικά πρωτόκολλα (Araki et al., 2016· Chen et al., 2015· Freeman et al., 2008, 2013· Loken et al., 2012· Terwijn et al., 2013).

Αρχικά, η εκτίμηση της MRD γινόταν με τον προσδιορισμό του φαινότυπου των λευχαιμικών κυττάρων (Leukemia-Associated Phenotypes, LAPs) στη διάγνωση και την προσπάθεια εντοπισμού αυτών των δεικτών στα εμπύρηννα κύτταρα μετά από την ολοκλήρωση της θεραπείας. Ωστόσο, γρήγορα αυτό αποδείχθηκε προβληματικό, αφού οι LAPs ήταν συχνά ασταθείς μεταξύ της διάγνωσης και της υποτροπής. Έτσι, πλέον, χρησιμοποιούνται μεθοδολογίες που αναγνωρίζουν τους παθολογικούς μυελοβλάστες με βάση αντιγόνα επιφανείας και σύμφωνα με την απόκλισή τους από τον φυσιολογικό τρόπο έκφρασης, ανάλογα με τη σειρά προέλευσης και τον βαθμό ωρίμανσης των κυττάρων (“different than normal” μέθοδος), κάτι που επιτρέπει τον προσδιορισμό της MRD ακόμα και αν δεν έχει γίνει Α/Φ προσδιορισμός των βλαστικών κυττάρων κατά τη διάγνωση.

Μέσω της MFC, η ανίχνευση της MRD μπορεί να γίνει ανεξάρτητα από μεθοδολογικές διαφορές, όρια θετικότητας, χρόνο προσδιορισμού και ηλικία των ασθενών. Από τους ασθενείς με μη ανιχνεύσιμη MRD, περίπου το 20%-33% θα υποτροπιάσει, σε αντίθεση με το 85-95% των ασθενών με ανιχνεύσιμη MRD, είτε αφορά ενήλικες είτε παιδιατρικούς ασθενείς (Inaba et al., 2012).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2ο

ΜΥΕΛΟΔΥΣΠΛΑΣΤΙΚΑ ΣΥΝΔΡΟΜΑ (ΜΔΣ)

2.1. Εισαγωγή

Τα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα – ΜΔΣ (Myelodysplastic Syndromes, MDS) είναι μια ετερογενής ομάδα ασθενειών, οι οποίες σχετίζονται με κλωνικές αιμοποιητικές διαταραχές που χαρακτηρίζονται από ανεπαρκή αιμοποίηση και παραγωγή μη φυσιολογικών κυττάρων. Οι διαταραχές αυτές μπορεί να είναι τόσο ποσοτικές όσο και ποιοτικές και επηρεάζουν μία ή περισσότερες αιμοποιητικές σειρές (Nimer, 2008· Valent et al., 2007). Συχνά, ο μυελός των οστών εμφανίζεται υπερκυτταρικός, ενώ συχνή είναι η εμφάνιση πολλών σωματικών μεταλλάξεων, όπως επίσης αυξημένη είναι η συχνότητα εξέλιξης τους (περίπου το 30%) σε οξεία μυελογενή λευχαιμία (ΟΜΛ) (Gerds et al., 2013· Will et al., 2012).

ΜΔΣ εμφανίζουν κυρίως άτομα ηλικίας 60-80 ετών. Το 86% των ασθενών είναι άνω των 60 ετών και το ποσοστό εμφάνισης αυξάνεται σε άτομα άνω των 70. Σε άτομα κάτω των 50 ετών το ποσοστό είναι κοντά στο 6% (Bowen, 2006· Ma, 2012· Sekeres, 2010). Μελέτες αναφέρουν ότι οι άνδρες παρουσιάζουν ελαφρώς αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΜΔΣ σε σχέση με τις γυναίκες (Ma, 2012). Σπάνια έχουμε την εμφάνιση ΜΔΣ σε παιδιά με χαρακτηριστικά πολύ διαφορετικά σε σχέση με αυτά των ενηλίκων, για παράδειγμα δεν έχουν εμφανιστεί σε παιδιά ΜΔΣ του τύπου RARS και 5q- ενώ μεγάλο ποσοστό των παιδιών εμφανίζουν ανωμαλίες στο χρωμόσωμα 7 (Bowen, 2006).

Η παθογένεση του ΜΔΣ δεν είναι πλήρως κατανοητή, περιλαμβάνει τη σταδιακή απόκτηση ογκογόνων μεταλλάξεων και μπορεί να προκύψουν πρωτοπαθή (de novo) σε ποσοστό 80-90% ή δευτεροπαθή (secontary MDS, sMDS) μετά από έκθεση σε παράγοντες, όπως αλκυλιωτικοί παράγοντες, περιβαλλοντικές τοξίνες π.χ. βενζόλιο, έκθεση σε γεωργικά χημικά προϊόντα (εντομοκτόνα, παρασιτοκτόνα, ζιζανιοκτόνα ή λιπάσματα), διαλυτικά μέσα, ή έκθεση σε διάφορες μορφές ακτινοβολίας κτλ, ενώ ορισμένες μορφές προκύπτουν μετά από χημειοθεραπεία (therapy-related, tMDS)). Έχει αναφερθεί ότι η αυξημένη κατανάλωση αλκοόλ και καπνίσματος είναι από τους βασικούς παράγοντες εμφάνισης ΜΔΣ. Επίσης, το

οικογενειακό ιστορικό αιματολογικών νεοπλασιών είναι ένας από τους παράγοντες εμφάνισης ΜΔΣ.

Τέλος, ΜΔΣ μπορεί να αναπτυχθούν από προ υπάρχοντες κλώνους ανθεκτικών στη χημειοθεραπεία (π.χ., με μεταλλάξεις του TP53) (Wong et al., 2015).

2.2. Ταξινόμηση

Δύο είναι οι βασικές ταξινομήσεις των ΜΔΣ: η κατά FAB και η κατά WHO, που περιγράφονται αναλυτικά στις παρακάτω υποενότητες.

2.2.1. Ταξινόμηση ΜΔΣ κατά FAB

Η Γαλλο-Αμερικανο-Βρετανική (French-American-British (FAB) ομάδα περιέγραψε αρχικά, το 1976, τα ΜΔΣ ως προλευχαιμίες. Το 1982, η ίδια ομάδα μελέτης πρότεινε μια ταξινόμηση βασισμένη κυρίως σε μορφολογικά χαρακτηριστικά, τόσο στο αίμα όσο και στο μυελό των οστών. Συγκεκριμένα, περιέγραφε το ποσοστό των δακτυλιοειδών σιδηροβλαστών στα βλαστικά κύτταρα του μυελού και τον αριθμό των μονοκυττάρων στο περιφερικό αίμα καθώς και την παρουσία των ραβδίων Auer (Cazzola & Malcovati, 2005· Nösslinger et al., 2001).

Καταγράφηκαν πέντε υποομάδες με σημαντικά διαφορετικές προγνώσεις:

- 1.** Ανθεκτική Αναιμία (RA- refractory anemia)
- 2.** Ανθεκτική Αναιμία με δακτυλιοειδείς σιδηροβλάστες (RARS- refractory anemia with ringed sideroblasts)
- 3.** Ανθεκτική Αναιμία με περίσσεια βλαστών (RAEB- refractory anemia with excess blasts)
- 4.** Ανθεκτική Αναιμία με περίσσεια βλαστών σε μεταμόρφωση (RAEB-t- refractory anemia with excess blasts in transformation)
- 5.** Χρόνια Μυελομονοκυτταρική Λευχαιμία (CMML- chronic myelomonocytic leukemia) (Cazzola & Malcovati, 2005· Ghosh, 2011· Vardiman, 2012).

Πίνακας 2.1.

Ταξινόμηση ΜΔΣ κατά FAB

FAB Classification of Myelodysplastic Syndrome				
Subtype	Blood Myeloblasts	Bone Marrow Myeloblasts	Other Features	Average Survival
RA	< 1%	< 5%		32 mo
RARS	< 1%	< 5%	RS > 15% BM cells	76 mo
RAEB	< 5%	5%–20%		10 mo
RAEB-t	5%–30%	20%–30%		5 mo
CMML	< 5%	< 20%	AMC > 1,000/μL	22 mo

AMC = absolute monocyte count; BM = bone marrow; CMML = chronic myelomonocytic leukemia; FAB = French/American/British; RA = refractory anemia; RAEB = RA with excess blasts; RAEB-t = RAEB in transformation; RARS = RA with ringed sideroblasts; RS = ringed sideroblast.

Adapted from Muhi GJ et al. [9]

2.2.2. Ταξινόμηση ΜΔΣ κατά WHO

Το 2001, η Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας (ΠΟΥ, World Health Organization, WHO) πρότεινε αναθεώρηση της FAB ταξινόμησης κυρίως με μορφολογική προσέγγιση, ενώ ενσωματώθηκαν κλινικά και γενετικά δεδομένα. Σημαντικό ρόλο στην ταξινόμηση της WHO ως ορογνωστικό δείκτη κατέχει το ποσοστό των βλαστών στο μυελό σε μυελοβλάστες, μονοβλάστες, προμονοκύτταρα και μεγακαρυοβλάστες, αλλά όχι ερυθροβλάστες (Ghosh, 2011).

Στην καινούρια ταξινόμηση καταργήθηκαν, αλλά και προστέθηκαν ομάδες :

- 1) Καταργήθηκε η ομάδα RAEB-t
- 2) Η CMML κατετάχθη στην ομάδα των μυελοδυσπλαστικών/μυελουπερπλαστικών νοσημάτων
- 3) Στις ομάδες RA και RARS κατετάχθηκαν ασθενείς με δυσπλασία στην ερυθρά σειρά
- 4) Εισήχθη η νέα κατηγορία- Ανθεκτική κυτταροπενία με δυσπλασία πολλών κυτταρικών σειρών με (RCMD-RS) ή χωρίς δακτυλιοειδείς σιδηροβλάστες (RCMD)
- 5) Η ομάδα RAEB διαιρέθηκε στις ομάδες RAEB-1 και RAEB-2 με βάση τον αριθμό των βλαστικών κυττάρων στο μυελό.

- 6) Προστέθηκε η ομάδα των Αταξινόμητων ΜΔΣ (MDS-U).
 7) Το σύνδρομο 5q- ταξινομήθηκε ως ξεχωριστή κατηγορία.

Πίνακας 2.2.

Ταξινόμηση ΜΔΣ κατά WHO 2001

Category	Peripheral blood	Bone marrow
RA	Anemia Blasts <1% Monocytes <1,000/μl	Erythroid dysplasia Blasts <5% Ring sideroblasts <15%
RARS	Anemia Blasts <1% Monocytes <1,000/μl	Dysplasia only in the erythroid line Ring sideroblasts ≥15% Blasts <5%
RCMD	Cytopenias (bi- or pancytopenia) Blasts <1% Monocytes <1,000/μl	Dysplasia ≥10% of the cells Blasts <5% Ring sideroblasts <15%
RCMD-RS	Cytopenias (bi- ou pancytopenia) Blasts <1% Monocytes <1,000/μl	Dysplasia ≥10% of the cells Blasts <5% Ring sideroblasts ≥15%
RAEB-I	Cytopenias Blasts <5% Monocytes <1,000/μl	Dysplasia uni- or multilines Blasts 5-9%
RAEB-II	Cytopenias Blasts 5-19% Monocytes <1,000/μl Auer rods ±	Dysplasia uni- or multilines Blasts 10-19% Auer rods ±
5q- syndrome	Anemia Blasts <5% Normal or increased platelet counts	Megakaryocytes hypolobulate normal or increased Blasts <5% del(5q) alone
MDS without classification	Cytopenias Blasts <1%	Single line dysplasia of the granulocytes or megakaryocytes Blasts <5%

RA, refractory anemia; RARS, RA with ring sideroblasts; RCMD, refractory cytopenia with multiline dysplasia; RCMD-RS, RCMD with ring sideroblasts; RAEB, RA with excess blasts; MDS, myelodysplastic syndrome.

Το 2008, η WHO σε συνεργασία με την European Association for Haematopathology και την Society for Hematopathology δημοσίευσε μια αναθεωρημένη και διευρυμένη έκδοση της ταξινόμησης αυτών των αιματολογικών νοσημάτων. Ο ορισμός των υποομάδων MDS έγινε με βάση την ακριβή κλινική σημασία, ενώ πολύ σημαντικός ήταν ο διαγνωστικός ρόλος της κυτταρογενετικής και της κυτταρομετρίας ροής (Πίνακας 2.3) (Ghosh, 2011· Vardiman, 2012).

Πίνακας 2.3.

Ταξινόμηση ΜΔΣ κατά WHO 2008

	Blood findings	Bone marrow findings
RCUD	single or bi-cytopenia	dysplasia in $\geq 10\%$ of 1 cell line < 5% blasts
RA		dysplasia in $\geq 10\%$ of the erythroid cell line < 5% blasts
RN		dysplasia in $\geq 10\%$ of the granulocytic cell line < 5% blasts
RT		dysplasia in $\geq 10\%$ of the megakaryocytic cell line < 5% blasts
RARS	anemia, no blasts	$\geq 15\%$ of erythroid precursors with ring sideroblasts, erythroid dysplasia only < 5% blasts
RCMD	cytopenia(s), < $1 \times 10^9/L$ monocytes	dysplasia in $\geq 10\%$ of cells in ≥ 2 hematopoietic lineages $\pm 15\%$ ring sideroblasts, < 5% blasts
RAEB-1	cytopenia(s) $\geq 2-4\%$ blasts < $1 \times 10^9/L$ monocytes	unilineage or multilineage dysplasia no Auer rods 5-9% blasts
RAEB-2	5-19% blasts < $1 \times 10^9/L$ monocytes	unilineage or multilineage dysplasia or Auer rods or 10-19% blasts
5q-	anemia, platelet levels normal or increased	unilineage erythroid dysplasia, isolated del(5q) < 5% blasts
MDS-U	cytopenias	unilineage dysplasia with pancytopenia or no dysplasia but characteristic MDS cytogenetics, < 5% blasts

Refractory Thrombocytopenia and Neutropenia: a Diagnostic Challenge
The Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases

Την άνοιξη του 2014, μια κλινική συμβουλευτική επιτροπή (Clinical Advisory Committee, CAC) αποτελούμενη από παθολόγους, αιματολόγους, ογκολόγους και γενετιστές συνέστησε την αναθεώρηση της ταξινόμησης στην τέταρτη έκδοσή της. Η αναθεώρηση της τέταρτης έκδοσης έλαβε ως βάση την τρίτη και την τέταρτη έκδοση, περιλαμβάνοντας κλινικά χαρακτηριστικά, μορφολογικά, ανοσοφαινοτυπικά, κυτταρογενετικά και μοριακά για τον προσδιορισμό της νόσου (Πίνακας 2.4) (Arber et al., 2016).

Πίνακας 2.4.

Ταξινόμηση ΜΑΣ κατά WHO 2016

PB and BM findings and cytogenetics of MDS

	Dysplastic lineages	Cytopenias*	Name	BM and PB blasts	Cytogenetics by conventional karyotypic analysis
MDS with single lineage dysplasia (MDS-SLD)	1	1 or 2	<15%/<5% [†]	BM <5%, PB <1%, no Auer rods	Any, unless fulfills all criteria for MDS with isolated del(5q)
MDS with multiline age dysplasia (MDS-MLD)	2 or 3	1-3	<15%/<5% [†]	BM <5%, PB <1%, no Auer rods	Any, unless fulfills all criteria for MDS with isolated del(5q)
MDS with ring sideroblasts (MDS-RS)					
MDS-RS with single line age dysplasia (MDS-RS-SLD)	1	1 or 2	≥15%/≥5% [†]	BM <5%, PB <1%, no Auer rods	Any, unless fulfills all criteria for MDS with isolated del(5q)
MDS-RS with multiline age dysplasia (MDS-RS-MLD)	2 or 3	1-3	≥15%/≥5% [†]	BM <5%, PB <1%, no Auer rods	Any, unless fulfills all criteria for MDS with isolated del(5q)
MDS with isolated del(5q)	1-3	1-2	None or any	BM <5%, PB <1%, no Auer rods	del(5q) alone or with 1 additional abnormality except -7 or del(7q)
MDS with excess blasts (MDS-EB)					
MDS-EB-1	0-3	1-3	None or any	BM 5%-9% or PB 2%-4%, no Auer rods	Any
MDS-EB-2	0-3	1-3	None or any	BM 10%-19% or PB 5%-19% or Auer rods	Any
MDS, unclassifiable (MDS-U)					
with 1% blood blasts	1-3	1-3	None or any	BM <5%, PB = 1%, [‡] no Auer rods	Any
with single lineage dysplasia and pancytopenia	1	3	None or any	BM <5%, PB <1%, no Auer rods	Any
based on defining cytogenetic abnormality	0	1-3	<15%	BM <5%, PB <1%, no Auer rods	MDS-defining abnormality
Refractory cytopenia of childhood	1-3	1-3	None	BM <5%, PB <2%	Any

* Cytopenias defined as: hemoglobin, <10 g/dL; platelet count, <100 × 10⁹/L; and absolute neutrophil count, <1.8 × 10⁹/L.

Rarely, MDS may

present with mild anemia or thrombocytopenia above these levels. PB monocytes must be <1 × 10⁹/L

ARBER et al. Blood, 19 May 2016

2.3. Συστήματα Πρόγνωσης

2.3.1. Διεθνές Προγνωστικό Σύστημα Βαθμολόγησης (International Prognostic Scoring System, IPSS)

Παράλληλα με τις δυο ταξινομήσεις κατά FAB και κατά WHO, το 1997 προτάθηκε από τη Διεθνή ομάδα εργασίας (International MDS Risk Analysis Workshop) το Διεθνές Προγνωστικό Σύστημα Βαθμολόγησης, που αφορά τους παράγοντες κινδύνου των ΜΔΣ (International Prognostic Scoring System, IPSS) για τα πρωτοπαθή ΜΔΣ (Greenberg et al., 1997, 2012).

Στο IPSS, πιο σημαντικοί και ανεξάρτητοι παράμετροι πρόγνωσης (στοιχεία για εκτροπή ΜΔΣ προς οξεία λευχαιμία και επιβίωση) αποτέλεσαν το ποσοστό των βλαστών (<5%, 5-10%, 11-20% και 21-30%) του μυελού των οστών, ο αριθμός των κυτταροπενιών του περιφερικού αίματος (0-1, 2, 3) και ο καρύοτυπος (καλός, ενδιάμεσος, κακός) (Greenberg et al., 1997, 2012).

Πίνακας 2.5.

Ταξινόμηση κριτηρίων του IPSS score για τα ΜΔΣ

Prognostic variable	Score value				
	0	0,5	1	1,5	2,0
Bone marrow blasts (%)	<5	5-10	11-20	21-30
Karyotype ¹	Good	Intermediate	Poor		
Cytopenia ²	0/1	2/3			

IPSS Group	IPSS Total Score	Survival (median; yrs)		25% AML evolution (yrs)	
		Age at diagnosis		Age at diagnosis	
		≤70yrs	>70yrs	≤70yrs	>70yrs
Low	0	9	3,9	>9,4 (NR)	>5,8 (NR)
Intermediate-1	0,5-1,0	4,4	2,4	5,5	2,2
Intermediate-2	1,5-2	1,3	1,2	1,0	1,4
High	≥2,5	0,4	0,4	0,2	0,4

¹ Definition of karyotype	
Good	Normal, Y-, 5q-, 20q-
Intermediate	All other
Poor	Chromosom 7 aberration and/or ≥ 3 Chromosomal aberrations.

² Cytopenia	NR, not reached
Hemoglobin < 100 g/L (10 g/dL)	
Neutrophil count < 1,8 G/L (1.800/μl)	
Platelet count < 100 G/L (100.000/μl)	

Handbook Stauder Greenberg et al., 1997

Για αρκετά χρόνια, το IPSS εφαρμόστηκε και εφαρμόζεται ευρέως, ωστόσο εμφανίζει μειονεκτήματα. Συγκεκριμένα, υποεκτιμά την κλινική σημασία της βαρύτητας της ουδετεροπενίας και της θρομβοπενίας στον προσδιορισμό της θεραπευτικής παρέμβασης. Επιπλέον, δεν λαμβάνει υπόψη την όποια αλλαγή στις σημαντικές παραμέτρους, όπως είναι οι απόλυτοι αριθμοί των κυττάρων του περιφερικού αίματος και το ποσοστό των βλαστών κατά τη διάρκεια της παρακολούθησης, ενώ δίδεται σημασία μόνο στα ευρήματα της αρχικής διάγνωσης. Έτσι, το 2012 έγινε αναθεώρηση του συστήματος. Αυτή η νέα κυτταρογενετική ταξινόμηση ορίζει 16 κυτταρογενετικές ανωμαλίες που ομαδοποιήθηκαν σε πέντε προγνωστικές κατηγορίες (Greenberg et al., 2012). Επίσης, στην αναθεωρημένη έκδοση προγνωστική αξία έχουν η ηλικία, το μέγεθος των κυτταροπενιών, η LDH, η φερριτίνη, η β₂-μικροσφαιρίνη και ο βαθμός ίνωσης του μυελού (Jonas & Greenberg, 2015).

Πίνακας 2.6.

Ταξινόμηση κριτηρίων του IPSS-R (IPSS- revised score) για τα ΜΔΣ

Parameter	Categories and Associated Scores (Scores in italics)				
Cytogenetic risk group ^a	Very good	Good	Intermediate	Poor	Very Poor
	<i>0</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>
Marrow blast proportion	≤2.0%	>2.0–<5.0%	5.0–<10.0%	≥10.0%	
	<i>0</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	
Hemoglobin	≥10 g/dL	8–<10 g/dL	<8 g/dL		
	<i>0</i>	<i>1</i>	<i>1.5</i>		
Absolute neutrophil count	≥0.8 × 10 ⁹ /L	<0.8 × 10 ⁹ /L			
	<i>0</i>	<i>0.5</i>			
Platelet count	≥100 × 10 ⁹ /L	50–100 × 10 ⁹ /L	<50 × 10 ⁹ /L		
	<i>0</i>	<i>0.5</i>	<i>1</i>		
Risk group	Total score ^b	Proportion of patients in category (%)	Median survival (survival data based on n = 7012) (years)	Time until AML progression (AML data available based on n = 6485) (years)	
Very low	0–1.0	19	8.8	Not reached	
Low	1.5–3.0	38	5.3	10.8	
Intermediate	3.5–4.5	20	3.0	3.2	
High	5.0–6.0	13	1.5	1.4	
Very high	>6.0	10	0.8	0.7	
^a Cytogenetic risk group, very good: -Y, del(11q); good: normal; del(5q) ± 1 other abnormality del(20q), or del(12p); intermediate: +8, i(17q), del(7q), +19, any other abnormality not listed including the preceding with 1 other abnormality; poor: -7 ± del(7q), inv(3)/t(3q)/del(3q), any 3 separate abnormalities; very poor: more than 3 abnormalities, especially if 17p is deleted or rearranged ^b Sum scores on a 0–10 point scale Source: adapted from Greenberg P et al, <i>Blood</i> 120(12):2454–65					

2.3.2. Προγνωστικό σύστημα ταξινόμηση των ΜΔΣ κατά WHO (WHO classification-based prognostic scoring system, WPSS)

Το 2003, ανακοινώθηκε το πρώτο Σύστημα Πρόγνωσης βασισμένο στην κατά WHO ταξινόμηση των ΜΔΣ (WHO classification-based prognostic scoring system, WPSS). Το 2007, το σύστημα αυτό ένταξε ως σημαντικό προγνωστικό παράγοντα για την βαρύτητα των ασθενών με ΜΔΣ, την εξάρτηση της μετάγγισης τους, χρησιμοποιώντας –παράλληλα– και τα κυτταρογενετικά ευρήματα (Malcovati et al., 2007). Η βέλτιστη ικανότητα πρόγνωσης, με βάση την εξάρτηση μετάγγισης, παρατηρήθηκε σε ασθενείς με ΜΔΣ χωρίς περίσσεια βλαστών. Το 2011, η παράμετρος εξάρτησης από μετάγγιση αφαιρέθηκε (ως υπερβολικά αντικειμενικό κριτήριο για τον καθορισμό της σοβαρής αναιμίας) και στη θέση της προστέθηκε η παράμετρος, η οποία βασίζεται στα όρια των τιμών της αιμοσφαιρίνης. Επίπεδα αιμοσφαιρίνης χαμηλότερα από 9 g / dL στους άνδρες (HR 5,56, P = 0,018) και 8 g / dL στις γυναίκες (HR = 5,35, P = 0,026) ήταν ανεξάρτητα από τη μειωμένη συνολική επιβίωση, τον υψηλότερο κίνδυνο εκτροπής σε λευχαιμία και τον καρδιακό θάνατο (P <0,001) (Malcovati et al., 2011).

Πίνακας 2.7.

Σύστημα Πρόγνωσης WPSS με βάση την ταξινόμηση WHO

Variable	Variable scores			
	0	1	2	3
WHO category	RCUD, RARS, MDS with isolated deletion (5q)	RCMD	RAEB-1	RAEB-2
Karyotype*	Good	Intermediate	Poor	-
Severe anemia (Hb <9 g/dL in males or <8 g/dL in females)	Absent	Present	-	-
WPSS risk	Sum of individual variable scores			
Very low	0			
Low	1			
Intermediate	2			
High	3-4			
Very high	5-6			

*Hb: hemoglobin concentration. *Good: normal, -Y, del(5q), del(20q); Poor: complex, chromosome 7 anomalies; Intermediate: other chromosomal abnormalities.⁶*

Στο WPSS σύστημα οι πέντε υποκατηγορίες καθορίζονται βάσει του βαθμού δυσπλασίας και του αριθμού βλαστών στο BM. Εξετάζονται οι ίδιες ομάδες κυτταρογενετικού κινδύνου, όπως και στο σύστημα IPSS. Στην πλέον αναθεωρημένη έκδοσή του, προστίθεται η ύπαρξη σοβαρού βαθμού αναιμίας ως πρόσθετος παράγοντας κινδύνου. Έτσι, αυτές οι μεταβλητές χρησιμοποιούνται για την κατάταξη των ασθενών σε μία από τις πέντε ομάδες κινδύνου με σημαντικές διαφορές στην συνολική επιβίωση. Είναι απλό σύστημα στην εφαρμογή του και επιπλέον μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε όλη τη διάρκεια παρακολούθησης της πορείας της νόσου, πέραν της διάγνωσης, επιτρέποντάς του να χρησιμοποιηθεί ως ένα σύστημα υψηλής βαθμονόμησης (Bejar, 2013).

Το σύστημα WPSS συμπεριλήφθηκε στις κατευθυντήριες θεραπευτικές οδηγίες του NCCN[®] (National Comprehensive Cancer Network[®]). Το σύστημα πρόγνωσης NCCN ταξινομεί τους ασθενείς σε δύο ομάδες μέσω ενός θεραπευτικού αλγορίθμου βασισμένου σε στοιχεία από τα συστήματα πρόγνωσης IPSS και WPSS, όπου στην ομάδα χαμηλού κινδύνου (lower-risk MDS) περιλαμβάνονται οι ομάδες low και INT-1 και στην ομάδα υψηλού κινδύνου (higher-risk MDS) οι ομάδες INT-2 και high, του συστήματος IPSS (NCCN, 2009).

2.3.3. Λοιπά Προγνωστικά Συστήματα Ταξινόμησης των ΜΔΣ

2.3.3.α. M.D. Anderson Lower-Risk MDS Prognostic Scoring System (MDA-LR)

Από το αντικαρκινικό κέντρο M.D. Anderson έγινε μια προσπάθεια αξιολόγησης της πρόγνωσης ασθενών με lower-risk IPSS, ασθενών με low-risk ή INT-1, η οποία προέβλεπε βραδύτερη επιβίωση. Η μελέτη των κλινικών χαρακτηριστικών αυτών των ασθενών έδειξε ότι ο δυσμενής κυτταρογενετικός έλεγχος, η αιμοσφαιρίνη, ο αριθμός των αιμοπεταλίων, καθώς και ο αριθμός των βλαστών στον μυελό σχετίζονταν με την επιβίωση. Βάσει αυτών των μεταβλητών, αναπτύχθηκε το MDA-LR σύστημα και οι ασθενείς κατατάσσονταν σε τρεις ομάδες κινδύνου. Στην ανάλυση αυτή, συμπεριλήφθηκαν ασθενείς με CMML και ασθενείς με δευτερογενή ΜΔΣ (sMDS). Ακολουθήθηκαν οι ίδιοι περιορισμοί με τα συστήματα IPSS και WPSS (Jonas & Greenberg, 2015).

2.3.3.β. French Prognostic Scoring System (FPSS)

To Groupe Francophone des Myelodysplasies (GFM) αξιολόγησε τους INT-2 και τους high-risk ασθενείς που έλαβαν θεραπεία με 5-azacitidine (AZA) ως προς τους προγνωστικούς παράγοντες που επηρέασαν την ανταπόκριση και την επιβίωση. Τα προγνωστικά κριτήρια επιβίωσης ήταν ο κυτταρογενετικός κίνδυνος βάσει του IPSS, ο αριθμός των βλαστών και ο βαθμός εξάρτησης μεταγγίσεων. Επιπλέον, λήφθηκε υπ' όψιν οποιαδήποτε αιματολογική βελτίωση σε ασθενείς με πλήρη ή μερική ύφεση. Με αυτά τα κριτήρια, το FPSS σύστημα κατατάσσει τους ασθενείς σε τρεις προγνωστικές ομάδες. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι δεν υπήρξαν σημαντικές διαφορές στην συνολική επιβίωση με βάση την FPSS σε ασθενείς που έπαιρναν 5-azacitidine (AZA) σε σχέση με την IPSS.

2.3.4. Επιπλέον προγνωστικοί παράγοντες ταξινόμησης των ΜΔΣ

Η διάγνωση, η πρόγνωση και την ανταπόκριση στη θεραπεία των ΜΔΣ, θεωρείται δύσκολη πολλές φορές με τα υπάρχοντα μοντέλα ταξινόμησης. Έτσι, κατέστη αναγκαία η αναθεώρηση των κριτηρίων διάγνωσης και κατάταξης των συνδρόμων αυτών, με σκοπό την ενσωμάτωση και άλλων δεικτών, ώστε η αρχική κατάταξη να αντανακλά καλύτερα την παθογένεια των νοσημάτων. Τα υπάρχοντα προγνωστικά μοντέλα πιθανά να αναθεωρηθούν εκ νέου λόγω των νέων μεθόδων προγνωστικής προσέγγισης της νόσου. Συγκεκριμένα, η κυτταρομετρία ροής, η κυτταρογενετική ανάλυση και η μοριακή μελέτη έχουν να προσθέσουν πολλές πληροφορίες για την διάγνωση, τη πρόγνωση και την εξέλιξη του νοσήματος (Greenberg, 2013).

2.3.4.α. Κυτταρομετρία Ροής

Η μελέτη του ανοσοφαινοτύπου των ΜΔΣ με κυτταρομετρία ροής έχει τόσο διαγνωστική όσο και προγνωστική αξία. Η διάγνωση των ΜΔΣ βασιζόταν επί χρόνια στην μορφολογία των κυττάρων, καθώς επίσης σε κλινικά και κυτταρογενετικά ευρήματα. Ο ρόλος της ΚΡ είναι να διακρίνει τον παθολογικό πληθυσμό κυττάρων, αναγνωρίζοντας την απόκλιση αυτών από τα φυσιολογικά patterns αντιγονικής έκφρασης των σταδίων ωρίμανσης. Απαραίτητη είναι η χρήση μεγάλου αριθμού

μονοκλωνικών αντισωμάτων προς τα κύτταρα όλων των μυελικών σειρών (Van Lochem et al., 2003) (Elghetany et al., 2004· Van Lochem et al., 2004).

Το σύστημα κατάταξης με βάση την ΚΡ (Flow Cytometric Scoring System – FCSS) αναπτύχθηκε συγκρίνοντας τα ανοσοφαινοτυπικά χαρακτηριστικά των κυττάρων του μυελού ασθενών με ΜΔΣ με εκείνα ασθενών με άλλες διαταραχές ή με υγιείς δότες. Κυρίως, μελετήθηκαν οι διαφορές όσον αφορά τα κύτταρα της μυελικής σειράς και τα μονοκύτταρα, κατατάσσοντας τους ασθενείς σε τρεις κατηγορίες: φυσιολογικές/ήπιες, μέτριες και σοβαρές συσχετίζοντας αυτές τις ομάδες κατά το IPSS σύστημα. Το FCSS επικυρώθηκε και χρησιμοποιήθηκε για την προγνωστική αξία που είχε στους ασθενείς μετά από μεταμόσχευση και στην ανταπόκριση στην θεραπεία ενώ συμπεριλήφθηκε και στο αναθεωρημένο IPSS-revised στον οποίο προστέθηκε ως προγνωστικός δείκτης ο αριθμός των CD34+/CD13+ κυττάρων. Ιδιαίτερη είναι η συμβολή της ΚΡ στις περιπτώσεις χαμηλού κινδύνου ΜΔΣ όπου η διάγνωση είναι εξαιρετικά δύσκολη. Το European LeukemiaNet Working Group επικύρωσε μια βαθμολογία ΚΡ, Flow Cytometric score (FCM-score), βασισμένο σε τέσσερις κύριους παράγοντες, myeloblast-related cluster size, B-progenitor-related cluster size, lymphocyte to myeloblast CD45 ratio, και granulocyte to lymphocyte side scatter ratio. Οι παράγοντες αυτοί μπορούν να προσδιοριστούν βάσει του forward scatter, side scatter, την έκφραση του CD45, CD13, και CD33 (Westers et al., 2012).

2.3.4.β. Κυτταρογενετική

Η καρυοτυπική ανάλυση G-banding (G,Q,R καρυότυπος) αποτελεί μια μέθοδο τόσο για την διάγνωση όσο και την πρόγνωση των ΜΔΣ, δίνοντας στοιχεία πιθανής εξέλιξης τους σε ΟΜΛ. Απαιτείται μέτρηση τουλάχιστον 20-25 μεταφάσεων. Περίπου το 50-55% των ασθενών με ΜΔΣ εμφανίζουν φυσιολογικό καρυότυπο με την κλασική κυτταρογενετική μεταφάσεων, Metaphase Cytogenetics (MC), λόγω του περιορισμένου βαθμού ευαισθησίας loss of heterozygosity (CN-LOH) copy from acquired uniparental disomy. Για την επίλυση των προβλημάτων εφαρμόζονται νέες κυτταρογενετικές τεχνικές όπως η μελέτη συστοιχίας πολυμορφισμού ενός νουκλεοτιδίου, single-nucleotide polymorphism array (SNP-A) και η συστοιχία συγκριτικής γονιδιωματικής υβριδισμού, comparative genomic hybridization array

(aCGH). Ο συνδυασμός των SNP-A και MC βελτίωσε την ανίχνευση των χρωμοσωμικών ανωμαλιών από 44% σε 74% και η παρουσία και ο αριθμός των νέων αλλοιώσεων που ανιχνεύθηκαν από το SNP-A χρησιμοποιήθηκε ως ανεξάρτητος προγνωστικός δείκτης. Η ανάλυση SNP-A των κυττάρων BM ή PB ήταν επίσης ικανή να ανιχνεύσει χρωμοσωμικές ανωμαλίες στο 50% των ασθενών με ανεπιτυχή MC και συσχετίστηκαν με ομάδες κινδύνου κατά το IPSS-R.

Κάποιες από τις πιο συχνές ανωμαλίες είναι οι ελλείψεις -5/del(5q), ανιχνεύονται περίπου στο 10% των ΜΔΣ χαμηλού κινδύνου και στο 40% υψηλού κινδύνου καθώς και σε δευτεροπαθή ΜΔΣ/ΟΜΛ. Το σύνδρομο 5q-, αναγνωρίζεται ως μία διακριτή κλινική οντότητα από την αναθεωρημένη ταξινόμηση WHO. Άλλες καρυοτυπικές ανωμαλίες είναι οι ελλείψεις -7/del(7q), del(11q), del(12p), del(20q), η απώλεια του χρωμοσώματος Y και η τρισωμία 8 (Malcovati et al., 2013). Επίσης, η μονοσωμία 7,(-7) συνδέεται με κακή πρόγνωση ενώ, η απώλεια τμήματος του 20q, (20q-), η οποία εμφανίζεται σε συχνότητα της τάξεως του 7% στους ασθενείς με πρωτοπαθές ΜΔΣ έχει σχετικά καλή πρόγνωση.

2.3.4.γ. Ανάλυση Gene Expression, microRNAs

Ο προγνωστικός ρόλος των μεταβολών της γονιδιακής έκφρασης στα ΜΔΣ έχει μελετηθεί αρκετά και στο παρελθόν, αλλά και τώρα, κυρίως με την εφαρμογή της μελέτης του προφίλ της γονιδιακής έκφρασης με βάση τις μικροσυστοιχίες (microarray-based gene expression profiling, GEP). Για παράδειγμα, οι αλλαγές στην έκφραση των *BCL2*, *MYC*, *WT1*, *MNI*, *ERG*, *BAALC*, *EVII* και *RPS14* έχουν αποδειχθεί ότι έχουν σημαντική προγνωστική σημασία στα ΜΔΣ. Με βάση το GEP, έχουν αναπτυχθεί βαθμολογίες που βασίζονται στο IPSS.

Επιπλέον, η μελέτη της έκφρασης του microRNA (miR) αποκάλυψε ότι οι αλλαγές στην έκφραση τους παίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεση του ΜΔΣ, καθώς και στην ανταπόκριση στην θεραπεία και στην επιβίωση.

Οι επιγενετικές αλλαγές, ιδιαίτερα η υπερμεθυλίωση του DNA, είναι επίσης σημαντικές στην παθογένεση των ΜΔΣ. Η αυξημένη υπερμεθυλίωση του DNA έχει αποδειχθεί ότι συσχετίζεται με βραχύτερο OS και μικρότερο χρόνο εξέλιξης τους σε ΟΜΛ, ανεξάρτητα από την κατηγορία κινδύνου IPSS (Malcovati et al., 2013).

2.3.4.δ. Γονιδιακές Μεταλλάξεις

Έχουν γίνει πολλές προσπάθειες ανίχνευσης μεταλλάξεων που σχετίζονται με τα ΜΔΣ. Ειδικά τα τελευταία χρόνια με την εφαρμογή του Next Generation Sequencing (NGS) έχουν μελετηθεί πολλοί ασθενείς για αρκετές ομάδες γονιδίων μελετώντας ολόκληρο το γονιδίωμα ή κάποιο εξόνιο (whole exome or genome sequencing) (Walter et al., 2013). Στον Πίνακα 2.7 που ακολουθεί, φαίνονται οι μεταλλάξεις και η προγνωστική τους αξία.

Πίνακας 2.8.

Σύστημα Πρόγνωσης WPSS με βάση την ταξινόμηση WHO

Prognostic Impact of Recurrent (>5%) Mutations in MDS	
Function	Gene
Epigenetic/Chromatin Modifiers	TET2, DNMT3A, ASXL1, EZH2
Splicing	SF3B1, SRSF2, U2AF1, ZRSR2
Differentiation	RUNX1
DNA Damage Response/Apoptosis	TP53, BCOR
Cohesin Complex	STAG2
Signaling	CBL

Leukemia. 2013 Jun; 27(6): 1275–1282

Έχει παρατηρηθεί ότι οι μεταλλάξεις TP53, TET2, DNMT3A και SRSF2 σχετίζονται με την θεραπεία του TP53 και παρουσιάζουν αρνητική πρόγνωση. Το 93% των ασθενών με CMML εμφανίζει τουλάχιστον μια από τις μεταλλάξεις TET2, SRSF2, ASXL1, RAS, RUNX1, CBL, EZH2, JAK2 και IDH1/2. Στις CMML, οι μεταλλάξεις U2AF1 και DNMT3A σχετίστηκαν με κακή πρόγνωση.

Οι γονιδιακές μεταλλάξεις έχουν σαφή αντίκτυπο στην πρόγνωση των ΜΔΣ. Για το λόγο αυτό, έχουν γίνει πολλές μελέτες με σκοπό την εύρεση και συσχέτιση αυτών με τα προγνωστικά συστήματα κατάταξης. Μια διεθνής συνεργατική μελέτη του IWG-PM βρίσκεται σε εξέλιξη και εργάζεται για τη συγχώνευση ενός μεγάλου μοριακού και κλινικού συνόλου δεδομένων για την περαιτέρω βελτίωση της προγνωστικής ταξινόμησης των ΜΔΣ (Walter et al., 2013).

2.4. Θεραπεία

Οι ασθενείς με ΜΔΣ είναι κυρίως μεγάλης ηλικίας και πάσχουν από διάφορα νοσήματα, με αποτέλεσμα η θεραπεία των ΜΔΣ να είναι δύσκολη λόγω των πολλών επιπλοκών. Η προσέγγιση της θεραπείας βασίζεται στην αναθεωρημένη βαθμολογία του Διεθνούς Προγνωστικού Βαθμολογικού Συστήματος (IPSS-R). Η θεραπεία είναι κυρίως υποστηρικτική με μεταγγίσεις αίματος και αιμοπεταλίων. Στους ασθενείς χαμηλού κινδύνου, με βάση τα προγνωστικά συστήματα κυρίως κατά IPSS, στόχος είναι η βελτίωση της ποιότητας ζωής και μείωση των μεταγγίσεων. Στους ασθενείς υψηλού κινδύνου, στόχος είναι η αύξηση του προσδόκιμου ζωής καθώς και η καθυστέρηση εκτροπής τους σε οξεία λευχαιμία (Sekeres & Cutler, 2014). Η αλλογενής μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων αποτελεί τη θεραπεία επιλογής για την πλήρη ίαση. Είναι δύσκολο να εφαρμοστεί στην πλειονότητα των ασθενών λόγω της υψηλής τοξικότητας.

2.4.1. Θεραπεία των χαμηλότερου κινδύνου ΜΔΣ

2.4.1.α. Παράγοντες Ερυθροποίησης (Erythropoiesis Stimulating Agents -ESAs)

Η θεραπεία με ερυθροποιητικούς παράγοντες **ESA** (ερυθροποιητίνη ή δαρβεποετίνη, epoetin alfa, darbepoetin alfa) έχουν εγκριθεί στα Κράτη-Μέλη της ΕΕ. Η ερυθροποιητίνη αποτελεί θεραπεία πρώτης γραμμής για την αντιμετώπιση της αναιμίας στα χαμηλότερου κινδύνου ή ενδιάμεσου κινδύνου ΜΔΣ κατά WPSS (score 0-2) με επίπεδα αιμοσφαιρόνης <10 g/dl, εκτός εάν τα επίπεδα ερυθροποιητίνης ορού είναι πάνω από 500 U/L. Υψηλές δόσεις ερυθροποιητίνης [ερυθροποιητίνη άλφα, -βήτα, -θήτα ή -ζήτα 30.000-60.000 U/εβδομάδα ή δαρβεποετίνη (darbepoetin) 150-300 ug/εβδομάδα] προκαλούν ανταπόκριση σε ποσοστά περίπου 40-60% των ασθενών με χαμηλότερου κινδύνου ΜΔΣ με καμία ή σχετικά χαμηλή ανάγκη για μεταγγίσεις και αν προστεθεί στην αγωγή G-CSF (Malcovati et al., 2013).

2.4.1.β. Υποστηρικτική Αγωγή

Σχετικά με τις μεταγγίσεις συμπυκνωμένων ερυθρών αιμοσφαιρίων, η μεγάλη ηλικία των ασθενών και η συνύπαρξη συννοσηρότητας, θα πρέπει οι ασθενείς να μεταγγίζονται με επίπεδα αιμοσφαιρίνης άνω των 8 g/dl. Στους υπερτασικούς ασθενείς, συνιστάται τακτική παρακολούθηση της αρτηριακής πίεσης και αν χρειάζεται χορήγηση κατάλληλης αντιυπερτασικής αγωγής. Μετάγγιση αιμοπεταλίων ενδείκνυται είτε σε περιπτώσεις ενεργού αιμορραγίας είτε προφυλακτικά μόνο σε όσους ασθενείς λαμβάνουν κυτταρομειωτικές θεραπείες, όπως χημειοθεραπεία, ΑΜΑΚ, παράγοντες υπομεθυλίωσης, λεναλιδομίδη και ΑΤΓ και έχουν αριθμό αιμοπεταλίων <10.000, ενώ σε περιπτώσεις που φέρουν υποκείμενα νοσήματα (σακχαρώδη διαβήτη, αθηροσκλήρωση, υπερταση κτλ), καλό είναι να λαμβάνουν προφυλακτικά αντιαιμοπεταλιακή αγωγή.

Στις ουδετεροπενίες επί πυρετού, θα πρέπει να χορηγούνται άμεσα αντιβιοτικά ευρέος φάσματος και επί ανθεκτικού πυρετού, θα πρέπει να χορηγούνται επίσης αντιμυκητιασικά ευρέος φάσματος (Fenaux & Adès, 2013).

Σε περιπτώσεις υπερφόρτωσης με σίδηρο μπορούν να χορηγηθούν παράγοντες αποσιδήρωσης, εφόσον το προσδόκιμο επιβίωσης είναι τουλάχιστον 12 μήνες εάν έχει μεταγγιστεί συνολικά με > από 25 μονά, όπως το deferoxamine, που χορηγείται ενδοφλεβίως ή υποδορίως, και κυρίως το deferasirox, που χορηγείται από του στόματος.

