



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΑΣ
Α' ΠΡΟΠΑΙΔΕΥΤΙΚΗ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΚΑΙ ΕΙΔΙΚΗ ΝΟΣΟΛΟΓΙΑ
Διευθυντής: Καθηγητής Πέτρος Π. Σφηκάκης

Μεταλλάξεις γονιδίων στην Οξεία Μυελογενή Λευχαιμία, συσχέτιση με τους ισχύοντες προγνωστικούς παράγοντες στα ποσοστά ύφεσης, υποτροπής, ολικής επιβίωσης.

Αικατερίνη Μπιτσάνη
Αιματολόγος

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Αθήνα 2021



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΑΣ
Α' ΠΡΟΠΑΙΔΕΥΤΙΚΗ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΚΑΙ ΕΙΔΙΚΗ ΝΟΣΟΛΟΓΙΑ
Διευθυντής: Καθηγητής Πέτρος Π. Σφηκάκης

Μεταλλάξεις γονιδίων στην Οξεία Μυελογενή Λευχαιμία, συσχέτιση με τους ισχύοντες προγνωστικούς παράγοντες στα ποσοστά ύφεσης, υποτροπής, ολικής επιβίωσης.

Αικατερίνη Μπιτσάνη
Αιματολόγος

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Αθήνα 2021

Ο ΟΡΚΟΣ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΡΑΤΗ

Ὅμιμι Ἀπόλλωνα ἰητρὸν, καὶ Ἄσκληπιόν, καὶ Ὑγίαν, καὶ Πανάκειαν, καὶ θεοὺς πάντας τε καὶ πάσας, ἱστορας ποιέμενος, ἐπιτελέα ποιήσω κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμὴν ὄρκον τόνδε καὶ ξυγγραφὴν τήνδε, ἤρῃσασθαι μὲν τὸν διδάξαντά με τὴν τέχνην ταύτην ἴσα γενέτησιν ἐμοῖσι, καὶ βίου κοινώσασθαι, καὶ χρεῶν χρηζῶντι μετάδοσιν ποιήσασθαι, καὶ γένος τὸ ἐξ αὐτέου ἀδελφοῖς ἴσον ἐπικρινέειν ἄρρεσι, καὶ διδάξεν τὴν τέχνην ταύτην, ἣν χρηζῶσι μαθηταῖν, ἄνευ μισθοῦ καὶ ξυγγραφῆς, παραγγελῆς τε καὶ ἀκροήσεως καὶ τῆς λοιπῆς ἀπάσης μαθήσεως μετάδοσιν ποιήσασθαι υἱοῖσι τε ἐμοῖσι, καὶ τοῖσι τοῦ ἐμὲ διδάξαντος, καὶ μαθηταῖσι συγγεγραμμένοιῖσι τε καὶ ἀρκασμένοις νόμῳ ἱητρικῷ, ἄλλω δὲ οὐδενί. Διαιτήμασί τε χρῆσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμὴν, ἐπὶ δηλήσει δὲ καὶ ἀδικίῃ εἴρξω. Οὐ δώσω δὲ οὐδὲ φάρμακον οὐδενὶ αἰτηθεὶς θανάσιμον, οὐδὲ ὑψηλῆσομαι συμβουλήν τοσιμδε, ὁμοίως δὲ οὐδὲ γυναικὶ πεσσὸν φθόριον δώσω. Ἄγνως δὲ καὶ ὁσίως διατηρήσω βίον τὸν ἐμὸν καὶ τέχνην τὴν ἐμήν. Οὐ τεμέω δὲ οὐδὲ μὴν λιθῶντας, ἐκχωρήσω δὲ ἐργάτησιν ἀνδράσι πρήξις τῆσδε. Ἐς οὐκίας δὲ ὁκόσας ἂν ἐσίω, ἐσλεύσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων, ἐκτὸς ἐὼν πάσης ἀδικίης ἐκουσίης καὶ φθορίας, τῆς τε ἄλλης καὶ ἀφροδισίων ἔργων ἐπὶ τε γυναικείων σαμμάτων καὶ ἀνδράων, ἐλευθέρων τε καὶ δοῦλων. Ἄ δ' ἂν ἐν θεραπείῃ ἦ ἴδω, ἢ ἀκούσω, ἢ καὶ ἄνευ θεραπείης κατὰ βίον ἀνθρώπων, ἂ μὴ χρή ποτε ἐκλαλέεσθαι ἔξω, σιγήσομαι, ἄρρητα ἠγείμενος εἶναι τὰ τοιαῦτα. Ὅρκον μὲν οὖν μοι τόνδε ἐπιτελέα ποιέοντι, καὶ μὴ ξυγχέοντι, εἴη ἐπαύρασθαι καὶ βίου καὶ τέχνης δοξαζομένῳ παρ' ἀπᾶσιν ἀνθρώποις ἐς τὸν αἰεὶ χρόνον, παραβαίνοντι δὲ καὶ ἐπιποροῦντι, τὰ ναντία τουτέων

ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Ημερομηνία αίτησης υποψήφιου Διδάκτορα:22/09/2010