2.4.2. Θεραπεία με Ανοσοκατασταλτικά Φάρμακα

Σε μεγάλο βαθμό, οι κυτταροπενίες των ασθενών με ΜΔΣ είναι αποτέλεσμα διαταραχών του ανοσοποιητικού συστήματος. Οι ασθενείς που ανταποκρίνονται στην θεραπεία είναι κυρίως χαμηλού κινδύνου ΜΔΣ και μάλιστα τα υποπλαστικά, προκαλώντας αναστροφή της αναιμίας και των άλλων κυτταροπενιών σε 30-40% των ασθενών χαμηλότερου κινδύνου που είναι ανθεκτικοί στην ερυθροποιητίνη. Συνήθως, οι ασθενείς με θετική ανταπόκριση εμφανίζουν φυσιολογικό καρυότυπο ή τρισωμία 8, ενώ εκφράζουν το HLA-DR15 αλληλίο (Fenaux & Adès, 2013).

Η κύρια θεραπεία είναι με αντιθυμοκυτταρική σφαιρίνη (ΑΤΓ), με ή χωρίς κυκλοσπορίνη (CSA). Σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες του LeukemiaNet,

ανοσοκατασταλτική θεραπεία με ATG σε συνδυασμό με 6 μήνες κυκλοσπορίνη από του στόματος πρέπει να χορηγείται σε ασθενείς κάτω των 60 ετών, με βλάβες μυελού των οστών κάτω του 5%, φυσιολογικό καρυότυπο και εξάρτηση από μεταγγίσεις, οι οποίοι δεν έχουν ανταποκριθεί στην θεραπεία με ESA (Gore & Hermes-DeSantis, 2009).

2.4.3. Θεραπεία με Λεναλιδομίδη

Η Λεναλιδομίδη είναι ανοσοτροποποιητικό φάρμακο αντίστοιχο της θαλιδομίδης, η οποία μείωσε ή/και κατήργησε την ανάγκη για μεταγγίσεις σε ένα ποσοστό ασθενών, αλλά η μακροχρόνια θεραπεία προκαλούσε σημαντική νευρολογική τοξικότητα. Η λεναλιδομίδη αποτελεί το 4-αμινο-γλουταριμιδικό ανάλογο της θαλιδομίδης, που δεν προκαλεί νευρολογική τοξικότητα. Χορηγείται κυρίως σε ασθενείς με εξάλειψη των μακρών σκελών του χρωμοσώματος 5 [del(5q)], χωρίς επιπρόσθετες χρωμοσωμικές ανωμαλίες ή περίσσεια βλαστών, οι οποίοι κατατάσσονται IPSS Low ή Int-1. Χορηγείται από το στόμα σε κύκλους των 28 ημερών. Η θεραπεία γίνεται συνήθως καλά ανεκτή, μπορεί όμως να συνοδεύεται από μυελική ή εξωμυελική τοξικότητα.

2.4.4. Θεραπεία των υψηλότερου κινδύνου ΜΔΣ

2.4.4.α. Χημειοθεραπεία

Χημειοθεραπεία εφαρμόζεται σε ασθενείς με ΜΔΣ υψηλότερου κινδύνου, που δεν ανταποκρίνονται σε άλλες θεραπείες είτε έχουν εξελιχθεί σε ΟΜΛ είτε όχι. Χορηγείται σε συνδυασμό με μια ανθρακυκλίνη (συνήθως ινταρουμπικίνη ή νταουνορουμπικίνη) και κυταραμπίνης. Νεότεροι χημειοθεραπευτικοί παράγοντες περιλαμβάνουν την clofarabine και την cloretazine.

2.4.5. Θεραπεία με Παράγοντες Υπομεθυλίωσης (η 5-αζακυτιδίνη και η 5-αζα-2'-δεοξυκυτιδίνη-decitabine)

Η 5-αζακυτιδίνη είναι ένα πυριμιδινικό νουκλεοσιδικό ανάλογο, αναστολέας της DNA-μεθυλτρανσφεράσης. Η αζακυτιδίνη ως προς τη συνολική επιβίωση, πλεονεκτεί σε σχέση με τη συμβατική θεραπεία (εντατική χημειοθεραπεία ή χαμηλή δόση κυταραμπίνης) σε ασθενείς με υψηλού κινδύνου ΜΔΣ ή ΟΜΛ. Στους IPSS Int-

2 ή High risk ασθενείς που δεν είναι επιλέξιμοι για χημειοθεραπεία ή για αλλογενή μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων (Άλλο-ΜΑΚ) ενδείκνυται η χορήγηση αζακυτιδίνης. Τα ποσοστά ανταπόκρισης κυμαίνονται στο 30-40%.

Η δεσιταμπίνη έχει επιπλέον της αζακυτιδίνης δράση αντιμεταβολήτη προάγοντας απ' ευθείας την απόπτωση ορισμένου αριθμού παθολογικών κυττάρων.

Τα ποσοστά ανταπόκρισης με τη δεσιταμπίνη είναι παρόμοια με αυτά της αζακυτιδίνης (Choudhary et al., 2005).

2.4.6. Αλλογενής Μεταμόσχευση Αιμοποιητικών Κυττάρων

Στους ασθενείς με υψηλού κινδύνου ΜΔΣ, IPSS Int-2 ή High ή έχουν IPSS Int-1 με περίσσεια βλαστών ή δυσμενή καρυότυπο, η αλλογενής μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων (Άλλο-ΜΑΚ) παραμένει μονόδρομος με σκοπό την πλήρη ύφεση. Σε αλλογενή μεταμόσχευση με σχήματα προετοιμασίας μυελοκαταστροφική ή μυελοαφανιστική (myeloablative), μπορούν να υποβληθούν ασθενείς κάτω των 40-50 ετών, ενώ με μη μυελοκαταστροφικά ή μη μυελοαφανιστικά (non-myeloablative) σχήματα μπορούν να υποβληθούν ασθενείς μέχρι 65-70 ετών, έχοντας πλήρη συμβατό HLA δότη (Gore & Hermes-DeSantis, 2009).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3ο

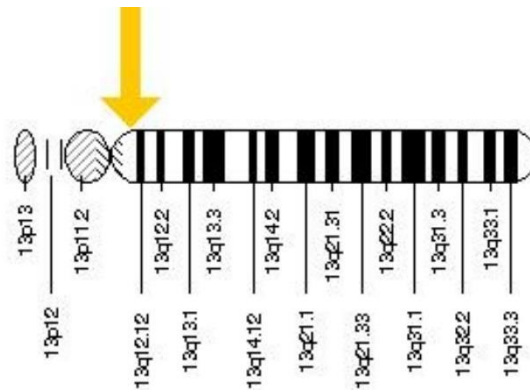
FLT3 και *NPM1* Γονίδια

3.1. Γονίδιο *FLT3*

Το *FLT3* (FMS-like tyrosine kinase 3, CD135), επίσης γνωστό ως FLK-2 Val, (Fetal liver kinase 2, FLK2), και STK-1 (human stem cell kinase 1) είναι ένας υποδοχέας κινάσης τυροσίνης τύπου III, στενά συνδεδεμένο με τα PDGF-R, c-FMS και c-Kit.

Οι υποδοχείς αυτοί μεταδίδουν σήματα από την κυτταρική επιφάνεια μέσα στο κύτταρο μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζεται μεταγωγή σήματος. Η πρωτεΐνη *FLT3* βρίσκεται στην εξωτερική μεμβράνη ορισμένων κυτταρικών τύπων, όπου μια συγκεκριμένη πρωτεΐνη που ονομάζεται *FLT3 ligand*, FL (συνδέτης) μπορεί να προσκολληθεί , να δεσμευτεί σε αυτήν. Αυτή η δέσμευση ενεργοποιεί την πρωτεΐνη *FLT3*, η οποία στη συνέχεια ενεργοποιεί μια σειρά πρωτεϊνών μέσα στο κύτταρο, που αποτελούν μέρος πολλαπλών οδών σηματοδότησης. Τα μονοπάτια σηματοδότησης που διεγείρονται από την πρωτεΐνη *FLT3* ελέγχουν πολλές σημαντικές κυτταρικές διεργασίες, όπως η ανάπτυξη και η διαίρεση, ο πολλαπλασιασμός και η επιβίωση των κυττάρων, ιδιαίτερα των πρόιμων, προγονικών, αιματοποιητικών κυττάρων (Choudhary et al., 2005· Gilliland & Griffin, 2002).

Ο υποδοχέας *FLT3* αποτελείται από πέντε immunoglobulin-like εξωκυττάριας περιοχές, μια διαμεμβρανική περιοχή (transmembrane domain TM), μια περιοχή μεμβράνης juxtamembrane domain (JM) και δύο περιοχές ενδοκυτταρικής κινάσης τυροσίνης "activation loop" (tyrosine kinase domain, TKD). Το γονίδιο *FLT3* εντοπίζεται στο μακρύ σκέλος (q) του χρωμοσώματος 13 στη θέση 12, 13q12.



NCBI Gene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>)

3.2. Μεταλλάξεις του Γονιδίου *FLT3*

Οι μεταλλάξεις του γονιδίου *FLT3* συγκαταλέγονται στις πιο συνηθισμένες γενετικές αλλαγές στην ΟΜΛ, στα ΜΔΣ, αλλά και σε άλλες αιματολογικές κακοήθειες.

Αρχικά, αναφέρθηκαν οι μεταλλάξεις διπλασιασμού εντός πλαισίου του θραύσματος της κωδικοποιούσας αλληλουχίας της περιοχής “juxtamembrane” JM, (Internal Tandem Duplications, ITD). Το μέγεθος των διπλασιασμών αυτών κυμαίνεται από 3 έως 400 βάσεις. Οι μεταλλάξεις αυτές οδηγούν στην αυτοφωσφορυλίωση του υποδοχέα, με αποτέλεσμα την αναστολή της απόπτωσης. Αναφέρθηκε, επίσης, ότι οι μεταλλάξεις αυτές αλλάζουν τη δευτεροταγή δομή της πρωτεΐνης με έναν τρόπο που επίσης προκαλεί διαταραχή της αυτοκατασταλτικής λειτουργίας στην JM περιοχή (Gilliland & Griffin, 2002· Nakao et al., 1996).

Ασθενείς που έφεραν αυτή τη μετάλλαξη βρέθηκε ότι είχαν αυξημένη λευκοκυττάρωση, χειρότερη απόκριση στα κυτταροτοξικά φάρμακα και δυσμενή πρόγνωση, αφού παρουσίαζαν μειωμένη επιβίωση και μεγαλύτερο κίνδυνο υποτροπής. Το allelic ratio (ο λόγος του μεταλλαγμένου αλλήλιου, προς το φυσιολογικό, mut/wt) φαίνεται να έχει προγνωστική αξία. Με βάση τις οδηγίες του European LeukemiaNet (ELN), ασθενείς με *FLT3*-ITD μετάλλαξη και allele ratio (AR) <0.5 (low AR) φαίνεται να έχουν καλύτερη πρόγνωση σε σχέση με τους ασθενείς *FLT3*-ITD μετάλλαξη και AR ≥ 0.5 (high AR) (Sakaguchi et al., 2018).

Ο μηχανισμός με τον οποίο συμβαίνουν οι διπλασιασμοί δεν είναι ξεκάθαρος και απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για τον χαρακτηρισμό των βιολογικών και κλινικών χαρακτηριστικών τους.

Μεγάλο ποσοστό ασθενών με ΟΜΛ εμφανίζουν μεταλλάξεις στο γονίδιο *FLT3*, δεδομένου ότι οι μεταλλάξεις αυτές σχετίζονται με κακή πρόγνωση, έχουν καταστήσει τον *FLT3* έναν ελκυστικό θεραπευτικό στόχο. Το παράγωγο κινοζαλίνης AG1295 ήταν ο πρώτος αναστολέας που χρησιμοποιήθηκε έναντι της δραστηριότητας *FLT3* αλλά παρουσίαζε αρκετές δυσκολίες στη χρήση του. Ωστόσο, αρκετοί άλλοι αναστολείς χρησιμοποιήθηκαν και αξιολογήθηκαν έναντι του *FLT3* σε διάφορες κλινικές μελέτες, όπως: PKC412 (midostaurin; Novartis), CEP-701 (lestaurtinib; Cephalon Inc.), MLN-518 (tandutinib; Millennium Pharmaceuticals), SU11248 (sunitinib; Pfizer), SU5416 (semaxanib; SUGEN), Bay 43-9006 (sorafenib; Bayer Pharmaceuticals), KW-2449 (Kyowa Pharmaceuticals) και AC220 (Amit Biosciences) (El Fakih et al., 2018· Wu et al., 2018).

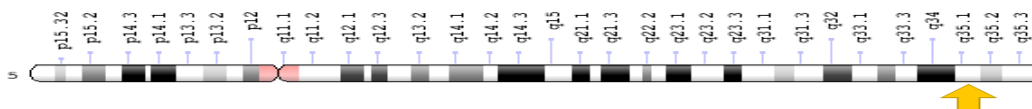
Η πλειονότητα αυτών των φαρμάκων είναι ετεροκυκλικές ενώσεις που αναστέλλουν τη δραστηριότητα του *FLT3* δρώντας ανταγωνιστικά στη θέση δέσμευσης του ATP υποδοχέα.

Οι σημειακές μεταλλάξεις (Point mutation *FLT3*-PM) του υποδοχέα *FLT3* απαντώνται συχνά σε ασθενείς με AML. Οι πιο κοινές σημειακές μεταλλάξεις αφορούν στο κωδικόνιο D835 (ασπαρτικού οξέως) όπου παρατηρείται αντικατάσταση του δεύτερου νουκλεοτιδίου A με T, (D835 V). Αντικατάσταση του G νουκλεοτιδίου με C, (D835 H). Η αντικατάσταση του πρώτου νουκλεοτιδίου G με T, χαρακτηρίζει την (D835 Y) μετάλλαξη. Ενώ ελλείψεις παρουσιάζονται στην μετάλλαξη του κωδικονίου I836 (ισολευκίνης), μέσα στην "activation loop" περιοχή της τυροσινικής κινάσης (Griffin, 2001· Levis, 2013).

Ο μηχανισμός ενεργοποίησης της κινάσης παρουσία αυτών των μεταλλάξεων, είναι παρόμοιος με αυτόν των άλλων υποδοχέων, όμως παρουσιάζουν διαφορετικές βιολογικές λειτουργίες σε σύγκριση με την *FLT3*-ITD. Για παράδειγμα, παρουσιάζουν ασθενέστερες διαφορές δυναμικού μετασχηματισμού σήματος σε σχέση με τις *FLT3*-ITD μεταλλάξεις.

3.3. Γονίδιο *NPM1*

Το ανθρώπινο γονίδιο *NPM1* εντοπίζεται στο μακρύ σκέλος (q) του χρωμοσώματος 5 στη θέση 35, 5q35.1 και περιέχει 12 εξόνια.



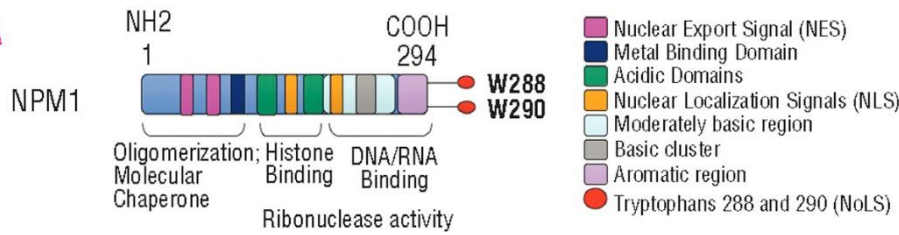
NCBI Gene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>)

Η Νουκλεοφωσμίνη NPM, γνωστή και ως B23, είναι μία πολυλειτουργική πρωτεΐνη που ανήκει σε μία ομάδα φωσφοπρωτεϊνών, η οποία μετακινείται συνεχώς μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος. Εντοπίζεται κυρίως στον πυρήνα παίζοντας σημαντικό ρόλο στις λειτουργίες του κυττάρου, όπως στη βιογένεση των ριβοσωμάτων, καθώς συμμετέχει στην μεταφορά προριβοσωμικών κομματιών, στην αναδιαμόρφωση της χρωματίνης, συμμετέχει στον διπλασιασμό του κεντροσώματος στη μίτωση καθώς και στην αντιγραφή και επιδιόρθωση του DNA. Ενώ είναι, επίσης, γνωστή η λειτουργία του *NPM1* σε μεταβολικές οδούς (Myc-ARF-p53), έτσι καθίσταται σαφές ότι το *NPM1* παίζει κύριο ρόλο στη διατήρηση της γονιδιοματικής σταθερότητας, επεμβαίνοντας σε διάφορες οδούς επιδιόρθωσης του DNA ρυθμίζοντας έτσι την απόπτωση (Box et al., 2016· Herrera et al., 1995· Yu et al., 2006).

Το γονίδιο *NPM1* κωδικοποιεί τρεις εναλλακτικές ισομορφές της πρωτεΐνης, την R1(B23.1), R2(B23.2), και R3(B23.3).

Η R1 ισομορφή είναι η επικρατούσα, μεταφράζεται από τα εξόνια 1-9 και 11-12 δίνοντας την μεγαλύτερη σε μήκος πρωτεΐνη 294 αμινοξέων (35–40 kDa). Περιέχει αρκετούς λειτουργικούς τομείς όπως:

- Oligomerization domain
- Histone Binding domain
- Ribonuclease activity domain
- DNA/RNA Binding domain



Falini. Haematologica April 2007 92: 519-532

Στην μορφή αυτήν, παρατηρούμε την ύπαρξη της περιοχής του πυρηνικού σήματος εξαγωγής, Nuclear export signal (NES) και στο C-terminus το σήμα πυρηνικού εντοπισμού Nucleolar localization signal (NoLS). Τα διμερή αυτά παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της πυρηνο-κυτταροπλασματικής κυκλοφορίας της πρωτεΐνης. Το NLS οδηγεί το *NPM1* από το κυτταρόπλασμα στο νουκλεοπλάσμα, όπου μεταφέρεται στον πυρήνα διαμέσου του τομέα δέσμευσης νουκλεοτιδίων (nucleolar binding domain), ιδιαίτερα των τρυπτοφανών 288 και 290, οι οποίες, όπως έχει ήδη αναφερθεί, απαιτούνται για τον πυρηνικό εντοπισμό της πρωτεΐνης (NoLS). Το *NPM1* παραμένει στον πυρήνα, ακόμη και αν περιέχει την εξαιρετικά υδρόφοβη πλούσια σε Λευκίνη (leucine-rich) NES περιοχή εντός των υπολειμμάτων 94-102 και 42-49, τα οποία έχουν σαν κύριο ρόλο την εξαγωγή του από τον πυρήνα. Ως εκ τούτου, σε φυσιολογική κατάσταση του κυττάρου, η wild type (Άγριος, αρχικός, φυσικός τύπος) *NPM1*wt κυριαρχεί εντός του πυρήνα έναντι του κυτταροπάσματος (Falini et al., 2006, 2007a).

Η ισομορφή R2 περιέχει τα εξόνια 1 έως 10, στερείται τα δυο τελευταία εξόνια 11-12, ενώ διατηρεί το 10 εξόνιο. Τα τελευταία 35 αμινοξέα *NPM1* C-terminus απουσιάζουν, δίνοντας μια πρωτεΐνη 259 αμινοξέων μήκους (34–38 kDa), στερούμενη της περιοχής του πυρηνικού εντοπισμού (nucleolar localization signal NoLS). Από την ισομορφή R3 απουσιάζουν τα εξόνια 8 και 10, παράγοντας μια πρωτεΐνη 265 αμινοξέων (Falini et al., 2007b).

3.4. Μεταλλάξεις του γονιδίου *NPM1*

Οι μεταλλάξεις του γονιδίου *NPM1* εμφανίζονται σε ποσοστό 50%-60% σε ασθενείς με ΟΜΛ. Η μεταλλαγμένη *NPM1mut* είναι ασυνήθιστα εντοπισμένη στο κυτταρόπλασμα των λευχαιμικών κυττάρων, γι' αυτόν τον λόγο αναφέρονται και ως *NPM-cytoplasmic* (*NPMc+*), αντίθετα με την *NPM1wt*, η οποία κυριαρχεί εντός του πυρήνα.

Ο μηχανισμός μετάλλαξης σχετίζεται με δυο μεταβολές που εντοπίζονται στο μεταλλαγμένο c-terminus. Η πρώτη μεταβολή αφορά την δημιουργία ενός επιπρόσθετου μοτίβου σήματος leucine-rich NES στο C-terminus, ενώ η δεύτερη αφορά στην απώλεια τμημάτων της τρυπτοφάνης 288 και 290 ή μόνο της 290, τα οποία είναι κρίσιμα για την λειτουργία του πυρηνικού εντοπισμού της πρωτεΐνης (Falini et al., 2006).

Οι μεταλλάξεις του γονιδίου *NPM1* είναι συνήθως μεταλλάξεις εισαγωγής ενός τετρανουκλεοτιδίου (insertion 4bp) προκαλώντας μετατόπισης πλαισίου (frameshift) και επιμήκυνση της πρωτεΐνης προκαλώντας τις λειτουργικές μεταβολές που περιγράφηκαν ανωτέρω. Οι μεταλλάξεις αυτές εντοπίζονται κυρίως στο εξόνιο 12. Οι μεταλλάξεις αυτές είναι σταθερές και ως εκ τούτου χρησιμοποιούνται στην παρακολούθηση της ελάχιστης υπολειμματικής νόσου, Minimal Residual Disease (MRD) (Palmisano et al., 2007).

Έχουν περιγραφεί περισσότεροι από 40 διαφορετικοί τύποι της μετάλλαξης ανάλογα με το είδος του τετρανουκλεοτιδίου που εισάγεται. Ο πιο συνήθης τύπος της μετάλλαξης είναι ο A, (mutation A), όπου εισάγεται το τετρανουκλεοτίδιο TCTG στην θέση 863-864 (accession number..NM_002520.6), βρίσκεται σε ποσοστό 70%-80% σε ασθενείς με ΟΜΛ. Στην ίδια θέση έχει βρεθεί η εισαγωγή των CATG που οδηγεί στην μετάλλαξη B (mutation B) σε ποσοστό περίπου 10%, η εισαγωγή CCTG που οδηγεί στην μετάλλαξη D (mutation D) σε ποσοστό περίπου 5%. Έχουν περιγραφεί και αλλοί τύποι μεταλλάξεων στην ίδια θέση ή σε διαφορετική όπως για παράδειγμα η μετάλλαξη CGGC στην θέση 964, η CGCA στην θέση 958, όπως επίσης έχουν βρεθεί με εισαγωγή και συγχρόνως απαλοιφή κάποιων βάσεων (ins9del5) (Falini et al., 2007a· Thiede et al., 2006).

Στον Πίνακα 3.1 που ακολουθεί, φαίνονται μερικές από τις πιο χαρακτηριστικές μεταλλάξεις.

Πίνακας 3.1.
Μεταλλάξεις NPM1

Wild-Type*	gaccaagaggctattcaagatctct	g		gcag	t		ggagg	aagtctctttaagaaaatag	286-DLQWRKSL
Mutation A	gaccaagaggctattcaagatctct	g	TCTG	gcag	t		ggagg	aagtctctttaagaaaatag	286-DICLA/EE/SIRK
Mutation B	gaccaagaggctattcaagatctct	g	CATG	gcag	t		ggagg	aagtctctttaagaaaatag	286-DICVA/EE/SIRK
Mutation C	gaccaagaggctattcaagatctct	g	CGTG	gcag	t		ggagg	aagtctctttaagaaaatag	286-DICVA/EE/SIRK
Mutation D	gaccaagaggctattcaagatctct	g	CCTG	gcag	t		ggagg	aagtctctttaagaaaatag	286-DICLA/EE/SIRK
Mutation E	gaccaagaggctattcaagatctct	g		gcag	t		CTCTGCCC	aagtctctttaagaaaatag	286-DLQSLAQ/SIRK
Mutation F	gaccaagaggctattcaagatctct	g		gcag	t		CCCTGGAGA	aagtctctttaagaaaatag	286-DLQSLK/SIRK
Mutation B*	gaccaagaggctattcaagatctct	g		gcag	t		CCCTGCCC	aagtctctttaagaaaatag	286-DLQSLAQ/SIRK
Mutation G*	gaccaagaggctattcaagatctct	g		gcag	t		GCTTCGCCC	aagtctctttaagaaaatag	286-DLQCFQ/SIRK
Mutation H*	gaccaagaggctattcaagatctct	g		gcag	t		GTTTTCAA	aagtctctttaagaaaatag	286-DLQCFK/SIRK
Mutation J	gaccaagaggctattcaagatctct	g		gcag	t	CTCTTCTA		aagtctctttaagaaaatag	286-DLQSLK/SIRK
Mutation L	gaccaagaggctattcaagatctct	CCCG	g	gcag	t			aagtctctttaagaaaatag	286-DISRA/EE/SIRK
Mutation K	gaccaagaggctattcaagatctct	g		gcag	t	CCCTTCCA		aagtctctttaagaaaatag	286-DLQSLK/SIRK
Mutation M	gaccaagaggctattcaagatctct	g	TAGC	gcag	t		ggagg	aagtctctttaagaaaatag	286-DICTA/EE/SIRK
Mutation N	gaccaagaggctattcaagatctct	g	CCAC	gcag	t		ggagg	aagtctctttaagaaaatag	286-DICHA/EE/SIRK
Mutation O	gaccaagaggctattcaagatctct	g		gcag	CGTTCC		ggagg	aagtctctttaagaaaatag	286-DLQRFQ/SIRK
Mutation P	gaccaagaggctattcaagatctct	g	TACCTCC		t		ggagg	aagtctctttaagaaaatag	286-DICTP/EE/SIRK
Mutation Q	gaccaagaggctattcaagatctct	g		gcag	AGGA	t	ggagg	aagtctctttaagaaaatag	286-DLQRF/EE/SIRK
Mutation Qm	gaccaagaggctattcaagatctct	g	CAGG	gcag	t		ggagg	aagtctctttaagaaaatag	286-DICRA/EE/SIRK
Mutation Km	gaccaagaggctattcaagatctct	g	CCCG	gcag	t		ggagg	aagtctctttaagaaaatag	286-DICRA/EE/SIRK
Mutation Lm	gaccaagaggctattcaagatctct	g	CCCGCG	ag	t		ggagg	aagtctctttaagaaaatag	286-DICRG/EE/SIRK
Mutation Nm	gaccaagaggctattcaagatctct	g	CCAG	gcag	t		ggagg	aagtctctttaagaaaatag	286-DICQA/EE/SIRK
Mutation Om	gaccaagaggctattcaagatctct	g	TTTG	gcag	t		ggagg	aagtctctttaagaaaatag	286-DICLA/EE/SIRK
Mutation Qm	gaccaagaggctattcaagatctct	g	TCGG	gcag	t		ggagg	aagtctctttaagaaaatag	286-DICRA/EE/SIRK
Mutation 1	gaccaagaggctattcaagatctct	g		gcag	TCCA	t	ggagg	aagtctctttaagaaaatag	286-DLQSL/EE/SIRK
Mutation 3	gaccaagaggctattcaagatctct	g	TCAT	gcag	t		ggagg	aagtctctttaagaaaatag	286-DICHA/EE/SIRK
Mutation 4	gaccaagaggctattcaagatctct	g	CTTG	gcag	t		ggagg	aagtctctttaagaaaatag	286-DICLA/EE/SIRK
Mutation 6	gaccaagaggctattcaagatctct	g		gca	AGATTTCTAAATC			gtctctctttaagaaaatag	286-DLQD/LMR/FFKIV
Mutation 7	gaccaagaggctattcaagatctct	ATGC	ctg	gcag	t		ggagg	aagtctctttaagaaaatag	286-DICLA/EE/SIRK
Mutation 12	gaccaagaggctattcaagatctct	g	GCCC	gcag	t		ggagg	aagtctctttaagaaaatag	286-DICAA/EE/SIRK
Mutation 13	gaccaagaggctattcaagatctct	g	TAAG	gcag	t		ggagg	aagtctctttaagaaaatag	286-DICKA/EE/SIRK
Mutation 10	gaccaagaggctattcaagatctct	g		gcag	tg		CTGCTCCC	aagtctctttaagaaaatag	286-DLQCSQ/SIRK
Mutation 14	gaccaagaggctattcaagatctct	g		gcag	t		TATTTCCC	aagtctctttaagaaaatag	286-DLQCSQ/SIRK
Mutation Gf	gaccaagaggctattcaagatctct	g	TTTG	gcag	t		ggagg	aagtctctttaagaaaatag	286-DICLA/EE/SIRK
Mutation Hf	gaccaagaggctattcaagatctct	g	CTTG	gcag	t		ggagg	aagtctctttaagaaaatag	286-DICLA/EE/SIRK
Mutation If	gaccaagaggctattcaagatctct	g	TAAG	gcag	t		ggagg	aagtctctttaagaaaatag	286-DICKA/EE/SIRK
Mutation Jf	gaccaagaggctattcaagatctct	g	TATG	gcag	t		ggagg	aagtctctttaagaaaatag	286-DICVA/EE/SIRK
Mutation I	gaccaagaggctattcaagatctct	g	CAGA	gcag	t		ggagg	aagtctctttaagaaaatag	286-DICRA/EE/SIRK

Brunangelo Falini. Blood 2007 109:874-885

3.5. Συσχέτιση των μεταλλάξεων *NPM1* και *FLT3* με τα ανοσοφαινοτυπικά χαρακτηριστικά τους

Αρκετές μελέτες έχουν γίνει για την συσχέτιση των μοριακών και ανοσοφαινοτυπικών χαρακτηριστικών των περιπτώσεων ασθενών κυρίως με ΟΜΛ αλλά και με ΜΔΣ.

Σε 88 ασθενείς με φυσιολογικό καρυότυπο παρατηρήθηκαν οι παρακάτω συσχετίσεις:

α) οι *NPM1mut* και *FLT3 wt* ήταν *CD34-*, *CD14-* και *CD2+*, *CD4+*

β) οι *FLT3/ITD+* ήταν *CD56+*

γ) αυτοί με *NPM1mut* και *FLT3wt* ήταν *CD34-*, *CD56-* και, τέλος,

δ) εκείνοι που είχαν *NPM1wt* και *FLT3mut* ήταν κακής πρόγνωσης και ήταν *CD34+* και *TdT +* (Dalal, Mansoor, Manna et al., 2012).

Σε 99 ασθενείς με ΟΜΛ και φυσιολογικό καρυότυπο έχει παρατηρηθεί ότι υψηλή έκφραση του *CD33* σχετίζεται με την ανίχνευση της μετάλλαξης *NPM1*, ενώ η ανίχνευση της μετάλλαξης *FLT3* δεν επηρεάζει την ένταση της έκφρασης του *CD33* (De Propriis, Raponi, Diverio et al., 2011).

Παράλληλα με την απουσία έκφρασης του *CD34* και του *HLADR*, στους *NPM1mut* ασθενείς παρατηρήθηκε αυξημένος αριθμός αιμοπεταλίων και απουσία ηπατοσπληνομεγαλίας σε ομάδα 166 ασθενών με ΟΜΛ. Στην ίδια μελέτη, οι *FLT3/ITDmut* εμφάνιζαν υψηλότερο αριθμό λευκών αιμοσφαιρίων και συχνότερα έκτοπη έκφραση *CD7*. Στην μελέτη αυτή, δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση των μεταλλάξεων των δυο γονιδίων (Chauhan, Ihsan, Singh et al., 2013).

Επίσης, σε παρόμοια μελέτη που αφορά το *FLT3* παρατηρήθηκε αυξημένο ποσοστό ασθενών με έλλειψη έκφρασης *CD34* και *HLADR* και αυξημένη έκφραση *CD33* και *MPO* (Muñoz, Aventín, Villamor et al., 2003).

Σε μεγάλη αναδρομική μελέτη 684 ασθενών παρατηρήθηκε ότι η έκτοπη έκφραση του *CD7* συνοδεύεται με την εμφάνιση των μεταλλάξεων του *FLT3*. Επίσης, σε αυτούς τους ασθενείς παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση του *CD11b* (van Solinge, Zeijlemaker, Ossenkoppele, Cloos, & Schuurhuis, 2018).

Αν και είναι γνωστό ότι οι *NPM1* + ασθενείς παρουσιάζουν συνήθως *CD34*-ανοσοφαινότυπο, το μικρό ποσοστό των *CD34+* έστω και με ασθενή έκφραση μυελοβλαστών, παρουσιάζει μεταλλαγμένο *NPM1*. Μάλιστα, ο ανοσοφαινότυπος των κυττάρων αυτών είναι συχνά *CD34+CD38-CD123+/CD33+/CD90-* ανοσοφαινότυπο stem cells (Martelli, Pettirossi, Thiede et al., 2010).

Έκτοπος έκφραση δεικτών στους μυελοβλάστες ασθενών με ΜΔΣ συνδυάζεται με ελαττωμένη ανταπόκριση σε χορήγηση αυξητικών παραγόντων και ερυθροποιητίνης. Είναι, επομένως, σημαντική η συμβολή του ανοσοφαινότυπου στην επιλογή των κατάλληλων ασθενών για χορήγηση αυξητικών παραγόντων (Westers, Alhan, Chamuleau et al., 2010).

Η κυτταρομετρία ροής αναφέρεται ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για την άμεση ανίχνευση της μεταλλαγμένης καθώς και της μη *NPM1* πρωτεΐνης με χρήση ποικίλων έμμεσα ή άμεσα συνδεδεμένων μονοκλωνικών αντισωμάτων. Υπάρχει, ωστόσο, συζήτηση για την εκτίμηση της θετικότητας των αποτελεσμάτων με κυτταρομετρία ροής σε αρκετές από αυτές τις μελέτες (Falini, Martelli, Bolli et al., 2011· Oelschlaegel, Koch, Mohr et al., 2010).

Επίσης, έγινε προσπάθεια ανίχνευσης με κυτταρομετρία ροής της επιφανειακής έκφρασης του *CD135* δηλαδή του υποδοχέα του *FLT3*. Φαίνεται ότι η ένταση της έκφρασης του *CD135* είναι πολύ υψηλή στην *M5* κατά FAB (Kuchenbauer, Kern, Schoch et al., 2005).

Σε άλλη μελέτη, η υψηλή έκφραση του *CD135* συσχετίστηκε πάλι με τους ΟΜΛ *M5* αλλά και με τους θετικούς ασθενείς *FLT3/ITD* με υψηλή ευαισθησία αλλά χαμηλή ειδικότητα (Mekawy, Eissa, Hamza, Hamed, & Youssef, 2018).

ΜΕΡΟΣ Β΄: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ

Εισαγωγή

Τα τελευταία χρόνια, χρησιμοποιούνται πολλές μέθοδοι τόσο για την διάγνωση όσο και για την παρακολούθηση των οξείων λευχαιμιών αλλά και των μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων. Οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες μέθοδοι είναι αυτές της *κυτταρομετρίας ροής* και των *μοριακών τεχνικών*.

Το βασικό κριτήριο του διαχωρισμού μεταξύ φυσιολογικών κυττάρων και παθολογικών τόσο στην ΟΜΛ όσο και στα ΜΔΣ είναι η μορφολογία των κυττάρων που ήταν και το βασικό κριτήριο τεκμηρίωσης της νόσου μαζί με τις κυτταροχημικές τεχνικές. Πλέον, η μελέτη του ανοσοφαινοτύπου δίνει σαφείς πληροφορίες για τον υποπληθυσμό των λευκοκυττάρων και τη διάκριση μεταξύ φυσιολογικών, ενεργοποιημένων και παθολογικών βλαστικών κυττάρων. Είναι μια ταχεία μέθοδος με μεγάλη ακρίβεια και ειδικότητα. Οι τεχνικές μοριακής βιολογίας ταυτοποιούν τις κλωνικές, γενετικές αλλαγές και έχουν εφαρμογή στη διάγνωση αλλά και στην πρόγνωση τους. Και οι δύο τεχνικές παίζουν σπουδαίο ρόλο στην τεκμηρίωση της διάγνωσης αλλά και στην γρήγορη έναρξη της θεραπείας

Στην παρούσα μελέτη των ΟΜΛ και ΜΔΣ περιστατικών εφαρμόστηκαν αυτές οι δύο τεχνικές για την εύρεση και σύγκριση ιδιαίτερων χαρακτηριστικών τους.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4ο

ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟΥ ΈΡΓΟΥ

4.1. Δείγματα

Η παρούσα ερευνητική μελέτη εκπονήθηκε στο Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών «Ο Ευαγγελισμός», κατά το χρονικό διάστημα 2011-2017, στο εργαστήριο μοριακής βιολογίας της Αιματολογικής-Λεμφωμάτων Κλινικής και Μονάδας Μεταμόσχευσης Μυελού των οστών και στο εργαστήριο κυτταρομετρίας ροής του τμήματος Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας. Σε αυτό το χρονικό διάστημα, μελετήθηκαν 94 δείγματα (72 δείγματα μυελού των οστών και 22 δείγματα περιφερικού αίματος), που αφορούσαν ασθενείς με ΟΜΛ και ΜΔΣ. Σε όλα ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο, που πραγματοποιείται καθημερινά στη ρουτίνα των εργαστηρίων για τη διάγνωση της νόσου.

Η μελέτη του ανοσοφαινοτύπου βασίστηκε στις κλινικές πληροφορίες και στα κυτταρομορφολογικά ευρήματα .

Οι ασθενείς είχαν μέση ηλικία τα 57,6 έτη (SD=15,0 έτη). Στον πίνακα που ακολουθεί δίνονται τα δημογραφικά στοιχεία των ασθενών, καθώς και οι τιμές της αιμοσφαιρίνης, των λευκών αιμοσφαιρίων και των αιμοπεταλίων τους.

Πίνακας 4.1.

Δημογραφικά στοιχεία των ασθενών, καθώς και οι τιμές της αιμοσφαιρίνης, των λευκών αιμοσφαιρίων και των αιμοπεταλίων τους

		N	%
Φύλο	Γυναίκες	37	39,4
	Άντρες	57	60,6
Δημογραφικά στοιχεία			
Ηλικία, μέση τιμή (SD)		57,6 (15)	
Ht%, μέση τιμή (SD)		29,2 (7,2)	
WBC, μέση τιμή (SD) διάμεσος (ενδ. εύρος)		43.469,1 (72.202,9)	13.290 (4.260 – 35.670)
PLT, μέση τιμή (SD) διάμεσος (ενδ. εύρος)		90.501,4 (72.786,1)	77.500 (25.000 – 127.000)

Το 60,6% των ασθενών ήταν άντρες. Η μέση τιμή του αιματοκρίτη των ασθενών ήταν 29,2 μονάδες (SD=7,2 μονάδες), η διάμεση τιμή των λευκών αιμοσφαιρίων ήταν 13.290 (4.260 – 35.670) και των αιμοπεταλίων ήταν 77.500 (25.000 – 127.000).

Στον ακόλουθο πίνακα δίνονται στοιχεία που αφορούν στο δείγμα των ασθενών.

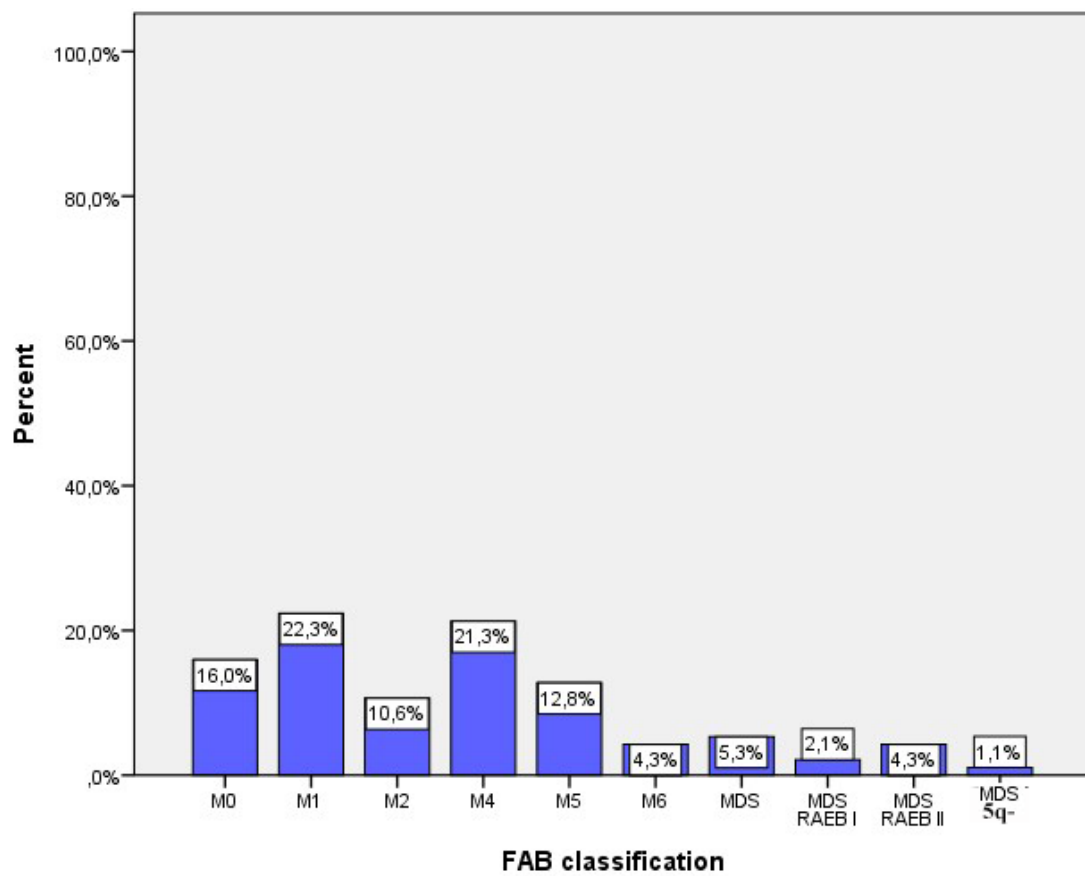
Πίνακας 4.2.

Στοιχεία που αφορούν στο δείγμα των ασθενών

		N	%
Δείγμα από:	Μυελό των οστών	72	76,6
	Περιφερικό αίμα	22	23,4
FAB classification	M0	15	16,0
	M1	21	22,3
	M2	10	10,6
	M4	20	21,3
	M5	12	12,8
	M6	4	4,3
	MΔΣ	5	5,3
	MΔΣ RAEB I	2	2,1
	MΔΣ RAEB II	4	4,3
	MΔΣ 5q-	1	1,1
FAB classification	OMΛ	82	87,2
	MΔΣ	12	12,8
Genetics	RUNX1/RUNX1T1	5	5,3
	CBFB-MYH11A	7	7,4
Cytogenetics	del 9	1	1,1
	45 del Y	1	1,1
	46 XY t(6;9)	1	1,1
	46XX	33	35,1
	46XY	40	42,6
	46XY +8 inv(16)(p13;q22)	3	3,2
	47XX +8	2	2,1
	47XY +8	1	1,1
	47XYY	1	1,1
	del (5q)(3q)(7q)	1	1,1
	del 11q22	1	1,1
	inv(16)(p13;q22)	4	4,3
	t(8;21)(q22;q22)	5	5,3
	Καρυότυπος	Φυσιολογικός	73
Παθολογικός		21	22,3

Στο 76,6% των περιπτώσεων, είχε ληφθεί δείγμα από μυελό των οστών και στο υπόλοιπο 23,4% από περιφερικό αίμα. Το 87,2% των περιπτώσεων είχε οξεία μυελογενή λευχαιμία, με συχνότερο τύπο κατάταξης τον M1, σε ποσοστό 22,3%. Φυσιολογικός ήταν ο καρύοτυπος του 77,7% των ασθενών.

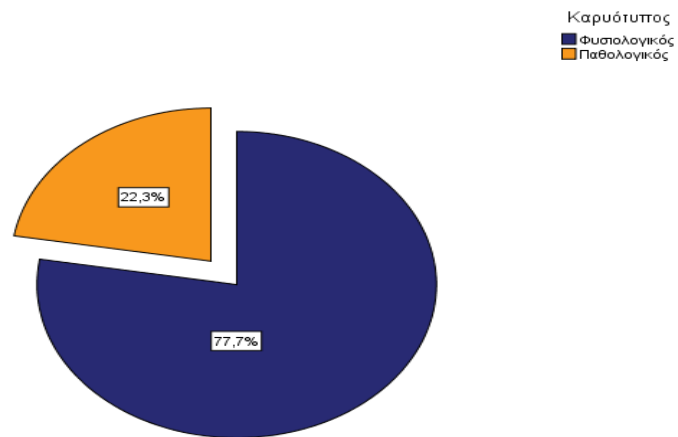
Στο ακόλουθο γράφημα δίνεται η ταξινόμηση των ασθενών.



Γράφημα 4.1

Ταξινόμηση των ασθενών

Στο ακόλουθο γράφημα δίνεται ο καρυότυπος των ασθενών.



Γράφημα 4.2

Καρυότυπος των ασθενών

4.2. Κυτταρομετρία Ροής

4.2.1. Υλικά και Μέθοδοι

4.2.1.1. Ανοσοφαινοτυπική Μελέτη

Η μελέτη του ανοσοφαινότυπου έγινε σε δείγματα PB ή BM κατά τη διάγνωση με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής.