Ημερομηνία ορισμού τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής από την Γ.Σ.Ε.Σ. της Ιατρικής Σχολής: 22/09/2010

ΜΕΛΗ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

Παναγιώτης Παναγιωτίδης

Καθηγητής Αιματολογίας ΕΚΠΑ, Α' Προπαιδευτική Παθολογική Κλινική, ΓΝΑ Λαϊκό, επιβλέπον μέλος

Μαρία-Χριστίνα Κυρτσώνη

Καθηγήτρια Αιματολογίας ΕΚΠΑ, Α' Προπαιδευτική Παθολογική Κλινική, ΓΝΑ Λαϊκό, μέλος

Μαρία Κ. Αγγελοπούλου

Καθηγήτρια Αιματολογίας ΕΚΠΑ, Αιματολογική Κλινική , ΓΝΑ Λαϊκό, μέλος

Ημερομηνία έγκρισης-ορισμού θέματος και πρωτοκόλλου: 20/01/2011

Ημερομηνία ορισμού θέματος Διδακτορικής Διατριβής: 02/09/2014

Ημερομηνία κατάθεσης 1^{ης} προόδου:10/09/2014

Ημερομηνία κατάθεσης 2^{ης} προόδου:31/08/2015

Ημερομηνία κατάθεσης 3^{ης} προόδου:20/01/2017

Ημερομηνία κατάθεσης Διδακτορικής Διατριβής: 24/06/2020

«Η έγκριση της Διδακτορικής Διατριβής υπό της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών, δεν υποδηλοί αποδοχή των γνωμών του συγγραφέως».

(Νόμος 5343/32 αρθρ. 202 & 2 και νόμος 1268/82, αρθρ. 50& 8)

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η οξεία μυελογενής λευχαιμία (ΟΜΛ) είναι μια κλωνική αιματολογική κακοήθεια που χαρακτηρίζεται από τη συσσώρευση βλαστικών κυττάρων στο μυελό των οστών, στο περιφερικό αίμα ή σε άλλους ιστούς. Είναι μια οντότητα με μεγάλη ετερογένεια ως προς τα μορφολογικά και γενετικά χαρακτηριστικά και την κλινική εικόνα. Το απαιτούμενο ποσοστό βλαστών για τον ορισμό της οξείας μυελογενούς λευχαιμίας είναι 20% μυελοβλάστες, μονοβλάστες ή προμονοκύτταρα, ή μεγακαρυοβλάστες στο μυελό των οστών. Η διάγνωση της οξείας μυελογενούς λευχαιμίας καθορίζεται επίσης όταν το ποσοστό των βλαστών είναι μικρότερο από 20%, εάν στον καρυότυπο των βλαστών ανευρίσκεται μία από τις ακόλουθες χρωμοσωμικές ανωμαλίες: $t(8;21)(q22;q22.1)$, $inv(16)(p13;q22)$ ή $t(16;16)(p13.1;q22)$ ή το γονίδιο σύντηξης *PML-RARA* που προκύπτει από την αντιμετάθεση $t(15;17)$.

Θεμελιώδους σημασίας για τη διαστρωμάτωση των ασθενών με οξεία μυελογενή λευχαιμία σε καλής, ενδιάμεσης και κακής πρόγνωσης, αποτελεί η μελέτη του καρυότυπου των βλαστών.

Δεδομένου του, ταχύτατα αναπτυσσόμενου, αριθμού των γονιδίων που αναγνωρίζονται ως στόχοι των επαναλαμβανόμενων σημειακών μεταλλάξεων στην οξεία μυελογενή λευχαιμία, μεγαλύτερος αριθμός μεταλλάξεων αρχίζει να εισέρχεται στη συνήθη κλινική αξιολόγηση, αποσκοπώντας στην εφαρμογή στοχευμένων θεραπειών.

Η ανίχνευσή τους διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αρχική ταξινόμηση των ασθενών σε κατηγορίες κινδύνου. Η σημασία τους έχει τονιστεί από το 2008 στην αναθεωρημένη κατάταξη κατά WHO της οξείας μυελογενούς λευχαιμίας, όταν για πρώτη φορά ενσωματώθηκαν και χαρακτηρίστηκαν οντότητες με παρουσία μεταλλαγμένων γονιδίων ως «provisional», οι οποίες είναι η οξεία μυελογενής λευχαιμία με μεταλλαγμένο *NPM1* και η οξεία μυελογενής λευχαιμία με μεταλλαγμένο *CEBPA*. Στην αναθεωρημένη κατάταξη κατά WHO του 2016, εισάγεται μια νέα οντότητα, η οποία είναι η οξεία μυελογενής λευχαιμία με *biallelic* μεταλλάξεις του *CEBPA* και μια νέα «provisional» οντότητα, η οξεία μυελογενής λευχαιμία με μεταλλαγμένο *RUNX1*.