4.2.1.2. Αρχές Κυτταρομετρίας

Η κυτταρομετρία ροής (ΚΡ) αποτελεί μια ποσοτική, ταχεία, δυναμική και πολυπαραμετρική τεχνική, η οποία βασίζεται στην ανάλυση των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών του κάθε κυττάρου/ σωματιδίου ξεχωριστά, με βάση τη σκέδαση και το φθορισμό, και την προϋπόθεση ότι το υπό έλεγχο δείγμα βρίσκεται σε μορφή κυτταρικού εναιωρήματος (Carter & Meyer, 1998· Kamensky, Burger, Gershman, Kamensky, & Luther, 1997· Rahman, 2006· Shapiro, 2004).

4.2.1.3. Αρχή μεθόδου Κυτταρομετρίας Ροής

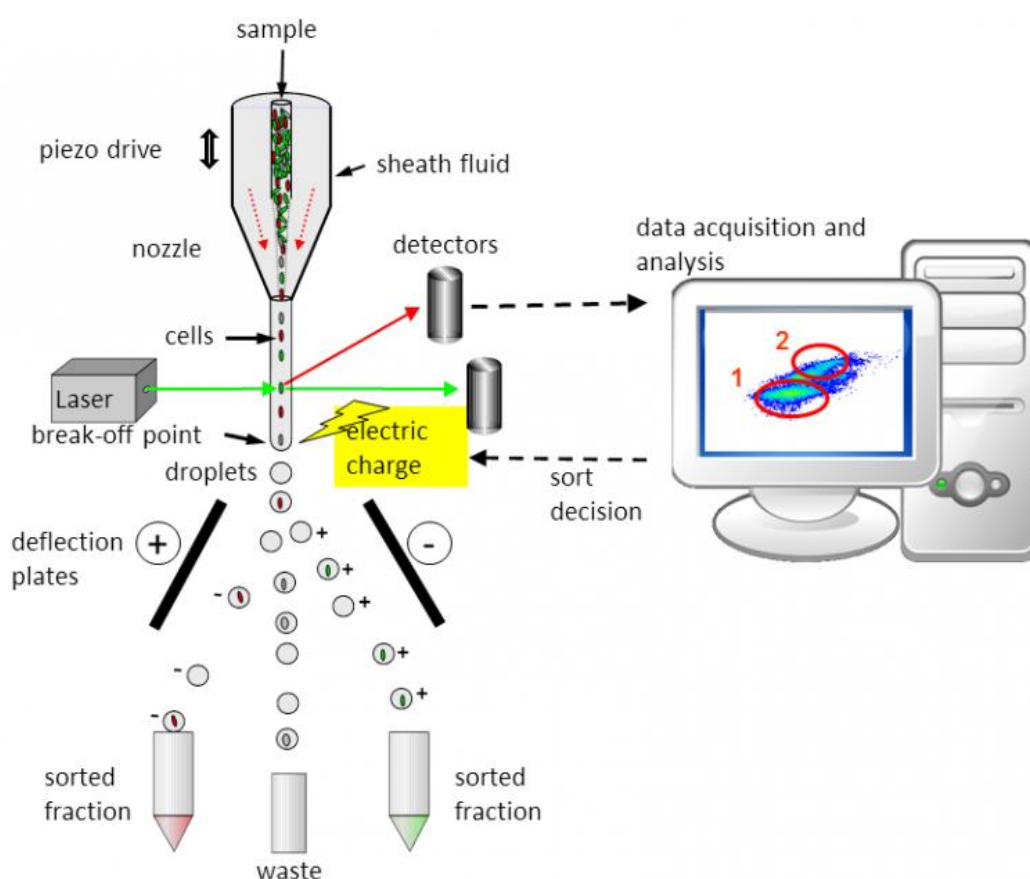
Η τεχνολογία της ΚΡ στηρίζεται στα φαινόμενα σκέδασης του φωτός και φθορισμού, ενώ –παράλληλα– επιτρέπει την ταυτόχρονη πολυπαραμετρική ανάλυση χαρακτηριστικών των κυτταρικών πληθυσμών μέσω του οπτικο-ηλεκτρονικού συστήματος ανίχνευσης. Στο προς μελέτη δείγμα που πρόκειται να αναλυθεί και φέρει κάποιο αντιγόνο, όπως συμπλέγματα διαφοροποίησης (CD clusters of differentiation), επιφανείας, της κυτταριπλοσματικής μεμβράνης ή του κυτταροπλάσματος, προστίθεται ειδικό σε αυτό μονοκλωνικό αντίσωμα (mAb), το οποίο είναι επισημασμένο με φθορίζουσα ουσία. Κατά τη διέλευση του σωματιδίου από τον θαλάμο ροής (υδροδυναμικό σύστημα), εντοπίζεται από την ακτίνα Laser (οπτικό σύστημα). Κάθε αιωρούμενο σωματίδιο από 0.2 έως 150μm, που περνάει δια μέσου της ακτίνας, σκεδάζει το φως. Όταν η ακτίνα εκτραπεί κατά 90°, μετρείται η Πλάγια Σκέδαση του Φωτός (Side Scatter, SSc) που δίνει πληροφορίες για τη δομή του κυττάρου. Όταν η ακτίνα εκτραπεί κατά 10°, προσδιορίζεται το μέγεθος του κυττάρου με βάση την Πρόσθια Σκέδαση του Φωτός (Forward Scatter, FSc). Ο συνδυασμός φωτεινών σημάτων προερχόμενων από σκέδαση και φθορισμό ανιχνεύεται από τους ανιχνευτές και η ανάλυση των διακυμάνσεων της έντασης σε

κάθε ανιχνευτή (έναν για κάθε κατανομή εκπομπής φθορισμού) παρέχει ποικιλία πληροφοριών για τη φυσική και χημική δομή κάθε μεμονωμένου σωματιδίου

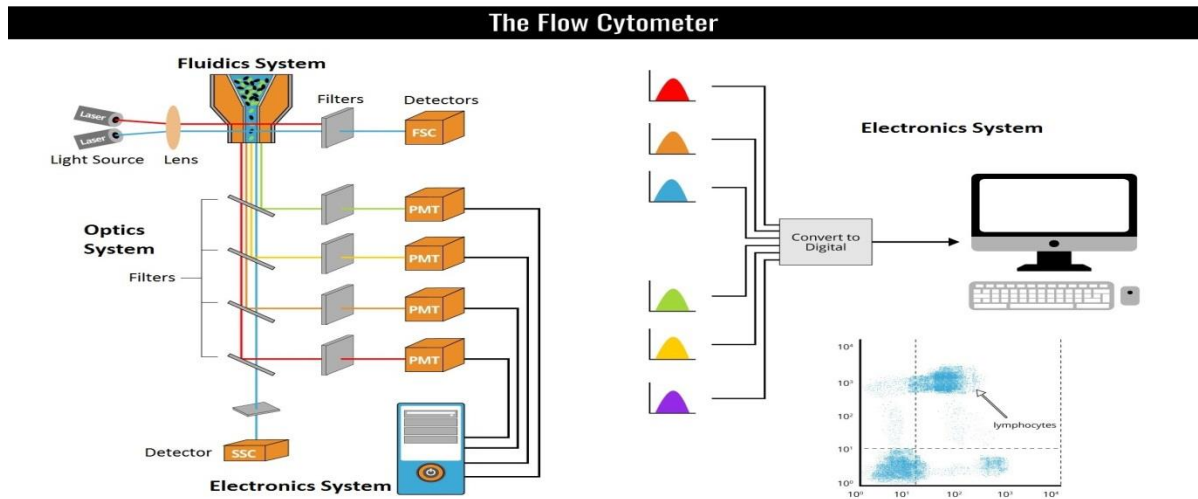
Οι σύγχρονοι κυτταρομετρητές ροής είναι ικανοί να αναλύουν πολλές χιλιάδες σωματίδια το δευτερόλεπτο, σε «πραγματικό χρόνο» (real time), να διαχωρίζουν και να απομονώνουν σωματίδια με εξειδικευμένες ιδιότητες. Έτσι, μπορούν να ανιχνεύουν νεοπλασματικά κύτταρα που βρίσκονται σε αναλογία 1:104 και με ειδικές τεχνικές 1:106 σε σχέση με τα φυσιολογικά κύτταρα, στην περίπτωση ελέγχου ελάχιστης υπολειπόμενης νόσου (Minimal Residual Disease, MRD) (Brown & Wittwer, 2000· McCoy, 2002· Ormerod, 2008).

4.2.1.4. Μέρη Κυτταρομετρητή Ροής

Είναι γνωστό, ότι ο κυτταρομετρητής ροής αποτελείται κύρια από 3 μέρη, όπως φαίνεται στις Εικόνες 4.1 και 4.2, που ακολουθούν.



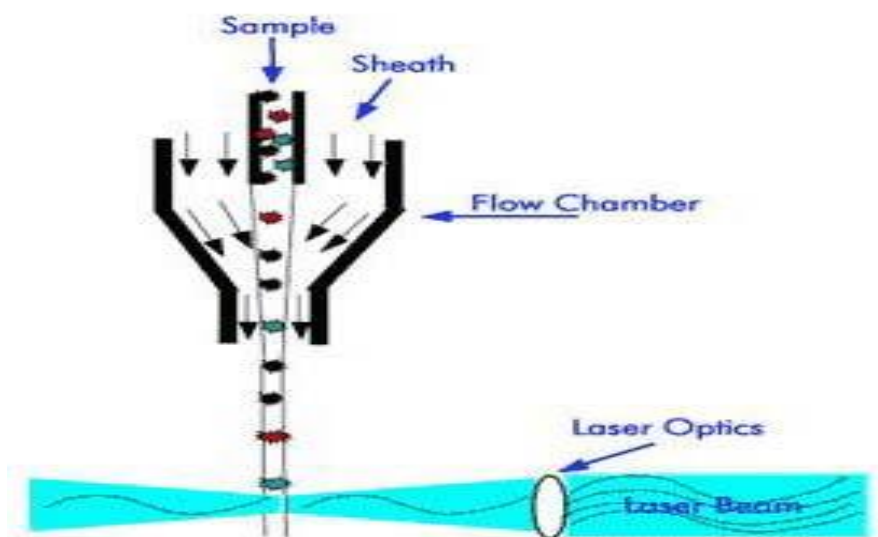
Εικόνα 4.1. Principle of flow cytometric analysis and sorting© B. Fuchs / MPI-MM



Εικόνα 4.2. Flow Cytometry Fundamental Principle, How FACS Works | Boster

4.2.1.4.α. Υδροδυναμικό σύστημα ή σύστημα ροής

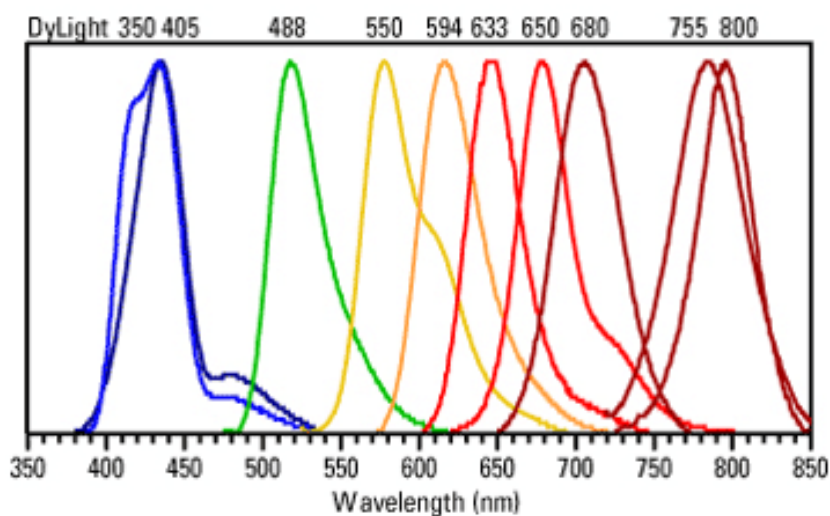
Αποτελείται από την κυψελίδα ροής (flow cell), το υδραυλικό σύστημα μεταφοράς του δείγματος και το περιρρέον υγρό. Η κυψελίδα ροής δρα ως κανάλι, μέσω του οποίου διέρχεται το κυτταρικό εναιώρημα περιβαλλόμενο από το περιρρέον υγρό (sheathflow) (βλ. Εικόνα 4.3) (McCoy, 2002· Longobardi Givan, 2001· Shapiro, 2003).



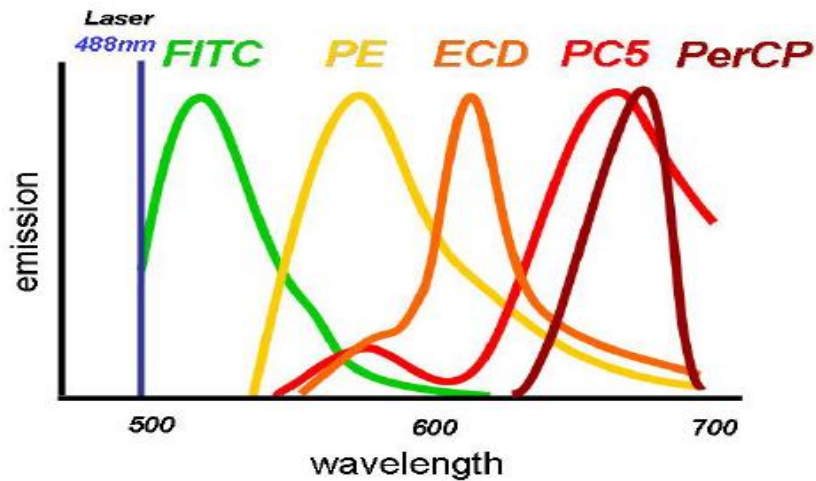
Εικόνα 4.3. Διάταξη κυψελίδας σε κυτταρομετρητή ροής. Διακρίνεται η κεντρική ροή του δείγματος, η περιβάλλουσα ροή (sheath), η προερχόμενη από laser φωτεινή

4.2.1.4.β. Οπτικό σύστημα

Το οπτικό σύστημα περιλαμβάνει μονοχρωματικές πηγές φωτός, που είναι γνωστές σε όλους μας με την ονομασία laser (μία ή και περισσότερες), καθώς και ένα πολύπλοκο σύστημα φακών, κατόπτρων, φίλτρων, φωτοανιχνευτών και φωτοπολλαπλασιαστών, το οποίο συλλέγει τα φωτεινά σήματα σκέδασης και φθορισμού και τα διοχετεύει στο ηλεκτρονικό σύστημα του κυτταρομετρητή ροής. Όσο περισσότερες φθορίζουσες ουσίες χρησιμοποιούνται για την κυτταρομετρική ανάλυση τόσο πιο πολύπλοκη γίνεται και η διαδικασία διαχωρισμού και πιθανής επικάλυψης της εκπομπής φθορισμού των χρωστικών. Η διαδικασία αφαίρεσης των κοινών περιοχών μήκους κύματος εκπομπής των επιμέρους χρωστικών είναι απαραίτητη για μια σωστή ανάλυση και είναι γνωστή ως χρωματική αντιατάθμιση (compensation) (Bigos, Baumgarth, Jager et al., 1999· Marti, Stetler-Stevenson, Blessing, & Fleisber, 2001· Roederer, 2001).



Εικόνα 4.4. Σχηματική απεικόνιση των επικαλυμμένων περιοχών εκπομπής

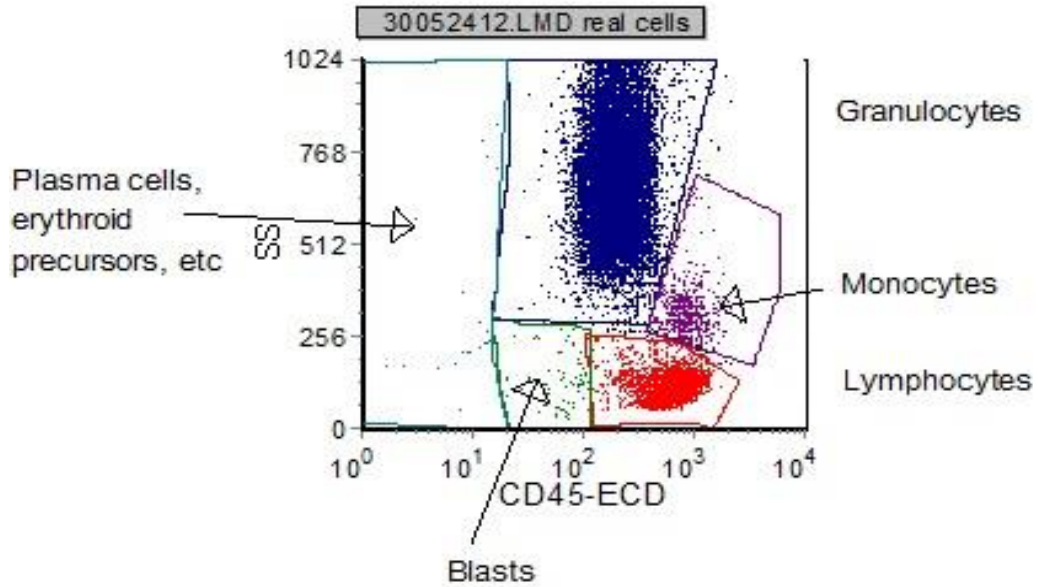


Εικόνα 4.5. Σχηματική απεικόνιση των επικαλυμμένων περιοχών εκπομπής

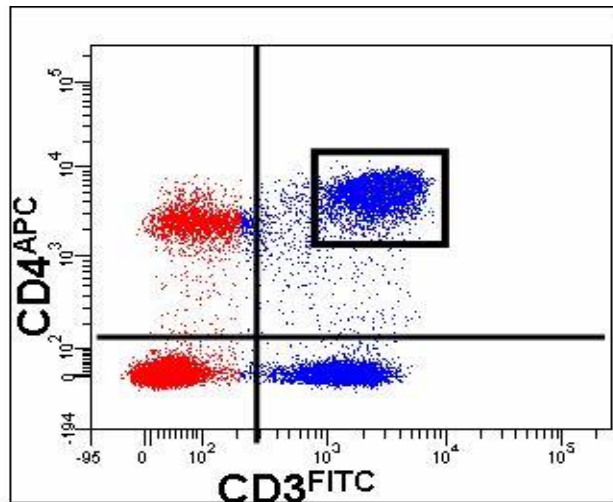
4.2.1.4.γ. Ηλεκτρονικό σύστημα ανάλυσης

Το ηλεκτρονικό σύστημα ανάλυσης δεδομένων είναι απαραίτητο για τη μετατροπή των φωτεινών σημάτων σε πληροφορίες καθώς και για την ανάλυση των δεδομένων. Υπάρχουν διαφορετικοί τύποι ηλεκτρονικών συστημάτων και λογισμικών που τα συνοδεύουν και κάθε εταιρεία επιλέγει το ποια είναι αυτά που σε κάθε περίπτωση είναι καταλληλότερα. Υπάρχουν, επίσης, διαφορετικοί τρόποι απεικόνισης των αποτελεσμάτων, όπως για παράδειγμα ιστογράμματα ή στικτογράμματα, χρησιμοποιώντας διαφορετικές παραμέτρους σε κάθε άξονα, όπως τον πρόσθιο ή τον πλάγιο σκεδασμό, που μεταφράζονται σε μέγεθος και κοκκίωση, αντίστοιχα, ή την ένταση του φθορισμού. Η ανάλυση αυτή μπορεί να περιλαμβάνει και περισσότερες της μίας παραμέτρους, όπως το *Ιστόγραμμα των χαρακτηριστικών σκέδασης των κυττάρων*, το *στικτόγραμμα (dot plot)*, όπου μελετώνται ταυτόχρονα δύο παράμετροι. Κάθε παράμετρος παρουσιάζεται στον ένα από τους δύο άξονες του διαγράμματος, κάθε κουκίδα στο στικτόγραμμα αντιστοιχεί σε ένα κύτταρο και βάσει του πρόσθιου και πλάγιου σκεδασμού μπορούμε να διαχωρίσουμε κυτταρικούς πληθυσμούς, το *ιστόγραμμα κατανομής συχνοτήτων*, όπου στον άξονα x παρουσιάζεται η ένταση του φθορισμού και στον άξονα των y ο αριθμός των κυττάρων, *διάγραμμα τριών διαστάσεων* (Baumgarth & Roederer, 2000· Boeck, 2000· Chapman, 2000· Zola, 2000).

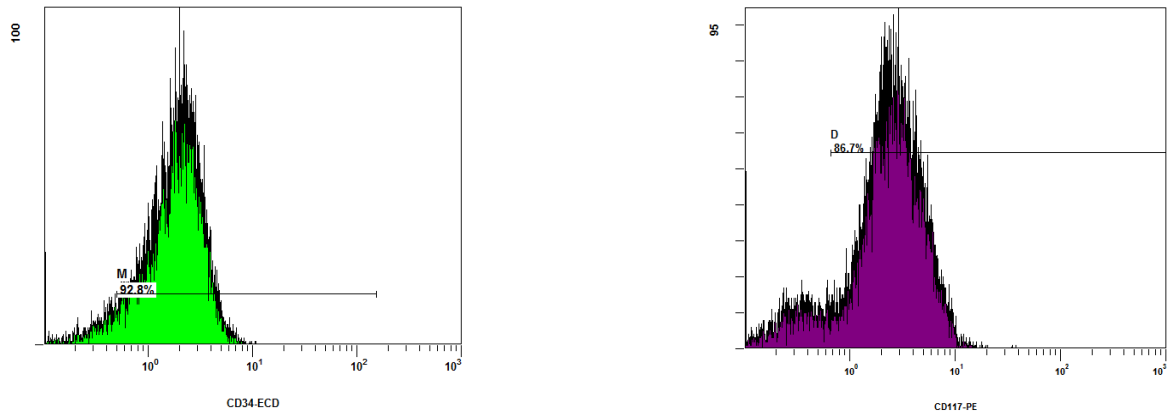
Μερικοί από τους επικρατέστερους και πιο εύχρηστους τρόπους παρουσίασης των αποτελεσμάτων της ΚΡ απεικονίζονται στις Εικόνες 5.6-5.9



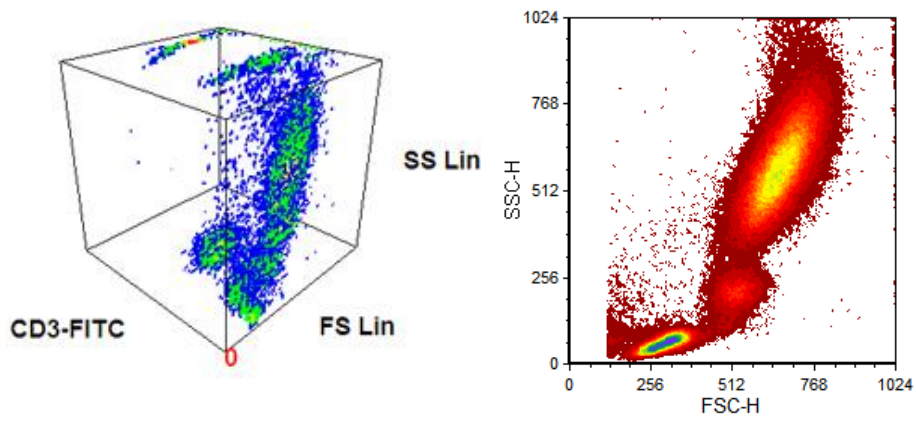
Εικόνα 4.6. Ιστόγραμμα των χαρακτηριστικών σκέδασης των κυττάρων



Εικόνα 4.7. Στικτόγραμμα (dot plot)



Εικόνα 4.8. Ιστόγραμμα κατανομής συχνότητας



Εικόνα 4.9. Διαγράμματα τριών διαστάσεων

4.2.2. Έλεγχος καλής λειτουργίας του Κυτταρομετρητή Ροής

Ο κυτταρομετρητής ροής πρέπει να ελέγχεται σε τακτά χρονικά διαστήματα και να ρυθμίζεται, με σκοπό την εξασφάλιση της σωστής λειτουργίας και τη λήψη αξιόπιστων αποτελεσμάτων. Τα προγράμματα ελέγχου ποιότητας των αποτελεσμάτων του κυτταρομετρητή περιλαμβάνουν τον έλεγχο ρύθμισης των παραμέτρων (βαθμονόμηση) που χρησιμοποιούνται (set up) για την σωστή λειτουργία του οργάνου και τον έλεγχο της απόδοσής του. Ο έλεγχος της απόδοσης έχει ως στόχο να πιστοποιήσει την καθημερινή, σταθερή απόδοση του οργάνου στις συγκεκριμένες παραμέτρους (Αναγνωστάκου, 2006).

Η βαθμονόμηση του κυτταρομετρητή ροής αφορά την εγκατάσταση των αρχικών παραμέτρων λειτουργίας για το κάθε πρόγραμμα ανάλυσης που επιτελείται. Η βαθμονόμηση πραγματοποιείται με ειδικά σφαιρίδια αναφοράς (standards), συνήθως από πολυστηρένιο, με γνωστά και σταθερά χαρακτηριστικά σκέδασης και φθορισμού. Με τη βαθμονόμηση, επιτυγχάνεται η βελτιστοποίηση της ευαισθησίας των φωτοπολλαπλασιαστών, της χρωματικής επικάλυψης και της οπτικής ευθυγράμμισης, ώστε να καθοριστούν περιοχές ανάλυσης για τη διάκριση επισημασμένων κυττάρων με ασθενή έκφραση από το «θόρυβο» του οργάνου.

4.2.2.1. Τύποι σφαιριδίων

Υπάρχουν 3 τύποι σφαιριδίων, που είναι οι εξής (Schwartz, Marti, Poon, Gratama, & Fernandez-Repollet, 1998· Stelzer, Marti, Hurley et al., 1997).

4.2.2.4.a. Σφαιρίδια οπτικής ευθυγράμμισης (τύπος I standards, alignment particles)

Σφαιρίδια για τον έλεγχο του Οπτικού και Υδροδυναμικού συστήματος, δηλαδή της ευθυγράμμισης. Τα σφαιρίδια τύπου I είναι φθορίζοντα που παράγουν φθορισμό πολύ υψηλής έντασης. Παρέχουν τη δυνατότητα ρύθμισης της θέσης της κυψελίδας ροής σε σχέση με τα τμήματα του οπτικού συστήματος, εξασφαλίζοντας τη βέλτιστη απόδοση των ανιχνευτών σκέδασης και φθορισμού.

4.2.2.4.β. Σφαιρίδια αναφοράς (τύπος II standards, reference particles)

Με τα σφαιρίδια αναφοράς γίνεται ο έλεγχος της σταθερότητας και της επαναλαμβανόμενης έντασης φθορισμού στα κανάλια στόχους.

4.2.2.4.γ. Σφαιρίδια βαθμονόμησης (τύπος III standards, calibration particles)

Με τα σφαιρίδια βαθμονόμησης επιτυγχάνεται η δυνατότητα ανίχνευσης όλων των πληθυσμών των σφαιριδίων, σε όλο το φάσμα των εντάσεων φθορισμού από σφαιρίδια που φθορίζουν ασθενώς έως σφαιρίδια με έντονο φθορισμό, καθώς επίσης και ο προσδιορισμός του ελάχιστου αριθμού μορίων χρωστικής, που μπορεί να ανιχνεύσει ο κυτταρομετρητής.

4.2.3. Πειραματική Πορεία Κυτταρομετρίας Ροής

4.2.3.1. Αναλώσιμα Υλικά

- Πλαστικές πιπέτες 3 ml τύπου Pasteur
- Αυτόματες πιπέτες Gilson όγκου, 10, 100, 200, 1000 μl
- Ρύγχη για αυτόματες πιπέτες όγκου 10 και 100 μl, 500μl
- Πλαστικά σωληνάρια των 5 ml, κατάλληλα για κυτταρομετρία ροής
- Πώματα πλαστικών σωληναρίων
- Πλαστικά σωληνάρια των και 50 ml τύπου Falcon για την προετοιμασία του μυελού.

4.2.3.2. Όργανα Μελέτης

Τα δείγματα μελετήθηκαν στον κυτταρομετρητή (Flow Cytometer - NAVIOS™) της εταιρείας Beckman Coulter.

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων αποθηκεύονταν ως αρχεία Lismode του λογισμικού προγράμματος XL2 (System II™ software version 3.0) της Beckman Coulter. Τα αποθηκευμένα αρχεία επεξεργάστηκαν με το πρόγραμμα Kaluza (Flow Cytometry Analysis Software - Kaluza 1.3).

4.2.3.3. Διαλύματα

- IsoFlow™ solution: Ρυθμιστικό διάλυμα της εταιρείας Becton Coulter που χρησιμοποιείται για το σχηματισμό της ομοαξονικής ροής. Περιέχει: NaCl, KCl, K3EDTA και συντηρητικά.
- Cleanse: Απορρυπαντικό διάλυμα με Πρωτοελυτικό ένζυμο.
- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (Phosphate Buffered Saline, PBS) pH=7,2.
- Paraformaldehyde (PFA): Παραφορμαλδεΐδη, διάλυμα 1% σε PBS.
- Φυσιολογικός ορός (Normal Human Serum, NHS): για αραιώσεις δειγμάτων.

4.2.3.4. Μονοκλωνικά Αντισώματα

Χρησιμοποιήθηκαν μονοκλωνικά αντισώματα (mAbs) των εταιρειών Beckman Coulter, BD Biosciences, Immunotech, Pharmigen. Η χρήση περισσότερων της μίας πηγής ακτίνας laser (τρεις στο συγκεκριμένο μηχάνημα) εξυπηρετεί τη σύγχρονη επιλογή πολλών διαφορετικών φθορίζουσών ουσιών, οι οποίες θα μπορούν να διεγείρονται και να εκπέμπουν σήματα σε διαφορετικές συχνότητες (single Dyes, FITC, ECD, PE).

Οι σύγχρονες ανάγκες της πολυπαραμετρικής και πολυχρωματικής κυτταρικής ανάλυσης οδήγησε στη χρήση των σύνθετων φθορίζουσών ουσιών, που είναι γνωστές ως χρωστικές tandem. Οι συγκεκριμένες φθορίζουσες ουσίες είναι αποτέλεσμα ένωσης δύο χρωστικών. Η διέγερση της πρώτης χρωστικής προκαλεί εκπομπή ενέργειας που διεγείρει τη δεύτερη χρωστική (φαινόμενο FRET). Το τελικό αποτέλεσμα είναι εκπομπή ενέργειας και φθορισμού σε μήκος κύματος μεγαλύτερο από ότι θα μπορούσε να επιτύχει η πηγή laser των 488nm με μία φθορίζουσα ουσία.

Στη συγκεκριμένη εργασία για τη μελέτη των ανοσοφαινοτυπικών χαρακτηριστικών χρησιμοποιήθηκε πενταπλός φθορισμός με τις φθορίζουσες ουσίες που απεικονίζονται στον Πίνακα 4.3 που ακολουθεί.

Πίνακας 4.3.*Φθορίζουσες ουσίες και τα φασματικά χαρακτηριστικά τους*

α/α	Φθορίζουσα Ουσία		Φασματικά Χαρακτηριστικά	
	Όνομα	Πλήρης Ονομασία	Μήκος κύματος διέγερσης (nm)	Μήκος κύματος εκπομπής(nm)
1	FITC	Ισοθειοκυανιούχος Φλουορεσκεΐνη	488	520
2	PE	Φυκοερυθρίνη	488	578
3	ECD	φυκοερυθρίνης	488	613
4	PC5	φυκοερυθρίνης-κυανίνης 5.1	488	688
5	PC7	φυκοερυθρίνης-κυανίνης 7	488	770
6	DyLight 488	Ισοθειοκυανιούχος Φλουορεσκεΐνη	488	524

Οι φθορίζουσες ουσίες είναι εμπορικά διαθέσιμες, συνήθως συνδεδεμένες με μονοκλωνικά αντισώματα από διαφορετικές εταιρείες, οι οποίες παρατίθενται στον Πίνακα 4.4 που ακολουθεί.

Πίνακας 4.4.*Μονοκλωνικά αντισώματα επισημασμένα με φθορίζουσες ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη*

α/α	Μονοκλωνικά Αντισώματα		Φθορίζουσα Ουσία	Εταιρεία
	Όνομα MAb	Κλώνος		
1	CD3	UCHT1	ECD	Beckman Coulter
2	CD3/CD(16+56)	UCHT1/3G8+N901	FITC/PE	Beckman Coulter
3	CD4	13B8.2	FITC	Beckman Coulter
4	CD4	SFCI12T4D11(T4)	ECD	Beckman Coulter
5	CD5	BL1a	ECD	Beckman Coulter
6	CD7	8H8.1	FITC	Beckman Coulter
7	CD7	8H8.1	PE	Beckman Coulter
8	CD8	SFCI21Thy2D3(T8)	PC5	Beckman Coulter
9	CD8	B9.11	PE	Beckman Coulter
10	CD10	ALB1	PC5	Beckman Coulter
11	CD11b	Bear1	PC5	Beckman Coulter
12	CD13	L138	PE	BD Biosciences
13	CD13	Immu103.44	PC5	Beckman Coulter
14	CD14	RMO52	PC5	Beckman Coulter
15	CD15	MSC-1	FITC	Cytognos

16	CD16	3G8	PC5	Beckman Coulter
17	CD16	3G8	ECD	Beckman Coulter
18	CD19	89B (B4)	PE	Beckman Coulter
19	CD19	H1B19	FITC	Cytognos
20	CD20	B9E9(HRC20)	FITC	Beckman Coulter
21	CD22	SJ10.1H11	PC5	Beckman Coulter
22	CD33	D3HL60.251	PC5	Beckman Coulter
23	CD33	D3HL60.251	PE	Beckman Coulter
24	CD34	581	PC5	Beckman Coulter
25	CD34	581	ECD	Beckman Coulter
26	CD36	FA6.152	FITC	Beckman Coulter
27	CD38	T16	FITC	Beckman Coulter
28	CD38	LS198-4-3	PC5	Beckman Coulter
29	CD45	J33	ECD	Beckman Coulter
30	CD45	J33	PC7	Beckman Coulter
31	CD56	N901(NKH-1)	PC5	Beckman Coulter
32	CD64	22	PE	Beckman Coulter
33	CD79a	HM47	PE	Beckman Coulter
34	CD117	95C3	PE	Beckman Coulter
35	CD135	IM2234U	PE	Beckman Coulter
36	anti-HLA-DR	L243	FITC	BD Biosciences
37	anti-MPO/LF	CLB-MPO-1/CLB13.17	FITC /PE	Beckman Coulter
38	Nucleophsmin Antibody	NB110-61646G	DyLight488	NOVUS BIOLOGICALS

4.2.4. Αντιδραστήρια Λύσης Ερυθρών Αιμοσφαιρίων

4.2.4.1. Σύστημα αντιδραστηρίων ImmunoPREP™ της εταιρείας Beckman Coulter

Το σύστημα ImmunoPREP™ χρησιμοποιείται για την χημική λύση των ερυθροκυττάρων, αλλά και για να διατηρήσει την δυναμική των κυττάρων στη μέθοδο της μελέτης των κυτταρικών αντιγόνων επιφανείας. Περιλαμβάνει το συνδυασμό 3 αντιδραστηρίων:

1. *ImmunoPREP™ A*: Λειτουργεί ως αντιδραστήριο λύσης των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Περιέχει Μυρμηκικό οξύ (HCOOH) 1,2 mg/L και σταθεροποιητή.

2. *ImmunoPREP™ B*: Λειτουργεί ως σταθεροποιητής των λευκοκυττάρων. Περιέχει ανθρακικό νάτριο (Na_2CO_3) περιεκτικότητας 6,0 g/L, υποχλωριώδες νάτριο (NaClO_2) περιεκτικότητας 14,5 g/L, θειικό νάτριο [$\text{Na}_2(\text{SO}_4)$] περιεκτικότητας 31,3 g/L και σταθεροποιητή.
3. *ImmunoPREP™ C*: Αποτελεί το υλικό μονιμοποίησης της κυτταρικής μεμβράνης. Περιέχει παραφορμαλδεύδη (PFA) 10,0 g/L και ρυθμιστικό διάλυμα.

4.2.4.2. Σύστημα αντιδραστηρίων *IntraPREP™ Permeabilization* της εταιρείας **Beckman Coulter**

Το σύστημα *IntraPREP™* χρησιμοποιείται στη μέθοδο της μελέτης κυτταροπλασματικών αντιγόνων και περιλαμβάνει το συνδυασμό 2 αντιδραστηρίων:

1. *IntraPREP™ Reagent 1*: Φορμαλδεύδη ($\text{HCH}=\text{O}$). Λειτουργεί ως μονιμοποιητικό.
2. *IntraPREP™ Reagent 2*: Σαπωνίνη. Λειτουργεί ως απορρυπαντικό, που αυξάνει τη διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης και προκαλεί λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων.

4.2.5. Προετοιμασία δειγμάτων

Τα δείγματα που πρόκειται να αναλυθούν για τον προσδιορισμό ανοσοφαινοτύπου υφίστανται ειδική επεξεργασία.

Η λήψη του δείγματος, είτε μυελού είτε περιφερικού αίματος, γίνεται σε σωληνάρια των 5 ml που περιέχουν K_3EDTA , ως αντιπηκτικό. Όλα τα δείγματα αναλύονταν εντός διαστήματος 24h από την συλλογή τους. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν επιφανειακοί και κυτταροπλασματικοί δείκτες των λευκών αιμοσφαιρίων χρησιμοποιώντας αρκετά αντιγόνα διαφοροποίησης (CDs), με σκοπό την εύρεση των ιδιαίτερων ανοσοφαινοτυπικών χαρακτηριστικών που εμφανίζονται στους διάφορους υποπληθυσμούς τους. Συγκεκριμένα μελετήθηκε η έκφραση (υπό-, υπέρ) των δεικτών αυτών ή / και η συνέκφρασή τους.

4.2.5.1. Μελέτη Έκφρασης κυτταρικών δεικτών για τον προσδιορισμό ανοσοφαινοτύπου

4.2.5.1.α. Αντιγόνα επιφανείας

- Σε δοκιμαστικό σωλήνα των 5 ml προστίθενται βάσει πρωτοκόλλου τα μονοκλωνικά αντισώματα επιφανείας συνδεδεμένα με φθορίζουσες ουσίες. Οι όγκοι που χρησιμοποιούνται ορίζονται από τις οδηγίες του κατασκευαστή
- Στη συνέχεια προστίθενται 50 ml δείγματος
- Γίνεται ανάδευση με vortex
- Ακολουθείται επώαση για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου (20-25°C)
- Στη συνέχεια γίνεται λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων αυτοματοποιημένα στο μηχάνημα της Coulter TQ-Prep με το σύστημα αντιδραστηρίων ImmunoPREP™

Στη συνέχεια, το δείγμα εισάγεται στον κυτταρομετρητή για μέτρηση.

4.2.5.1.β. Κυτταροπλασματικά αντιγόνα (MPO, LF, NPM1)

Χρησιμοποιήθηκε το διαφανοποιητικό σύστημα της Beckman Coulter

- Σε δοκιμαστικό σωλήνα των 5 ml προστίθενται βάσει πρωτοκόλλου τα μονοκλωνικά αντισώματα επιφανείας συνδεδεμένα με φθορίζουσες ουσίες. Οι όγκοι που χρησιμοποιούνται ορίζονται από τις οδηγίες του κατασκευαστή
- Στη συνέχεια, προστίθενται 50 ml δείγματος
- Γίνεται ανάδευση με vortex
- Ακολουθείται επώαση για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου (20-25°C)
- Προσθήκη 100μl αντιδραστηρίου IntraPREP Reagent 1 για μονιμοποίηση των εξωτερικών επιτόπων
- Γίνεται ανάδευση του δείγματος με vortex
- Ακολουθεί επώαση του δείγματος για 15min σε θερμοκρασία δωματίου

- Προσθήκη 2ml διαλύματος PBS
- Ανάδευση του δείγματος με vortex
- Φυγοκέντρηση στο 300g για 5min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος
- Αφαιρείται το υπερκείμενο υγρό
- Προστίθενται 100μl IntraPREP Reagent 2 για να την λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων και διάνοιξη της μεμβράνης των λευκών ώστε να μπορέσουν να εισέλθουν τα αντισώματα στο εσωτερικό του κυττάρου.
- Επώαση του δείγματος για 5min σε θερμοκρασία δωματίου
- Προσθήκη κυτταροπλασματικού μονοκλωνικού αντισώματος
- Ανάδευση του δείγματος με vortex
- Επώαση του δείγματος για 15min σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι
- Προσθήκη 2ml διαλύματος PBS
- Φυγοκέντρηση στο 300g για 5min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος
- Αφαιρείται το υπερκείμενο υγρό
- Προστίθενται 500μl PFA
- Το μίγμα αναδεύεται στο vortex

Στη συνέχεια, το δείγμα εισάγεται στον κυτταρομετρητή για μέτρηση.

4.2.6. Μελέτη ανοσοφαινοτύπου

Για την μελέτη του ανοσοφαινοτύπου, χρησιμοποιούνται διάφοροι συνδυασμοί μονοκλωνικών αντισωμάτων. Η επιλογή κάθε αντισώματος γίνεται βάσει του κυτταρικού πληθυσμού τον οποίο μελετάμε. Έτσι, κάθε συνδυασμός περιέχει δείκτες οι οποίοι χαρακτηρίζουν κύτταρα του ίδιου κυτταρικού πληθυσμού. Στον Πίνακα 4.5 που ακολουθεί, παρατίθενται οι δείκτες και οι πληθυσμοί των κυττάρων που αφορούν.

Πίνακας 4.5.

Μονοκλωνικά αντισώματα μελέτης ανοσοφαινοτύπου

CD2: T λεμφοκύτταρα και NK κύτταρα.
CD3: T λεμφοκύτταρα και ώριμα θυμοκύτταρα.
CD4: Υποπληθυσμός T λεμφοκυττάρων (βοηθητικά), μονοκύτταρα.
CD7: T λεμφοκύτταρα και NK κύτταρα.
CD8: T λεμφοκύτταρα (κυτταροτοξικά), υποπληθυσμός NK κυττάρων.
CD10: Προ B λεμφοκύτταρα.
CD11b: Μονοκύτταρα, μακροφάγα, κοκκιοκύτταρα, NK κύτταρα.
CD13: Κύτταρα μυελικής σειράς.
CD14: Μονοκύτταρα, μακροφάγα.
CD16: Κοκκιοκύτταρα, υποπληθυσμός T λεμφοκυττάρων, NK κύτταρα.
CD19: Όλα τα λεμφοκύτταρα B κυτταρικής προέλευσης, δενδριτικά κύτταρα λεμφοζιδίων.
CD20: B λεμφοκύτταρα, μερικά πρόδρομα B λεμφοκύτταρα.
CD33: Κύτταρα της μυελικής σειράς εκτός της κοκκιάδους και σε μονοκύτταρα.
CD34: Αιμοποιητικό πολυδύναμο κύτταρο, B λεμφοβλάστες, πρόδρομα T λεμφοκύτταρα και μυελοβλάστες.
CD36: Ερυθροβλάστες και άωρα κύτταρα της ερυθράς σειράς, μονοκύτταρα, μακροφάγα, αιμοπετάλια, μεγακαρυοκύτταρα.
CD38: Ενεργοποιημένα B και T λεμφοκύτταρα, θυμοκύτταρα, πλασματοκύτταρα, άωρα κύτταρα
CD45: Λευκοκύτταρα (πανλευκοκυτταρικό αντιγόνο)
CD56: NK κύτταρα, υποπληθυσμοί T λεμφοκυττάρων.
CD64: Μονοκύτταρα, μακροφάγα, ενεργοποιημένα κοκκιοκύτταρα.
CD117: Προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα, μυελοβλάστες, πρόδρομα ερυθροποιητικά κύτταρα, μεγακαρυοβλάστες, μαστοκύτταρα.
HLA-DR: Ενεργοποιημένα T λεμφοκύτταρα, B λεμφοκύτταρα, Μονοκύτταρα, Άωρα κύτταρα μυελικής σειράς.
LF: Ωριμα Ουδετερόφιλα, Κοκκιοκύτταρα.
MPO: Μονοκύτταρα, ουδετερόφιλα

4.2.6.1. Μελέτη ΜΔΣ

Για την μελέτη των ΜΔΣ ακολουθήθηκε η επεξεργασία των δειγμάτων, όπως περιγράφηκε.