Σύμφωνα με τις συστάσεις του ELN 2017 για την οξεία μυελογενή λευχαιμία, αναφορικά με τα γονίδια *NPM1* και *FLT3*, οι ασθενείς με μετάλλαξη *NPM1* και *FLT3-ITD* με χαμηλό (<0,5) φορτίο αλληλίου (allelic burden), δηλαδή οι *FLT3-ITD-low*, έχουν παρόμοιο, ευνοϊκό αποτέλεσμα με τους ασθενείς με μετάλλαξη *NPM1* αλλά όχι *FLT3-ITD*. Ως εκ τούτου και οι δύο ομάδες θεωρούνται τώρα ευνοϊκές. Αντίθετα, η οξεία μυελογενής λευχαιμία με wild-type *NPM1* και *FLT3-ITD* με υψηλό (> 0.5) φορτίο αλληλίου, δηλαδή οι *FLT3-ITD high*, έχουν δυσμενέστερη πορεία και κατατάσσονται στην ομάδα κακής πρόγνωσης.

Αφορμή για την παρούσα εργασία αποτέλεσε το υψηλό ενδιαφέρον σχετικά με το ρόλο των *IDH1* και *IDH2* μεταλλάξεων στη λευχαιμογένεση, γύρω στο 2010. Αρκετές μελέτες, όπως των Paschka et. al. και των Green et.al., προσπάθησαν να αξιολογήσουν τις συχνότητες των παραπάνω μεταλλάξεων και να διερευνήσουν τη σύνδεσή τους με κλινικά, κυτταρογενετικά και μοριακά χαρακτηριστικά, καθώς και με την έκβαση των ασθενών με οξεία μυελογενή λευχαιμία.

Σκοπός της μελέτης αυτής ήταν να προσδιοριστεί η συχνότητα των μεταλλάξεων των γονιδίων *IDH1* και *IDH2* σε ασθενείς που διαγνώστηκαν με οξεία μυελογενή λευχαιμία και έλαβαν θεραπεία στην Α' Προπαιδευτική Παθολογική Κλινική του Πανεπιστημίου Αθηνών και την Πανεπιστημιακή Αιματολογική Κλινική, καθώς και η ανάλυση του ρόλου τους στην επίτευξη ύφεσης, στην υποτροπή και την ολική επιβίωση.

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο σύνολο της, στο Ερευνητικό Αιματολογικό Εργαστήριο του Πανεπιστημίου Αθηνών, Μιχαλακοπούλου 176 (Υπεύθυνος εργαστηρίου: Παναγιώτης Παναγιωτίδης, Καθηγητής Αιματολογίας ΕΚΠΑ, Διευθυντής της Αιματολογικής Κλινικής του ΓΝΑ «Λαϊκό»). Η τριμελής επιτροπή αποτελούνταν από την Καθηγήτρια Αιματολογίας ΕΚΠΑ, κυρία Μαρία-Χριστίνα Κυρτσώνη, από την Καθηγήτρια Αιματολογίας ΕΚΠΑ, κυρία Μαρία Αγγελοπούλου και από τον επιβλέποντα Καθηγητή Αιματολογίας ΕΚΠΑ, κύριο Παναγιώτη Παναγιωτίδη.

Ευχαριστώ θερμά την Καθηγήτρια Αιματολογίας ΕΚΠΑ κυρία Μαρία-Χριστίνα Κυρτσώνη, για τη συμπαράστασή της καθ' όλη την πορεία της εκπόνησης της διδακτορικής μου διατριβής.

Επίσης, ευχαριστώ την Καθηγήτρια Αιματολογίας ΕΚΠΑ κυρία Μαρία Αγγελοπούλου, για τη συμμετοχή της στην τριμελή επιτροπή.

Ένα τεράστιο ευχαριστώ από καρδιάς στο δάσκαλο και μέντορά μου, τον Καθηγητή Αιματολογίας κύριο Παναγιώτη Παναγιωτίδη, Διευθυντή της Αιματολογικής Κλινικής του ΓΝΑ «Λαϊκό», για την υποστήριξή του καθ' όλη τη διάρκεια της διαδρομής μου για την εκπόνηση αυτής της διδακτορικής διατριβής. Τον ευγνωμονώ για το ουσιαστικό ενδιαφέρον και τη συμπαράσταση, όχι μόνο σε επιστημονικό αλλά και σε ανθρώπινο επίπεδο, για την εμπιστοσύνη του και για όλα όσα μου έμαθε και εξακολουθεί να μου μαθαίνει, με αστείρευτη διάθεση και υπομονή.

Ευχαριστώ θερμά τον Ιατρό Αιματολόγο, κύριο Γεώργιο Γεωργίου, γιατί αποτέλεσε την «πηγή έμπνευσης» αυτής της διδακτορικής διατριβής.

Ευχαριστώ θερμά τη γραμματέα μας, κυρία Ειρήνη Ρισσάκη, για τη πολύτιμη βοήθεια κατά τη διεκπεραίωση των γραφειοκρατικών διαδικασιών.

Επίσης, ευχαριστώ θερμά τις βιολόγους του Ερευνητικού Αιματολογικού Εργαστηρίου του Πανεπιστημίου Αθηνών, κυρία Μαρία Ρουμελιώτη, κυρία Αγγελική Στεφάνου, κυρία Ευτυχία Στάϊκου, και κυρία Δανάη Παλαιολόγου, για την πολύτιμη βοήθειά τους στην ολοκλήρωση επεξεργασίας των δειγμάτων.