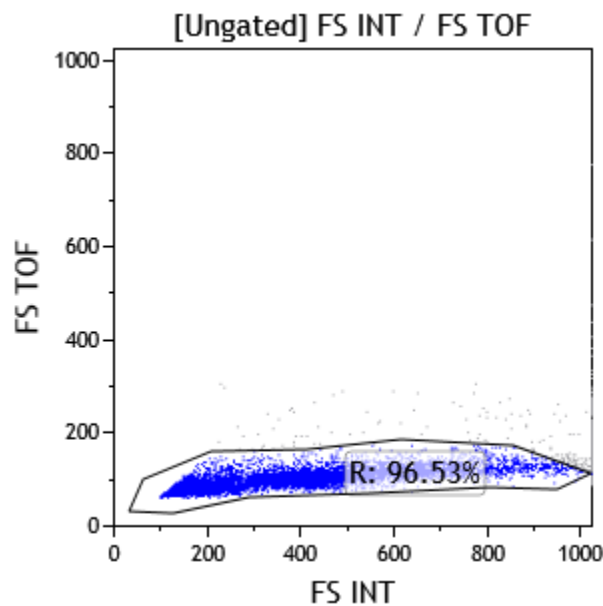
Οι συνδυασμοί που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

- ✓ Σωληνάριο 1: CD10-FITC CD19-PE CD34-ECD CD20-PC5 CD45-PC7
- ✓ Σωληνάριο 2 : HLA-DR- FITC CD33-PE CD34-ECD CD38-PC5 CD45-PC7

- ✓ Σωληνάριο 3 : CD7-FITC CD117-PE CD34-ECD CD13-PC5 CD45-PC7
- ✓ Σωληνάριο 4 : MPO-FITC LF-PE CD34-ECD CD16-PC5 CD45-PC7
- ✓ Σωληνάριο 5 : CD36-FITC CD64-PE CD34-ECD CD14-PC5 CD45-PC7
- ✓ Σωληνάριο 6 : CD16-FITC CD13-PE CD5-ECD CD11b-PC5 CD45-PC7
- ✓ Σωληνάριο 7 : CD3-FITC CD(16+56)-PE CD4-ECD CD8-PC5 CD45-PC7

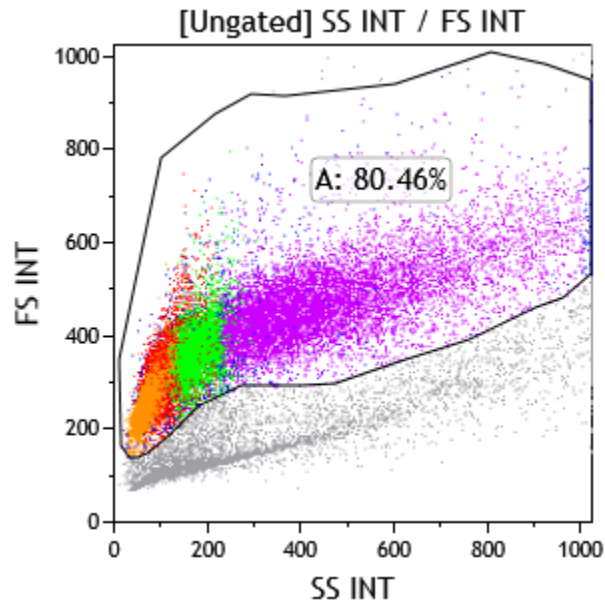
Αφού μπουν τα δείγματα στον κυτταρομετρητή, για κάθε σωληνάκι που μελετάται συλλέγονται περίπου 100.000 συμβάματα (events). Για την μελέτη των δειγμάτων, εξετάζονται οι διάφοροι υποπληθυσμοί των κυττάρων ξεχωριστά. Η οριοθέτηση (gating) του κάθε κυτταρικού πληθυσμού, έγινε με τη χρήση του στικτογράμματος $SSC=f(CD45+)$.

Στο διάγραμμα FSTOF-FS οριοθετούνται τα κύτταρα, ώστε να αποκλείονται τα συγκολλημένα κύτταρα (background), τα οποία δημιουργούν διπλέτες και τριπλέτες και έτσι αυξάνουν μη ειδικά την ένταση του φθορισμού (βλ. Εικόνα 4.10).



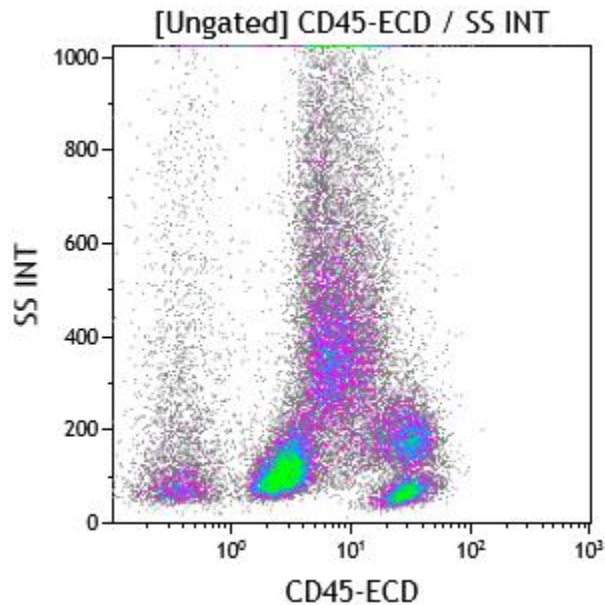
Εικόνα 4.10. Διάγραμμα FSTOF-FS

Στο διάγραμμα FSC-SSC οριοθετούνται τα κύτταρα, ώστε να αποκλειστούν από την μέτρηση τα σωματίδια που εμφανίζονται να έχουν χαμηλό FSC, όπως κυτταρικά θραύσματα και νεκρά κύτταρα (βλ. Εικόνα 4.11).



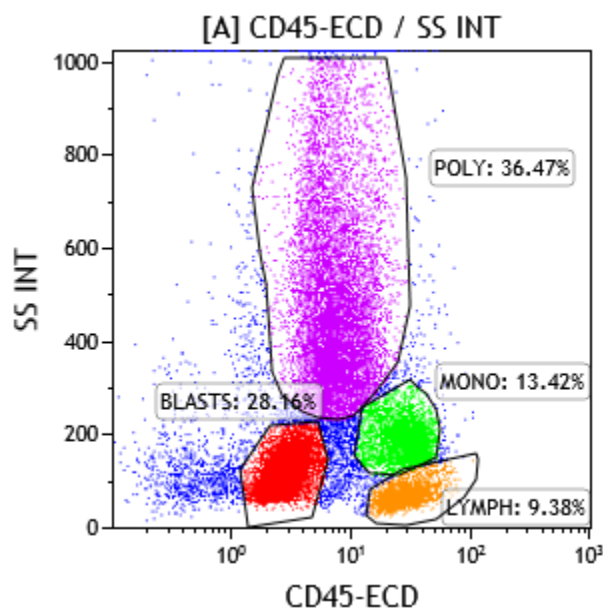
Εικόνα 4.11. Διάγραμμα FSC-SSC (οριοθέτηση)

Η μελέτη των δεικτών σε κάθε πληθυσμό γίνεται μέσω της έκφρασης του CD45. Ο κάθε υποπληθυσμός ξεχωρίζει με βάσει τα σκεδαστικά του χαρακτηριστικά και την ένταση έκφρασης του CD45.



Εικόνα 4.12. Διάγραμμα FSC-SSC (οριοθέτηση)

Με θερμότερο χρώμα εμφανίζονται οι περιοχές με μεγαλύτερο αριθμό (πυκνότητα) κυττάρων.

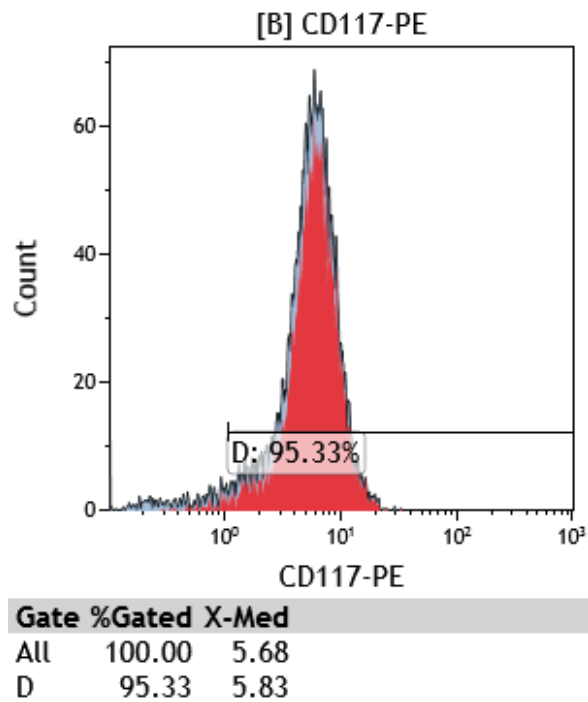


Εικόνα 4.13. Στικτόγραμμα CD45-SSC

Οριοθετούνται οι πληθυσμοί: LYMPH (λεμφοκύτταρα) υψηλή έκφραση CD45/χαμηλό SS. Blasts (στην περιοχή του βλαστικού παραθύρου) χαμηλή έκφραση CD45/ χαμηλό-μέσο SS.

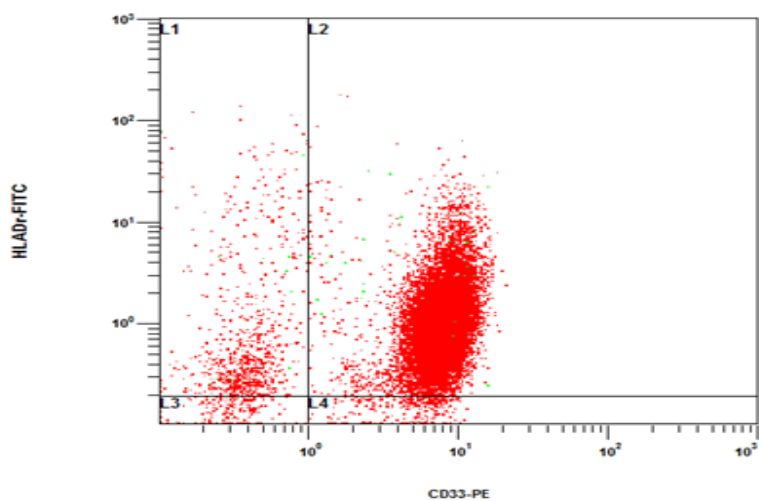
Μono (μονοκύτταρα) μέση έκφραση CD45/μέσο SS. Poly (πολυμορφοπύρηνα-ουδετερόφιλα) με χαμηλή έκφραση CD45 / υψηλό SS.

Αρχικά, μελετώνται τα ιστογράμματα του κάθε δείκτη ξεχωριστά για την έκφραση θετικότητας ή όχι.



Εικόνα 4.14. Ιστόγραμμα CD117. Η κατανομή των CD117+ κυττάρων αφορά την περιοχή του βλαστικού παραθύρου. Φαίνεται η τιμή του ποσοστού και του MFI των CD117+ κυττάρων

Στα διαγράμματα δυο παραμέτρων μελετώνται και συγκρίνονται οι εκφράσεις των δεικτών και οι συνεκφράσεις τους.



Εικόνα 4.15. Στικτόγραμμα HLA-DR/CD33

Στην L1 περιοχή βρίσκονται τα HLA-DR+ CD33- κύτταρα. Στην L2 περιοχή βρίσκονται τα διπλά θετικά κύτταρα HLA-DR+CD33+. Στην L3 περιοχή τα διπλά αρνητικά κύτταρα HLA-DR- CD33-. Στην L4 περιοχή τα HLA-DR- CD33+ κύτταρα.

4.2.6.2. Μελέτη ΟΜΛ

Για την μελέτη της ΟΜΛ, οι συνδυασμοί που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

- ο Σωληνάριο 1: CD8-FITC CD4-PE CD3-ECD CD22-PC5 CD45-PC7
- ο Σωληνάριο 2 : CD19- FITC CD10-PE CD34-ECD CD20-PC5 CD45-PC7
- ο Σωληνάριο 3 : CD2-FITC CD7-PE CD3-ECD CD56-PC5 CD45-PC7
- ο Σωληνάριο 4 : HLA-DR-FITC CD117-PE CD34-ECD CD33-PC5 CD45-PC7
- ο Σωληνάριο 5 : CD38-FITC CD13-PE CD34-ECD CD11b-PC5 CD45-PC7
- ο Σωληνάριο 6 : CD15-FITC CD64-PE CD16-ECD CD14-PC5 CD45-PC7
- ο Σωληνάριο 7 : MPO-FITC LF-PE CD4-ECD CD16-PC5 CD45- PC7

Η μελέτη των δεικτών έγινε όπως περιγράφηκε και στα μυελοδυσπλαστικά.

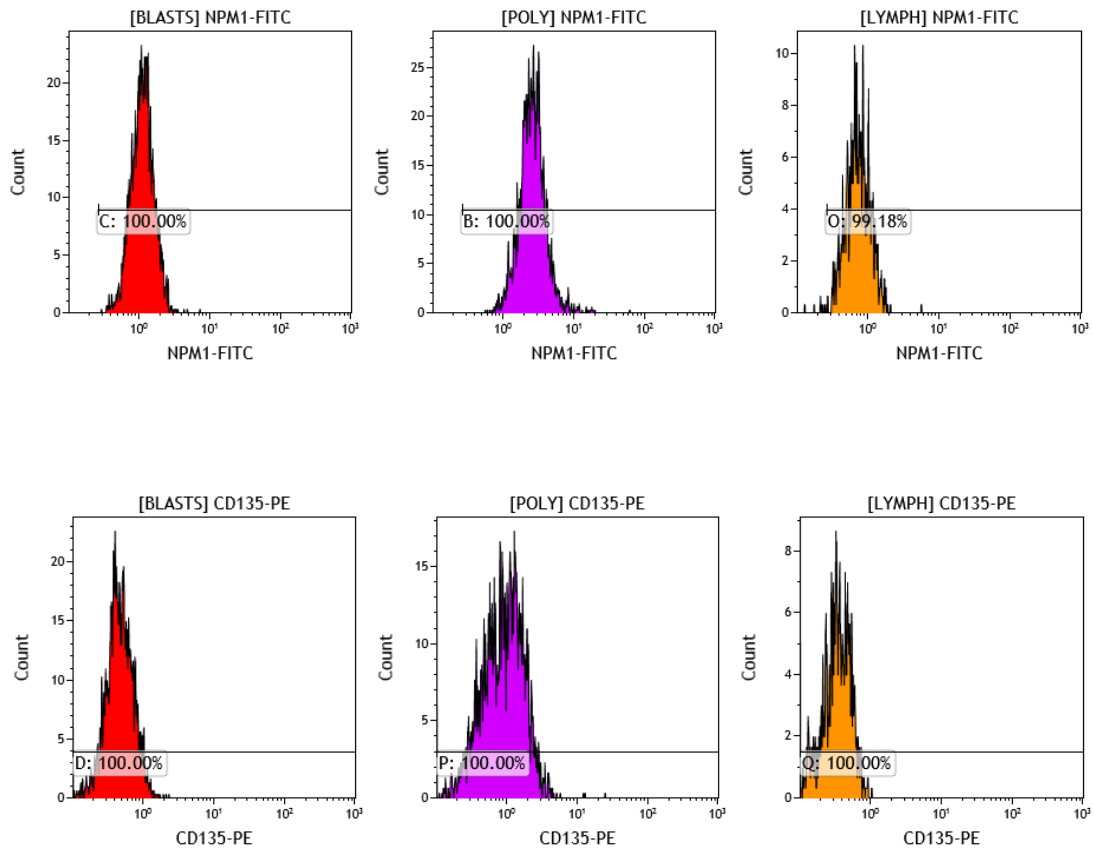
4.2.6.3. Μελέτη των *NPM1* και *FLT3* με κυτταρομετρία ροής

Ακολουθήθηκε η πορεία σήμανσης των κυττάρων, όπως περιγράφηκε ανωτέρω. Για το CD135, η πορεία ήταν ίδια με αυτήν των μονοκλωνικών αντιγόνων επιφανείας, ενώ για την μελέτη του *NPM1*, αυτή των κυτταροπλασματικών αντιγόνων.

Για τα *NPM1* και *FLT3* οι συνδυασμοί που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

- ο Σωληνάριο 1: Nucleophsmin Antibody- DyLight488 CD135-PE CD34-ECD CD33-PC5 CD45-PC7

Η μελέτη των δεικτών σε κάθε πληθυσμό γίνεται, επίσης, μέσω της έκφρασης του CD45.



Εικόνα 4.16. Συγκριτικό ιστόγραμμα έκφρασης των πρωτεϊνών των γονιδίων NPM1 και FLT3 (CD135) στους πληθυσμούς των βλαστών, των πολυμορφοκυττάρων και των λεμφοκυττάρων

4.3. Μοριακή Μελέτη

Η ανίχνευση των μεταλλάξεων των γονιδίων NPM1 και FLT3 (TKD, ITD) έγινε με τη μέθοδο Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR) σε δείγματα PB ή BM κατά τη διάγνωση. Τα προϊόντα της PCR μελετήθηκαν με Τριχοειδική Ηλεκτροφόρηση.

4.3.1. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

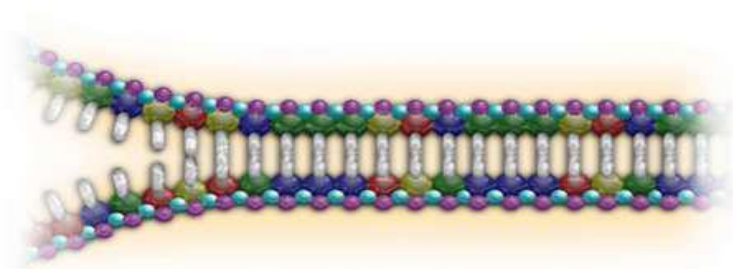
Η Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) είναι μια *in vitro* μέθοδος που επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό προεπιλεγμένης αλληλουχίας DNA σε πολλά αντίγραφα σε σύντομο χρόνο. Η PCR αποτελεί μία από τις πιο βασικές μεθόδους της μοριακής βιολογίας που εφαρμόζεται εκτενώς τόσο στο χώρο της μοριακής βιολογίας όσο και της ιατρικής με αναρίθμητες εφαρμογές τόσο σε ερευνητικό όσο και σε διαγνωστικό επίπεδο.

Η PCR είναι μια ταχεία μέθοδος πολλαπλασιασμού μιας συγκεκριμένης νουκλεοτιδικής αλληλουχίας DNA με τη βοήθεια του ενζύμου πολυμεράση και επιτυγχάνεται με επαναλαμβανόμενους κύκλους τριών αντιδράσεων που επιτελούνται σε διαφορετική θερμοκρασία.

Κάθε κύκλος αποτελείται από τα εξής στάδια:

4.3.1.1. DNA DENATURATION (Αποδιάταξη)

Όταν το DNA θερμαίνεται, η διπλή έλικα «ανοίγει» (βλ. Εικόνα 4.17). Το φαινόμενο αυτό αναφέρεται ως τήξη (melting).

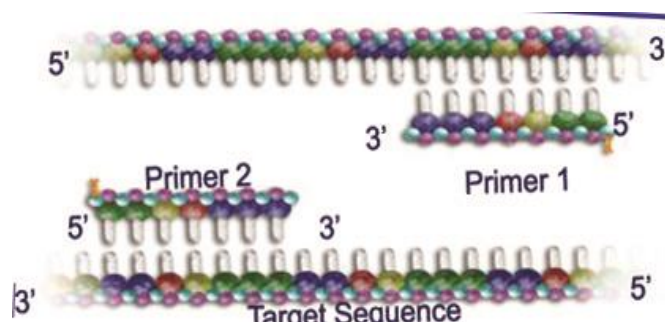


Εικόνα 4.17. Συνήθεις συνθήκες 94-96°C για 20-60 sec

Το ζεύγος A=T ενώνεται με δύο δεσμούς υδρογόνου, σε αντίθεση με το ζεύγος C≡G που ενώνεται με τρεις.

4.3.1.2. DNA ANNEALING (Επαναδιάταξη – Υβριδισμός Εκκινητών με τις Μονόκλωνες Αλυσίδες του DNA)

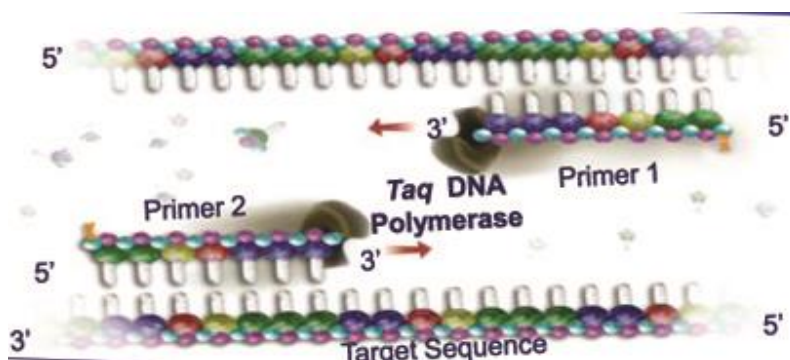
Οι εκκινητές είναι συμπληρωματικοί ως προς τις αλληλουχίες στόχους. Το μήκος τους είναι συνήθως 17-30 βάσεις.



Εικόνα 4.18. Συνήθεις συνθήκες 50-60°C για 20-60 sec

4.3.1.3. DNA EXTENSION (Επιμήκυνση)

Η DNA πολυμεράση σε περιβάλλον περισσεύσεως των τεσσάρων φωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων έχει σαν αποτέλεσμα την επιμήκυνση των εκκινητών με κατεύθυνση 5' → 3' και τη σύνθεση συμπληρωματικής ως προς τη μητρική, νέας αλυσίδας DNA με ταχύτητα αύξησης αλυσίδας 500 – 1000 ζεύγη βάσεων ανά λεπτό.



Εικόνα 4.19. Συνήθεις συνθήκες 72°C για 30sec-2min

4.3.2. Τριχοειδική Ηλεκτροφόρηση

Η Τριχοειδική Ηλεκτροφόρηση (Capillary Electrophoresis, CE) είναι μια διαχωριστική τεχνική υψηλής απόδοσης, στην οποία η Ηλεκτροφόρηση διεξάγεται σε στενούς τριχοειδείς σωλήνες, μικρής εσωτερικής διαμέτρου, συνήθως 25 έως 100 μm .

Ένα τυπικό σύστημα τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης αποτελείται από παροχή ισχύος υψηλής τάσης, σύστημα εισαγωγής δείγματος, τριχοειδή σωλήνα, ανίχνευτή και συσκευή εξόδου. Ο διαχωρισμός του δείγματος εξαρτάται από την ηλεκτροφορητική κινητικότητα και το ιξώδες των διαλυμάτων.

Η ανίχνευση των μεταλλάξεων *NPM1* και *FLT3* έγινε μετά από την PCR στον αναλυτή ABI 3130, ο οποίος αποτελεί ένα ενιαίο τριχοειδές όργανο με ανίχνευση φθορισμού πολλαπλών χρωμάτων που παρέχει μεγάλη δυνατότητα ανάλυσης DNA και τριχοειδή 36 cm. Οι πληροφορίες των δεδομένων της ανάλυσης υποβάλλονται σε σειριακή επεξεργασία με ρυθμό περίπου ενός δείγματος ανά 30 λεπτά λειτουργίας. Τα δείγματα προς ηλεκτροφόρηση τοποθετούνταν σε πλάκα 96 θέσεων κατάλληλη για το μηχάνημα, αναμιγνύοντας 1 μl από το προϊόν της PCR με 10 μl φορμαμίδιου με μάρτυρα (30 μl GeneScan™ 500 LIZ® Size Standard σε 1000 μl Formamide), ενώ χρησιμοποιήθηκε το πολυμερές POP-4.

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με το λογισμικό GeneMapper® Software v.4.

4.3.3. Αναλώσιμα Υλικά

- Σωληνάρια πολυπροπυλενίου των 15 και 50 ml τύπου Falcon
- Σωληνάρια όγκου 1,7 ml τύπου eppendorf Corning
- Σωληνάρια όγκου 0.5 ml τύπου eppendorf Sarstedt
- Σωληνάρια όγκου 0.2 ml τύπου eppendorf Sarstedt
- Πιπέτες Gilson και ρύγχη με φίλτρο όγκου, 10, 100, 200, 1000 μl
- Πλαστικές πιπέτες αποστειρωμένες 3 ml τύπου Pasteur
- Πλάκες 96 θέσεων (MicroAmp Optical 96-Well) Applied Biosystems
- Plate Septa 96-Well

4.3.4. Όργανα Μελέτης

- Επιτραπέζια ψυχωμένη φυγόκεντρος Thermo SCIENTIFIC SL16R
- Επιτραπέζια ψυχωμένη φυγόκεντρος Eppendorf 5417R
- Μικροφυγόκεντρος Eppendorf 5415
- Μικροσκόπιο Zeiss
- Ψυγείο συντήρησης ELCO tropic
- Καταψύκτης -30 °C SANYO
- Καταψύκτης -80 °C Forma
- Καταψύκτης -80 °C Forma 88000 SERIES
- Driblock , Techne
- DNA workstation aura mini, Bioair
- Πιπέτες ακριβείας ρυθμιζόμενες διαφορετικών όγκων, Gilson
- Θερμικός κυκλοποιητής MJ Research PTC-200
- Sequencer 3130 Genetic Analyzer Applied Biosystems
- 7500 Real Time PCR System Applied Biosystems

4.3.5. Χημικά – Αντιδραστήρια

- PBS, Phosphate Buffer Saline (Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων), Ph=7,4

gibco by life technologies

- Ficoll-Paque PLUS, Amersham Biosciences
- Lymphoprep™ STEMCELL TECHNOLOGIES
- RBC (Red Blood Cell Lysis Buffer) ammonium chloride NH₄CL 155Mm, Potassium bicarbonate KHCO₃ 10mM, EDTA 0.5M
- TRIzol® Reagent, Invitrogen™

- PureLink[®] Genomic DNA kit, Invitrogen[™]
- Hi-Di[™] Formamide, Applied Biosystems
- POP-4[™] Polymer for 3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems
- GeneScan[™] –500 LIZ[®] Size Standard, Applied Biosystems
- 3130 10 x Running Buffer, Applied Biosystems
- Platinum Taq DNA polymerase, invitrogen by life technologies
- dNTPs, invitrogen by life technologies
- Restriction Endonuclease EcoR V from Escherichia coli J62 pLG74, Roche
- NPM1 MutaScreen[™] kit, ipsogen

4.3.6. Πειραματική Πορεία

4.3.6.1. Επεξεργασία δειγμάτων

Κατά τη λήψη των δειγμάτων, αλλά και καθ' όλη την επεξεργασία τους, ήταν απαραίτητη η χρήση αποστειρωμένων γαντιών.

Παραλαβή δειγμάτων περιφερικού αίματος 10-15 ml ή μυελού των οστών 1-2 ml σε σωληνάρια πλαστικά μίας χρήσης των 5 ml με αντιπηκτικό K3EDTA .

Το κάθε δείγμα καταχωρείτο σε ειδικό βιβλίο παραλαβής κατά αύξοντα αριθμό. Τα στοιχεία του δείγματος αποθηκεύονταν και σε ηλεκτρονική μορφή με το πρόγραμμα FileMaker Pro 10 Advanced.

4.3.6.2. Απομόνωση μονοπύρηνων κυττάρων με Ficoll-PaquePLUS

Μεταφορά του δείγματος σε κωνικό σωληνάριο των (15 ml για τον μυελό ή 50 ml για το περιφερικό αίμα), με βιδωτό πάμα στο οποίο αναγραφόταν ο αύξοντας αριθμός αυτού. Προσθήκη διαλύματος PBS έως τα 7 ml τελικό όγκο, για τον μυελό και έως τα 35 για το περιφερικό .

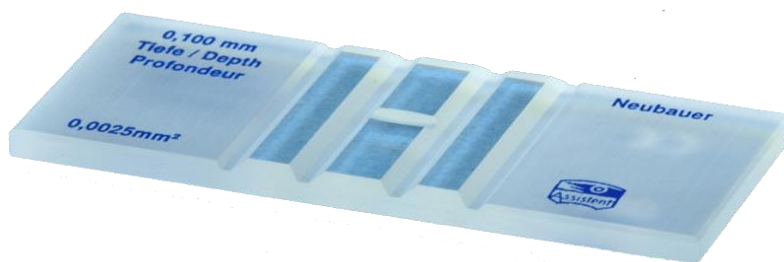
Σε καθαρό κωνικό σωληνάριο των 15 ml αναγράφονταν ξανά ο αύξοντας αριθμός του δείγματος και προσθέταμε 5 ml Ficoll-PaquePLUS. Με προσοχή

γίνονται η επιστίβαση του αραιωμένου δείγματος του μυελού πάνω στο διάλυμα της Ficoll. Η ίδια διαδικασία γίνονται και για τα δείγματα του αραιωμένου περιφερικού αίματος σε 15 ml διαλύματος Ficoll. Φυγοκέντρωση των δειγμάτων στη φυγόκεντρο, Thermo SCIENTIFIC SL16R στα 400xg (1459 rpm) για 20 λεπτά χωρίς φρένο στους 4° C. Μετά τη φυγοκέντρωση, παρατηρήθηκε η παρουσία διαφορετικών στιβάδων. Η κατώτερη στιβάδα περιέχει τα ερυθροκύτταρα και τα κοκκιοκύτταρα, η αμέσως ανώτερη στιβάδα της φικόλης που συγκρατεί τα μονοπύρηνα (λεμφοκύτταρα και μονοκύτταρα) και η ανώτερη στιβάδα περιέχει τα αιμοπετάλια και το πλάσμα.

Με προσοχή γινόταν συλλογή της στιβάδας των μονοκυττάρων και μεταφορά σε καθαρό σωληνάριο που αναγράφονταν ξανά ο αύξοντας αριθμός του δείγματος. Ακολουθούσε πλύσιμο των απομονωμένων κυττάρων με 10 ml διαλύματος PBS. Φυγοκέντρωση των δειγμάτων στη φυγόκεντρο, Thermo SCIENTIFIC SL16R στα 400xg (1459 rpm) για 10 λεπτά στους 4° C. Απόρριψη του υπερκειμένου. Προσθήκη 10 ml διαλύματος PBS στο ίζημα και ξανά φυγοκέντρωση. Απόρριψη του υπερκειμένου και διάλυση του ιζήματος με 2 ml διαλύματος PBS.

4.3.6.3. Μέτρηση συγκέντρωσης κυττάρων

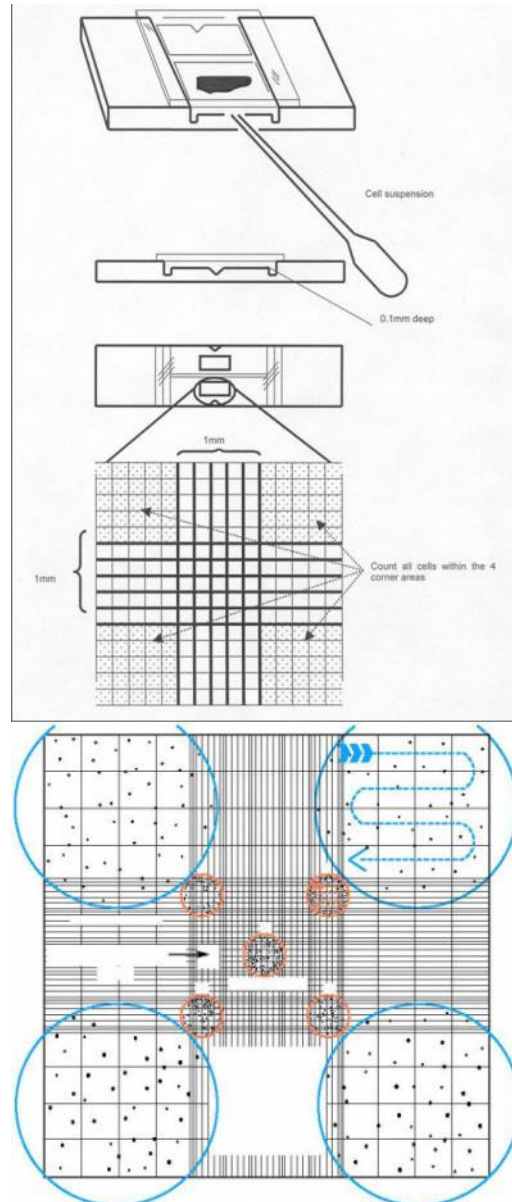
Η συγκέντρωση των απομονωμένων κυττάρων γινόταν με πλάκα Neubauer (βλ. Εικόνα 4.20).

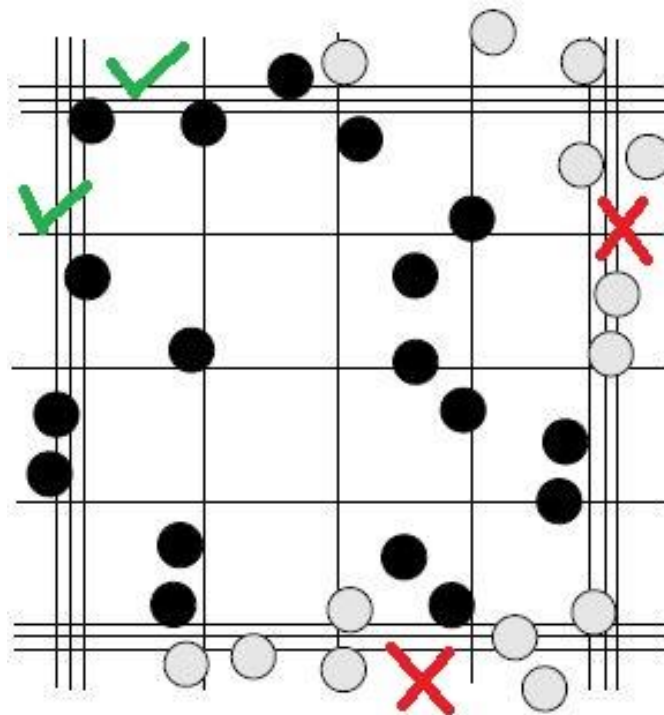
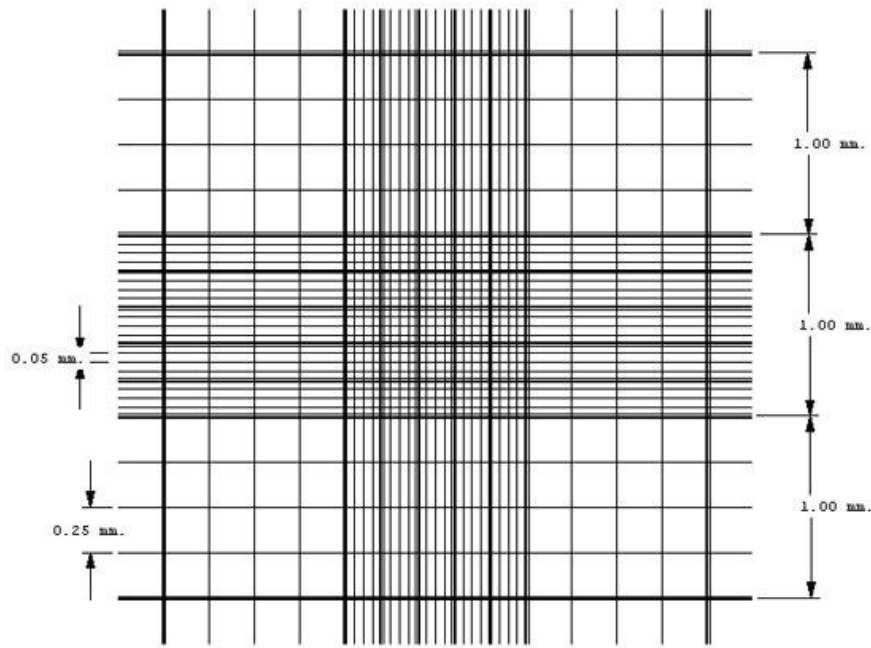


Εικόνα 4.20. Πλάκα Neubauer για τη συγκέντρωση των απομονωμένων κυττάρων

Σε καθαρή πλάκα Neubauer τοποθετούμε καλυπτρίδα, έτσι ώστε να μην υπάρχει κενό μεταξύ πλάκας και καλυπτρίδας. Σε σωληνάριο τύπου erpendorf των 1.5ml βάζουμε 190μl ammonium oxalate 1% και 10μl από τα αραιωμένα κύτταρα με σκοπό τη λύση των ερυθρών που τυχόν έχουν μείνει μετά την απομόνωση των κυττάρων.

Με προσοχή τοποθετούμε με τριχοειδές ποσότητα από το διάλυμα των αραιωμένων κυττάρων με ammonium oxalate στην άκρη της καλυπτρίδας ώστε να καλυφθεί η περιοχή μέτρησης (βλ. Εικόνα 4.21).





Εικόνα 4.21. Περιοχή μέτρησης λευκών αιμοσφαιρίων

Η μέτρηση των κυττάρων γίνεται σε μικροσκόπιο. Μετράμε τα κύτταρα που βρίσκονται στα 4 περιφερικά μεγάλα τετράγωνα (4 x 16 μικρά) (βλ. Εικόνα 4.21).

Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των κυττάρων εφαρμόζουμε τον εξής τύπο:

$$\text{Particles per } \mu\text{l volume} = \frac{\text{Counted particles}}{\text{Counted surface (mm}^2\text{)} \cdot \text{Chamber depth (mm)} \cdot \text{Dilution}}$$

Με βάση την αραιώση, το βάθος της πλάκας και την περιοχή μέτρησης, προκύπτει ένας συντελεστής (50) με τον οποίο πολλαπλασιάζουμε τον αριθμό των κυττάρων που μετρήσαμε για να βρούμε την τελική συγκέντρωση.

Παράδειγμα

Αριθμός κυττάρων που μετρήσαμε: $N = 150$

Area Counted = $1 \text{ mm}^2 \times 4 = 4 \text{ mm}^2$ περιοχή από τα 4 περιφερικά μεγάλα τετράγωνα

Depth = $1/10 \text{ mm}$ Dilution = 1:20

$N \times 50 = 150 \times 50 = 7.500/\mu\text{l}$ ή $\times 1000 = 7.500.000/\text{ml}$

Ανάλογα με τον αρχικό όγκο που ήταν διαλυμένα τα κύτταρα, γινόταν υπολογισμός του ολικού αριθμού των κυττάρων, ώστε να μοιραστούν σε σωληνάκια τύπου erpendorf των 1.5ml που το καθένα θα περιείχε έως 10^7 κύτταρα.

Φυγοκέντρηση των σωληναρίων στις 4500rpm για 5 λεπτά, απόχυση υπερκείμενου, προσθήκη 1 ml TRIzol[®] Reagent, λύση και ομογενοποίηση των κυττάρων με σύριγγα. Φύλαξη των κυττάρων στους -80°C

4.3.6.4. Εκχύλιση RNA με TRIzol[®] Reagent

- Απόψυξη των δειγμάτων σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.
- Προσθήκη 400 μl χλωροφόρμιο. Έντονη ανακίνηση (όχι vortex).
- Επάωση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος σε ηρεμία για 3 min.
- Φυγοκέντρηση για 20 min στους 4°C στις 15000 g ς χωρίς φρένο.
- Κατά τη φυγοκέντρηση, τα δείγματα διαχωρίζονται σε δύο φάσεις. Η επάνω άχρωμη, υδατική φάση, περιέχει το RNA, ενώ η κάτω, οργανική, περιέχει το Trisol και φαινόλη.

- Σε καθαρό eppendorf, στο οποίο αναγράφεται ο αύξοντας αριθμός του δείγματος, με προσοχή μεταφέρουμε την υδατική φάση, ώστε να μην πάρουμε την ενδιάμεση θολή φάση πριν την ροζ οργανική.

[Τα αρχικά σωληνάρια (eppendorf), στα οποία έχει μείνει η κάτω οργανική φάση, φυλάσσονται στους -20°C για να γίνει DNA extraction με το αντίστοιχο πρωτόκολλο]

- Κατακρημνίζουμε το RNA προσθέτοντας 600 μl ισοπροπανόλης, ήπια ανακίνηση.
- Επάωση των δειγμάτων στους -20 ° C τουλάχιστον για 20 min. Σε αυτό το στάδιο τα δείγματα μπορούν να μείνουν για 24 h.
- Φυγοκέντρωση στα 15000 g για 15 min στους 4 ° C χωρίς φρένο.
- Απόχυση του υπερκειμένου, αναστρέφοντας χωρίς να τινάζουμε το σωληνάριο. Στο ίζημα, είναι το RNA στο οποίο προσθέτουμε 950 μl αιθανόλης 75%.
- Φυγοκέντρωση στις 8000 g για 8 min χωρίς φρένο.
- Απόχυση υπερκειμένου και αναστροφή των σωληναρίων σε καθαρό διηθητικό χαρτί ώστε να εξατμισθεί η αιθανόλη. Προσοχή να μην ξεραθούν τα δείγματα.
- Διάλυση του ιζήματος με 20 μl H₂O DEPC .
- Τοποθέτηση των δειγμάτων σε dri block στους 56 ° C για 10 min.
- Φύλαξη των δειγμάτων στους - 80 ° C.

4.3.6.5. Εκχύλιση DNA

Μετά την απομόνωση του RNA και το στάδιο της συλλογής της διάφανης υδατινής φάσης, ακολουθούμε τα εξής :

- Προσθέτουμε στην απομείναντα ενδιάμεση φάση 400 μl ETHANOL 100% για κάθε 1 ml Trizol (βάζουμε περίπου 400 μl) και ομογενοποιούμε με έντονη ανακίνηση.
- Επάωση στους 15-20 °C για 2-3 min.
- Φυγοκέντρωση 3000 g για 5 min στους 2-8 °C.
- Απόχυση με προσοχή της υπερκείμενης στοιβάδας.
- Πλύσιμο του DNA με 0.1 M SODIUM CITRATE σε 10% ETHANOL (washing solution) σε αναλογία 1ml washing solution για 1ml Trizol. (βάζουμε περίπου 1,5 ml).

- Επώαση με το washing solution για 30 min στους 15-20 °C (περιοδική ανακίνηση).
- Φυγοκέντρηση 3000 g για 5 min στους 2-8 °C.
- Απόχυση με προσοχή της υπερκείμενης στοιβάδας.
- Πλύσιμο του DNA washing solution.
- Επώαση με το washing solution για 30 min στους 15-20 °C (περιοδική ανακίνηση).
- Φυγοκέντρηση 3000 g για 5 min στους 2-8 °C.
- Απόχυση με προσοχή της υπερκείμενης στοιβάδας.
- Προσθήκη στο ίζημα 1,5-2 ml 75% ETHANOL για κάθε 1 ml Trizol.
- Επώαση για 10-20 min στους 15-20 °C (περιοδική ανακίνηση).
- Φυγοκέντρηση 3000 g για 5 min στους 2-8 °C.
- Απόχυση με προσοχή της υπερκείμενης στοιβάδας.
- Στέγνωμα του DNA τοποθετώντας το ανάστροφα σε καθαρό διηθητικό χαρτί με ανοιχτό καπάκι για 10-15 min.
- Προσθήκη στο DNA 400 µl H₂O (water for injection).
- Τοποθέτηση των DNA σε dry block στους 65 °C για 10 min.
- Ομογενοποίηση του DNA με την πιπέτα.

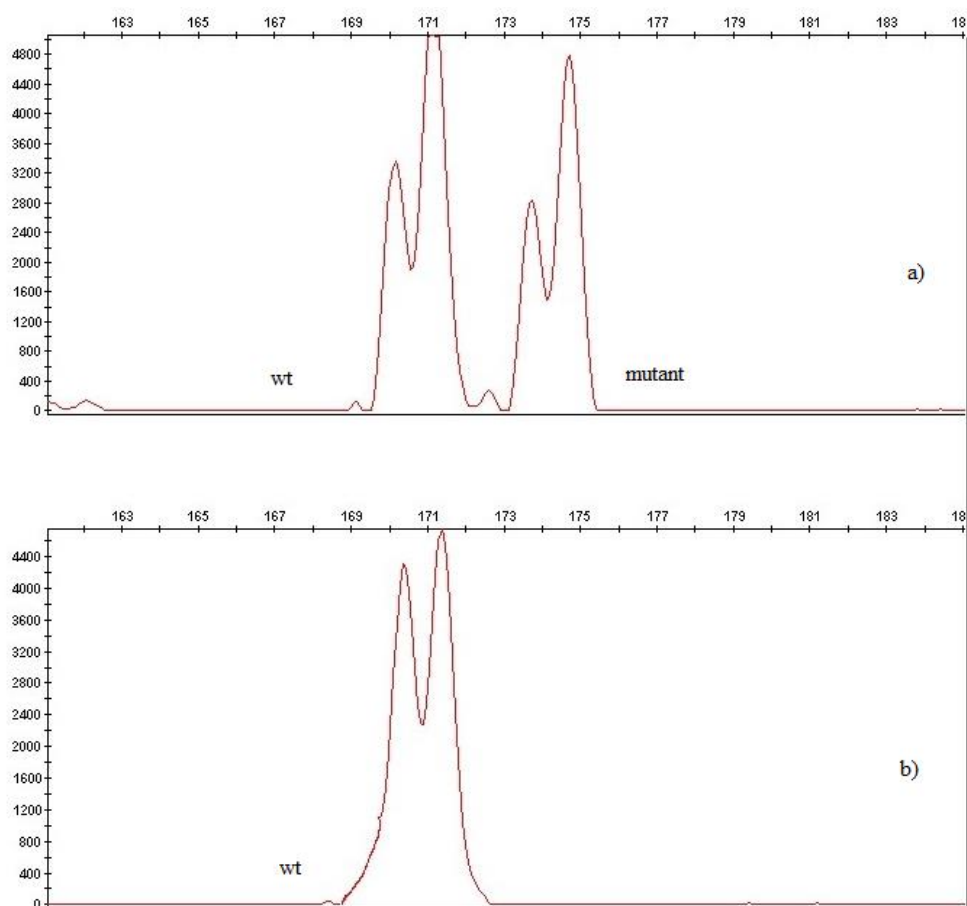
4.3.7. Ποιοτική ανίχνευση της μετάλλαξης του γονιδίου *NPM1*

Η ανίχνευση της μετάλλαξης του γονιδίου *NPM1* έγινε με την μέθοδο της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR) στον θερμικό κυκλοποιητή MJ Research PTC-200.

Σε μια αντίδραση τελικού όγκου 25µl εµπεριέχονταν: 1x reaction buffer, 0.1mM dNTPs, 2.5pmole από κάθε εκκινητή (Forward Primer: 5'-PET-GATGTCTATGAAGTGTTGTGGTTCC-3'), (Reverse Primer: 5'-GGACAGCCAGATATCAACTG-3') (Szankasi, Jama, & Bahler, 2008). 0.5µl Platinum *Taq*DNA Polymerase (Invitrogen), 1.5mM MgCl₂ και 10ng DNA. Η αρχική αποδιάταξη (denaturation) ήταν στους 95°C για 5 λεπτά, ακολουθούσαν 35 κύκλοι με αποδιάταξη στους 95°C για 30 δευτερόλεπτα, πρόσδεση (annealing) στους 60°C για

30 δευτερόλεπτα και επιμήκυνση (extension) στους 72°C για 45 δευτερόλεπτα. Τελική επιμήκυνση (Final extension) στους 60°C για 15 λεπτά.

Τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορούνται με Τριχοειδική Ηλεκτροφόρηση, όπως έχει ήδη περιγραφεί.



Εικόνα 4.22. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR για την μετάλλαξη *NPM1*

a) *Θετικό δείγμα.* Παρουσία μετάλλαξης με την ύπαρξη δεύτερης κορυφής στα 175bp, ενώ το μη μεταλλαγμένο κλάσμα έχει μέγεθος κορυφής στο 171bp

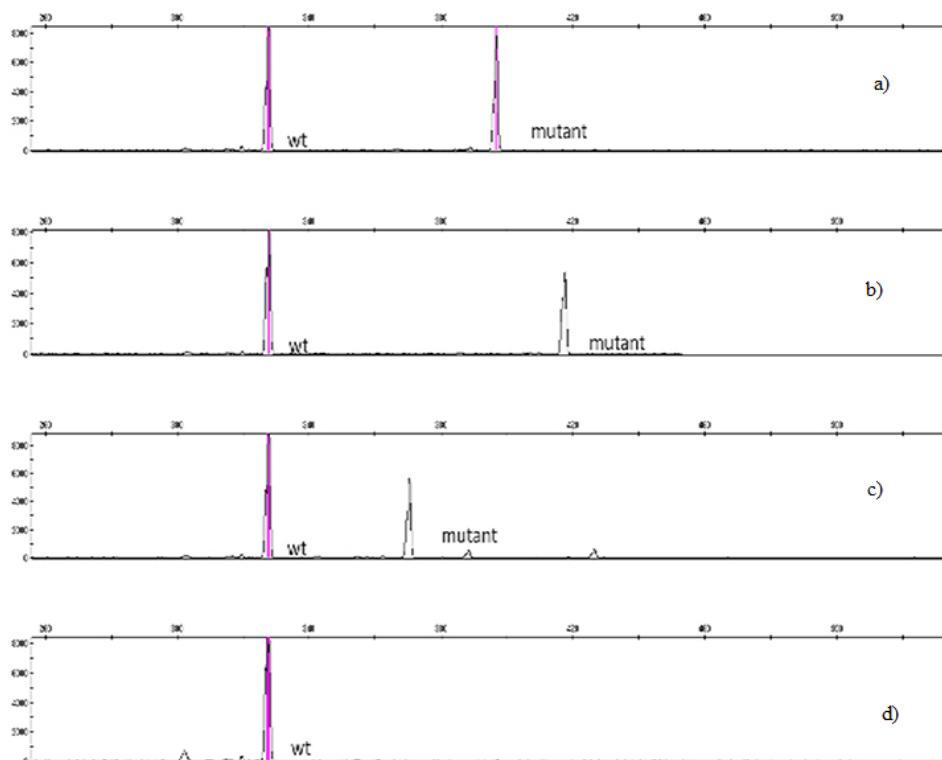
b) *Αρνητικό δείγμα.* Παρουσία μίας μόνο κορυφής στα 171bp του φυσιολογικού κλάσματος.

4.3.8. Ποιοτική ανίχνευση μεταλλάξεων του γονιδίου *FLT3*

4.3.8.1. Ποιοτική ανίχνευση της μετάλλαξης του γονιδίου *FLT3/ITD*

Η ανίχνευση των μεταλλάξεων του γονιδίου *FLT3/ITD* έγινε με την μέθοδο της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR) στον θερμικό κυκλοποιητή MJ Research PTC-200. Σε μια αντίδραση τελικού όγκου 25μl εμπεριέχονταν: 1x reaction buffer, 0.1mM dNTPs, 1.5pmole από κάθε εκκινητή (Forward: 5'-NED-CAATTTAGGTATGAAAGCCAGC-3' and (Reverse 5'-CTTTCAGCATTTTGACGGCAACC-3') (Zulkafli, Zainun, Hassan et al., 2014), 0.5μl Platinum *Taq*DNA Polymerase (Invitrogen), 1.5mM MgCl₂ και 10ng DNA. Η αρχική αποδιάταξη (denaturation) ήταν στους 94°C για 3 λεπτά, ακολουθούσαν 35 κύκλοι με αποδιάταξη στους 94°C για 20 δευτερόλεπτα, πρόσδεση (annealing) στους 60°C για 20 δευτερόλεπτα και επιμήκυνση (extension) στους 72°C για 20 δευτερόλεπτα. Τελική επιμήκυνση (Final extension) στους 72°C για 10 λεπτά.

4.3.8.2. Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της PCR για τη μετάλλαξη *FLT3/ITD*



Εικόνα 4.23. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR για την μετάλλαξη *FLT3/ITD*

a) *Θετικό δείγμα*. Παρουσία κορυφής στα 328bp που αντιστοιχεί στο φυσιολογικό κλάσμα, ενώ η δεύτερη κορυφή στα 388bp υποδηλώνει τη μετάλλαξη.

b) *Θετικό δείγμα*. Το μεταλλαγμένο κλάσμα εμφανίζει κορυφή στα 419bp.

c) *Θετικό δείγμα*. Το μεταλλαγμένο κλάσμα εμφανίζει κορυφή στα 367bp.

d) *Αρνητικό δείγμα*. Εμφανίζεται μόνο μια κορυφή στα 328bp.

Στις εικόνες a), b) και c) βλέπουμε την ποικιλομορφία της μετάλλαξης.

Το ποσοστό του μεταλλαγμένου αλληλίου υπολογίζεται διαιρώντας το εμβαδόν της καμπύλης της κορυφής του μεταλλαγμένου αλληλίου προς το εμβαδόν της καμπύλης της κορυφής του φυσιολογικού. Σύμφωνα με τις συστάσεις του European Leukemia Net (ELN), ορίζεται ως cut-off του αλληλικού λόγου (allelic ratio) στα 0,5. Allelic ratio >0.5 σχετίζεται με κακή πρόγνωση.

4.3.8.3. Ποιοτική ανίχνευση της μετάλλαξης του γονιδίου *FLT3/TKD*

Η ανίχνευση των μεταλλάξεων του γονιδίου *FLT3/TKD* έγινε με την μέθοδο της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR) στον θερμικό κυκλοποιητή MJ Research PTC-200.

Σε μια αντίδραση τελικού όγκου 25μl εμπεριέχονταν: 1x reaction buffer, 0.1mM dNTPs, 2.5pmole από κάθε εκκινητή (Forward Primer: 5'-6-FAM-CCGCCAGGAACGTGCTTG-3') και (Reverse Primer: 5'-GCAGCCTCACATTGCCCC-3') (Liang, Shih, Hung et al., 2003) 0.5μl Platinum *Taq*DNA Polymerase (Invitrogen), 1.5mM MgCl₂ και 10ng DNA. Η αρχική αποδιάταξη (denaturation) ήταν στους 94°C για 3 λεπτά, ακολουθούσαν 35 κύκλοι με αποδιάταξη στους 94°C για 20 δευτερόλεπτα, πρόσδεση (annealing) στους 60°C για 20 δευτερόλεπτα και επιμήκυνση (extension) στους 72°C για 20 δευτερόλεπτα. Τελική επιμήκυνση (Final extension) στους 72°C για 10 λεπτά.

Μετά το τέλος της PCR, τα προϊόντα της αντίδρασης υπόκεινται σε πέψη με περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRV η οποία κόβει την φυσιολογική αλληλουχία του γονιδίου:

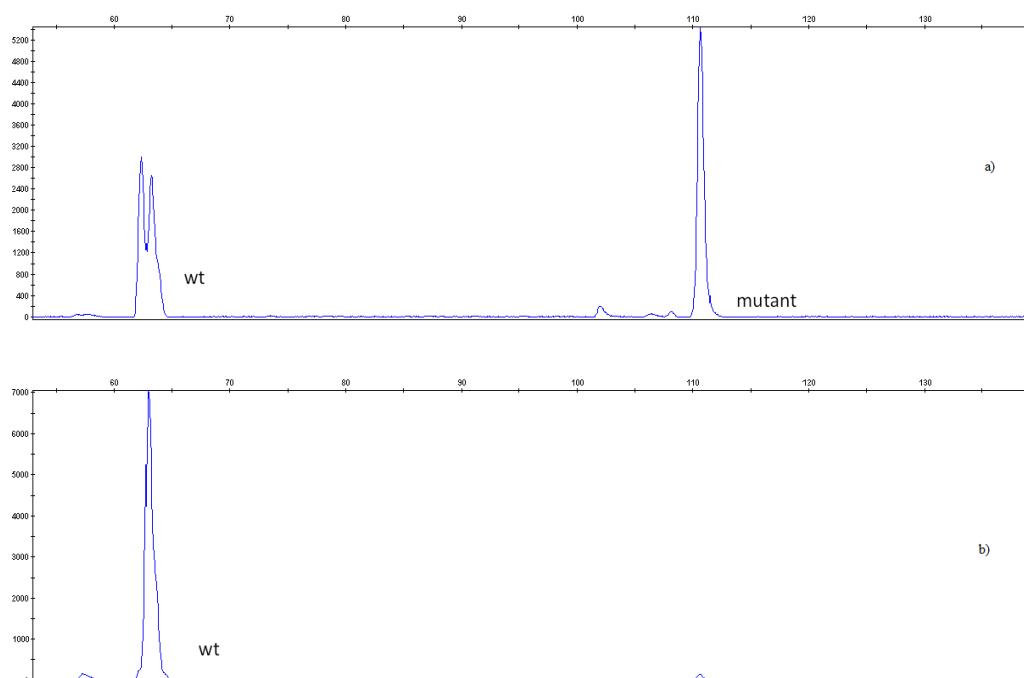
5'...G A T↓A T C...3'

3'...C T A↑T A G...5'

6μl από το προϊόν της PCR αναμιγνύονται με 1x Reaction Buffer και 10u ενζύμου EcoRV σε τελικό όγκο 10 μl. Τα δείγματα επωάζονται στους 38°C όλο το βράδυ.

Τα προϊόντα μετά την επώαση με την ενδονουκλεάση αναλύονται με Τριχοειδική Ηλεκτροφόρηση.

4.3.8.4. Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της PCR για τη μετάλλαξη *FLT3/TKD*



Εικόνα 4.24. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR για την μετάλλαξη *FLT3/TKD* μετά από επώαση με την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRV

a) *Θετικό δείγμα.* Παρουσία κορυφής στα 68bp που αντιστοιχεί στο φυσιολογικό κομμένο κλάσμα, ενώ η δεύτερη κορυφή στα 114bp υποδηλώνει τη μετάλλαξη, αφού παραμένει άκοπη η αλληλουχία του γονιδίου που δεν αναγνωρίζεται από την ενδονουκλεάση EcoRV.

b) *Αρνητικό δείγμα.* Παρουσία μίας μόνο κορυφής στα 68bp. Η περιοριστική ενδονουκλεάση αναγνώρισε και έκοψε πλήρως τη φυσιολογική αλληλουχία του γονιδίου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5ο

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

5.1. Στατιστική ανάλυση

Οι μέσες τιμές (mean), οι τυπικές αποκλίσεις (Standard Deviation=SD), οι διάμεσες τιμές (median) και τα ενδοτεταρτημοριακά εύρη (interquartile range) χρησιμοποιήθηκαν για την περιγραφή των ποσοτικών μεταβλητών. Οι απόλυτες (N) και οι σχετικές (%) συχνότητες χρησιμοποιήθηκαν για την περιγραφή των ποιοτικών μεταβλητών. Για τη σύγκριση αναλογιών χρησιμοποιήθηκε το Pearson's χ^2 test ή το Fisher's exact test, όπου ήταν απαραίτητο. Για τη σύγκριση ποσοτικών μεταβλητών μεταξύ δυο ομάδων, χρησιμοποιήθηκε το Student's t-test ή το μη παραμετρικό κριτήριο Mann-Whitney. Τα επίπεδα σημαντικότητας είναι αμφίπλευρα και η στατιστική σημαντικότητα τέθηκε στο 0,05. Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα SPSS 22.0.

5.2. Στατιστικά αποτελέσματα ανοσοφαινοτύπου

Με βάση τα αποτελέσματα του ανοσοφαινοτύπου των βλαστών με κυτταρομετρία ροής, οι ασθενείς κατατάσσονται ως εξής:

Πίνακας 5.1.

Σύγκριση του αριθμού και ποσοστού των ασθενών με θετική ή αρνητική έκφραση αντιγόνων με κυτταρομετρία ροής

		N	%
Κλασσική κυτταρομετρία (N=94)			
CD34	Θετικό	40	42,6
	Αρνητικό	54	57,4
CD117	Θετικό	74	79,6
	Αρνητικό	19	20,4
HLADR	Θετικό	84	89,4
	Αρνητικό	10	10,6
CD33	Θετικό	75	79,8
	Αρνητικό	19	20,2
CD38	Θετικό	86	91,5
	Αρνητικό	8	8,5
CD13	Θετικό	67	71,3
	Αρνητικό	27	28,7
CD11b	Θετικό	39	41,5
	Αρνητικό	55	58,5
CD64	Θετικό	27	28,7
	Αρνητικό	67	71,3
CD14	Θετικό	19	20,2
	Αρνητικό	75	79,8
MPO	Θετικό	60	68,2
	Αρνητικό	28	31,8
CD7	Θετικό	17	18,9
	Αρνητικό	73	81,1
CD19	Θετικό	5	5,3
	Αρνητικό	89	94,7

Πίνακας 5.2.

Ποσοστά και ένταση έκφρασης των αντιγόνων στο σύνολο των ασθενών

Κλασική κυτταρομετρία (N=94)			
	MFI μέση τιμή	(SD)	διάμεσος (ενδ. εύρος)
Βλαστικά κύτταρα	43,65	29,28	40(16,22 - 72,04)
CD34,	1,34	1,5	0,73 (0,38 - 1,63)
CD117	2,21	2,21 (1,633)	1,89 (1,08 - 2,81)
HLADR		7,63 (11,04)	5,14 (2,58 - 8,4)
CD33		3,49 (2,91)	2,95 (1,37 - 4,78)
CD34/117		31,13 (38,95)	0,93 (0,12 - 75,31)
CD38		3,7 (3,49)	2,9 (1,62 - 4,78)
CD13		4,27 (6,01)	2,23 (0,98 - 5,93)
CD11b		2,97 (4,35)	0,44 (0,27 - 4,1)
MPO		3,42 (4,43)	2,24 (0,4 - 4,66)
CD7 (%),		60,22 (25,97)	64,23 (35,99 - 78,51)
CD19 (%),		33,06 (16,87)	30,64 (18,18 - 47,84)

Πίνακας 5.3.

Ένταση έκφρασης των αντιγόνων NPM1 και CD135 στους διαφορετικούς πληθυσμούς κυττάρων

Κυτταρομετρία με ειδικά μονοκλωνικά (N=56)			
	MFI μέση τιμή	(SD)	διάμεσος (ενδ. εύρος)
NPM1 BLASTS,	0,83	0,41	0,72 (0,53 - 1,11)
NPM1 POLY,	1,62	1,05	1,28 (0,86 - 2,17)
NPM1 LYMPH,	0,49	0,28	0,45 (0,29 - 0,61)
CD135 BLASTS,	0,77 (1	1,88	0,4 (0,28 - 0,61)
CD135 POLY,	1,15	3,20	0,41 (0,25 - 1,04)
CD135 LYMPH,	0,32	0,53	0,15 (0,1 - 0,29)

Ο μέσος αριθμός των βλαστικών κυττάρων ήταν 43,65 (SD=29,28). Το 42,6% των ασθενών ήταν θετικοί σε CD34 κύτταρα, το 79,6% σε CD117 κύτταρα, το 89,4% σε HLADR και το 79,8% σε CD33 κύτταρα. Επίσης, το 91,5% των ασθενών ήταν θετικοί σε CD38 κύτταρα, το 71,3% σε CD13 κύτταρα, το 41,5% σε CD11b κύτταρα, το 28,7% σε CD64 κύτταρα, το 20,2% σε CD14 κύτταρα, το 68,2% σε MPO κύτταρα, το 18,9% σε CD7 κύτταρα και μόνο το 5,3% σε CD19 κύτταρα.

5.3. Στατιστικά στοιχεία της μοριακής μελέτης των δειγμάτων

Στοιχεία που αφορούν την μοριακή μελέτη των ασθενών δίνονται στον πίνακα που ακολουθεί.

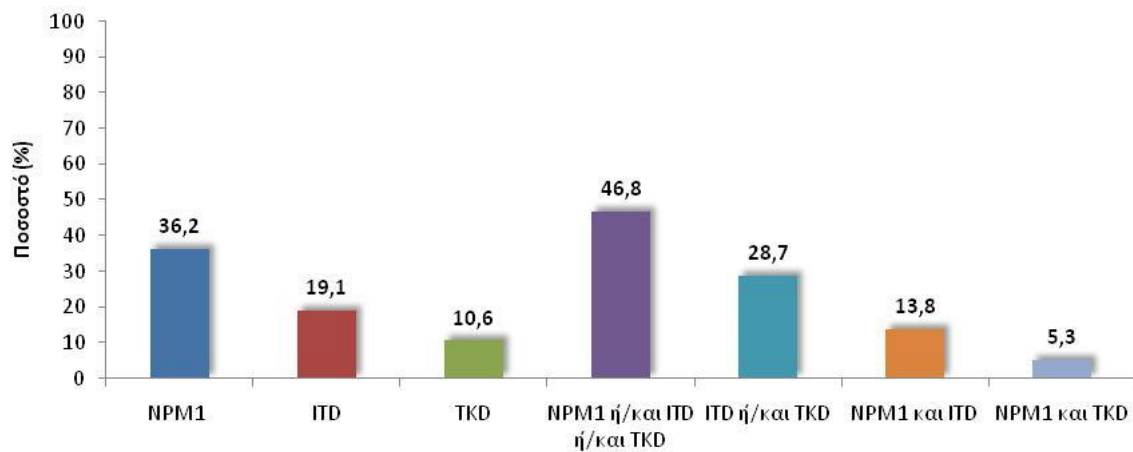
Πίνακας 5.4.

Στοιχεία που αφορούν την μοριακή μελέτη των ασθενών

		N	%
<i>NPM1</i> PCR	Θετικό	34	36,2
	Αρνητικό	60	63,8
<i>NPM1</i> subtype	A	27	28,7
	B	2	2,1
	D	4	4,3
	Not genotyped	1	1,1
ITD	Θετικό	18	19,1
	Αρνητικό	76	80,9
MUT/WT%, μέση τιμή (SD) διάμεσος (ενδ. εύρος)		64,3 (30,2)	65,3 (45,4 - 84,9)
TKD	Θετικό	10	10,6
	Αρνητικό	84	89,4
MUT/WT%, μέση τιμή (SD) διάμεσος (ενδ. εύρος)		231,9 (435,4)	16,4 (12,8 - 451)
<i>NPM1</i> ή/και ITD ή/και TKD	Αρνητικό	50	53,2
	Θετικό	44	46,8
ITD ή/και TKD	Αρνητικό	67	71,3
	Θετικό	27	28,7
<i>NPM1</i> και ITD	Αρνητικό	81	86,2
	Θετικό	13	13,8
<i>NPM1</i> και TKD	Αρνητικό	89	94,7
	Θετικό	5	5,3

NPM1 μετάλλαξη υπήρξε στο 36,2% των ασθενών. ITD μετάλλαξη υπήρξε στο 19,1% των ασθενών και TKD στο 10,6%. Το 46,8% των ασθενών είχε κάποιου είδους μετάλλαξη, ενώ το 28,7% είτε ITD είτε TKD. Το 13,8% των ασθενών είχε και *NPM1* και ITD μετάλλαξη ενώ το 5,3% είχε και *NPM1* και TKD μετάλλαξη.

Στο Γράφημα 5.1 που ακολουθεί, δίνονται τα ποσοστά ύπαρξης των διαφόρων μεταλλάξεων των ασθενών



Γράφημα 5.1

Ποσοστά ύπαρξης των διαφόρων μεταλλάξεων των ασθενών

5.4. Συσχέτιση της μοριακής μελέτης και του ανοσοφαινότυπο των ασθενών

5.4.1. Συσχέτιση της ανίχνευσης της μετάλλαξης *NPM1* με στοιχεία από την κυτταρομετρία, με δημογραφικά στοιχεία και με στοιχεία που αφορούν στην κατάσταση των ασθενών

Στον Πίνακα 5.5 που ακολουθεί, δίνονται τα δημογραφικά στοιχεία, η αιμοσφαιρίνη, τα λευκά αιμοσφαίρια, τα αιμοπετάλια, η κατάταξη και ο καρυότυπος των ασθενών ανάλογα με την ύπαρξη ή μη της μετάλλαξης *NPM1*.

Πίνακας 5.5.

*Δημογραφικά στοιχεία, αιμοσφαιρίνη, λευκά αιμοσφαίρια, αιμοπετάλια, κατάταξη και ο καρυότυπος των ασθενών, ανάλογα με την ύπαρξη ή μη της μετάλλαξης *NPM1**

		<i>NPM1</i> PCR				P
		Θετικό		Αρνητικό		
		N	%	N	%	
FAB classification	OMΛ	33	40,2	49	59,8	0,050**
	ΜΔΣ	1	8,3	11	91,7	
Καρυότυπος	Φυσιολογικός	34	46,6	39	53,4	<0,001*
	Παθολογικός	0	0,0	21	100,0	
Φύλο	Γυναίκες	14	37,8	23	62,2	0,786*
	Άντρες	20	35,1	37	64,9	
Δημογραφικά στοιχεία						
Ηλικία, μέση τιμή (SD)		57,2 (11,6)		57,9 (16,8)		0,848 ⁺
Ht%, μέση τιμή (SD)		28,9 (6,9)		29,3 (7,4)		0,824 ⁺
WBC, μέση τιμή (SD) διάμεσος (ενδ. εύρος)		51390,6 (58699,4)	32445 (12540 - 70750)	38980,3 (78953,5)	8420 (3260 - 26830)	0,003⁺⁺
PLT, μέση τιμή (SD) διάμεσος (ενδ. εύρος)		109976,4 (76649,4)	101000 (50000 - 157000)	79465,6 (68718,9)	62000 (20500 - 123500)	0,037⁺⁺

*Pearson's χ^2 test **Fisher's exact test ⁺Student's t-test ⁺⁺Mann-Whitney test

Οι ασθενείς με οξεία μυελογενή λευχαιμία ήταν σε σημαντικά υψηλότερο ποσοστό θετικοί στην μετάλλαξη *NPM1* σε σύγκριση με τους ασθενείς με μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο. Επίσης, οι ασθενείς με φυσιολογικό καρυότυπο ήταν σε σημαντικά υψηλότερο ποσοστό θετικοί στην μετάλλαξη *NPM1* σε σύγκριση με τους ασθενείς με παθολογικό καρυότυπο. Ακόμα, οι ασθενείς που είχαν την μετάλλαξη *NPM1* είχαν σημαντικά υψηλότερες τιμές λευκών αιμοσφαιρίων και αιμοπεταλίων σε σύγκριση με εκείνους που δεν είχαν την μετάλλαξη αυτή.

Στον Πίνακα 5.6 που ακολουθεί, συγκρίνεται η έκφραση των αντιγόνων σε σχέση με την ανίχνευση ή όχι της μετάλλαξης *NPM1*

Πίνακας 5.6.

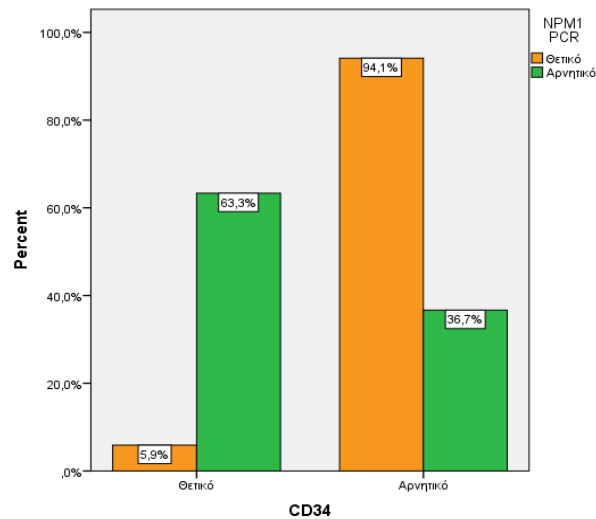
*Σύγκριση της έκφρασης των αντιγόνων, σε σχέση με την ανίχνευση ή όχι της μετάλλαξης *NPM1**

		<i>NPM1</i>		P Pearson's χ^2 test
		Θετικό N (%)	Αρνητικό N (%)	
CD34	Θετικό	2 (5,9)	38 (63,3)	<0,001
	Αρνητικό	32 (94,1)	22 (36,7)	
CD117	Θετικό	24 (70,6)	50 (84,7)	0,103
	Αρνητικό	10 (29,4)	9 (15,3)	
HLADR	Θετικό	26 (76,5)	58 (96,7)	0,004*
	Αρνητικό	8 (23,5)	2 (3,3)	
CD33	Θετικό	33 (97,1)	42 (70)	0,002
	Αρνητικό	1 (2,9)	18 (30)	
CD38	Θετικό	33 (97,1)	53 (88,3)	0,251
	Αρνητικό	1 (2,9)	7 (11,7)	
CD13	Θετικό	23 (67,6)	44 (73,3)	0,637*
	Αρνητικό	11 (32,4)	16 (26,7)	
CD11b	Θετικό	20 (58,8)	19 (31,7)	0,010
	Αρνητικό	14 (41,2)	41 (68,3)	
CD64	Θετικό	15 (44,1)	12 (20)	0,013
	Αρνητικό	19 (55,9)	48 (80)	
CD14	Θετικό	8 (23,5)	11 (18,3)	0,547
	Αρνητικό	26 (76,5)	49 (81,7)	
MPO	Θετικό	20 (62,5)	40 (71,4)	0,387
	Αρνητικό	12 (37,5)	16 (28,6)	
CD7	Θετικό	7 (21,2)	10 (17,5)	0,668
	Αρνητικό	26 (78,8)	47 (82,5)	
CD19	Θετικό	4 (11,8)	1 (1,7)	0,056*
	Αρνητικό	30 (88,2)	59 (98,3)	

*Fisher's exact test

Οι ασθενείς που ήταν θετικοί στην μετάλλαξη *NPM1* είχαν σημαντικά χαμηλότερα ποσοστά CD34 και HLADR MFI, σε σύγκριση με εκείνους που δεν είχαν την μετάλλαξη αυτή. Αντίθετα, οι ασθενείς που ήταν θετικοί στην μετάλλαξη *NPM1* είχαν σημαντικά υψηλότερο ποσοστό CD33, CD11b και CD64 MFI, σε σύγκριση με εκείνους που δεν είχαν την μετάλλαξη αυτή.

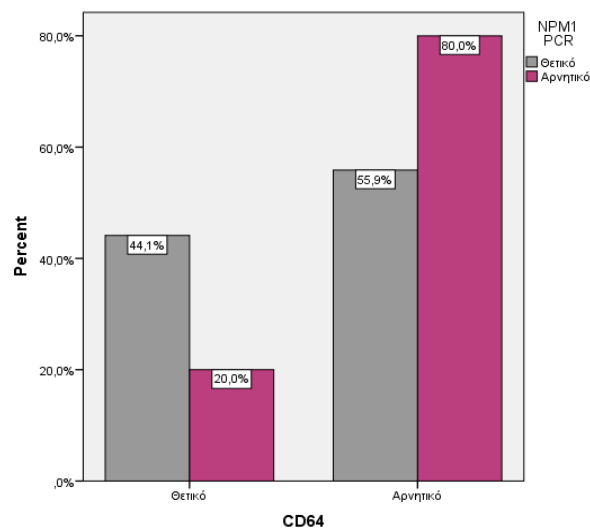
Στο Γράφημα 5.2 που ακολουθεί, δίνονται τα ποσοστά των ασθενών που ήταν θετικοί ή αρνητικοί στα CD34, ανάλογα με το αν είχαν ή όχι την μετάλλαξη *NPM1*.



Γράφημα 5.2

Ποσοστά των ασθενών που ήταν θετικοί ή αρνητικοί στα CD34, ανάλογα με το αν είχαν ή όχι την μετάλλαξη NPM1

Στο Γράφημα 5.3 που ακολουθεί, δίνονται τα ποσοστά των ασθενών που ήταν θετικοί ή αρνητικοί στα CD64 ανάλογα με το αν είχαν ή όχι την μετάλλαξη NPM1.



Γράφημα 5.3

Ποσοστά των ασθενών που ήταν θετικοί ή αρνητικοί στα CD64, ανάλογα με το αν είχαν ή όχι την μετάλλαξη NPM1

Στον Πίνακα 5.7 που ακολουθεί, δίνονται τα ποσοτικά στοιχεία έκφρασης των αντιγόνων με κυτταρομετρία ροής, ανάλογα με την ύπαρξη ή μη της μετάλλαξης NPM1.

Πίνακας 5.7.

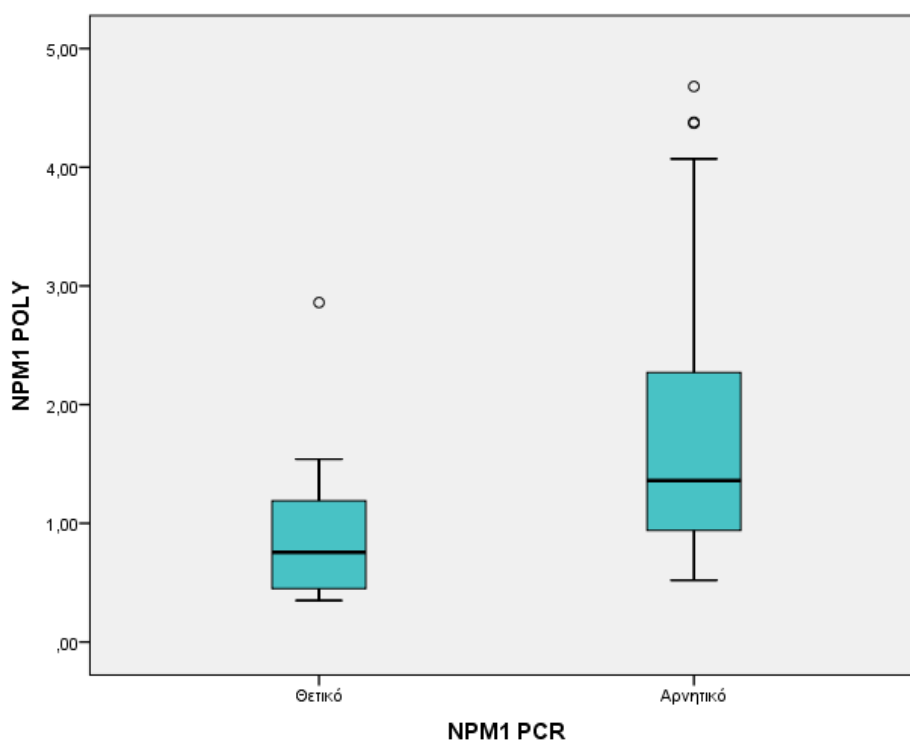
Ποσοτικά στοιχεία έκφρασης των αντιγόνων με κυτταρομετρία ροής, ανάλογα με την ύπαρξη ή μη της μετάλλαξης NPM1

	NPM1						P Mann- Whitney test
	Θετικό			Αρνητικό			
	N	Μέση τιμή (SD)	Διάμεσος (Ενδ. εύρος)	N	Μέση τιμή (SD)	Διάμεσος (Ενδ. εύρος)	
Κλασσική κυτταρομετρία							
Αριθμός βλαστικών κυττάρων	34	49,54 (27,09)	49,58 (24,01 - 74,1)	60	40,31 (30,16)	30,07 (13,25 - 62,35)	0,114
CD34+% BLASTS	2	14,4 (10,51)	14,4 (6,96 - 21,83)	38	81,22 (21,88)	90,99 (72,4 - 96,72)	0,022
CD34MFI	34	0,45 (0,36)	0,38 (0,3 - 0,46)	59	1,85 (1,71)	1,43 (0,72 - 1,97)	<0,001
CD117 MFI	34	1,5 (0,89)	1,37 (0,83 - 2,3)	60	2,61 (1,82)	2,52 (1,39 - 3,31)	0,002
HLADR MFI	34	4,69 (5,1)	3,7 (1,5 - 5,51)	60	9,3 (13,03)	5,84 (3,03 - 10,07)	0,006
CD33 MFI	34	4,74 (2,87)	4 (2,9 - 5,42)	60	2,78 (2,71)	2,13 (0,72 - 3,72)	<0,001
CD34/117 %	34	1,04 (2,12)	0,15 (0,06 - 0,74)	60	48,18 (39,64)	65,83 (0,57 - 87,31)	<0,001
CD38 MFI	34	2,99 (1,86)	2,5 (1,62 - 3,69)	60	4,11 (4,1)	3,12 (1,58 - 5,27)	0,353
CD13 MFI	34	3,8 (3,53)	2,59 (0,83 - 4,96)	60	4,54 (7,06)	2,16 (1,09 - 5,94)	0,950
CD11b MFI	34	4,57 (4,93)	2,16 (0,33 - 8,96)	60	2,06 (3,73)	0,41 (0,27 - 2,39)	0,007
MPO MFI	32	3 (5,09)	1,41 (0,38 - 2,99)	56	3,66 (4,04)	2,49 (0,43 - 4,99)	0,213
CD7 %	7	40,15 (20,2)	28,82 (24,11 - 66,33)	10	74,26 (19,86)	75,41 (63,67 - 90,28)	0,011
CD19 %	4	28,1 (14,69)	24,41 (16,96 - 39,24)	1	52,88 (-)	52,88 (52,88 - 52,88)	-*
Κυτταρομετρία με ειδικά μονοκλωνικά							
NPM1 BLASTS	10	0,66 (0,34)	0,58 (0,51 - 0,66)	46	0,87 (0,42)	0,77 (0,54 - 1,18)	0,137
NPM1 POLY	10	1 (0,75)	0,76 (0,45 - 1,19)	46	1,76 (1,06)	1,36 (0,94 - 2,27)	0,009
NPM1 LYMPH	10	0,26 (0,16)	0,24 (0,1 - 0,36)	46	0,54 (0,28)	0,49 (0,34 - 0,67)	0,002
CD135 BLASTS	7	0,82 (0,77)	0,66 (0,45 - 0,84)	43	0,76 (2,01)	0,39 (0,27 - 0,56)	0,102
CD135 POLY	7	0,71 (0,55)	0,7 (0,26 - 0,87)	43	1,22 (3,45)	0,38 (0,25 - 1,19)	0,706
CD135 LYMPH	7	0,23 (0,16)	0,19 (0,11 - 0,31)	43	0,33 (0,57)	0,15 (0,1 - 0,29)	0,406

*δεν υπολογίστηκε λόγω μη ύπαρξης κατανομής

Οι ασθενείς με την μετάλλαξη *NPM1* είχαν σημαντικά χαμηλότερες τιμές στα CD34+% , CD34, CD117, HLADR MFI , στο ποσοστό των διπλά θετικών CD34/117 καθώς και στα CD7% κύτταρα, τα *NPM1* POLY και τα *NPM1* LYMPH σε σύγκριση με τους ασθενείς που δεν είχαν την μετάλλαξη αυτή. Αντίθετα, οι ασθενείς με την μετάλλαξη *NPM1* είχαν σημαντικά υψηλότερες τιμές στα CD33, CD11b MFI καθώς και στους λόγους *NPM1* BLAST/POLY και *NPM1* BLAST/LYMP σε σύγκριση με τους ασθενείς που δεν είχαν την μετάλλαξη αυτή.

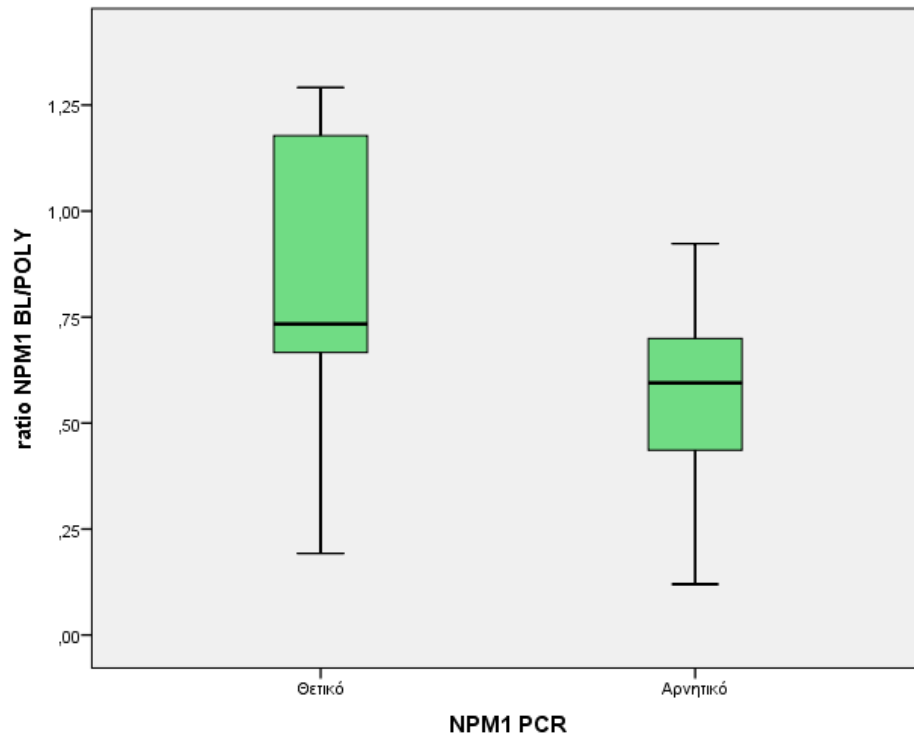
Στο Γράφημα 5.4 που ακολουθεί, δίνονται οι τιμές των *NPM1* POLY των ασθενών, ανάλογα με την ύπαρξη ή μη της μετάλλαξης *NPM1*.



Γράφημα 5.4

Τιμές NPM1 POLY των ασθενών, ανάλογα με την ύπαρξη ή μη μετάλλαξης NPM1

Στο Γράφημα 5.5 που ακολουθεί, δίνονται οι τιμές του λόγου NPM1 BLAST/POLY των ασθενών, ανάλογα με την ύπαρξη ή μη της μετάλλαξης NPM1.



Γράφημα 5.5

Τιμές του λόγου NPM1 BLAST/POLY των ασθενών, ανάλογα με την ύπαρξη ή μη της μετάλλαξης NPM1

5.4.2. Συσχέτιση της ανίχνευσης της μετάλλαξης ITD με στοιχεία από την κυτταρομετρία, με δημογραφικά στοιχεία και με στοιχεία που αφορούν στην κατάσταση των ασθενών

Στον Πίνακα 5.8 που ακολουθεί, δίνονται τα δημογραφικά στοιχεία, η αιμοσφαιρίνη, τα λευκά αιμοσφαίρια, τα αιμοπετάλια, η κατάταξη και ο καρυότυπος των ασθενών, ανάλογα με την ύπαρξη ή μη της μετάλλαξης ITD.

Πίνακας 5.8.

Δημογραφικά στοιχεία, αιμοσφαιρίνη, λευκά αιμοσφαίρια, αιμοπετάλια, κατάταξη και καρυότυπος των ασθενών, ανάλογα με την ύπαρξη ή μη της μετάλλαξης ITD

		ITD				P
		Θετικό		Αρνητικό		
		N	%	N	%	
FAB classification	OMΛ	17	20,7	65	79,3	0,451**
	ΜΔΣ	1	8,3	11	91,7	
Καρυότυπος	Φυσιολογικός	16	21,9	57	78,1	0,345**
	Παθολογικός	2	9,5	19	90,5	
Φύλο	Γυναίκες	6	16,2	31	83,8	0,560*
	Άντρες	12	21,1	45	78,9	
Δημογραφικά στοιχεία						
Ηλικία, μέση τιμή (SD)		58,4 (13,1)		57,4 (15,5)		0,813 ⁺
Ht%, μέση τιμή (SD)		28,5 (7,3)		29,3 (7,2)		0,680 ⁺
WBC, μέση τιμή (SD) διάμεσος (ενδ. εύρος)		72442,8 (100040)	32750 (12610 - 90480)	36607 (62823,4)	10955 (3540 - 32570)	0,012⁺⁺
PLT, μέση τιμή (SD) διάμεσος (ενδ. εύρος)		97555,6 (66226,2)	78000 (50000 - 127000)	88830,7 (74568)	77000 (23000 - 133500)	0,392 ⁺⁺

*Pearson's χ^2 test **Fisher's exact test ⁺Student's t-test ⁺⁺Mann-Whitney test

Οι ασθενείς που είχαν την μετάλλαξη ITD είχαν σημαντικά υψηλότερες τιμές λευκών αιμοσφαιρίων σε σύγκριση με εκείνους που δεν είχαν την μετάλλαξη αυτή.

Στον Πίνακα 5.9 που ακολουθεί, συγκρίνεται η έκφραση των αντιγόνων, σε σχέση με την ανίχνευση ή όχι της μετάλλαξης ITD.

Πίνακας 5.8.

Σύγκριση της έκφρασης των αντιγόνων, σε σχέση με την ανίχνευση ή όχι της μετάλλαξης ITD

		ITD		P Pearson's x ² test
		Θετικό N (%)	Αρνητικό N (%)	
CD34	Θετικό	2 (11,1)	38 (50)	0,003
	Αρνητικό	16 (88,9)	38 (50)	
CD117	Θετικό	14 (77,8)	60 (80)	1,000*
	Αρνητικό	4 (22,2)	15 (20)	
HLADR	Θετικό	14 (77,8)	70 (92,1)	0,094*
	Αρνητικό	4 (22,2)	6 (7,9)	
CD33	Θετικό	17 (94,4)	58 (76,3)	0,109*
	Αρνητικό	1 (5,6)	18 (23,7)	
CD38	Θετικό	17 (94,4)	69 (90,8)	1,000*
	Αρνητικό	1 (5,6)	7 (9,2)	
CD13	Θετικό	12 (66,7)	55 (72,4)	0,773
	Αρνητικό	6 (33,3)	21 (27,6)	
CD11b	Θετικό	9 (50)	30 (39,5)	0,437
	Αρνητικό	9 (50)	46 (60,5)	
CD64	Θετικό	6 (33,3)	21 (27,6)	0,773
	Αρνητικό	12 (66,7)	55 (72,4)	
CD14	Θετικό	3 (16,7)	16 (21,1)	1,000*
	Αρνητικό	15 (83,3)	60 (78,9)	
MPO	Θετικό	12 (70,6)	48 (67,6)	0,813
	Αρνητικό	5 (29,4)	23 (32,4)	
CD7	Θετικό	5 (27,8)	12 (16,7)	0,318*
	Αρνητικό	13 (72,2)	60 (83,3)	
CD19	Θετικό	2 (11,1)	3 (3,9)	0,243*
	Αρνητικό	16 (88,9)	73 (96,1)	

*Fisher's exact test

Οι ασθενείς που ήταν θετικοί στην μετάλλαξη ITD ήταν σε σημαντικά χαμηλότερο ποσοστό θετικοί στα CD34, σε σύγκριση με εκείνους που δεν είχαν την μετάλλαξη αυτή.

Στον Πίνακα 5.10 που ακολουθεί, δίνονται τα ποσοτικά στοιχεία της έκφρασης των αντιγόνων με κυτταρομετρία ροής, ανάλογα με την ανίχνευση ή όχι της μετάλλαξης ITD.