Ευχαριστώ θερμά το Διευθυντή της Μονάδας Μεταμόσχευσης Μυελού των οστών του ΓΝΑ «Ευαγγελισμός», κύριο Νικόλαο Χαρχαλάκη και τους υπεύθυνους της Μονάδας, κύριο Δημήτριο Καρακάση και κύριο Ιωάννη Μπαλταδάκη, για την εξάμηνη εκπαίδευσή μου στο Κέντρο τους.

Ευχαριστώ θερμά τη Διευθύντρια της Αιμοδοσίας του ΓΝΑ «Λαϊκό», κυρία Όλγα Κατσαρού και τους Αιματολόγους, κυρία Παρασκευή Κώτση, κυρία Μαρία Γαβαλάκη, κυρία Άννα Κουραμπά, κυρία Γεωργία Κανελλοπούλου και κύριο Φάνη Αδρακτά, για την εξάμηνη εκπαίδευσή μου στο Τμήμα τους.

Ευχαριστώ θερμά τον Ιατρό Αιματολόγο, κύριο Γεώργιο Μπούτσικα για τις ατελείωτες ώρες που αφιέρωσε στη στατιστική μελέτη των δεδομένων και τον Καθηγητή Αιματολογίας, κύριο Θεόδωρο Βασιλακόπουλο για την επίβλεψη του άρθρου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω το Διευθυντή μου, κύριο Πέτρο Π. Σφηκάκη, Καθηγητή Ρευματολογίας ΕΚΠΑ, Διευθυντή της Α' Προπαιδευτικής Κλινικής, για την κατανόησή του για την καθυστέρηση της εκπόνησης της διδακτορικής μου διατριβής. Επίσης, τον ευχαριστώ θερμά γιατί, κατά την προσέλευσή μου, με έκανε να νιώσω «μέλος» αυτής της Κλινικής.

Τίποτα δεν θα είχε επιτευχθεί χωρίς την πολύτιμη βοήθεια της Ιατρού Αιματολόγου, κυρίας Άννας Ευθυμίου, που είχα την τύχη να γνωρίσω κατά τη διάρκεια της ειδικότητας και που αποτελεί πλέον ένα από τα σημαντικότερα άτομα στη ζωή μου. Συνοδοιπόρος σε όλη τη διάρκεια, με αμέριστη όρεξη και υπομονή, αφιερώνοντας ατελείωτες ώρες στο Εργαστήριο, προκειμένου να με εκπαιδεύσει στις μοριακές μεθόδους ανίχνευσης των, υπό μελέτη, γονιδίων.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ από καρδιάς στην οικογένειά μου για την αμέριστη συμπαράσταση, την υποστήριξη και την υπομονή τους, για τον ουσιαστικό τους ρόλο στην ολοκλήρωση αυτής της διατριβής. Στην οικογένεια «ανήκει» και η παιδική μου φίλη, που χωρίς τη συμπαράσταση και την εμπύχωσή της, δεν θα είχε επιτευχθεί ο στόχος.

Αφιερώνω τη διδακτορική μου διατριβή στην κόρη μου Κωνσταντίνα, που με έμαθε να συνεχίζω με πείσμα, έως την εκπλήρωση των στόχων και στο γιο μου Αλέξανδρο, που με «εφοδιάζει» με ενέργεια τις στιγμές που το κενό και η απόγνωση είχαν καταλάβει το μυαλό μου..

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

σελ.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	7
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	11
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ.....	13
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	15
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....	16
I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	22
1. ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΙΜΟΠΟΙΗΣΗ.....	23
1.1 Παράγοντες που επηρεάζουν την αιμοποίηση.....	23
1.2 Μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών.....	23
1.3 Κυτταρικά μόρια προσκόλλησης.....	25
1.4 Κυτταροκίνες.....	26
1.5 Μεταγραφικοί παράγοντες.....	28
1.6 Επιγενετικοί μηχανισμοί.....	28
II. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	31
1.ΟΞΕΙΑ ΜΥΕΛΟΓΕΝΗΣ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ.....	32
1.1 Το αρχέγονο λευχαιμικό κύτταρο.....	33
1.2 Παθοβιολογία της Οξείας Μυελογενούς Λευχαιμίας.....	36
1.3 Αιτιολογία της Οξείας Μυελογενούς Λευχαιμίας.....	37
α .Φάρμακα.....	37
β . Προϋπάρχουσα αιματολογική κακοήθεια.....	38
γ . Συγγενή σύνδρομα ανεπάρκειας μυελού των οστών.....	39
1.4 Γενετικές και επιγενετικές μεταβολές στην Οξεία Μυελογενή Λευχαιμία..	40
α . Χρωμοσωμικές ανωμαλίες.....	40
β . Επαναλαμβανόμενες γενετικές μεταλλάξεις.....	44
γ . Μεταγραφικοί παράγοντες.....	48
δ . Ογκοκατασταλτικά γονίδια.....	50
ε . Ρυθμιστές της μεθυλίωσης του DNA.....	51
στ. Γονίδια <i>IDH1</i> και <i>IDH2</i>	53
ζ. Το πολυκλωνικό σύμπλεγμα (PolycombComplex).....	59
η . Το σύμπλοκο spliceosome.....	60
θ . Το σύμπλοκο cohesin.....	61