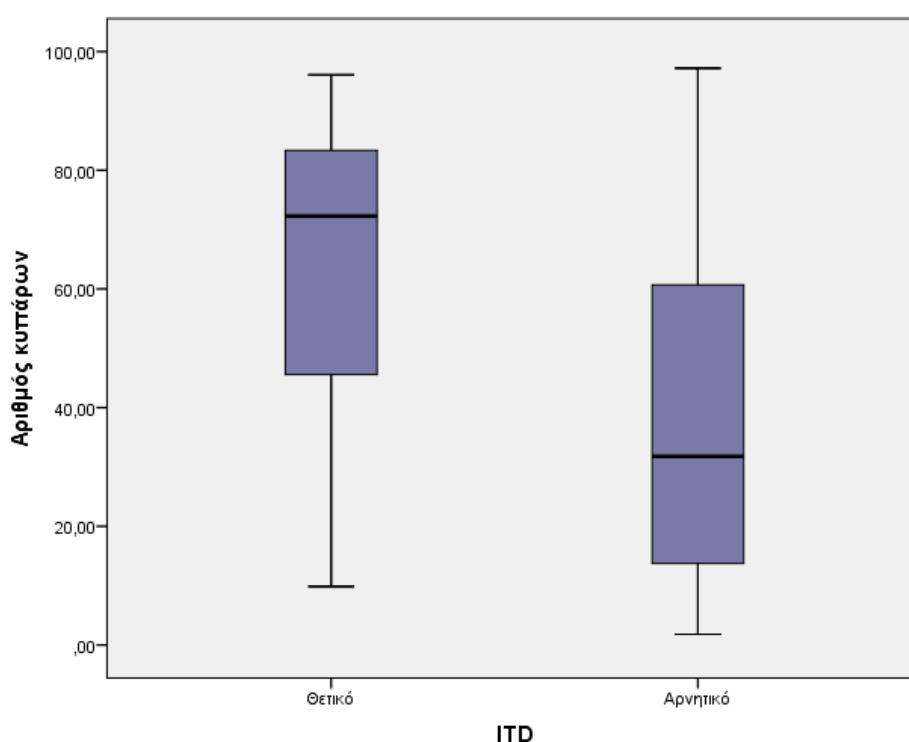
Πίνακας 5.10.

Ποσοτικά στοιχεία έκφρασης των αντιγόνων με κυτταρομετρία ροής, ανάλογα με την ύπαρξη ή μη της μετάλλαξης ITD

	ITD						P Mann-Whitney test
	Θετικό			Αρνητικό			
	N	Μέση τιμή (SD)	Διάμεσος (Ενδ. εύρος)	N	Μέση τιμή (SD)	Διάμεσος (Ενδ. εύρος)	
Κλασσική κυτταρομετρία							
Αριθμός βλαστικών κυττάρων	18	62,79 (26,3)	72,27 (45,58 - 83,34)	76	39,12 (28,24)	31,78 (13,76 - 60,7)	0,002
CD34+% BLASTS	2	65,99 (45,38)	65,99 (33,9 - 98,08)	38	78,5 (25,44)	90,4 (71,74 - 96,61)	0,951
CD34 MFI	18	0,57 (0,71)	0,38 (0,31 - 0,43)	75	1,52 (1,62)	1,26 (0,43 - 1,82)	0,001
CD117 MFI	18	1,45 (0,78)	1,37 (0,96 - 1,93)	76	2,39 (1,73)	2,11 (1,22 - 3,07)	0,021
HLADR MFI	18	4,75 (6,15)	2,8 (1,83 - 5,82)	76	8,31 (11,84)	5,45 (3,03 - 9,21)	0,028
CD33 MFI	18	3,83 (1,89)	3,48 (2,75 - 4,9)	76	3,41 (3,11)	2,74 (1,07 - 4,73)	0,129
CD34/117 %	18	12,04 (29,55)	0,15 (0,04 - 0,82)	76	35,65 (39,69)	6,92 (0,19 - 77,35)	0,010
CD38 MFI	18	2,74 (1,65)	2,41 (1,62 - 3,13)	76	3,93 (3,77)	3,1 (1,58 - 5,17)	0,311
CD13 MFI	18	4,88 (5,2)	2,18 (0,95 - 8,41)	76	4,12 (6,21)	2,23 (1,03 - 4,87)	0,676
CD11B MFI	18	4,08 (4,98)	1,38 (0,31 - 7,24)	76	2,71 (4,18)	0,43 (0,27 - 3,3)	0,198
MPO MFI	17	2,18 (2,16)	1,9 (0,38 - 2,78)	71	3,71 (4,78)	2,3 (0,41 - 5,06)	0,358
CD7 %	5	50,23 (23,94)	44,59 (28,82 - 66,33)	12	64,38 (26,62)	66,48 (46,42 - 84,4)	0,399
CD19 %	2	39,24 (12,16)	39,24 (30,64 - 47,84)	3	28,93 (20,77)	18,18 (15,74 - 52,88)	0,564
Κυτταρομετρία με ειδικά μονοκλωνικά							
NPM1 BLASTS	7	0,64 (0,25)	0,57 (0,51 - 0,97)	49	0,86 (0,42)	0,75 (0,53 - 1,18)	0,270
NPM1 POLY	7	1,25 (0,79)	1,16 (0,73 - 1,53)	49	1,68 (1,08)	1,3 (0,9 - 2,18)	0,310
NPM1 LYMPH	7	0,37 (0,21)	0,35 (0,13 - 0,59)	49	0,5 (0,29)	0,47 (0,29 - 0,62)	0,328
CD135 BLASTS	6	0,83 (0,82)	0,56 (0,4 - 0,68)	44	0,76 (1,99)	0,39 (0,27 - 0,57)	0,143
CD135 POLY	6	0,55 (0,62)	0,35 (0,25 - 0,44)	44	1,23 (3,41)	0,43 (0,25 - 1,12)	0,473
CD135 LYMPH	6	0,17 (0,11)	0,14 (0,1 - 0,19)	44	0,34 (0,56)	0,15 (0,1 - 0,29)	0,737

Οι ασθενείς με την μετάλλαξη ITD είχαν σημαντικά χαμηλότερες τιμές στα CD34, CD117, HLADR MFI και στο ποσοστό των διπλά θετικών CD34/117 σε σύγκριση με τους ασθενείς που δεν είχαν την μετάλλαξη αυτή. Αντίθετα, οι ασθενείς με την μετάλλαξη ITD είχαν σημαντικά υψηλότερο αριθμό βλαστικών κυττάρων σε σύγκριση με τους ασθενείς που δεν είχαν την μετάλλαξη αυτή.

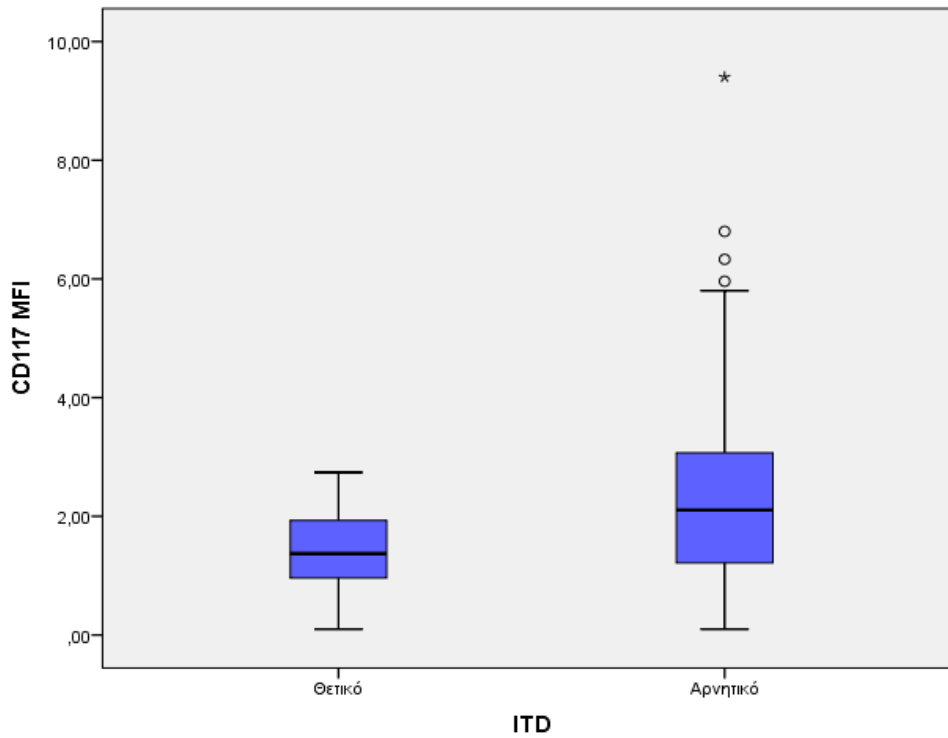
Στο Γράφημα 5.6 που ακολουθεί, δίνονται οι τιμές του αριθμού βλαστικών κυττάρων των ασθενών, ανάλογα με την ύπαρξη ή μη της μετάλλαξης ITD.



Γράφημα 5.6

Τιμές του αριθμού βλαστικών κυττάρων των ασθενών, ανάλογα με την ύπαρξη ή μη της μετάλλαξης ITD

Στο Γράφημα 5.7 που ακολουθεί, δίνονται οι τιμές των CD117 MFI των ασθενών, ανάλογα με την ύπαρξη ή μη της μετάλλαξης ITD.



Γράφημα 5.7

Τιμές CD117 MFI των ασθενών, ανάλογα με την ύπαρξη ή μη της μετάλλαξης ITD

5.4.3. Συσχέτιση της ανίχνευσης της μετάλλαξης TKD με στοιχεία από την κυτταρομετρία, με δημογραφικά στοιχεία και με στοιχεία που αφορούν στην κατάσταση των ασθενών

Στον Πίνακα 5.11 που ακολουθεί, δίνονται τα δημογραφικά στοιχεία, η αιμοσφαιρίνη, τα λευκά αιμοσφαίρια, τα αιμοπετάλια, η κατάταξη και ο καρύοτυπος των ασθενών, ανάλογα με την ύπαρξη ή μη της μετάλλαξης TKD.

Πίνακας 5.11.

Δημογραφικά στοιχεία, αιμοσφαιρίνη, λευκά αιμοσφαίρια, αιμοπετάλια, κατάταξη και καρύοτυπος των ασθενών, ανάλογα με την ύπαρξη ή μη της μετάλλαξης TKD

		TKD				P
		Θετικό		Αρνητικό		
		N	%	N	%	
FAB classification	OMΛ	10	12,2	72	87,8	0,351**
	ΜΔΣ	0	0,0	12	100,0	
Καρύοτυπος	Φυσιολογικός	9	12,3	64	87,7	0,448**
	Παθολογικός	1	4,8	20	95,2	
Φύλο	Γυναίκες	4	10,8	33	89,2	1,000**
	Άντρες	6	10,5	51	89,5	
Δημογραφικά στοιχεία						
Ηλικία, μέση τιμή (SD)		55,4 (10,1)		57,9 (15,5)		0,621 ⁺
Ht%, μέση τιμή (SD)		26,5 (6,9)		29,5 (7,2)		0,214 ⁺
WBC, μέση τιμή (SD) διάμεσος (ενδ. εύρος)		53558 (62218,4)	30585 (4680 - 85790)	42268,1 (73538,3)	12795 (3975 - 34035)	0,397 ⁺⁺
PLT, μέση τιμή (SD) διάμεσος (ενδ. εύρος)		116719,9 (89788,4)	105500 (37000 - 190000)	87380,1 (70492,9)	77000 (24500 - 126000)	0,333 ⁺⁺

*Pearson's χ^2 test **Fisher's exact test ⁺Student's t-test ⁺⁺Mann-Whitney test

Δεν διέφεραν σημαντικά τα στοιχεία του παραπάνω πίνακα, ανάλογα με την ανίχνευση ή όχι της μετάλλαξης TKD.

Στον Πίνακα 5.12 που ακολουθεί, συγκρίνεται η έκφραση των αντιγόνων, σε σχέση με την ανίχνευση ή όχι της μετάλλαξης TKD

Πίνακας 5.12.

Σύγκριση της έκφρασης των αντιγόνων, σε σχέση με την ανίχνευση ή όχι της μετάλλαξης TKD

		TKD		P Fisher's exact test
		Θετικό N (%)	Αρνητικό N (%)	
CD34	Θετικό	4 (40)	36 (42,9)	1,000
	Αρνητικό	6 (60)	48 (57,1)	
CD117	Θετικό	8 (80)	66 (79,5)	1,000
	Αρνητικό	2 (20)	17 (20,5)	
HLADR	Θετικό	9 (90)	75 (89,3)	1,000
	Αρνητικό	1 (10)	9 (10,7)	
CD33	Θετικό	8 (80)	67 (79,8)	1,000
	Αρνητικό	2 (20)	17 (20,2)	
CD38	Θετικό	10 (100)	76 (90,5)	0,539
	Αρνητικό	0 (0)	8 (9,5)	
CD13	Θετικό	9 (90)	58 (69)	0,272
	Αρνητικό	1 (10)	26 (31)	
CD11B	Θετικό	6 (60)	33 (39,3)	0,310
	Αρνητικό	4 (40)	51 (60,7)	
CD64	Θετικό	5 (50)	22 (26,2)	0,144
	Αρνητικό	5 (50)	62 (73,8)	
CD14	Θετικό	4 (40)	15 (17,9)	0,113
	Αρνητικό	6 (60)	69 (82,1)	
MPO	Θετικό	5 (50)	55 (70,5)	0,278
	Αρνητικό	5 (50)	23 (29,5)	
CD7	Θετικό	6 (60)	11 (13,8)	0,003
	Αρνητικό	4 (40)	69 (86,3)	
CD19	Θετικό	1 (10)	4 (4,8)	0,438
	Αρνητικό	9 (90)	80 (95,2)	

Οι ασθενείς με την μετάλλαξη TKD ήταν σε σημαντικά υψηλότερο ποσοστό θετικοί στα CD7 MFI, σε σύγκριση με τους ασθενείς που δεν είχαν τη μετάλλαξη αυτή.

Στον Πίνακα 5.13 που ακολουθεί, δίνονται τα ποσοτικά στοιχεία της έκφρασης των αντιγόνων με κυτταρομετρία ροής, ανάλογα με την ανίχνευση ή όχι της μετάλλαξης TKD.

Πίνακας 5.13.

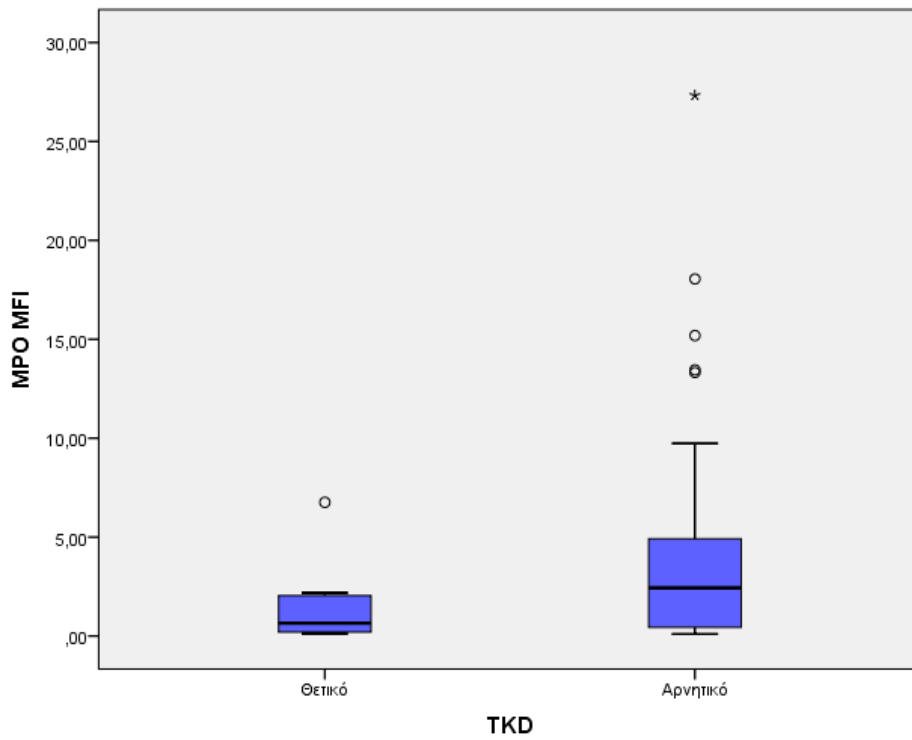
Ποσοτικά στοιχεία έκφρασης των αντιγόνων με κυτταρομετρία ροής, ανάλογα με την ύπαρξη ή μη της μετάλλαξης TKD

	TKD						P Mann- Whitney test
	Θετικό			Αρνητικό			
	N	Μέση τιμή (SD)	Διάμεσος (Ενδ. εύρος)	N	Μέση τιμή (SD)	Διάμεσος (Ενδ. εύρος)	
<i>Κλασσική κυτταρολογία</i>							
Αριθμός βλαστικών κυττάρων	10	43,06 (28,63)	35,78 (22,63 - 74,1)	84	43,72 (29,52)	41,33 (16,21 - 71,01)	1,000
CD34+% BLASTS	4	70,68 (27,89)	75,61 (52,44 - 88,93)	36	78,67 (26,04)	90,99 (70,05 - 96,67)	0,589
CD34MFI	10	1,14 (1,31)	0,59 (0,34 - 1,61)	83	1,36 (1,56)	0,74 (0,38 - 1,74)	0,552
CD117 MFI	10	1,95 (0,98)	2,02 (1,41 - 2,81)	84	2,24 (1,7)	1,87 (1,08 - 2,82)	0,980
HLADR MFI	10	5,11 (6,29)	3,42 (1,72 - 5,2)	84	7,93 (11,47)	5,32 (2,65 - 8,85)	0,173
CD33 MFI	10	3,95 (4,44)	2,19 (1,21 - 5,42)	84	3,43 (2,71)	3,03 (1,42 - 4,73)	0,844
CD34/117 % BLASTS	10	22,9 (35,86)	1,03 (0,13 - 55,24)	84	32,11 (39,38)	0,93 (0,12 - 76,58)	0,668
CD38 MFI	10	4,02 (3,23)	2,53 (1,85 - 6,33)	84	3,66 (3,53)	2,93 (1,58 - 4,77)	0,727
CD13 MFI	10	4,79 (2,91)	4,87 (2,05 - 8,24)	84	4,21 (6,29)	2,04 (0,96 - 4,41)	0,127
CD11b MFI	10	4,47 (5,16)	2,13 (0,29 - 8,96)	84	2,79 (4,25)	0,43 (0,27 - 3,57)	0,303
MPO MFI	10	1,41 (2,03)	0,65 (0,2 - 2,04)	78	3,67 (4,59)	2,44 (0,44 - 4,92)	0,029
CD7 %	6	52,86 (23,29)	60,54 (28,82 - 68,72)	11	64,23 (27,53)	66,33 (35,99 - 90,28)	0,366
CD19 %	1	30,64 ()	30,64 (30,64 - 30,64)	4	33,66 (19,42)	33,01 (16,96 - 50,36)	_*

*δεν υπολογίστηκε λόγω μη ύπαρξης κατανομής

Οι ασθενείς με την μετάλλαξη TKD είχαν σημαντικά χαμηλότερες τιμές στην ένταση της έκφρασης MPO MFI, σε σύγκριση με τους ασθενείς που δεν είχαν την μετάλλαξη αυτή.

Στο Γράφημα 5.8 που ακολουθεί, δίνονται οι τιμές των τιμών MPO MFI των ασθενών ανάλογα με την ύπαρξη ή μη της μετάλλαξης TKD.



Γράφημα 5.8

Τιμές MPO MFI των ασθενών, ανάλογα με την ύπαρξη ή μη της μετάλλαξης ITD

5.4.4. Συσχέτιση της ανίχνευσης τουλάχιστον μιας μετάλλαξης (NPM1 ή/και ITD ή/και TKD) με στοιχεία από την κυτταρομετρία, με δημογραφικά στοιχεία και με στοιχεία που αφορούν στην κατάσταση των ασθενών

Στον Πίνακα 5.14 που ακολουθεί, δίνονται τα δημογραφικά στοιχεία, η αιμοσφαιρίνη, τα λευκά αιμοσφαίρια, τα αιμοπετάλια, η κατάταξη και ο καρυότυπος των ασθενών ανάλογα με την ύπαρξη ή μη τουλάχιστον μίας μετάλλαξης.

Πίνακας 5.14.

Δημογραφικά στοιχεία, αιμοσφαιρίνη, λευκά αιμοσφαίρια, αιμοπετάλια, κατάταξη και καρυότυπος των ασθενών, ανάλογα με την ύπαρξη ή μη τουλάχιστον μίας μετάλλαξης

		NPM1 ή/και ITD ή/και TKD				P
		Αρνητικό		Θετικό		
		N	%	N	%	
FAB classification	OMΛ	40	48,8	42	51,2	0,025*
	ΜΔΣ	10	83,3	2	16,7	
Καρυότυπος	Φυσιολογικός	32	43,8	41	56,2	0,001*
	Παθολογικός	18	85,7	3	14,3	
Φύλο	Γυναίκες	20	54,1	17	45,9	0,893*
	Άντρες	30	52,6	27	47,4	
Δημογραφικά στοιχεία						
Ηλικία, μέση τιμή (SD)		59,2 (17,2)		55,9 (12,2)		0,301 ⁺
Ht%, μέση τιμή (SD)		29,6 (7,5)		28,7 (6,8)		0,559 ⁺
WBC, μέση τιμή (SD) διάμεσος (ενδ. εύρος)		27836,6 (57443,2)	8040 (3200 - 21900)	61233,4 (83114,2)	32355 (7965 - 78270)	0,001⁺⁺
PLT, μέση τιμή (SD) διάμεσος (ενδ. εύρος)		78694,7 (68943)	62000 (19000 - 122000)	103918,1 (75468)	90500 (43000 - 150500)	0,066 ⁺⁺

*Pearson's χ^2 test **Fisher's exact test ⁺Student's t-test ⁺⁺Mann-Whitney test

Οι ασθενείς με οξεία μυελογενή λευχαιμία είχαν σε σημαντικά υψηλότερο ποσοστό τουλάχιστον μία μετάλλαξη, σε σύγκριση με τους ασθενείς με μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο. Επίσης, οι ασθενείς με φυσιολογικό καρυότυπο είχαν σε σημαντικά υψηλότερο ποσοστό τουλάχιστον μία μετάλλαξη, σε σύγκριση με τους ασθενείς με παθολογικό καρυότυπο. Ακόμα, οι ασθενείς που είχαν τουλάχιστον μία μετάλλαξη είχαν σημαντικά υψηλότερες τιμές λευκών αιμοσφαιρίων, σε σύγκριση με εκείνους που δεν είχαν καμία μετάλλαξη.

Στον Πίνακα 5.15 που ακολουθεί, συγκρίνεται η έκφραση των αντιγόνων, σε σχέση με την ανίχνευση ή όχι τουλάχιστον μίας από τις μεταλλάξεις.

Πίνακας 5.15.

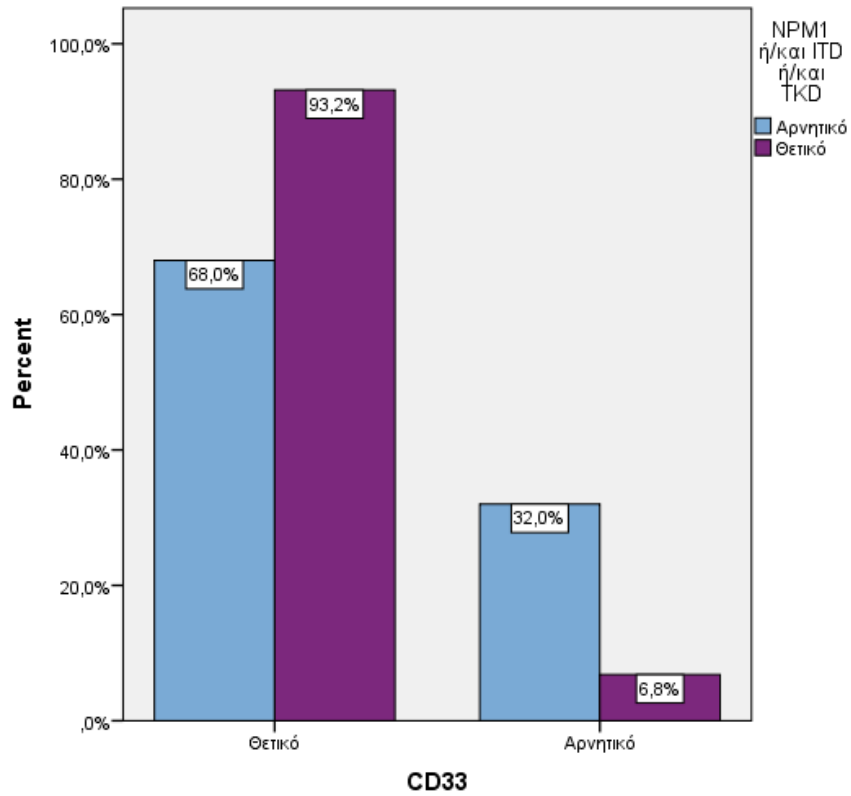
Σύγκριση της έκφρασης των αντιγόνων, σε σχέση με την ανίχνευση ή όχι τουλάχιστον μίας μετάλλαξης

		NPM1 ή/και ITD ή/και TKD		P Pearson's x ² test
		Αρνητικό N (%)	Θετικό N (%)	
CD34	Θετικό	32 (64)	8 (18,2)	<0,001
	Αρνητικό	18 (36)	36 (81,8)	
CD117	Θετικό	42 (85,7)	32 (72,7)	0,121
	Αρνητικό	7 (14,3)	12 (27,3)	
HLADR	Θετικό	49 (98)	35 (79,5)	0,005*
	Αρνητικό	1 (2)	9 (20,5)	
CD33	Θετικό	34 (68)	41 (93,2)	0,002
	Αρνητικό	16 (32)	3 (6,8)	
CD38	Θετικό	43 (86)	43 (97,7)	0,063*
	Αρνητικό	7 (14)	1 (2,3)	
CD13	Θετικό	38 (76)	29 (65,9)	0,281
	Αρνητικό	12 (24)	15 (34,1)	
CD11b	Θετικό	15 (30)	24 (54,5)	0,016
	Αρνητικό	35 (70)	20 (45,5)	
CD64	Θετικό	9 (18)	18 (40,9)	0,014
	Αρνητικό	41 (82)	26 (59,1)	
CD14	Θετικό	8 (16)	11 (25)	0,278
	Αρνητικό	42 (84)	33 (75)	
MPO	Θετικό	35 (76,1)	25 (59,5)	0,096
	Αρνητικό	11 (23,9)	17 (40,5)	
CD7	Θετικό	6 (12,8)	11 (25,6)	0,121
	Αρνητικό	41 (87,2)	32 (74,4)	
CD19	Θετικό	1 (2)	4 (9,1)	0,182*
	Αρνητικό	49 (98)	40 (90,9)	

*Fisher's exact test

Οι ασθενείς που ήταν θετικοί σε τουλάχιστον μία μετάλλαξη είχαν σημαντικά χαμηλότερο ποσοστό CD34 και HLADR MFI, σε σύγκριση με εκείνους που δεν είχαν καμία μετάλλαξη. Αντίθετα, οι ασθενείς που ήταν θετικοί σε τουλάχιστον μία μετάλλαξη είχαν σημαντικά υψηλότερο ποσοστό CD33, CD11B και CD64 MFI, σε σύγκριση με εκείνους που δεν είχαν καμία μετάλλαξη.

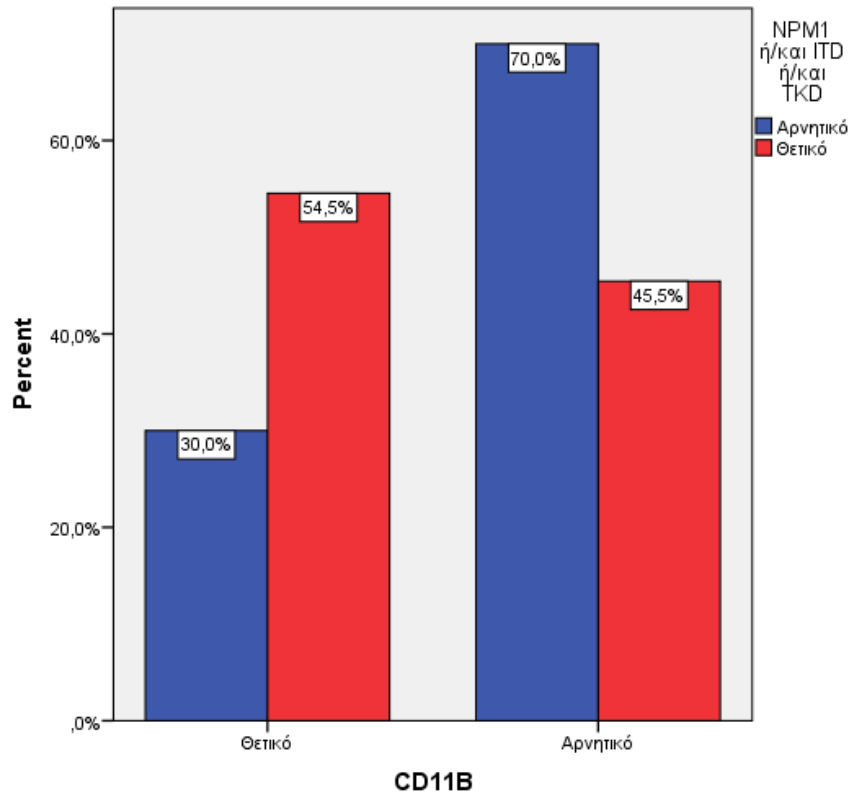
Στο Γράφημα 5.9 που ακολουθεί, δίνονται τα ποσοστά των ασθενών που ήταν θετικοί ή αρνητικοί στα CD33, ανάλογα με το αν είχαν ή όχι τουλάχιστον μία μετάλλαξη.



Γράφημα 5.9

Ποσοστά των ασθενών που ήταν θετικοί ή αρνητικοί στα CD33, ανάλογα με το αν είχαν ή όχι τουλάχιστον μία μετάλλαξη

Στο Γράφημα 5.10 που ακολουθεί, δίνονται τα ποσοστά των ασθενών που ήταν θετικοί ή αρνητικοί στο CD11b, ανάλογα με το αν είχαν ή όχι τουλάχιστον μία μετάλλαξη.



Γράφημα 5.10

Ποσοστά των ασθενών που ήταν θετικοί ή αρνητικοί στο CD11b, ανάλογα με το αν είχαν ή όχι τουλάχιστον μία μετάλλαξη

Στον Πίνακα 5.16 που ακολουθεί, δίνονται τα ποσοτικά στοιχεία της έκφρασης αντιγόνων με κυτταρομετρία ροής, ανάλογα με την ύπαρξη ή μη τουλάχιστον μίας μετάλλαξης.

Πίνακας 5.16.

Ποσοτικά στοιχεία έκφρασης των αντιγόνων με κυτταρομετρία ροής, σε σχέση με την ανίχνευση ή όχι τουλάχιστον μίας μετάλλαξης

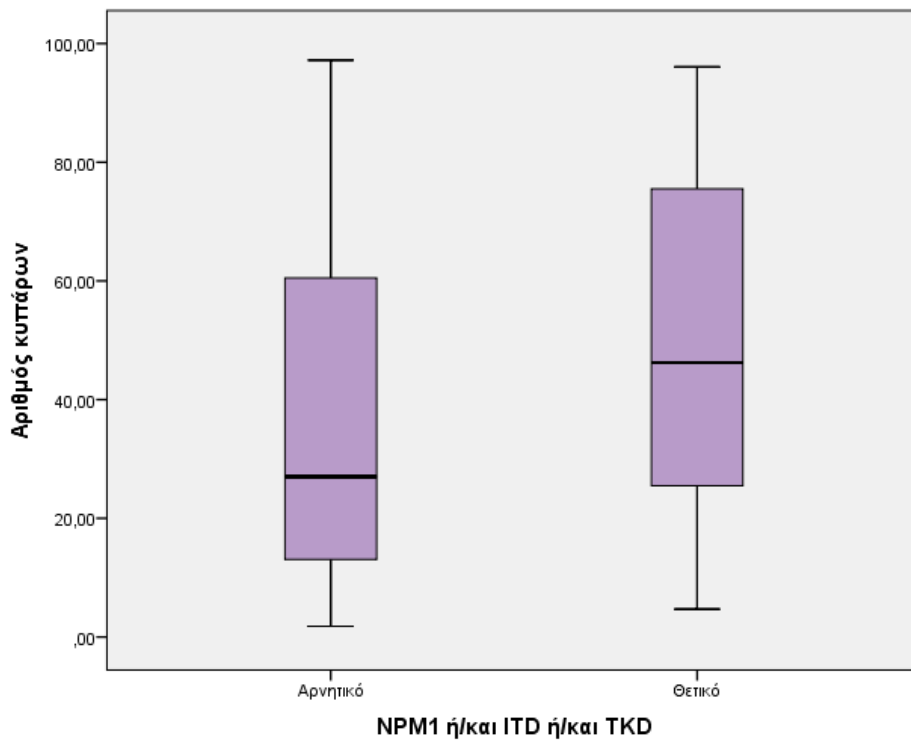
	<i>NPM1 ή/και ITD ή/και TKD</i>						P Mann-Whitney test
	Αρνητικό			Θετικό			
	N	Μέση τιμή (SD)	Διάμεσος (Ενδ. εύρος)	N	Μέση τιμή (SD)	Διάμεσος (Ενδ. εύρος)	
<i>Κλασσική κυτταρολογία</i>							
Αριθμός βλαστικών κυττάρων	50	38,24 (29,32)	27,02 (13,09 - 60,5)	44	49,8 (28,31)	46,24 (25,48 - 75,53)	0,043
CD34+% BLASTS	32	83,48 (19,87)	91,72 (75,08 - 96,67)	8	55,44 (35,91)	53,15 (27,15 - 88,45)	0,091
CD34 MFI	49	1,91 (1,78)	1,43 (0,84 - 1,97)	44	0,7 (0,84)	0,41 (0,31 - 0,6)	<0,001
CD117 MFI	50	2,76 (1,91)	2,59 (1,4 - 3,66)	44	1,58 (0,92)	1,56 (0,88 - 2,39)	0,001
HLADR MFI	50	10,13 (13,88)	6,21 (3,86 - 12,15)	44	4,79 (5,34)	3,48 (1,78 - 5,67)	<0,001
CD33 MFI	50	2,82 (2,86)	2,09 (0,64 - 3,89)	44	4,24 (2,81)	3,62 (2,53 - 5,33)	0,001
CD34/117 %	50	49,05 (39,76)	69,06 (0,55 - 87,29)	44	10,77 (26,12)	0,24 (0,08 - 3,42)	<0,001
CD38 MFI	50	4,26 (4,33)	3,4 (1,44 - 5,64)	44	3,06 (2,05)	2,5 (1,64 - 3,64)	0,312
CD13 MFI	50	4,59 (7,4)	2,16 (1,1 - 5,95)	44	3,91 (3,95)	2,55 (0,86 - 5,45)	0,898
CD11b MFI	50	1,98 (3,59)	0,33 (0,26 - 2,41)	44	4,09 (4,88)	1,83 (0,33 - 7,48)	0,008
MPO MFI	46	4,17 (4,26)	3,03 (1,01 - 5,5)	42	2,58 (4,52)	1,41 (0,29 - 2,78)	0,010
CD7 %	6	76,69 (24,57)	81,3 (63,67 - 98,66)	11	51,23 (22,93)	56,85 (28,48 - 68,72)	0,056
CD19 %	1	52,88 ()	52,88 (52,88 - 52,88)	4	28,1 (14,69)	24,41 (16,96 - 39,24)	-*

*δεν υπολογίστηκε λόγω μη ύπαρξης κατανομής

Οι ασθενείς με τουλάχιστον μία μετάλλαξη είχαν σημαντικά χαμηλότερες τιμές ποσοστών CD34 MFI, στο ποσοστό των διπλά θετικών CD34/117, καθώς και στην ένταση έκφρασης MFI των αντιγόνων CD34, CD117 και MPO, σε σύγκριση με

τους ασθενείς που δεν είχαν καμία μετάλλαξη. Αντίθετα, οι ασθενείς με τουλάχιστον μία μετάλλαξη είχαν σημαντικά υψηλότερο αριθμό κυττάρων, υψηλότερες τιμές στα CD33, CD11b, σε σύγκριση με τους ασθενείς που δεν είχαν καμία μετάλλαξη.

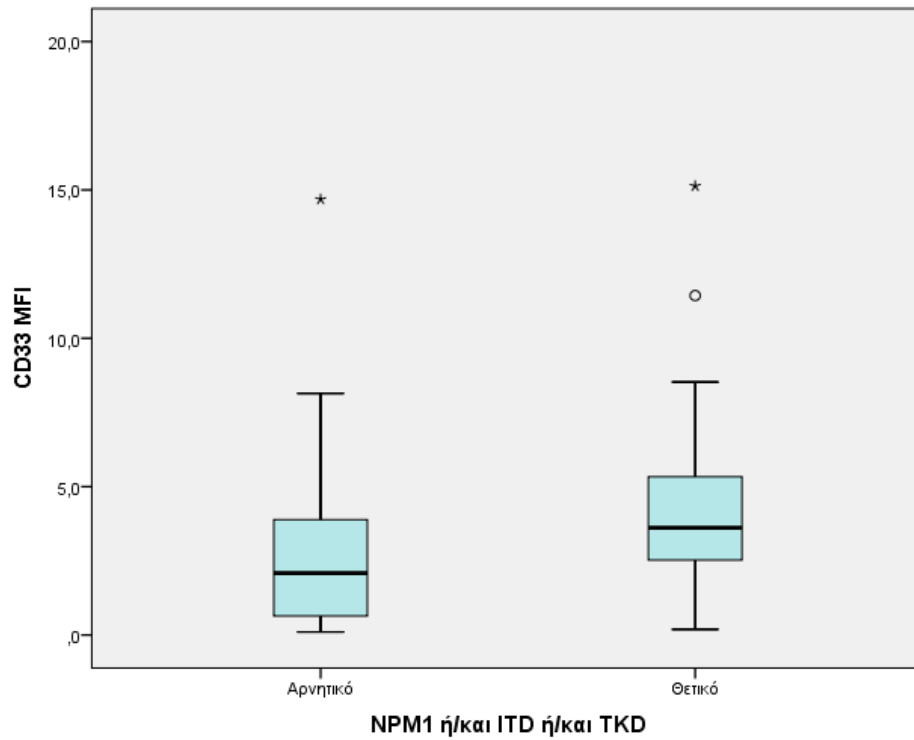
Στο Γράφημα 5.10 που ακολουθεί, δίνονται οι τιμές του αριθμού κυττάρων των ασθενών, ανάλογα με την ύπαρξη ή μη μίας τουλάχιστον μετάλλαξης.



Γράφημα 5.11

Τιμές του αριθμού κυττάρων των ασθενών, ανάλογα με την ύπαρξη ή μη μίας τουλάχιστον μετάλλαξης

Στο Γράφημα 5.12 που ακολουθεί, δίνονται οι τιμές έκφρασης CD33 MFI των ασθενών, ανάλογα με την ύπαρξη ή μη μίας τουλάχιστον μετάλλαξης.



Γράφημα 5.12

Τιμές έκφρασης CD33 MFI των ασθενών, ανάλογα με την ύπαρξη ή μη μίας τουλάχιστον μετάλλαξης

5.4.5. Συσχέτιση της ανίχνευσης των μεταλλάξεων ITD ή/και TKD με στοιχεία από την κυτταρομετρία, με δημογραφικά στοιχεία και με στοιχεία που αφορούν στην κατάσταση των ασθενών

Στον Πίνακα 5.17 που ακολουθεί, δίνονται τα δημογραφικά στοιχεία, η αιμοσφαιρίνη, τα λευκά αιμοσφαίρια, τα αιμοπετάλια, η κατάταξη και ο καρυότυπος των ασθενών, ανάλογα με την ύπαρξη ή μη των μεταλλάξεων ITD ή/και TKD.

Πίνακας 5.17.

Δημογραφικά στοιχεία, αιμοσφαιρίνη, λευκά αιμοσφαίρια, αιμοπετάλια, κατάταξη και καρυότυπος των ασθενών, ανάλογα με την ύπαρξη ή μη των μεταλλάξεων ITD ή/και TKD

		ITD ή/και TKD				P
		Αρνητικό		Θετικό		
		N	%	N	%	
FAB classification	OMΛ	56	68,3	26	31,7	0,169**
	ΜΔΣ	11	91,7	1	8,3	
Καρυότυπος	Φυσιολογικός	49	67,1	24	32,9	0,097*
	Παθολογικός	18	85,7	3	14,3	
Φύλο	Γυναίκες	27	73,0	10	27,0	0,770*
	Άντρες	40	70,2	17	29,8	
Δημογραφικά στοιχεία						
Ηλικία, μέση τιμή (SD)		57,9 (16,1)		57 (12,1)		0,785 ⁺
Ht%, μέση τιμή (SD)		29,7 (7,1)		27,8 (7,3)		0,261 ⁺
WBC, μέση τιμή (SD) διάμεσος (ενδ. εύρος)		34811 (62824,6)	10260 (3500 - 32400)	64954,1 (89195,1)	32410 (7590 - 90480)	0,013⁺⁺
PLT, μέση τιμή (SD) διάμεσος (ενδ. εύρος)		84805 (71317,9)	76000 (21000 - 125000)	104637 (75812,7)	79000 (48000 - 157000)	0,191 ⁺⁺

*Pearson's χ^2 test **Fisher's exact test ⁺Student's t-test ⁺⁺Mann-Whitney test

Οι ασθενείς που είχαν τις μεταλλάξεις ITD ή/και TKD είχαν σημαντικά υψηλότερες τιμές λευκών αιμοσφαιρίων σε σύγκριση με εκείνους που δεν είχαν τις μεταλλάξεις αυτές.

Στον Πίνακα 5.18 που ακολουθεί, συγκρίνεται η έκφραση των αντιγόνων, σε σχέση με την ανίχνευση ή όχι των μεταλλάξεων ITD ή/και TKD.

Πίνακας 5.18.

Σύγκριση της έκφρασης των αντιγόνων, σε σχέση με την ανίχνευση ή όχι των μεταλλάξεων ITD ή/και TKD

		ITD ή/και TKD		P Pearson's χ^2 test
		Αρνητικό	Θετικό	
		N (%)	N (%)	
CD34	Θετικό	34 (50,7)	6 (22,2)	0,011
	Αρνητικό	33 (49,3)	21 (77,8)	
CD117	Θετικό	53 (80,3)	21 (77,8)	0,784
	Αρνητικό	13 (19,7)	6 (22,2)	
HLADR	Θετικό	62 (92,5)	22 (81,5)	0,144*
	Αρνητικό	5 (7,5)	5 (18,5)	
CD33	Θετικό	51 (76,1)	24 (88,9)	0,163
	Αρνητικό	16 (23,9)	3 (11,1)	
CD38	Θετικό	60 (89,6)	26 (96,3)	0,432*
	Αρνητικό	7 (10,4)	1 (3,7)	
CD13	Θετικό	47 (70,1)	20 (74,1)	0,704
	Αρνητικό	20 (29,9)	7 (25,9)	
CD11b	Θετικό	25 (37,3)	14 (51,9)	0,196
	Αρνητικό	42 (62,7)	13 (48,1)	
CD64	Θετικό	16 (23,9)	11 (40,7)	0,102
	Αρνητικό	51 (76,1)	16 (59,3)	
CD14	Θετικό	12 (17,9)	7 (25,9)	0,381
	Αρνητικό	55 (82,1)	20 (74,1)	
MPO	Θετικό	44 (71)	16 (61,5)	0,586
	Αρνητικό	18 (29)	10 (38,5)	
CD7	Θετικό	7 (11,1)	10 (37)	0,004
	Αρνητικό	56 (88,9)	17 (63)	
CD19	Θετικό	3 (4,5)	2 (7,4)	0,623*
	Αρνητικό	64 (95,5)	25 (92,6)	

*Fisher's exact test

Οι ασθενείς που ήταν θετικοί στις μεταλλάξεις ITD ή/και TKD, είχαν σημαντικά χαμηλότερο ποσοστό CD34 MFI, σε σύγκριση με εκείνους που δεν είχαν τις μεταλλάξεις αυτές. Αντιθέτως, οι ασθενείς που ήταν θετικοί στις μεταλλάξεις ITD ή/και TKD, είχαν σημαντικά υψηλότερο ποσοστό CD7 MFI, σε σύγκριση με εκείνους που δεν είχαν τις μεταλλάξεις αυτές.

Στον Πίνακα 5.19 που ακολουθεί, δίνονται τα ποσοτικά στοιχεία της έκφρασης αντιγόνων με στοιχεία της κυτταρομετρίας, ανάλογα με την ανίχνευση ή όχι των μεταλλάξεων ITD ή/και TKD.

Πίνακας 5.19.