I . Nucleophosmin.....	61
1.5 Επιγενετικές μεταβολές στην Οξεία Μυελογενή Λευχαιμία.....	63
1.6 Βιολογία της Οξείας Μυελογενούς Λευχαιμίας.....	64
α. Ο ρόλος του μικροπεριβάλλοντος του μυελού των οστών.....	64
1.7 Κριτήρια Αξιολόγησης της Οξείας Μυελογενούς Λευχαιμίας.....	65
1.8 Κλινικές εκδηλώσεις στην Οξεία Μυελογενή Λευχαιμία.....	69
1.9 Διάγνωση της Οξείας Μυελογενούς Λευχαιμίας.....	70
1.10 Συστήματα Ταξινόμησης της Οξείας Μυελογενούς Λευχαιμίας.....	72
1.11 Πρόγνωση της Οξείας Μυελογενούς Λευχαιμίας.....	79
1.12 Θεραπεία της Οξείας Μυελογενούς Λευχαιμίας.....	81
α.Θεραπεία εφόδου.....	84
β. Θεραπεία συντήρησης.....	85
γ. Θεραπεία διάσωσης.....	86
δ.Ανάλογα πουρινών.....	86
1.13 Νεότερες θεραπείες στην οξεία μυελογενή λευχαιμία.....	87
α.Αναστολείς <i>FLT3</i>	87
β.Gemtuzumab ozogamicin.....	88.
γ.CPX-351.....	89
δ.Αναστολείς <i>IDH</i>	90
ε.Glasdegib.....	91
στ. Venetoclax.....	91
III. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	104
IV. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	106
1. ΑΣΘΕΝΕΙΣ, ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	107
ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ.....	107
1.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ DNA.....	107
1.2 ΦΩΤΟΜΕΤΡΗΣΗ ΤΟΥ DNA.....	110
1.4 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR).....	110
1.4.1 Τα συστατικά της PCR.....	111
α. DNA πολυμεράση.....	111
β. Ολιγονουκλεοτιδικοί.εκκινητές.....	111
γ. Γενετικό υλικό – αλληλουχία στόχος.....	112
δ. Ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης και Mg ²⁺	112
ε. Νουκλεοτίδια (dNTPs).....	113

1.4.2 PCR για την ανίχνευση μεταλλάξεων του γονιδίου <i>NPM1</i>	115
1.4.3 PCR για την ανίχνευση του εσωτερικού σε σειρά αναδιπλασιασμού (Internal Tandem Duplication, ITD) του γονιδίου <i>FLT3</i>	117
1.4.4 PCR για την ανίχνευση μεταλλάξεων του γονιδίου <i>IDH1</i>	118
1.4.5 PCR για την ανίχνευση μεταλλάξεων του γονιδίου <i>IDH2</i>	120
1.5 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΩΝ PCR ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ.....	121
1.5.1 PCR - <i>NPM1</i>	122
1.5.2 PCR – <i>FLT3</i>	124
1.5.3 PCR – <i>IDH1</i>	126
1.5.4 PCR – <i>IDH2</i>	127
1.5.5. Καθαρισμός PCR προϊόντος (PCR product purification).....	128
α. Δέσμευση DNA.....	128
β. Έκλυση DNA.....	128
1.5.6. Ανάγνωση της αλληλουχίας βάσεων (Sequencing).....	129
2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	133
3. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	146
V. ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	154
VI. SUMMARY.....	158
VII. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	161
VIII. ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ.....	182
IX. ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΗ.....	192

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	σελ.
Εικόνα 1. Μεταλλάξεις <i>FLT3</i> . Σχηματική απεικόνιση των μεταλλάξεων <i>FLT3</i> σύμφωνα με την περιοχή υποδοχέα τους.....	45
Εικόνα 2. The FMS-like tyrosine kinase 3 (<i>FLT3</i>) pathway: Το μονοπάτι του <i>FLT3</i>	46

Εικόνα 3. Προτεινόμενο μοντέλο για το ρόλο του R-2-HG στην ογκογένεση.....	55
Εικόνα 4. <i>IDH1</i> gene location at chromosome 2.....	58
Εικόνα 5. <i>IDH2</i> gene location at chromosome 15.....	58
Εικόνα 6. Ρόλος του <i>NPM1</i>	62
Εικόνα 7. Μονοπάτια που μεταβάλλονται στην Οξεία Μυελογενή Λευχαιμία.....	67
Εικόνα 8. Αλγόριθμος διερεύνησης οξείας μυελογενούς λευχαιμίας.....	70