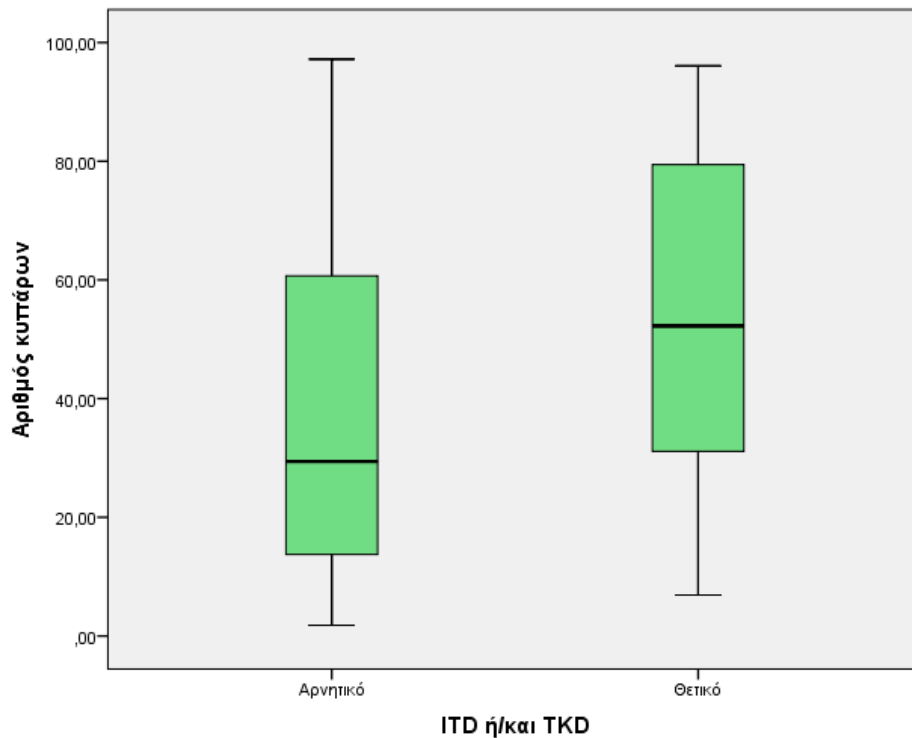
Ποσοτικά στοιχεία έκφρασης των αντιγόνων με κυτταρομετρία ροής, σε σχέση με την ανίχνευση ή όχι των μεταλλάξεων ITD ή/και TKD

	ITD ή/και TKD						P Mann-Whitney test
	Αρνητικό			Θετικό			
	N	Μέση τιμή (SD)	Διάμεσος (Ενδ. εύρος)	N	Μέση τιμή (SD)	Διάμεσος (Ενδ. εύρος)	
<i>Κλασσική κυτταρολογία</i>							
Αριθμός βλαστικών κυττάρων	67	39,19 (28,66)	29,4 (13,4 - 60,89)	27	54,72 (28,32)	52,26 (30,33 - 82,39)	0,017
CD34+% BLASTS	34	79,42 (25,43)	90,99 (71,74 - 96,61)	6	69,12 (29,74)	75,61 (33,9 - 98,08)	0,622
CD34MFI	66	1,56 (1,66)	1,28 (0,46 - 1,9)	27	0,79 (1)	0,4 (0,31 - 0,67)	0,002
CD117 MFI	67	2,44 (1,81)	2,14 (1,16 - 3,09)	27	1,63 (0,89)	1,7 (0,96 - 2,36)	0,060
HLADR MFI	67	8,73 (12,34)	5,7 (3,31 - 9,61)	27	4,91 (6,2)	3,02 (1,72 - 5,5)	0,005
CD33 MFI	67	3,31 (2,87)	2,77 (0,96 - 4,67)	27	3,94 (3,01)	3,45 (2,14 - 5,3)	0,198
CD34/117 %	67	37,02 (40,09)	7,26 (0,2 - 82,78)	27	16,5 (32,17)	0,2 (0,08 - 7,69)	0,022
CD38 MFI	67	3,9 (3,84)	3,11 (1,54 - 5,15)	27	3,21 (2,41)	2,22 (1,62 - 3,69)	0,525
CD13 MFI	67	4,09 (6,55)	2,14 (0,96 - 4,1)	27	4,72 (4,49)	2,76 (0,98 - 8,24)	0,265
CD11B MFI	67	2,47 (3,97)	0,41 (0,27 - 3,28)	27	4,2 (5,05)	1,88 (0,31 - 8,96)	0,106
MPO MFI	62	4,04 (4,98)	2,65 (0,47 - 5,43)	26	1,93 (2,14)	1,44 (0,26 - 2,48)	0,029
CD7 %	7	69,17 (29,97)	72,31 (35,99 - 98,66)	10	53,95 (22,23)	60,54 (28,82 - 68,72)	0,242
CD19 %	3	28,93 (20,77)	18,18 (15,74 - 52,88)	2	39,24 (12,16)	39,24 (30,64 - 47,84)	0,564

Οι ασθενείς με τις μεταλλάξεις ITD ή/και TKD είχαν σημαντικά χαμηλότερες τιμές στα CD34, HLADR MFI, στο ποσοστό των διπλά θετικά CD34/ CD 117 καθώς και στα MPO MFI, σε σύγκριση με τους ασθενείς που δεν είχαν τις μεταλλάξεις αυτές. Αντίθετα, οι ασθενείς με τις μεταλλάξεις ITD ή/και TKD είχαν σημαντικά

υψηλότερο αριθμό κυττάρων, σε σύγκριση με τους ασθενείς που δεν είχαν τις μεταλλάξεις αυτές.

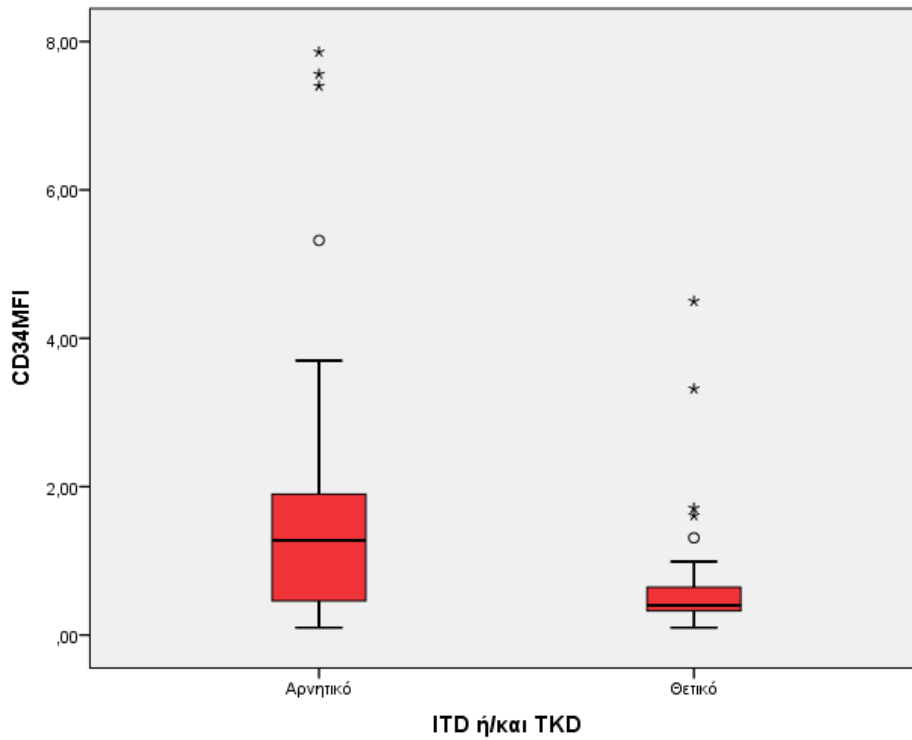
Στο Γράφημα 5.13, δίνονται οι τιμές του αριθμού των κυττάρων των ασθενών ανάλογα με την ύπαρξη ή μη των μεταλλάξεων ITD ή/και TKD.



Γράφημα 5.13

Αριθμός των κυττάρων, ανάλογα με την ύπαρξη ή μη των μεταλλάξεων ITD ή/και TKD.

Στο Γράφημα 5.14 που ακολουθεί, δίνονται οι τιμές των CD34 MFI των ασθενών, ανάλογα με την ύπαρξη ή μη των μεταλλάξεων ITD ή/και TKD.



Γράφημα 5.14

Τιμές των CD34 MFI των ασθενών, ανάλογα με την ύπαρξη ή μη των μεταλλάξεων ITD ή/και TKD

5.4.6. Συσχέτιση της ανίχνευσης των μεταλλάξεων *NPM1* και *ITD* με στοιχεία από την κυτταρομετρία, με δημογραφικά στοιχεία και με στοιχεία που αφορούν στην κατάσταση των ασθενών

Στον Πίνακα 5.20 που ακολουθεί, δίνονται τα δημογραφικά στοιχεία, η αιμοσφαιρίνη, τα λευκά αιμοσφαίρια, τα αιμοπετάλια, η κατάταξη και ο καρυότυπος των ασθενών, ανάλογα με την ύπαρξη ή μη των μεταλλάξεων *NPM1* και *ITD*.

Πίνακας 5.20.

*Δημογραφικά στοιχεία, αιμοσφαιρίνη, λευκά αιμοσφαίρια, αιμοπετάλια, κατάταξη και καρυότυπος των ασθενών, ανάλογα με την ύπαρξη ή μη των μεταλλάξεων *NPM1* και *ITD**

		<i>NPM1</i> και <i>ITD</i>				P
		Αρνητικό		Θετικό		
		N	%	N	%	
FAB classification	ΑΜΛ	69	84,1	13	15,9	0,207**
	ΜΔΣ	12	100,0	0	0,0	
Καρυότυπος	Φυσιολογικός	60	82,2	13	17,8	0,036**
	Παθολογικός	21	100,0	0	0,0	
Φύλο	Γυναίκες	32	86,5	5	13,5	0,943*
	Άντρες	49	86,0	8	14,0	
Δημογραφικά στοιχεία						
Ηλικία, μέση τιμή (SD)		56,9 (15,7)		61,9 (9,3)		0,268 ⁺
Ht%, μέση τιμή (SD)		29,1 (7,1)		29,3 (7,6)		0,956 ⁺
WBC, μέση τιμή (SD) διάμεσος (ενδ. εύρος)		42674,3 (76277,5)	12180 (3600 - 32740)	48421,5 (39793,9)	33020 (12610 - 85790)	0,068 ⁺⁺
PLT, μέση τιμή (SD) διάμεσος (ενδ. εύρος)		89273,2 (72973,5)	78000 (24000 - 127000)	98153,8 (74051,6)	77000 (50000 - 113000)	0,562 ⁺⁺

*Pearson's χ^2 test **Fisher's exact test ⁺Student's t-test ⁺⁺Mann-Whitney test

Οι ασθενείς με φυσιολογικό καρυότυπο ήταν σε σημαντικά υψηλότερο ποσοστό τις μεταλλάξεις *NPM1* και *ITD*, σε σύγκριση με τους ασθενείς με παθολογικό καρυότυπο.

Στον Πίνακα 5.21 που ακολουθεί, συγκρίνεται η έκφραση των αντιγόνων, σε σχέση με την ανίχνευση ή όχι των μεταλλάξεων *NPM1* και *ITD*.

Πίνακας 5.21.

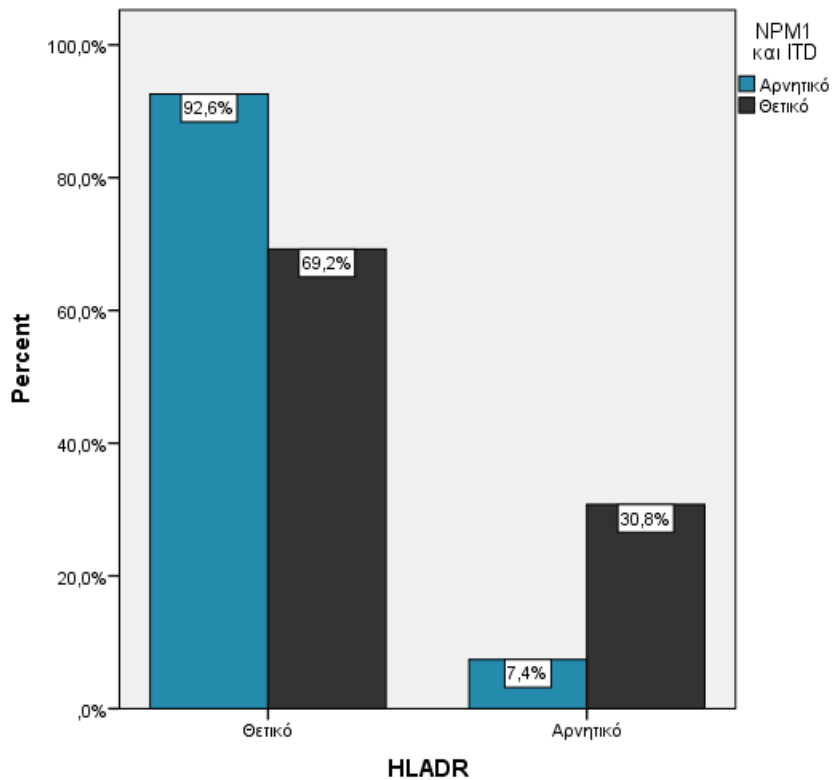
Σύγκριση της έκφρασης των αντιγόνων, σε σχέση με την ανίχνευση ή όχι των μεταλλάξεων *NPM1* και *ITD*

		<i>NPM1</i> και <i>ITD</i>		P Pearson's χ^2 test
		Αρνητικό	Θετικό	
		N (%)	N (%)	
CD34	Θετικό	40 (49,4)	0 (0)	0,001
	Αρνητικό	41 (50,6)	13 (100)	
CD117	Θετικό	65 (81,3)	9 (69,2)	0,456*
	Αρνητικό	15 (18,8)	4 (30,8)	
HLADR	Θετικό	75 (92,6)	9 (69,2)	0,030*
	Αρνητικό	6 (7,4)	4 (30,8)	
CD33	Θετικό	63 (77,8)	12 (92,3)	0,455*
	Αρνητικό	18 (22,2)	1 (7,7)	
CD38	Θετικό	74 (91,4)	12 (92,3)	1,000*
	Αρνητικό	7 (8,6)	1 (7,7)	
CD13	Θετικό	57 (70,4)	10 (76,9)	0,751*
	Αρνητικό	24 (29,6)	3 (23,1)	
CD11b	Θετικό	33 (40,7)	6 (46,2)	0,713
	Αρνητικό	48 (59,3)	7 (53,8)	
CD64	Θετικό	22 (27,2)	5 (38,5)	0,510*
	Αρνητικό	59 (72,8)	8 (61,5)	
CD14	Θετικό	17 (21)	2 (15,4)	1,000*
	Αρνητικό	64 (79)	11 (84,6)	
MPO	Θετικό	52 (68,4)	8 (66,7)	1,000*
	Αρνητικό	24 (31,6)	4 (33,3)	
CD7	Θετικό	13 (16,9)	4 (30,8)	0,258*
	Αρνητικό	64 (83,1)	9 (69,2)	
CD19	Θετικό	3 (3,7)	2 (15,4)	0,139*
	Αρνητικό	78 (96,3)	11 (84,6)	

*Fisher's exact test

Οι ασθενείς που ήταν θετικοί στις μεταλλάξεις *NPM1* και *ITD* είχαν σημαντικά χαμηλότερο ποσοστό CD34 και HLADR MFI, σε σύγκριση με εκείνους που δεν είχαν τις μεταλλάξεις αυτές.

Στο Γράφημα 5.15 που ακολουθεί, δίνονται τα ποσοστά των ασθενών που ήταν θετικοί ή αρνητικοί ως προς τα HLADR, ανάλογα με το αν είχαν ή όχι τις μεταλλάξεις *NPM1* και *ITD*.



Γράφημα 5.15

Ποσοστά των ασθενών που ήταν θετικοί ή αρνητικοί ως προς τα HLADR, ανάλογα με το αν είχαν ή όχι τις μεταλλάξεις NPM1 και ITD

Στον Πίνακα 5.22 που ακολουθεί, δίνονται τα ποσοτικά στοιχεία της έκφρασης των αντιγόνων με στοιχεία της κυτταρομετρίας, ανάλογα με την ανίχνευση ή όχι των μεταλλάξεων NPM1 και ITD.

Πίνακας 5.22.

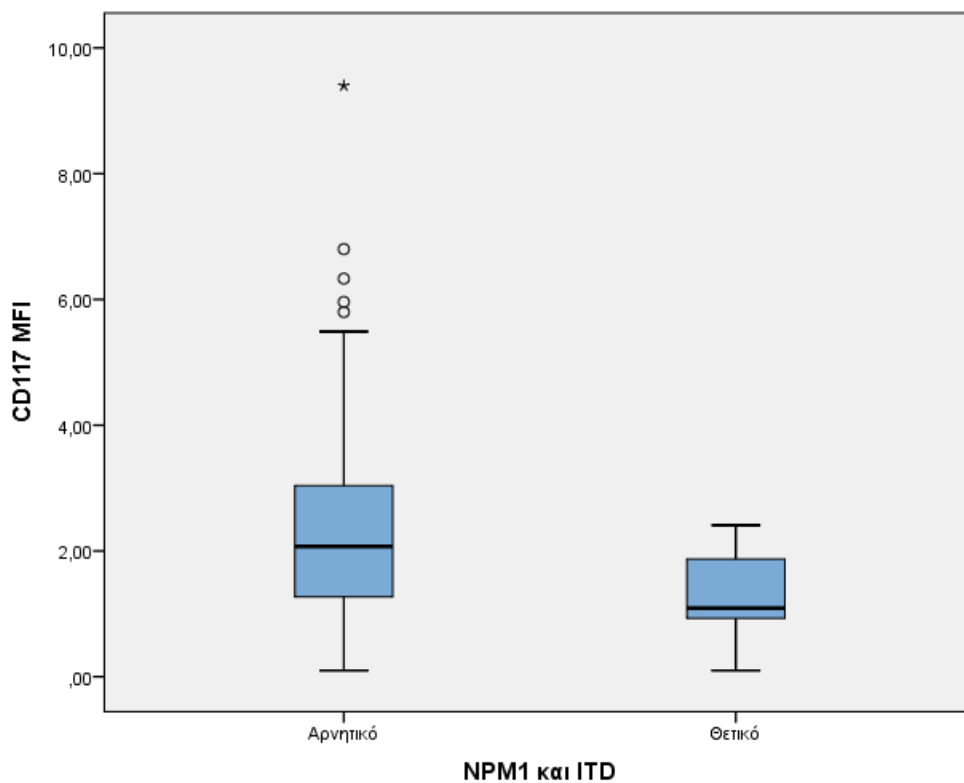
Ποσοτικά στοιχεία της έκφρασης των αντιγόνων με στοιχεία της κυτταρομετρίας, ανάλογα με την ανίχνευση ή όχι των μεταλλάξεων NPM1 και ITD

	<i>NPM1 και ITD</i>						P Mann- Whitney test
	Αρνητικό			Θετικό			
	N	Μέση τιμή (SD)	Διάμεσος (Ενδ. εύρος)	N	Μέση τιμή (SD)	Διάμεσος (Ενδ. εύρος)	
<i>Κλασσική κυτταρολογία</i>							
Αριθμός βλαστικών κυττάρων	81	40,7 (28,97)	31,89 (15,11 - 63,26)	13	62 (24,97)	72,04 (46,9 - 82,39)	0,018
CD34+% BLASTS	40	77,88 (25,97)	90,4 (70,05 - 96,67)	0	-	-	-*
CD34MFI	80	1,5 (1,59)	1,14 (0,43 - 1,8)	13	0,35 (0,08)	0,35 (0,3 - 0,38)	<0,001
CD117 MFI	81	2,36 (1,69)	2,07 (1,27 - 3,04)	13	1,24 (0,72)	1,09 (0,93 - 1,87)	0,007
HLADR MFI	81	8,05 (11,52)	5,43 (2,93 - 8,73)	13	5,02 (7,17)	3,02 (0,33 - 5,18)	0,060
CD33 MFI	81	3,44 (3,04)	2,78 (1,21 - 4,67)	13	3,81 (2)	3,5 (2,75 - 4,9)	0,233
CD34/117 %	81	36,06 (39,81)	7,26 (0,2 - 77,83)	13	0,39 (0,87)	0,12 (0,03 - 0,17)	<0,001
CD38 MFI	81	3,88 (3,67)	3,09 (1,63 - 5,15)	13	2,58 (1,78)	2,18 (1,37 - 2,94)	0,198
CD13 MFI	81	4,16 (6,24)	2,17 (0,98 - 4,77)	13	4,97 (4,5)	3,33 (1,33 - 8,41)	0,447
CD11b MFI	81	2,8 (4,3)	0,44 (0,27 - 3,28)	13	4,04 (4,71)	0,33 (0,31 - 7,24)	0,536
MPO MFI	76	3,6 (4,65)	2,29 (0,43 - 4,89)	12	2,28 (2,52)	1,44 (0,36 - 3,15)	0,444
CD7 %	13	65,8 (26)	68,72 (56,85 - 82,93)	4	42,06 (17,84)	36,71 (28,65 - 55,46)	0,141
CD19 %	3	28,93 (20,77)	18,18 (15,74 - 52,88)	2	39,24 (12,16)	39,24 (30,64 - 47,84)	0,564
<i>Κυτταρομετρία με ειδικά μονοκλωνικά</i>							
<i>NPM1 BLASTS</i>	53	0,85 (0,41)	0,75 (0,54 - 1,13)	3	0,45 (0,13)	0,51 (0,3 - 0,55)	0,047
<i>NPM1 POLY</i>	53	1,64 (1,05)	1,3 (0,9 - 2,16)	3	1,35 (1,32)	0,73 (0,45 - 2,86)	0,423
<i>NPM1 LYMPH</i>	53	0,5 (0,28)	0,47 (0,32 - 0,62)	3	0,19 (0,13)	0,13 (0,1 - 0,34)	0,035
CD135 BLASTS	48	0,74 (1,91)	0,4 (0,28 - 0,6)	2	1,5 (1,39)	1,5 (0,51 - 2,48)	0,119
CD135 POLY	48	1,15 (3,27)	0,41 (0,25 - 1,02)	2	1,03 (1,1)	1,03 (0,25 - 1,8)	0,747
CD135 LYMPH	48	0,33 (0,54)	0,15 (0,1 - 0,29)	2	0,15 (0,06)	0,15 (0,11 - 0,19)	0,980

*δεν υπολογίστηκε λόγω μη ύπαρξης κατανομής

Οι ασθενείς με τις μεταλλάξεις *NPM1* και *ITD* είχαν σημαντικά χαμηλότερες τιμές στα CD34, CD117 MFI, στο ποσοστό των διπλά θετικών CD34/CD117, στα *NPM1* BLASTS και στα *NPM1* LYMPH, σε σύγκριση με τους ασθενείς που δεν είχαν τις μεταλλάξεις αυτές. Αντίθετα, οι ασθενείς με τις μεταλλάξεις *NPM1* και *ITD* είχαν σημαντικά υψηλότερο αριθμό κυττάρων σε σύγκριση με τους ασθενείς που δεν είχαν τις μεταλλάξεις αυτές.

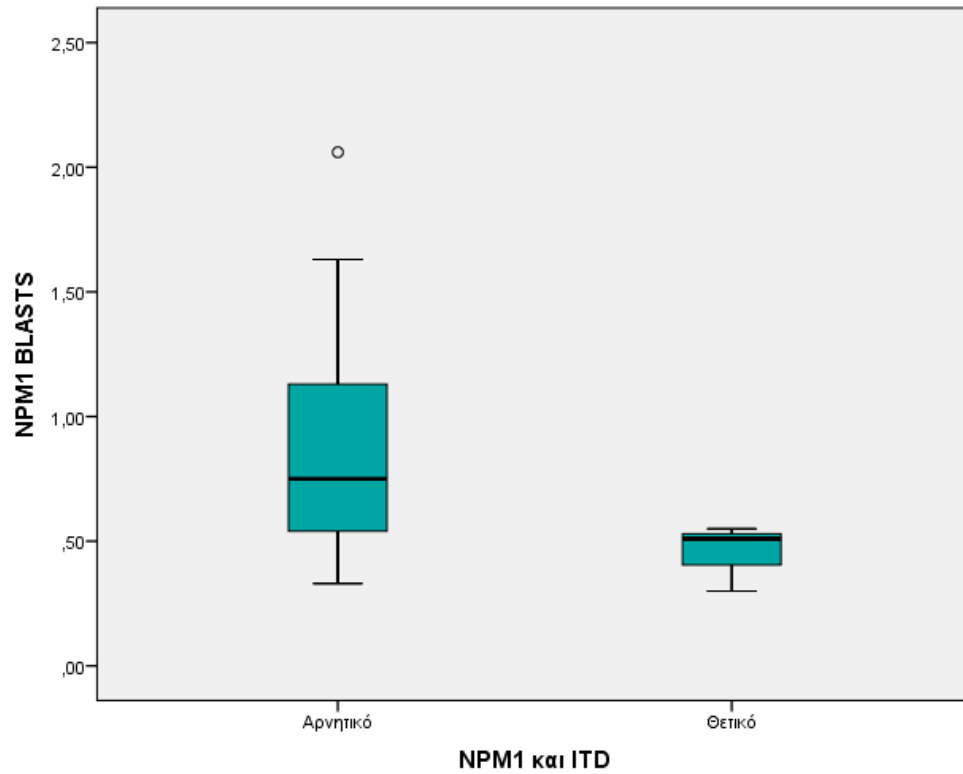
Στο Γράφημα 5.16 που ακολουθεί, δίνονται οι τιμές του CD117 MFI των ασθενών, ανάλογα με την ύπαρξη ή μη των μεταλλάξεων *NPM1* και *ITD*.



Γράφημα 5.16

Τιμές του CD117 MFI των ασθενών, ανάλογα με την ύπαρξη ή μη των μεταλλάξεων NPM1 και ITD

Στο Γράφημα 5.17 που ακολουθεί, δίνονται οι τιμές των *NPM1* BLASTS κυττάρων των ασθενών, ανάλογα με την ύπαρξη ή μη των μεταλλάξεων *NPM1* και *ITD*.



Γράφημα 5.17

Τιμές των NPM1 BLASTS κυττάρων των ασθενών, ανάλογα με την ύπαρξη ή μη των μεταλλάξεων NPM1 και ITD

5.4.7. Συσχέτιση της ανίχνευσης των μεταλλάξεων *NPM1* και *TKD* με στοιχεία από την κυτταρομετρία, με δημογραφικά στοιχεία και με στοιχεία που αφορούν στην κατάσταση των ασθενών

Στον Πίνακα 5.23 που ακολουθεί, δίνονται τα δημογραφικά στοιχεία, η αιμοσφαιρίνη, τα λευκά αιμοσφαίρια, τα αιμοπετάλια, η κατάταξη και ο καρυότυπος των ασθενών ανάλογα με την ύπαρξη ή μη των μεταλλάξεων *NPM1* και *TKD*.

Πίνακας 5.23.

*Δημογραφικά στοιχεία, αιμοσφαιρίνη, λευκά αιμοσφαίρια, αιμοπετάλια, κατάταξη και καρυότυπος των ασθενών, ανάλογα με την ύπαρξη ή μη των μεταλλάξεων *NPM1* και *TKD**

		<i>NPM1</i> και <i>TKD</i>				P
		Αρνητικό		Θετικό		
		N	%	N	%	
FAB classification	OMΛ	77	93,9	5	6,1	1,000**
	ΜΔΣ	12	100,0	0	0,0	
Καρυότυπος	Φυσιολογικός	68	93,2	5	6,8	0,584**
	Παθολογικός	21	100,0	0	0,0	
Φύλο	Γυναίκες	35	94,6	2	5,4	0,976**
	Άντρες	54	94,7	3	5,3	
Δημογραφικά στοιχεία						
Ηλικία, μέση τιμή (SD)		57,7 (15,2)		57 (11,7)		0,924 ⁺
Ht%, μέση τιμή (SD)		29,5 (7,1)		23,9 (6,1)		0,089 ⁺
WBC, μέση τιμή (SD) διάμεσος (ενδ. εύρος)		42955,3 (73709,8)	12610 (3690 - 35050)	52616 (39608,5)	31170 (30000 - 85790)	0,119 ⁺⁺
PLT, μέση τιμή (SD) διάμεσος (ενδ. εύρος)		86439,7 (71426,6)	76000 (24000 - 125000)	162800 (63519,3)	157000 (113000 - 190000)	0,020⁺⁺

*Pearson's χ^2 test **Fisher's exact test ⁺Student's t-test ⁺⁺Mann-Whitney test

Οι ασθενείς που είχαν τις μεταλλάξεις *NPM1* και *TKD* είχαν σημαντικά υψηλότερες τιμές αιμοπεταλίων, σε σύγκριση με εκείνους που δεν είχαν τις μεταλλάξεις αυτές.

Στον Πίνακα 5.24 που ακολουθεί, συγκρίνεται η έκφραση των αντιγόνων σε σχέση με την ανίχνευση ή όχι των μεταλλάξεων *NPM1* και *TKD*

Πίνακας 5.24.

Σύγκριση της έκφρασης των αντιγόνων, σε σχέση με την ανίχνευση ή όχι των μεταλλάξεων NPM1 και TKD

		<i>NPM1 και TKD</i>		P
		Αρνητικό	Θετικό	Fisher's
		N (%)	N (%)	exact test
CD34	Θετικό	40 (44,9)	0 (0)	0,070
	Αρνητικό	49 (55,1)	5 (100)	
CD117	Θετικό	69 (78,4)	5 (100)	0,579
	Αρνητικό	19 (21,6)	0 (0)	
HLADR	Θετικό	79 (88,8)	5 (100)	1,000
	Αρνητικό	10 (11,2)	0 (0)	
CD33	Θετικό	70 (78,7)	5 (100)	0,579
	Αρνητικό	19 (21,3)	0 (0)	
CD38	Θετικό	81 (91)	5 (100)	1,000
	Αρνητικό	8 (9)	0 (0)	
CD13	Θετικό	62 (69,7)	5 (100)	0,317
	Αρνητικό	27 (30,3)	0 (0)	
CD11b	Θετικό	34 (38,2)	5 (100)	0,010
	Αρνητικό	55 (61,8)	0 (0)	
CD64	Θετικό	24 (27)	3 (60)	0,141
	Αρνητικό	65 (73)	2 (40)	
CD14	Θετικό	17 (19,1)	2 (40)	0,265
	Αρνητικό	72 (80,9)	3 (60)	
MPO	Θετικό	56 (67,5)	4 (80)	1,000
	Αρνητικό	27 (32,5)	1 (20)	
CD7	Θετικό	14 (16,5)	3 (60)	0,045
	Αρνητικό	71 (83,5)	2 (40)	
CD19	Θετικό	4 (4,5)	1 (20)	0,244
	Αρνητικό	85 (95,5)	4 (80)	

Οι ασθενείς που ήταν θετικοί στις μεταλλάξεις *NPM1* και *TKD* είχαν σημαντικά υψηλότερο ποσοστό *CD11b* και *CD7* MFI, σε σύγκριση με εκείνους που δεν είχαν τις μεταλλάξεις αυτές.

Στον Πίνακα 5.25 που ακολουθεί, δίνονται τα ποσοτικά στοιχεία της έκφρασης των αντιγόνων, ανάλογα με την ύπαρξη ή μη των μεταλλάξεων *NPM1* και *TKD*.

Πίνακας 5.25.

Ποσοτικά στοιχεία της έκφρασης των αντιγόνων με στοιχεία της κυτταρομετρίας, ανάλογα με την ανίχνευση ή όχι των μεταλλάξεων NPM1 και TKD

	NPM1 και TKD						P Mann-Whitney test
	Αρνητικό			Θετικό			
	N	Μέση τιμή (SD)	Διάμεσος (Ενδ. εύρος)	N	Μέση τιμή (SD)	Διάμεσος (Ενδ. εύρος)	
Κλασσική κυτταρολογία							
Αριθμός βλαστικών κυττάρων	89	43,31 (29,5)	40,15 (16,19 - 69,98)	5	49,62 (27,21)	36,13 (31,89 - 74,1)	0,528
CD34+% BLASTS	40	77,88 (25,97)	90,4 (70,05 - 96,67)	0	-	-	.*
CD34MFI	88	1,4 (1,55)	0,92 (0,39 - 1,73)	5	0,33 (0,17)	0,34 (0,25 - 0,42)	0,016
CD117 MFI	89	2,21 (1,67)	1,86 (1,07 - 2,81)	5	2,17 (0,6)	2,07 (1,97 - 2,36)	0,631
HLADR MFI	89	7,83 (11,31)	5,18 (2,58 - 8,73)	5	4 (1,59)	4,17 (3,64 - 5,2)	0,424
CD33 MFI	89	3,31 (2,68)	2,82 (1,21 - 4,58)	5	6,66 (5,04)	5,42 (3,69 - 6,81)	0,055
CD34/117 %	89	32,85 (39,33)	3,22 (0,13 - 76,29)	5	0,47 (0,78)	0,13 (0,08 - 0,2)	0,094
CD38 MFI	89	3,65 (3,53)	2,87 (1,62 - 4,75)	5	4,56 (2,91)	3,59 (2,87 - 6,33)	0,345
CD13 MFI	89	4,19 (6,15)	2,14 (0,96 - 4,56)	5	5,69 (2,67)	4,96 (4,77 - 8,24)	0,070
CD11b MFI	89	2,68 (4,16)	0,43 (0,27 - 3,28)	5	8,16 (5)	8,96 (4,52 - 11,13)	0,009
MPO MFI	83	3,49 (4,52)	2,3 (0,38 - 4,86)	5	2,24 (2,6)	1,1 (1,01 - 2,04)	0,633
CD7 %	14	64,72 (24,55)	65,28 (44,59 - 82,93)	3	39,18 (25,96)	28,82 (20 - 68,72)	0,166
CD19 %	4	33,66 (19,42)	33,01 (16,96 - 50,36)	1	30,64 (-)	30,64 (30,64 - 30,64)	.*

*δεν υπολογίστηκε λόγω μη ύπαρξης κατανομής.

Οι ασθενείς με τις μεταλλάξεις NPM1 και TKD είχαν σημαντικά χαμηλότερες τιμές στα CD34 MFI, σε σύγκριση με τους ασθενείς που δεν είχαν τις μεταλλάξεις αυτές. Αντίθετα, οι ασθενείς με τις μεταλλάξεις NPM1 και TKD είχαν σημαντικά υψηλότερες τιμές CD11b MFI, σε σύγκριση με τους ασθενείς που δεν είχαν τις μεταλλάξεις αυτές.

5.5. Συσχέτιση των στοιχείων της κυτταρομετρίας με τη νόσο των ασθενών ΟΜΛ/ΜΔΣ

Στον Πίνακα 5.26 που ακολουθεί, γίνεται σύγκριση της έκφρασης των αντιγόνων, ανάλογα με τη νόσο των ασθενών.

Πίνακας 5.26.

Σύγκριση της έκφρασης των αντιγόνων, ανάλογα με τη νόσο των ασθενών

		FAB classification				P Fisher's exact test
		AML		MDS		
		N	%	N	%	
CD34	Θετικό	31	37,8	9	75,0	0,015*
	Αρνητικό	51	62,2	3	25,0	
CD117	Θετικό	63	77,8	11	91,7	0,448
	Αρνητικό	18	22,2	1	8,3	
HLADR	Θετικό	72	87,8	12	100,0	0,351
	Αρνητικό	10	12,2	0	0,0	
CD33	Θετικό	64	78,0	11	91,7	0,448
	Αρνητικό	18	22,0	1	8,3	
CD38	Θετικό	75	91,5	11	91,7	1,000
	Αρνητικό	7	8,5	1	8,3	
CD13	Θετικό	59	72,0	8	66,7	0,738
	Αρνητικό	23	28,0	4	33,3	
CD11b	Θετικό	35	42,7	4	33,3	0,755
	Αρνητικό	47	57,3	8	66,7	
CD64	Θετικό	26	31,7	1	8,3	0,169
	Αρνητικό	56	68,3	11	91,7	
CD14	Θετικό	18	22,0	1	8,3	0,448
	Αρνητικό	64	78,0	11	91,7	
MPO	Θετικό	52	67,5	8	72,7	1,000
	Αρνητικό	25	32,5	3	27,3	
CD7	Θετικό	16	20,3	1	9,1	0,683
	Αρνητικό	63	79,7	10	90,9	
CD19	Θετικό	5	6,1	0	0,0	1,000
	Αρνητικό	77	93,9	12	100,0	

*Pearson's χ^2 test

Οι ασθενείς με μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο είχαν σημαντικά υψηλότερο ποσοστό CD34 MFI, σε σύγκριση με τους ασθενείς με οξεία μυελογενή λευχαιμία.

Στον Πίνακα 5.27 που ακολουθεί, δίνονται τα ποσοτικά στοιχεία της έκφρασης των αντιγόνων, ανάλογα με τη νόσο των ασθενών.

Πίνακας 5.27.

Ποσοτικά στοιχεία της έκφρασης των αντιγόνων, ανάλογα με τη νόσο των ασθενών

	FAB classification						P Mann- Whitney test
	ΟΜΑ			ΜΑΣ			
	N	Μέση τιμή (SD)	Διάμεσος (Ενδ. εύρος)	N	Μέση τιμή (SD)	Διάμεσος (Ενδ. εύρος)	
Αριθμός κυττάρων	82	47,27 (28,14)	45,33 (23,15 - 72,5)	12	18,89 (25,46)	10,61 (7,15 - 16,39)	0,001
CD34+% BLASTS	31	75,38 (28,12)	84,71 (68,35 - 96,82)	9	86,48 (14,7)	90,56 (85,84 - 96,38)	0,662
CD34 MFI	81	1,15 (1,24)	0,6 (0,38 - 1,61)	12	2,6 (2,53)	1,66 (0,98 - 2,79)	0,009
CD117 MFI	82	2,12 (1,58)	1,83 (1,08 - 2,76)	12	2,78 (1,96)	2,31 (1,28 - 3,77)	0,300
HLADR MFI	82	7,68 (11,68)	4,91 (2,58 - 7,9)	12	7,3 (5,13)	5,59 (3,11 - 11,35)	0,458
CD33 MFI	82	3,47 (2,9)	2,95 (1,21 - 4,9)	12	3,62 (3,08)	2,78 (1,74 - 4,18)	0,986
CD34/117 %	82	26,31 (37,53)	0,65 (0,1 - 69,03)	12	64,03 (33,2)	81,1 (40,25 - 88,17)	0,001
CD38 MFI	82	3,7 (3,65)	2,87 (1,62 - 4,6)	12	3,7 (2,12)	3,8 (2,02 - 5,24)	0,497
CD13 MFI	82	4,14 (4,08)	2,7 (0,98 - 6,02)	12	5,14 (13,5)	1,12 (0,97 - 1,83)	0,050
CD11b MFI	82	3,12 (4,51)	0,46 (0,28 - 4,52)	12	1,95 (2,97)	0,42 (0,26 - 2,81)	0,408
MPO MFI	77	2,98 (3,96)	2,19 (0,41 - 3,52)	11	6,44 (6,34)	5,5 (0,28 - 13,32)	0,152
CD7 %	16	58,8 (26,13)	63,95 (32,41 - 75,41)	1	82,93	82,93 (82,93 - 82,93)	-*
CD19 %	5	33,06 (16,87)	30,64 (18,18 - 47,84)	0	-	-	-*

*δεν υπολογίστηκε λόγω μη ύπαρξης κατανομής

Οι ασθενείς με μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο είχαν σημαντικά υψηλότερο CD34 MFI, σημαντικά υψηλότερο ποσοστό των διπλά θετικών CD34/117 καθώς και σημαντικά υψηλότερη τιμή στα CD13, σε σύγκριση με τους ασθενείς με οξεία μυελογενή λευχαιμία.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6ο

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σε νεοδιαγνωσμένους ασθενείς με ΟΜΛ, είναι πολύ σημαντική η ταχεία διάγνωση του ακριβούς τύπου λευχαιμίας καθώς και των μοριακών διαταραχών, ώστε να υπάρχει η προγνωστική πληροφορία και συζήτηση για τις θεραπευτικές επιλογές.

Ο πολυπαραμετρικός ανοσοφαινότυπος είναι ένα από τα πρώτα αποτελέσματα που φθάνουν στον κλινικό γιατρό, όταν διερευνάται ένα νέο περιστατικό οξείας λευχαιμίας.

Σκοπός αυτής της μελέτης ήταν η προσφορά όσο το δυνατόν πληρέστερης πληροφορίας στο εργαστήριο μοριακής βιολογίας που μελετά τις μεταλλάξεις που σχετίζονται με τις αιματολογικές κακοήθειες, καθώς και στον κλινικό γιατρό την στιγμή της διάγνωσης.

Για τον σκοπό αυτό, έγινε προσπάθεια να αναπτυχθεί μια κυτταρομετρική μέθοδος διερεύνησης της έκφρασης των πρωτεϊνών των μεταλλαγμένων γονιδίων, τόσο στην επιφάνεια όσο και στο κυτταρόπλασμα των άωρων κυττάρων της μυελικής σειράς. Η έκφραση αυτή συγκρίθηκε με τα αντίστοιχα αποτελέσματα της μοριακής μελέτης.

Παρόμοιες μέθοδοι έχουν βρεθεί στην βιβλιογραφία όπου φαίνεται ότι η κυτταρομετρία ανιχνεύει επιτυχώς την μετάλλαξη *NPM1* (Falini et al., 2011· Oelschlaegel et al., 2010).

Όμως, τα αποτελέσματα της προσπάθειας αυτής δεν ήταν τα αναμενόμενα, ακόμα και με τη χρήση διαφορετικού μονοκλωνικού αντισώματος (εμπορικά διαθέσιμο), σε σχέση με την βιβλιογραφία. Επίσης, δεν αποκτήθηκε χρήσιμη πληροφορία ούτε σε σύγκριση με εσωτερικά δείγματα ελέγχου ούτε σε σύγκριση με δείγματα φυσιολογικών ατόμων.

Ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί ότι η επιτυχής ανίχνευση αναφέρεται σε κυτταρικές σειρές και σε ασθενείς με ΟΜΛ χρησιμοποιώντας ποικίλες τεχνικές που δεν χρησιμοποιούνται στην ρουτίνα των εργαστηρίων κυτταρομετρίας.

Η ανίχνευση των μεταλλάξεων του *FLT3* μελετώντας την έκφραση του CD135 με κυτταρομετρία ροής από την ομάδα μας δεν υπήρξε επιτυχής, αλλά αυτό ήταν σε συμφωνία με αντίστοιχη μελέτη σε παιδιατρικούς ασθενείς (Tarlock, Alonzo, Loken et al., 2017).

Τελικά, μελετήθηκε η ένταση έκφρασης των συνήθων ανοσοφαινοτυπικών δεικτών για την τυποποίηση της οξείας λευχαιμίας, καθώς και η έκτοπη έκφραση δεικτών με σκοπό να προβλεφθεί η παρουσία *NPM1* και *FLT3* μεταλλάξεων.

Οι ασθενείς που είχαν την μετάλλαξη *NPM1* είχαν σημαντικά υψηλότερες τιμές λευκών αιμοσφαιρίων και αιμοπεταλίων, σε σύγκριση με εκείνους που δεν είχαν την μετάλλαξη αυτή. Οι ασθενείς που είχαν την μετάλλαξη ITD είχαν σημαντικά υψηλότερες τιμές λευκών αιμοσφαιρίων, σε σύγκριση με εκείνους που δεν είχαν την μετάλλαξη αυτή (Davoudi & Davoodi, 2015).

Οι ασθενείς με χαμηλή έκφραση ή χωρίς έκφραση αώρων κυτταρικών δεικτών, όπως τα CD34, CD117, HLADR, και υψηλή έκφραση πιο ώριμων δεικτών, όπως το CD11b, βρέθηκαν θετικοί για την μετάλλαξη *NPM1*.

Πρέπει, επίσης, να αναφερθεί η υψηλότερη έκφραση του CD33. Σε ασθενείς με χαμηλή η καθόλου έκφραση των CD34, CD117, HLADR βρέθηκαν, επιπλέον, μεταλλάξεις του *FLT3*.

Αυτά τα αποτελέσματα ήταν σε συμφωνία με άλλες μελέτες (Box et al., 2016· Martelli et al., 2010· Falini et al., 2006, 2007· Palmisano et al., 2007· Thiede, Koch, Creutzig et al., 2006).

Η ταυτόχρονη παρουσία των μεταλλάξεων *NPM1* και *FLT3*(ITD/TKD), αλλά όχι συνύπαρξη και των τριών μαζί, έχει βρεθεί σε ασθενείς με χαμηλή η χωρίς έκφραση των CD34, CD117, HLADR.

Δεν έχει αναφερθεί παρόμοια συσχέτιση με τον συνδυασμό αυτών των μεταλλάξεων στην βιβλιογραφία.

Ο συνδυασμός και των τριών μεταλλάξεων φαίνεται να συσχετίζεται μόνο με υψηλότερη έκφραση του CD11b.

Η υψηλή έκφραση του CD11b έχει συσχετιστεί με κακή πρόγνωση σε ομάδα ασθενών χωρίς κυτταρογενετικές και μοριακές διαταραχές και ο συνδυασμός των τριών μεταλλάξεων συσχετίζεται επίσης με κακή πρόγνωση.

Η παρουσία της έκτοπης έκφρασης του CD7 βρέθηκε σε ασθενείς με *FLT3* αλλά όχι *NPM1* μετάλλαξη.

Θετικό CD56 ή CD2 έχει βρεθεί μόνο σε αρνητικούς για μεταλλάξεις ασθενείς.

Οι ασθενείς με μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο είχαν σημαντικά υψηλότερο CD34 MFI, σημαντικά υψηλότερο ποσοστό των διπλά θετικών CD34/117, καθώς και σημαντικά υψηλότερη τιμή στα CD13, σε σύγκριση με τους ασθενείς με οξεία μυελογενή λευχαιμία.

Η σπάνια περίπτωση CD34 αρνητικού ασθενή με ΜΔΣ βρέθηκε θετική για *FLT3/ITD*, που τελικά εκτράπηκε σε ΟΜΛ. Αυτό πρέπει να λαμβάνεται υπόψη στη μελέτη των ΜΔΣ.

Συμπερασματικά, η κυτταρομετρική ανίχνευση κοινών φαινοτυπικών δεικτών στην ΟΜΛ και στα ΜΔΣ προσφέρει ενδείξεις σχετικά με την παρουσία *NPM1* και *FLT3* μεταλλάξεων, που συνδέονται με την πρόγνωση. Επίσης, η θετικότητα κάποιων έκτοπων λεμφικών δεικτών φαίνεται να συσχετίζεται με την παρουσία ή την απουσία αυτών των μεταλλάξεων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Anderson, J. E., Kopecky, K. J., Willman, C. L., Head, D., O'Donnell, M. R., Luthardt, F. W., ... & Appelbaum, F. R. (2002). Outcome after induction chemotherapy for older patients with acute myeloid leukemia is not improved with mitoxantrone and etoposide compared to cytarabine and daunorubicin: a Southwest Oncology Group study. *Blood*, *100*(12), 3869-3876.
- Appelbaum, F. R., Gundacker, H., Head, D. R., Slovak, M. L., Willman, C. L., Godwin, J. E., ... & Petersdorf, S. H. (2006). Age and acute myeloid leukemia. *Blood*, *107*(9), 3481-3485.
- Araki, D., Wood, B. L., Othus, M., Radich, J. P., Halpern, A. B., Zhou, Y., ... & Walter, R. B. (2016). Allogeneic hematopoietic cell transplantation for acute myeloid leukemia: time to move toward a minimal residual disease-based definition of complete remission?. *Journal of Clinical Oncology*, *34*(4), 329-336.
- Arber, D. A., Orazi, A., Hasserjian, R., Thiele, J., Borowitz, M. J., Le Beau, M. M., ... & Vardiman, J. W. (2016). The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*, *127*(20), 2391-2405.
- Arber, D. A., Orazi, A., Hasserjian, R., Thiele, J., Borowitz, M. J., Le Beau, M. M., ... & Vardiman, J. W. (2016). The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*, *127*(20), 2391-2405.
- Αναγνωστάκου, Χ. (2006). Έλεγχος ποιότητας και λειτουργίας κυτταρομετρητή ροής (σσ. 14-16). Κλινικό Φροντιστήριο «Κυτταρομετρία Ροής: Κλινικές και Ερευνητικές Εφαρμογές», 6ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Χημείας. Αθήνα.
- Bacher, U., Kern, W., Schnittger, S., Hiddemann, W., Haferlach, T., & Schoch, C. (2005). Population-based age-specific incidences of cytogenetic subgroups of acute myeloid leukemia. *Haematologica*, *90*(11), 1502-1510.
- Baer, M. R., Stewart, C. C., Lawrence, D., Arthur, D. C., Byrd, J. C., Davey, F. R., ... & Bloomfield, C. D. (1997). Expression of the neural cell adhesion molecule

CD56 is associated with short remission duration and survival in acute myeloid leukemia with t (8; 21)(q22; q22). *Blood*, 90(4), 1643-1648.

Baumgarth, N., & Roederer, M. (2000). A practical approach to multicolor flow cytometry for immunophenotyping. *Journal of Immunological Methods*, 243(1-2), 77-97.

Becker, H., Marcucci, G., Maharry, K., Radmacher, M. D., Mrózek, K., Margeson, D., ... & Powell, B. L. (2010). Favorable prognostic impact of NPM1 mutations in older patients with cytogenetically normal de novo acute myeloid leukemia and associated gene-and microRNA-expression signatures: a Cancer and Leukemia Group B study. *Journal of Clinical Oncology*, 28(4), 596-604.

Becker, P. S., Kopecky, K. J., Wilks, A. N., Chien, S., Harlan, J. M., Willman, C. L., ... & Appelbaum, F. R. (2009). Very late antigen-4 function of myeloblasts correlates with improved overall survival for patients with acute myeloid leukemia. *Blood*, 113(4), 866-874.

Bejar, R. (2013). Prognostic models in myelodysplastic syndromes. *ASH Education Program Book*, 2013(1), 504-510.

Bene, M. C., Castoldi, G., Knapp, W., Ludwig, W. D., Matutes, E., Orfao, A., & Veer van't, M. B. (1995). Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia*, 9(10), 1783-1786.

Bigos, M., Baumgarth, N., Jager, G. C., Herman, O. C., Nozaki, T., Stovel, R. T., ... & Herzenberg, L. A. (1999). Nine color eleven parameter immunophenotyping using three laser flow cytometry. *Cytometry*, 36(1), 36-45.

Bishop, J. F., Matthews, J. P., Young, G. A., Bradstock, K., & Lowenthal, R. M. (1998). Intensified induction chemotherapy with high dose cytarabine and etoposide for acute myeloid leukemia: a review and updated results of the Australian Leukemia Study Group. *Leukemia & lymphoma*, 28(3-4), 315-327.

Boeck, G. (2000). Current Status of Flow Cytometry in Cell and Molecular Biology. *International Review of Cytology*, 204, 239-298.

- Bowen, D. T. (2006). Etiology and epidemiology of MDS. In *Hematologic Malignancies: Myelodysplastic Syndromes* (pp. 15-22). Berlin, Heidelberg: Springer.
- Box, J. K., Paquet, N., Adams, M. N., Boucher, D., Bolderson, E., O'Byrne, K. J., & Richard, D. J. (2016). Nucleophosmin: from structure and function to disease development. *BMC Molecular Biology*, *17*(1), 19.
- Brown, M., & Wittwer, C. (2000). Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology. *Clinical Chemistry*, *46*(8), 1221-1229.
- Büchner, T., Berdel, W., Schoch, C., Haferlach, T., Serve, H., Kienast, J., ... & Lengfelder, E. (2006). Double Induction Containing Either Two Courses or One Course of High-Dose Cytarabine Plus Mitoxantrone and Postremission Therapy by Either Autologous Stem-Cell Transplantation or by Prolonged Maintenance for Acute Myeloid Leukemia. *Journal of Clinical Oncology*, *24*(16), 2480-2489.
- Cancer Genome Atlas Research Network. (2013). Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *New England Journal of Medicine*, *368*(22), 2059-2074.
- Carter, N. P., & Meyer, E. W. (1998). Introduction to the principles of flow cytometry, In M. G. Ormerod (Ed.), *Flow Cytometry. A Practical Approach* (pp. 1-28). Oxford: Oxford University Press.
- Cazzola, M., & Malcovati, L. (2005). Myelodysplastic syndromes--coping with ineffective hematopoiesis. *The New England Journal of Medicine*, *352*(6), 536-538.
- Chapman, G. V. (2000). Instrumentation for flow cytometry. *Journal of Immunological Methods*, *243*(1-2), 3-12.
- Chauhan, P. S., Ihsan, R., Singh, L. C., Gupta, D. K., Mittal, V., & Kapur, S. (2013). Mutation of NPM1 and FLT3 genes in acute myeloid leukemia and their association with clinical and immunophenotypic features. *Disease Markers*, *35*(5), 581-588.
- Chen, X., Xie, H., Wood, B. L., Walter, R. B., Pagel, J. M., Becker, P. S., ... & Estey, E. H. (2015). Relation of clinical response and minimal residual disease and

- their prognostic impact on outcome in acute myeloid leukemia. *Journal of Clinical Oncology*, 33(11), 1258-1264.
- Choudhary, C., Schwäble, J., Brandts, C., Tickenbrock, L., Sargin, B., Kindler, T., ... & Serve, H. (2005). AML-associated Flt3 kinase domain mutations show signal transduction differences compared with Flt3 ITD mutations. *Blood*, 106(1), 265-273.
- Cook, A. M., Li, L., Ho, Y., Lin, A., Li, L., Stein, A., ... & Bhatia, R. (2014). Role of altered growth factor receptor-mediated JAK2 signaling in growth and maintenance of human acute myeloid leukemia stem cells. *Blood*, 123(18), 2826-2837.
- Corces-Zimmerman, M. R., Hong, W. J., Weissman, I. L., Medeiros, B. C., & Majeti, R. (2014). Preleukemic mutations in human acute myeloid leukemia affect epigenetic regulators and persist in remission. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(7), 2548-2553.
- Dalal, B. I., Mansoor, S., Manna, M., Pi, S., Di Sauro, G., & Hogge, D. E. (2012). Detection of CD34, TdT, CD56, CD2, CD4, and CD14 by flow cytometry is associated with NPM1 and FLT3 mutation status in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia*, 12(4), 274-279.
- Davoudi, M., & Davoodi, P. (2015). Nucleophosmin 1 expression in acute myeloid leukemia. *Reviews in Clinical Medicine*, 2(4), 209-211.
- De Propriis, M. S., Raponi, S., Diverio, D., Milani, M. L., Meloni, G., Falini, B., ... & Guarini, A. (2011). High CD33 expression levels in acute myeloid leukemia cells carrying the nucleophosmin (NPM1) mutation. *Haematologica*, 96(10), 1548-1551.
- Devillier, R., Mansat-De Mas, V., Gelsi-Boyer, V., Demur, C., Murati, A., Corre, J., ... & Recher, C. (2015). Role of ASXL1 and TP53 mutations in the molecular classification and prognosis of acute myeloid leukemias with myelodysplasia-related changes. *Oncotarget*, 6(10), 8388-8396.
- Döhner, H., Estey, E. H., Amadori, S., Appelbaum, F. R., Büchner, T., Burnett, A. K., ... & Lo-Coco, F. (2010). Diagnosis and management of acute myeloid leukemia

in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*, *115*(3), 453-474.

Döhner, H., Estey, E., Grimwade, D., Amadori, S., Appelbaum, F. R., Büchner, T., ... & Levine, R. L. (2017). Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*, *129*(4), 424-447.

Döhner, H., Weisdorf, D. J., & Bloomfield, C. D. (2015). Acute myeloid leukemia. *New England Journal of Medicine*, *373*(12), 1136-1152.

Döhner, K., Schlenk, R. F., Habdank, M., Scholl, C., Rücker, F. G., Corbacioglu, A., ... & Döhner, H. (2005). Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: interaction with other gene mutations. *Blood*, *106*(12), 3740-3746.

Dores, G. M., Devesa, S. S., Curtis, R. E., Linet, M. S., & Morton, L. M. (2012). Acute leukemia incidence and patient survival among children and adults in the United States, 2001-2007. *Blood*, *119*(1), 34-43.

Duployez, N., Marceau-Renaut, A., Boissel, N., Petit, A., Bucci, M., Geffroy, S., ... & Celli-Lebras, K. (2016). Comprehensive mutational profiling of core binding factor acute myeloid leukemia. *Blood*, *127*(20), 2451-2459.

El Fakih, R., Rasheed, W., Hawsawi, Y., Alsermani, M., & Hassanein, M. (2018). Targeting FLT3 mutations in acute myeloid leukemia. *Cells*, *7*(1), 4.

Elghetany, M. T., Ge, Y., Patel, J., Martinez, J., & Uhrova, H. (2004). Flow cytometric study of neutrophilic granulopoiesis in normal bone marrow using an expanded panel of antibodies: correlation with morphologic assessments. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, *18*(1), 36-41.

Estey, E. H. (2014). Acute myeloid leukemia: 2014 Update on risk-stratification and management. *American Journal of Hematology*, *89*(11), 1063-1081.

Falini, B., Bolli, N., Shan, J., Martelli, M. P., Liso, A., Pucciarini, A., ... & Gorello, P. (2006). Both carboxy-terminus NES motif and mutated tryptophan (s) are crucial for aberrant nuclear export of nucleophosmin leukemic mutants in NPMc+ AML. *Blood*, *107*(11), 4514-4523.

- Falini, B., Martelli, M. P., Bolli, N., Sportoletti, P., Liso, A., Tiacci, E., & Haferlach, T. (2011). Acute myeloid leukemia with mutated nucleophosmin (NPM1): is it a distinct entity?. *Blood*, *117*(4), 1109-1120.
- Falini, B., Mecucci, C., Tiacci, E., Alcalay, M., Rosati, R., Pasqualucci, L., ... & Bigerna, B. (2005). Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *New England Journal of Medicine*, *352*(3), 254-266.
- Falini, B., Nicoletti, I., Bolli, N., Martelli, M. P., Liso, A., Gorello, P., ... & Martelli, M. F. (2007b). Translocations and mutations involving the nucleophosmin (NPM1) gene in lymphomas and leukemias. *Haematologica*, *92*(4), 519-532.
- Falini, B., Nicoletti, I., Martelli, M. F., & Mecucci, C. (2007a). Acute myeloid leukemia carrying cytoplasmic/mutated nucleophosmin (NPMc+ AML): biologic and clinical features. *Blood*, *109*(3), 874-885.
- Fenaux, P., & Adès, L. (2013). How we treat lower-risk myelodysplastic syndromes. *Blood*, *121*(21), 4280-4286.
- Freeman, S. D., Jovanovic, J. V., & Grimwade, D. (2008). Development of minimal residual disease-directed therapy in acute myeloid leukemia. In *Seminars in Oncology* (Vol. 35, No. 4, pp. 388-400). WB Saunders.
- Freeman, S. D., Virgo, P., Couzens, S., Grimwade, D., Russell, N., Hills, R. K., & Burnett, A. K. (2013). Prognostic relevance of treatment response measured by flow cytometric residual disease detection in older patients with acute myeloid leukemia. *Journal of Clinical Oncology*, *31*(32), 4123-4131.
- Gaidzik, V. I., Teleanu, V., Papaemmanuil, E., Weber, D., Paschka, P., Hahn, J., ... & Brossart, P. (2016). RUNX1 mutations in acute myeloid leukemia are associated with distinct clinico-pathologic and genetic features. *Leukemia*, *30*(11), 2160-2168.
- Gerds, A. T., Walter, M. J., & Scott, B. L. (2013). Emerging Importance of Mutational Analysis in Myelodysplastic Syndrome and Acute Myelogenous Leukemia. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, *19*(1), S33-S37.
- Ghosh, A. (2011). Myelodysplastic syndrome: classification and changing concept. *Journal of Pathology of Nepal*, *1*(2), 142-150.

- Ghoshal, S., Baumann, H., & Wetzler, M. (2008). Epigenetic regulation of signal transducer and activator of transcription 3 in acute myeloid leukemia. *Leukemia Research*, 32(7), 1005-1014.
- Gilliland, D. G., & Griffin, J. D. (2002). The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood*, 100(5), 1532-1542.
- Gilliland, D. G., & Griffin, J. D. (2002). The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood*, 100(5), 1532-1542.
- Goldstone, A. H., Burnett, A. K., Wheatley, K., Smith, A. G., Hutchinson, R. M., & Clark, R. E. (2001). Attempts to improve treatment outcomes in acute myeloid leukemia (AML) in older patients: the results of the United Kingdom Medical Research Council AML11 trial. *Blood*, 98(5), 1302-1311.
- Gore, S. D., & Hermes-DeSantis, E. R. (2009). Enhancing survival outcomes in the management of patients with higher-risk myelodysplastic syndromes. *Cancer Control*, 16(4), 2-10.
- Gough, S. M., Slape, C. I., & Aplan, P. D. (2011). NUP98 gene fusions and hematopoietic malignancies: common themes and new biologic insights. *Blood*, 118(24), 6247-6257.
- Greenberg, P. L. (2013). The multifaceted nature of myelodysplastic syndromes: clinical, molecular, and biological prognostic features. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 11(7), 877-885.
- Greenberg, P. L., Tuechler, H., Schanz, J., Sanz, G., Garcia-Manero, G., Solé, F., ... & Kantarjian, H. (2012). Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood*, 120(12), 2454-2465.
- Greenberg, P., Cox, C., LeBeau, M. M., Fenau, P., Morel, P., Sanz, G., ... & Ohyashiki, K. (1997). International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood*, 89(6), 2079-2088.
- Griffin, J. D. (2001). Point mutations in the FLT3 gene in AML. *Blood*, 97(8), 2193-2193.
- Grimwade, D. (2001). The clinical significance of cytogenetic abnormalities in acute myeloid leukaemia. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, 14(3), 497-529.

- Grimwade, D., & Freeman, S. D. (2014). Defining minimal residual disease in acute myeloid leukemia: which platforms are ready for “prime time”? *ASH Education Program Book, 2014(1)*, 222-233.
- Grimwade, D., & Freeman, S. D. (2014). Defining minimal residual disease in acute myeloid leukemia: which platforms are ready for “prime time”? *Blood, 124*, 3345-3355.
- Grimwade, D., Hills, R. K., Moorman, A. V., Walker, H., Chatters, S., Goldstone, A. H., ... & National Cancer Research Institute Adult Leukaemia Working Group. (2010). Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood, 116(3)*, 354-365.
- Grimwade, D., Ivey, A., & Huntly, B. J. (2016). Molecular landscape of acute myeloid leukemia in younger adults and its clinical relevance. *Blood, 127(1)*, 29-41.
- Grimwade, D., Walker, H., Harrison, G., Oliver, F., Chatters, S., Harrison, C. J., ... & Goldstone, A. H. (2001). The predictive value of hierarchical cytogenetic classification in older adults with acute myeloid leukemia (AML): analysis of 1065 patients entered into the United Kingdom Medical Research Council AML11 trial. *Blood, 98(5)*, 1312-1320.
- Grimwade, D., Walker, H., Oliver, F., Wheatley, K., Harrison, C., Harrison, G., ... & Goldstone, A. (1998). The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. *Blood, 92(7)*, 2322-2333.
- Herrera, J. E., Savkur, R., & Olson, M. O. (1995). The ribonuclease activity of nucleolar protein B23. *Nucleic Acids Research, 23(19)*, 3974-3980.
- Ho, A. D., Schetelig, J., Bochtler, T., Schaich, M., Schäfer-Eckart, K., Hänel, M., ... & Berdel, W. E. (2016). Allogeneic stem cell transplantation improves survival in patients with acute myeloid leukemia characterized by a high allelic ratio of mutant FLT3-ITD. *Biology of Blood and Marrow Transplantation, 22(3)*, 462-469.

- Hollink, I. H., van den Heuvel-Eibrink, M. M., Arentsen-Peters, S. T., Praticorona, M., Abbas, S., Kuipers, J. E., ... & Trka, J. (2011). NUP98/NSD1 characterizes a novel poor prognostic group in acute myeloid leukemia with a distinct HOX gene expression pattern. *Blood*, *118*(13), 3645-3656.
- Howlader, N., Noone, A., Krapcho, M., Garshell, J., Neyman, N., & Altekruse, S. (2013). SEER stat fact sheets: acute myeloid leukemia. 2013. Available from: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/amyl.html> (Retrieved at: 13/10/2019).
- Inaba, H., Coustan-Smith, E., Cao, X., Pounds, S. B., Shurtleff, S. A., Wang, K. Y., ... & Dahl, G. V. (2012). Comparative analysis of different approaches to measure treatment response in acute myeloid leukemia. *Journal of Clinical Oncology*, *30*(29), 3625.
- Jan, M., Snyder, T. M., Corces-Zimmerman, M. R., Vyas, P., Weissman, I. L., Quake, S. R., & Majeti, R. (2012). Clonal evolution of preleukemic hematopoietic stem cells precedes human acute myeloid leukemia. *Science Translational Medicine*, *4*(149), 149ra118.
- Jaso, J. M., Wang, S. A., Jorgensen, J. L., & Lin, P. (2014). Multi-color flow cytometric immunophenotyping for detection of minimal residual disease in AML: past, present and future. *Bone Marrow Transplantation*, *49*(9), 1129-1138.
- Jonas, B. A., & Greenberg, P. L. (2015). MDS prognostic scoring systems—past, present, and future. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, *28*(1), 3-13.
- Jourdan, E., Boissel, N., Chevret, S., Delabesse, E., Renneville, A., Cornillet, P., ... & Delaunay, J. (2013). Prospective evaluation of gene mutations and minimal residual disease in patients with core binding factor acute myeloid leukemia. *Blood*, *121*(12), 2213-2223.
- Kamentsky, L. A., Burger, D. E., Gershman, R. J., Kamentsky, L. D., & Luther, E. (1997). Slide-based laser scanning cytometry. *Acta Cytologica*, *41*(1), 123-143.
- Kantarjian, H., O'Brien, S., Cortes, J., Giles, F., Faderl, S., Jabbour, E., ... & Estey, E. (2006). Results of intensive chemotherapy in 998 patients age 65 years or older with acute myeloid leukemia or high-risk myelodysplastic syndrome: predictive

prognostic models for outcome. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, 106(5), 1090-1098.

Kihara, R., Nagata, Y., Kiyoi, H., Kato, T., Yamamoto, E., Suzuki, K., ... & Miyazaki, Y. (2014). Comprehensive analysis of genetic alterations and their prognostic impacts in adult acute myeloid leukemia patients. *Leukemia*, 28(8), 1586-1595.

Kita, K., Nakase, K., Miwa, H., Masuya, M., Nishii, K., Morita, N., ... & Ueda, T. (1992). Phenotypical characteristics of acute myelocytic leukemia associated with the t (8; 21)(q22; q22) chromosomal abnormality: frequent expression of immature B-cell antigen CD19 together with stem cell antigen CD34. *Blood*, 80(2), 470-477.

Klepin, H. D. (2015). Elderly acute myeloid leukemia: assessing risk. *Current Hematologic Malignancy Reports*, 10(2), 118-125.

Krönke, J., Bullinger, L., Teleanu, V., Tschürtz, F., Gaidzik, V. I., Kühn, M. W., ... & Späth, D. (2013). Clonal evolution in relapsed NPM1-mutated acute myeloid leukemia. *Blood*, 122(1), 100-108.

Kuchenbauer, F., Kern, W., Schoch, C., Kohlmann, A., Hiddemann, W., Haferlach, T., & Schnittger, S. (2005). Detailed analysis of FLT3 expression levels in acute myeloid leukemia. *Haematologica*, 90(12), 1617-1625.

Leith, C. P., Kopecky, K. J., Godwin, J., McConnell, T., Slovak, M. L., Chen, I. M., ... & Willman, C. L. (1997). Acute myeloid leukemia in the elderly: assessment of multidrug resistance (MDR1) and cytogenetics distinguishes biologic subgroups with remarkably distinct responses to standard chemotherapy. A Southwest Oncology Group study. *Blood*, 89(9), 3323-3329.

Levis, M. (2013). FLT3 mutations in acute myeloid leukemia: what is the best approach in 2013?. *ASH Education Program Book*, 2013(1), 220-226.

Li, H. Y., Deng, D. H., Huang, Y., Ye, F. H., Huang, L. L., Xiao, Q., ... & Liu, Z. F. (2015). Favorable prognosis of biallelic CEBPA gene mutations in acute myeloid leukemia patients: a meta-analysis. *European Journal of Haematology*, 94(5), 439-448.

- Liang, D. C., Shih, L. Y., Hung, I. J., Yang, C. P., Chen, S. H., Jaing, T. H., ... & Chang, W. H. (2003). FLT3-TKD mutation in childhood acute myeloid leukemia. *Leukemia*, *17*(5), 883-886.
- Loken, M. R., Alonzo, T. A., Pardo, L., Gerbing, R. B., Raimondi, S. C., Hirsch, B. A., ... & Meshinchi, S. (2012). Residual disease detected by multidimensional flow cytometry signifies high relapse risk in patients with de novo acute myeloid leukemia: a report from Children's Oncology Group. *Blood*, *120*(8), 1581-1588.
- Longobardi Givan, A. (2001). *Flow Cytometry: First Principles* (2nd Edition). New York: Wiley-Liss.
- Lowenberg, B., Downing, J. R., & Burnett, A. (1999). Acute myeloid leukemia. *New England Journal of Medicine*, *341*(14), 1051-1062.
- Ma, X. (2012). Epidemiology of myelodysplastic syndromes. *The American Journal of Medicine*, *125*(7), S2-S5.
- Malcovati, L., Della Porta, M. G., Strupp, C., Ambaglio, I., Kuendgen, A., Nachtigal, K., ... & Germing, U. (2011). Impact of the degree of anemia on the outcome of patients with myelodysplastic syndrome and its integration into the WHO classification-based Prognostic Scoring System (WPSS). *Haematologica*, *96*(10), 1433-1440.
- Malcovati, L., Germing, U., Kuendgen, A., Della Porta, M. G., Pascutto, C., Invernizzi, R., ... & Strupp, C. (2007). Time-dependent prognostic scoring system for predicting survival and leukemic evolution in myelodysplastic syndromes. *Journal of Clinical Oncology*, *25*(23), 3503-3510.
- Malcovati, L., Hellström-Lindberg, E., Bowen, D., Adès, L., Cermak, J., Del Cañizo, C., ... & Jansen, J. H. (2013). Diagnosis and treatment of primary myelodysplastic syndromes in adults: recommendations from the European LeukemiaNet. *Blood*, *122*(17), 2943-2964.
- Martelli, M. P., Pettirossi, V., Thiede, C., Bonifacio, E., Mezzasoma, F., Cecchini, D., ... & Manes, N. (2010). CD34+ cells from AML with mutated NPM1 harbor cytoplasmic mutated nucleophosmin and generate leukemia in immunocompromised mice. *Blood*, *116*(19), 3907-3922.

- Marti, G. E., Stetler-Stevenson, M., Blessing, J. J. H., & Fleisber, T. A. (2001). Introduction to flow cytometry. *Seminars in Hematology*, 38(2), 93-99.
- Mayer, R. J., Davis, R. B., Schiffer, C. A., Berg, D. T., Powell, B. L., Schulman, P., ... & Frei, E. (1994). Intensive postremission chemotherapy in adults with acute myeloid leukemia. *New England Journal of Medicine*, 331(14), 896-903.
- McCoy, J. P. (2002). Basic principles of flow cytometry. *Hematology/Oncology Clinics*, 16(2), 229-243.
- Medeiros, B. C., Othus, M., Estey, E. H., Fang, M., & Appelbaum, F. R. (2014). Unsuccessful diagnostic cytogenetic analysis is a poor prognostic feature in acute myeloid leukaemia. *British Journal of Haematology*, 164(2), 245-250.
- Medeiros, B. C., Othus, M., Fang, M., Roulston, D., & Appelbaum, F. R. (2010). Prognostic impact of monosomal karyotype in young adult and elderly acute myeloid leukemia: the Southwest Oncology Group (SWOG) experience. *Blood*, 116(13), 2224-2228.
- Mehranfar, S., Zeinali, S., Hosseini, R., Mohammadian, M., Akbarzadeh, A., & Feizi, A. H. P. (2017). History of Leukemia: Diagnosis and Treatment from Beginning to Now. *Galen Medical Journal*, 6(1), 12-22.
- Mekawy, M. A., Eissa, D. S., Hamza, M. T., Hamed, G. M., & Youssef, M. K. (2018). FLT3 receptor/CD135 expression by flow cytometry in acute myeloid leukemia: Relation to FLT3 gene mutations and mRNA transcripts. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*, 19(4), 345-351.
- Mendler, J. H., Maharry, K., Radmacher, M. D., Mrózek, K., Becker, H., Metzeler, K. H., ... & Nicolet, D. (2012). RUNX1 mutations are associated with poor outcome in younger and older patients with cytogenetically normal acute myeloid leukemia and with distinct gene and MicroRNA expression signatures. *Journal of Clinical Oncology*, 30(25), 3109.
- Metzeler, K. H., Herold, T., Rothenberg-Thurley, M., Amler, S., Sauerland, M. C., Görlich, D., ... & Ksienzyk, B. (2016). Spectrum and prognostic relevance of driver gene mutations in acute myeloid leukemia. *Blood*, 128(5), 686-698.
- Mrózek, K., Heerema, N. A., & Bloomfield, C. D. (2004). Cytogenetics in acute leukemia. *Blood Reviews*, 18(2), 115-136.

- Mrózek, K., Marcucci, G., Nicolet, D., Maharry, K. S., Becker, H., Whitman, S. P., ... & Pettenati, M. J. (2012). Prognostic significance of the European LeukemiaNet standardized system for reporting cytogenetic and molecular alterations in adults with acute myeloid leukemia. *Journal of Clinical Oncology*, *30*(36), 4515-4523.
- Muñoz, L., Aventín, A., Villamor, N., Juncà, J., Acebedo, G., Domingo, A., ... & Nomdedéu, J. F. (2003). Immunophenotypic findings in acute myeloid leukemia with FLT3 internal tandem duplication. *Haematologica*, *88*(6), 637-645.
- Nakao, M., Yokota, S., Iwai, T., Kaneko, H., Horiike, S., Kashima, K., ... & Misawa, S. (1996). Internal tandem duplication of the *flt3* gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia*, *10*(12), 1911-1918.
- National Cancer Institute (2012). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2009. Available from: https://seer.cancer.gov/archive/csr/1975_2009_pops09/index.html (Retrieved at: 13/10/2019).
- National Comprehensive Cancer Network - NCCN (2009). Clinical Practice Guidelines in Oncology: Myelodysplastic Syndromes. Available from: https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/default.aspx (Retrieved at: 15/10/2019).
- Nimer, S. D. (2008). Myelodysplastic syndromes. *Blood*, *111*(10), 4841-4851.
- Nösslinger, T., Reisner, R., Koller, E., Grüner, H., Tüchler, H., Nowotny, H., ... & Pfeilstöcker, M. (2001). Myelodysplastic syndromes, from French-American-British to World Health Organization: comparison of classifications on 431 unselected patients from a single institution. *Blood*, *98*(10), 2935-2941.
- Oelschlaegel, U., Koch, S., Mohr, B., Schaich, M., Falini, B., Ehninger, G., & Thiede, C. (2010). Rapid flow cytometric detection of aberrant cytoplasmic localization of nucleophosmin (NPMc) indicating mutant *NPM1* gene in acute myeloid leukemia. *Leukemia*, *24*(10), 1813.
- Ormerod, M. G. (2008). *Flow cytometry: a basic introduction*. Los Angeles, CA: De Novo Software.

- Ossenkoppele, G. J., & Schuurhuis, G. J. (2014). MRD in AML: it is time to change the definition of remission. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, 27(3-4), 265-271.
- Ossenkoppele, G., & Löwenberg, B. (2015). How I treat the older patient with acute myeloid leukemia. *Blood*, 125(5), 767-774.
- Palmisano, M., Grafone, T., Ottaviani, E., Testoni, N., Baccarani, M., & Martinelli, G. (2007). NPM1 mutations are more stable than FLT3 mutations during the course of disease in patients with acute myeloid leukemia. *Haematologica*, 92(9), 1268-1269.
- Papaemmanuil, E., Gerstung, M., Bullinger, L., Gaidzik, V. I., Paschka, P., Roberts, N. D., ... & Gundem, G. (2016). Genomic classification and prognosis in acute myeloid leukemia. *New England Journal of Medicine*, 374(23), 2209-2221.
- Paschka, P., Du, J., Schlenk, R. F., Gaidzik, V. I., Bullinger, L., Corbacioglu, A., ... & Ganser, A. (2013). Secondary genetic lesions in acute myeloid leukemia with inv (16) or t (16; 16): a study of the German-Austrian AML Study Group (AML5G). *Blood*, 121(1), 170-177.
- Paschka, P., Schlenk, R. F., Gaidzik, V. I., Herzig, J. K., Aulitzky, T., Bullinger, L., ... & Brossart, P. (2015). ASXL1 mutations in younger adult patients with acute myeloid leukemia: a study by the German-Austrian Acute Myeloid Leukemia Study Group. *Haematologica*, 100(3), 324-330.
- Patel, J. P., Gönen, M., Figueroa, M. E., Fernandez, H., Sun, Z., Racevskis, J., ... & Huberman, K. (2012). Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. *New England Journal of Medicine*, 366(12), 1079-1089.
- Pratcorona, M., Abbas, S., Sanders, M. A., Koenders, J. E., Kavelaars, F. G., Erpelinck-Verschueren, C. A., ... & Valk, P. J. (2012). Acquired mutations in ASXL1 in acute myeloid leukemia: prevalence and prognostic value. *Haematologica*, 97(3), 388-392.
- Pratcorona, M., Brunet, S., Nomdedéu, J., Ribera, J. M., Tormo, M., Duarte, R., ... & Bargay, J. (2013). Favorable outcome of patients with acute myeloid leukemia

- harboring a low-allelic burden FLT3-ITD mutation and concomitant NPM1 mutation: relevance to post-remission therapy. *Blood*, *121*(14), 2734-2738.
- Rahman, F. (2006). Introduction to flow cytometry. *Journal of Clinical Investigation*, *45*, 345-361.
- Ries, L. A. G., Eisner, M. P., Kosary, C. L., Hankey, B. F., Miller, B. A., Clegg, L., ... & Edwards, B. K. (2003). *SEER cancer statistics review, 1975–2000*. Bethesda, MD: National Cancer Institute, 2.
- Roederer, M. (2001). Spectral compensation for flow cytometry: visualization artifacts, limitations, and caveats. *Cytometry*, *45*(3), 194-205.
- Rowe, J. M., Neuberg, D., Friedenberg, W., Bennett, J. M., Paietta, E., Makary, A. Z., ... & Tallman, M. S. (2004). A phase 3 study of three induction regimens and of priming with GM-CSF in older adults with acute myeloid leukemia: a trial by the Eastern Cooperative Oncology Group. *Blood*, *103*(2), 479-485.
- Sakaguchi, M., Yamaguchi, H., Najima, Y., Usuki, K., Ueki, T., Oh, I., ... & Kako, S. (2018). Prognostic impact of low allelic ratio FLT3-ITD and NPM1 mutation in acute myeloid leukemia. *Blood Advances*, *2*(20), 2744-2754.
- Schlenk, R. F., Kayser, S., Bullinger, L., Kobbe, G., Casper, J., Ringhoffer, M., ... & Kindler, T. (2014). Differential impact of allelic ratio and insertion site in FLT3-ITD–positive AML with respect to allogeneic transplantation. *Blood*, *124*(23), 3441-3449.
- Schnittger, S., Eder, C., Jeromin, S., Alpermann, T., Fasan, A., Grossmann, V., ... & Kreuzer, K. A. (2013). ASXL1 exon 12 mutations are frequent in AML with intermediate risk karyotype and are independently associated with an adverse outcome. *Leukemia*, *27*(1), 82-91.
- Schnittger, S., Schoch, C., Dugas, M., Kern, W., Staib, P., Wuchter, C., ... & Haferlach, T. (2002). Analysis of FLT3 length mutations in 1003 patients with acute myeloid leukemia: correlation to cytogenetics, FAB subtype, and prognosis in the AMLCG study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease: Presented in part at the 42nd annual meeting of the American Society of Hematology, December 1-5, 2000, San Francisco, CA (abstract 3569). *Blood*, *100*(1), 59-66.

- Schnittger, S., Schoch, C., Kern, W., Mecucci, C., Tschulik, C., Martelli, M. F., ... & Falini, B. (2005). Nucleophosmin gene mutations are predictors of favorable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *Blood*, *106*(12), 3733-3739.
- Schuringa, J. J., Wierenga, A. T., Kruijer, W., & Vellenga, E. (2000). Constitutive Stat3, Tyr705, and Ser727 phosphorylation in acute myeloid leukemia cells caused by the autocrine secretion of interleukin-6. *Blood*, *95*(12), 3765-3770.
- Schwartz, A., Marti, G. E., Poon, R., Gratama, J. W., & Fernandez-Repollet, E. (1998). Standardizing flow cytometry: a classification system of fluorescence standards used for flow cytometry. *Cytometry*, *33*(2), 106-114.
- Sekeres, M. A. (2010). The epidemiology of myelodysplastic syndromes. *Hematology/ Oncology Clinics*, *24*(2), 287-294.
- Sekeres, M. A., & Cutler, C. (2014). How we treat higher-risk myelodysplastic syndromes. *Blood*, *123*(6), 829-836.
- Shapiro, H. M. (2003). *Practical Flow Cytometry* (4th Edition). John Wiley & Sons.
- Shapiro, H. M. (2004). The evolution of cytometers. *Cytometry Part A: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, *58*(1), 13-20.
- Shlush, L. I., Zandi, S., Mitchell, A., Chen, W. C., Brandwein, J. M., Gupta, V., ... & McLeod, J. L. (2014). Identification of pre-leukaemic haematopoietic stem cells in acute leukaemia. *Nature*, *506*(7488), 328-333.
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2016). Cancer statistics, 2016. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *66*(1), 7-30.
- Sill, H., Olipitz, W., Zebisch, A., Schulz, E., & Wölfler, A. (2011). Therapy-related myeloid neoplasms: pathobiology and clinical characteristics. *British Journal of Pharmacology*, *162*(4), 792-805.
- Spiekermann, K., Bagrintseva, K., Schwab, R., Schmieja, K., & Hiddemann, W. (2003). Overexpression and constitutive activation of FLT3 induces STAT5 activation in primary acute myeloid leukemia blast cells. *Clinical Cancer Research*, *9*(6), 2140-2150.

- Spoo, A. C., Lübbert, M., Wierda, W. G., & Burger, J. A. (2007). CXCR4 is a prognostic marker in acute myelogenous leukemia. *Blood*, *109*(2), 786-791.
- Steensma, D. P., McClure, R. F., Karp, J. E., Tefferi, A., Lasho, T. L., Powell, H. L., ... & Kaufmann, S. H. (2006). JAK2 V617F is a rare finding in de novo acute myeloid leukemia, but STAT3 activation is common and remains unexplained. *Leukemia*, *20*(6), 971-978.
- Stelzer, G. T., Marti, G., Hurley, A., McCoy, P., Lovett, E. J., & Schwartz, A. (1997). US-Canadian consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematologic neoplasia by flow cytometry: standardization and validation of laboratory procedures. *Cytometry*, *30*(5), 214-230.
- Swerdlow, S. H., Campo, E., Harris, N. L., Jaffe, E. S., Pileri, S. A., Stein, H., ... & Orazi, A. (2017). *WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues* (revised 4th edition). IARC: Lyon, 421.
- Szankasi, P., Jama, M., & Bahler, D. W. (2008). A new DNA-based test for detection of nucleophosmin exon 12 mutations by capillary electrophoresis. *The Journal of Molecular Diagnostics*, *10*(3), 236-241.
- Takahashi, S. (2011). Current findings for recurring mutations in acute myeloid leukemia. *Journal of Hematology & Oncology*, *4*(1), 36.
- Tarlock, K., Alonzo, T. A., Loken, M. R., Gerbing, R. B., Ries, R. E., Aplenc, R., ... & McKenney, A. (2017). Disease Characteristics and Prognostic Implications of Cell-Surface FLT3 Receptor (CD135) Expression in Pediatric Acute Myeloid Leukemia: A Report from the Children's Oncology Group. *Clinical Cancer Research*, *23*(14), 3649-3656.
- Terwijn, M., van Putten, W. L., Kelder, A., van der Velden, V. H., Brooimans, R. A., Pabst, T., ... & Preijers, F. W. (2013). High prognostic impact of flow cytometric minimal residual disease detection in acute myeloid leukemia: data from the HOVON/SAKK AML 42A study. *Journal of Clinical Oncology*, *31*(31), 3889-3897.
- Thiede, C., Creutzig, E., Illmer, T., Schaich, M., Heise, V., Ehninger, G., & Landt, O. (2006). Rapid and sensitive typing of NPM1 mutations using LNA-mediated PCR clamping. *Leukemia*, *20*(10), 1897-1899.

- Thiede, C., Koch, S., Creutzig, E., Steudel, C., Illmer, T., Schaich, M., & Ehninger, G. (2006). Prevalence and prognostic impact of NPM1 mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood*, *107*(10), 4011-4020.
- Thiede, C., Steudel, C., Mohr, B., Schaich, M., Schäkel, U., Platzbecker, U., ... & Ehninger, G. (2002). Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis: Presented in part at the 42nd Annual Meeting of the American Society of Hematology, December 1-5, 2000, San Francisco, CA (abstract 2334). *Blood*, *99*(12), 4326-4335.
- Thol, F., Kölking, B., Hollink, I. H. I., Damm, F., Van Den Heuvel-eibrink, M. M., Zwaan, C. M., ... & Hofmann, W. K. (2013). Analysis of NUP98/NSD1 translocations in adult AML and MDS patients. *Leukemia*, *27*(3), 750-754.
- Tsai, C. H., Hou, H. A., Tang, J. L., Liu, C. Y., Lin, C. C., Chou, W. C., ... & Liu, C. W. (2016). Genetic alterations and their clinical implications in older patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia*, *30*(7), 1485-1492.
- Valent, P., Horny, H. P., Bennett, J. M., Fonatsch, C., Germing, U., Greenberg, P., ... & Loken, M. (2007). Definitions and standards in the diagnosis and treatment of the myelodysplastic syndromes: consensus statements and report from a working conference. *Leukemia Research*, *31*(6), 727-736.
- Van Lochem, E. G., Van der Velden, V. H. J., Wind, H. K., Te Marvelde, J. G., Westerdaal, N. A. C., & Van Dongen, J. J. M. (2004). Immunophenotypic differentiation patterns of normal hematopoiesis in human bone marrow: Reference patterns for age-related changes and disease-induced shifts. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, *60*(1), 1-13.
- van Solinge, T. S., Zeijlemaker, W., Ossenkoppele, G. J., Cloos, J., & Schuurhuis, G. J. (2018). The interference of genetic associations in establishing the prognostic value of the immunophenotype in acute myeloid leukemia. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*, *94*(1), 151-158.
- Vardiman, J. (2012). The classification of MDS: from FAB to WHO and beyond. *Leukemia Research*, *36*(12), 1453-1458.

- Vardiman, J. W., Thiele, J., Arber, D. A., Brunning, R. D., Borowitz, M. J., Porwit, A., ... & Bloomfield, C. D. (2009). The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*, *114*(5), 937-951.
- Wahlin, A., Hörnsten, P., & Jonsson, H. (1991). Remission rate and survival in acute myeloid leukemia: impact of selection and chemotherapy. *European journal of haematology*, *46*(4), 240-247.
- Walter, M. J., Shen, D., Shao, J., Ding, L., White, B. S., Kandoth, C., ... & Fulton, R. (2013). Clonal diversity of recurrently mutated genes in myelodysplastic syndromes. *Leukemia*, *27*(6), 1275-1282.
- Westers, T. M., Alhan, C., Chamuleau, M. E., van der Vorst, M. J., Eeltink, C., Ossenkoppele, G. J., & van de Loosdrecht, A. A. (2010). Aberrant immunophenotype of blasts in myelodysplastic syndromes is a clinically relevant biomarker in predicting response to growth factor treatment. *Blood*, *115*(9), 1779-1784.
- Westers, T. M., Ireland, R., Kern, W., Alhan, C., Balleisen, J. S., Bettelheim, P., ... & Dräger, A. M. (2012). Standardization of flow cytometry in myelodysplastic syndromes: a report from an international consortium and the European LeukemiaNet Working Group. *Leukemia*, *26*(7), 1730-1741.
- Whitman, S. P., Maharry, K., Radmacher, M. D., Becker, H., Mrózek, K., Margeson, D., ... & Wen, J. (2010). FLT3 internal tandem duplication associates with adverse outcome and gene-and microRNA-expression signatures in patients 60 years of age or older with primary cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. *Blood*, *116*(18), 3622-3626.
- WHO (2016). Global Health Observatory Data (database on the Internet). WHO. (cited 01.02.16), 2016. Available from: http://www.who.int/gho/mortality_burden_disease/life_tables/life_tables/en/ (Retrieved at: 01/02/2016).
- Will, B., Zhou, L., Vogler, T. O., Ben-Neriah, S., Schinke, C., Tamari, R., ... & Heuck, C. (2012). Stem and progenitor cells in myelodysplastic syndromes show aberrant stage-specific expansion and harbor genetic and epigenetic alterations. *Blood*, *120*(10), 2076-2086.

- Wong, T. N., Ramsingh, G., Young, A. L., Miller, C. A., Touma, W., Welch, J. S., ... & Heath, S. (2015). Role of TP53 mutations in the origin and evolution of therapy-related acute myeloid leukaemia. *Nature*, *518*(7540), 552-555.
- Wu, M., Li, C., & Zhu, X. (2018). FLT3 inhibitors in acute myeloid leukemia. *Journal of Hematology & Oncology*, *11*(1), 133.
- Yamada, O., & Kawauchi, K. (2013). The role of the JAK-STAT pathway and related signal cascades in telomerase activation during the development of hematologic malignancies. *Jak-Stat*, *2*(4), e25256.
- Yamamoto, J. F., & Goodman, M. T. (2008). Patterns of leukemia incidence in the United States by subtype and demographic characteristics, 1997–2002. *Cancer Causes & Control*, *19*(4), 379-390.
- Yu, Y., Maggi, L. B., Brady, S. N., Apicelli, A. J., Dai, M. S., Lu, H., & Weber, J. D. (2006). Nucleophosmin is essential for ribosomal protein L5 nuclear export. *Molecular and Cellular Biology*, *26*(10), 3798-3809.
- Zola, H. (2000). Immunological applications of flow cytometry. *Journal of Immunological Methods*, *1*(243), 1-2.
- Zulkafli, Z., Zainun, Z., Hassan, M. N., Ab Rahman, W., Suriana, W., Othman, N. A., ... & Hassan, R. (2014). FLT3 Gene Mutation in Childhood Acute Leukemia: A Preliminary Study. *New Journal of Science*, *2014*, Article ID 735453. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/735453>.