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Εικόνα 9. Qiagen Mini Spin Column.....	109
Εικόνα 10. Στάδια απομόνωσης γενωμικού DNA με στήλες που φέρουν μεμβράνη πυριτίου.....	109
Εικόνα 11. Τυπικό πρόγραμμα PCR για τον πολλαπλασιασμό ενός τμήματος DNA μεγέθους 500 bp	114
Εικόνα 12. Θερμικός κυκλοποιητής.....	115
Εικόνα 13. Τριχοειδική ηλεκτροφόρηση του γονιδίου wt <i>NPM1</i>	123
Εικόνα 14. Τριχοειδική ηλεκτροφόρηση του μεταλλαγμένου γονιδίου <i>NPM1</i> με την προσθήκη 4 ζευγών βάσεων.....	124
Εικόνα 15. Ηλεκτροφόρηση σε γέλη αгарόζης των προϊόντων της PCR για το γονίδιο <i>FLT3</i>	125
Εικόνα 16. Τριχοειδική ηλεκτροφόρηση (Capillary electrophoresis, CE) του γονιδίου wt <i>FLT3</i>	125
Εικόνα 17. Τριχοειδική ηλεκτροφόρηση του γονιδίου wt <i>FLT3</i> και του εσωτερικού σε σειρά διπλασιασμού (Internal Tandem Duplication) του γονιδίου <i>FLT3</i> (<i>FLT3-ITD</i>).....	126
Εικόνα 18. Ηλεκτροφόρηση σε γέλη αгарόζης των προϊόντων της PCR για το γονίδιο <i>IDH1</i>	127

Εικόνα 19. Αναπαράσταση της ενζυμικής μεθόδου αλληλούχησης κατά Sanger.....131

Εικόνα 20.Χρωματογράφημα αλληλούχησης κατά Sanger με ηλεκτροφόρηση σε τριχοειδή αυτόματου αναλυτή.....132

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΠΙΝΑΚΩΝ

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

σελ.

Πίνακας 1. Αιμοποιητικοί αυξητικοί παράγοντες.....27

Πίνακας 2. Ταξινόμηση της Οξείας Μυελογενούς Λευχαιμίας κατά FAB.....73

Πίνακας 3. Ταξινόμηση της Οξείας Μυελογενούς Λευχαιμίας- WHO 2016....75

Πίνακας 4. ELN 2017 ταξινόμηση βάσει του μοριακού προφίλ.....80

Πίνακας 5. Επιλεγμένα θεραπευτικά πρωτόκολλα για τη θεραπεία της οξείας μυελογενούς λευχαιμίας.....82

Πίνακας 6. NCCN κατευθυντήριες οδηγίες 2020, ενήλικες<60 ετών, θεραπεία εφόδου.....93

Πίνακας 7. NCCN κατευθυντήριες οδηγίες 2020, ενήλικες<60 ετών, θεραπευτικός αλγόριθμος μετά τη θεραπεία εφόδου.....94

Πίνακας 8. NCCN κατευθυντήριες οδηγίες 2020, ενήλικες<60 ετών, θεραπεία συντήρησης.....95

Πίνακας 9. NCCN κατευθυντήριες οδηγίες 2020, ενήλικες>60 ετών, θεραπεία εφόδου.....96

Πίνακας 10. NCCN κατευθυντήριες οδηγίες 2020, ενήλικες>60 ετών, θεραπευτικός αλγόριθμος μετά τη θεραπεία εφόδου.....97

Πίνακας 11. NCCN κατευθυντήριες οδηγίες 2020, ενήλικες>60 ετών, θεραπευτικός αλγόριθμος μετά τη θεραπεία λόγω υπολειπόμενης νόσου....	97
Πίνακας 12. NCCN κατευθυντήριες οδηγίες 2020, ενήλικες>60 ετών, ακατάλληλους για εντατική χημειοθεραπεία.....	98
Πίνακας 13. NCCN κατευθυντήριες οδηγίες 2020, ενήλικες>60 ετών, ακατάλληλους για εντατική χημειοθεραπεία, μετά την εκτίμηση ανταπόκρισης.....	99
Πίνακας 14. Κριτήρια ανταπόκρισης στην οξεία μυελογενή λευχαιμία (2017 ELN recommendations).....	101

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Πίνακας 15. Αποτελέσματα μεταλλάξεων των γονιδίων <i>NPM1</i> , <i>FLT3</i> , <i>IDH1</i> και <i>IDH2</i> στους 126 ασθενείς.....	134
Πίνακας 16. Χαρακτηριστικά 126 ασθενών.....	139

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ΟΜΛ: Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία

ΔΕΠ: Διάχυτη Ενδαγγειακή Πήξη

ΜΔΣ: Μυελοδυσπλαστικό Σύνδρομο

ΜΥΝ: Μυελοϋπερπλαστικό Νεόπλασμα

ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΕΣ

2-HG: 2-Hydroxyglutarate

5-hmC: 5-υδροξυ-μεθυλ-κυτοσίνη

5mC: 5-κυτοσίνη

AML1: Acute myeloid leukemia 1 protein

ASXL1: Additional Sex Combs-Like 1

BAD: BCL2 antagonist of cell death

bZip: basic DNA binding leucine zipper domain

C/EBP α : CCAAT-enhancer-binding proteins

CBF: Core Binding Factor

CBFB: Core-binding factor subunit beta

CD: Cluster of Differentiation

CR: Complete Remission

CREB: Cyclic adenosine monophosphate-response element binding protein

CRh: Complete Remission with partial hematologic recovery

CXCL12: C-X-C motif chemokine 12

DBA: Diamond-Blackfan anemia

DBD: DNA binding domain

DNMT3A: DNA Cytosine-5-Methyltransferase 3A

dNTPs: Νουκλεοτίδια

EFS: Event Free Survival

ELN: European Leukemia Net

EPO: Erythropoetin

ERK: Extracellular signal-regulated kinase

EVI1: Ecotropic viral integration site-1

EZH2: Zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit

ETO: Eight- twenty one

FAB: French American and British

FDA: Food and Drug Administration

FH: Fumarate Hydratase

FL: *Flt3*-ligand

FLT3: Fms-like tyrosine kinase 3

G6PD: Glucose-6-Phosphate-Dehydrogenase

G-CSF: Granulocyte-Colony Stimulating Factor

GM: Granulocyte-macrophages

GMPs: Granulocyte-Macrophage Progenitors

GRB2: Growth factor receptor-bound protein 2

HIF-1 α : Hypoxia Inducible Factor 1- α

ICAM: Intracellular Adhesion Molecule

IDH: Isocitrate dehydrogenase

IKZF1: IKAROS family zinc finger 1

IL: Interleukin

ITD: Internal Tandem Duplication

JAK2: Janus kinase 2

JmjC: Jumonji C domain-containing proteins

KDMs: JmjC domain-containing lysine demethylases

KRAS: Kirsten Rat Sarcoma Virus

LDH: Γαλακτική Αφυδρογονάση

LICs: Leukemia Initiating Cells

LIF: Leukemia inhibitory factor

LMPPs: Progenitors with Lymphomyeloid Potential

LMO-2: LIM domain only 2

MEKs: MAPK/ERK

MEPs: Megakaryocyte-Erythroid Progenitors

MLL: Mixed Lineage Leukemia

MPO: Myeloperoxidase

MRD: Minimal Residual Disease

MYH11: Smooth muscle myosin heavy chain 11

MAPK/ERK: Extracellular signal-Related Kinase

NGS: Next Generation Sequencing

NPM1: Nucleophosmin

NRAS: Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog

NSD1: Nuclear receptor binding SET domain protein 1

NSE: Non-specific esterase

NUP214: Nucleoporin 214

OS: Overall Survival

PAS: Periodic acid–Schiff

PCR: Polymerase Chain Reaction

PI3K: Phosphatidyl inositol 3-kinase

PML-RARA: Promyelocytic leukemia gene-retinoic acid receptor-alpha

PRC2: Polycomb Repressive Complex 2

PKO: Protein Kinase Activator

aPTT: Partial thromboplastin time

PT: Prothrombin time

RFS: Relapse Free Survival

R-2-HG: R-enantiomer of hydroxyglutarate

RSK: Ribosomal protein S6

RUNX1: Runt-related transcription factor 1

RUNX1T1: RUNX1 Partner Transcriptional Co-Repressor 1

sAML: secondary AML

SBB: Sudan black B

SBDS: Shwachman-Bodian-Diamond syndrome

SCF: Stem Cell Factor

SCL: Stem Cell Leukemia

SDF 1: Stromal cell-derived factor 1

SDH: Succinate Dehydrogenase

SF3B1: Splicing factor 3b

SHC: Src homology 2 domain-containing

SMC: Structural Maintenance of Chromosomes proteins

snRNA: small nuclear RNA

SRSF2: Serine And Arginine Rich Splicing Factor 2

STATs: Signal transducer and activators of transcription

TAL-1: T –cell Acute Leukemia Protein-1

t-AML: therapy-related AML

TCR: T-Cell Receptor

TET2: Ten-eleven translocation 2

TF: Transcription factor

TKD: Tyrosine kinase domain

TNF: Tumor necrosis factor

TPO:Thrombopoietin

TP53: Tumor protein

U2AF1: U2 Small Nuclear RNA Auxiliary Factor 1

VCAM: Vascular Cell Adhesion Molecule

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

WHO: World Health Organization

WT1: Wilms Tumor 1

ZRSR2 : Zinc Finger CCCH-Type, RNA Binding Motif And Serine/Arginine Rich 2

α-KG: Alpha-ketoglutarate

I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΙΜΟΠΟΙΗΣΗ

Η φυσιολογική αιμοποίηση ξεκινά με ένα πολυδύναμο κύτταρο που μπορεί με την ασύμμετρη κυτταρική διαίρεση να αυτοανανεώνεται και να οδηγήσει στις ξεχωριστές κυτταρικές γενεές. Τα στελαιχαιαία αιμοποιητικά κύτταρα έχουν την ικανότητα να επαναποικίζουν το μυελό των οστών, όταν τα αρχικά στελεχιαία κύτταρα εξαφανίζονται με ακτινοβολία ή χημειοθεραπεία.¹

Φυσιολογικά, υποβάλλονται σε κυτταρικές διαιρέσεις, 50 περίπου, προκαλώντας τη σύμπτυξη του μήκους των τελομερών τους, επηρεάζοντας έτσι τη βιωσιμότητά τους. Με την πρόοδο των ετών, ο αριθμός των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων ελαττώνεται και συσσωρεύονται γενετικές μεταλλάξεις, κατά μέσο όρο 8 στην ηλικία των 60 ετών².

1.1 Παράγοντες που επηρεάζουν την αιμοποίηση

Σημαντικό ρόλο στη διαδικασία παραγωγής των κυττάρων του αίματος (αιμοποίηση), διαδραματίζουν τα μόρια προσκόλλησης στην επιφάνεια των αρχέγονων και προγονικών κυττάρων, οι κυτταροκίνες-αυξητικοί παράγοντες με τους αντίστοιχους υποδοχείς τους, ενδοκυττάριοι μεταγραφικοί παράγοντες καθώς και επιγενετικοί μηχανισμοί³.

1.2 Μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών

Ο μυελός των οστών αποτελείται από κύτταρα του στρώματος και ένα δίκτυο πλούσιο σε μικρά αγγεία. Τα κύτταρα του στρώματος περιλαμβάνουν μεσεγχυματικά κύτταρα, λιποκύτταρα, ινοβλάστες, οστεοκύτταρα, ενδοθηλιακά κύτταρα και μακροφάγα. Μαζί με τους οστεοβλάστες ή τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα κύτταρα του στρώματος σχηματίζουν «φωλεές», οι οποίες εμπεριέχουν μόρια προσκόλλησης και κυτταροκίνες, δημιουργώντας έτσι το κατάλληλο περιβάλλον για την επιβίωση των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων, την αυτοανανέωσή τους και το σχηματισμό διαφορετικών κυτταρικών σειρών.⁴

Επιπλέον, τα κύτταρα του στρώματος εκκρίνουν ποικίλους αυξητικούς παράγοντες, απαραίτητους για την επιβίωση των αρχέγονων κυττάρων. Σε αυτούς συμπεριλαμβάνονται: ο παράγοντας των στελεχιαίων κυττάρων (Stem Cell Factor, SCF), ο αυξητικός παράγοντας των κοκκιοκυττάρων (Granulocyte-Colony Stimulating Factor, G-CSF), η θρομβοποιητίνη, ο αυξητικός παράγοντας του αγγειακού ενδοθηλίου (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF), το σύστημα αγγειοποιητίνης-1 (angiopoietin-1) που βρίσκεται στην επιφάνεια των οστεοβλαστών, η ιντερλευκίνη-8, το σύστημα αλληλεπίδρασης μεταξύ οστεοβλαστών και στελεχιαίων αιμοποιητικών κυττάρων Jagged 1 και Notch 1, η ομάδα πρωτεϊνών Wnt οι οποίες δρουν μέσω της υπερέκφρασης τόσο της ενεργοποιημένης β-κατενίνης όσο και των γονιδίων *HOXB4* και *Notch 1*, με τα τελευταία να εμπλέκονται στη διαδικασία αυτοανανέωσης των στελεχιαίων κυττάρων.⁵

Η θεμέλια ουσία αποτελείται από κολλαγόνο, φιμπρονεκτίνη, υαλουρονικό οξύ, πρωτεογλυκάνες και λαμινίνη. Οι λειτουργίες της αφορούν στη διαμόρφωση κατάλληλου περιβάλλοντος ώστε να προσκολλώνται τα κύτταρα στο στρώμα, στη ρύθμιση και τη διακίνηση των στελεχιαίων αιμοποιητικών κυττάρων και την εγκατάσταση των μεταμοσχευμένων άωρων προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων. Στις πρωτεογλυκάνες λαμβάνει χώρα η συγκέντρωση των διαλυτών αυξητικών παραγόντων. Μία επιπλέον σημαντική λειτουργία αποτελεί η μετάδοση σημάτων από τα στοιχεία του στρώματος στα αιμοποιητικά κύτταρα, λειτουργία που προάγει την ανάπτυξή τους και αναστέλλει την απόπτωσή τους. Η ένταση των σημάτων αυτών επιτυγχάνεται με ποικίλες οδούς, όπως με μεταβολές στις συγκεντρώσεις και στην ενεργότητα των ενζύμων, καθώς και με την ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων.⁶

1.3 Κυτταρικά μόρια προσκόλλησης

Τα μόρια προσκόλλησης μπορεί να ταξινομηθούν στις ακόλουθες ομάδες:

A) Οι πρωτεΐνες της εξωκυττάριας ουσίας, όπως ο παράγοντας von Willebrand, το κολλαγόνο και η φιβρονεκτίνη, είναι μακρομόρια που αποτελούνται από μικρότερες δομικές υπομονάδες, με διαφορετική ικανότητα προσκόλλησης η κάθε μία. Ως εκ τούτου, οι πρωτεΐνες προσκόλλησης αλληλεπιδρούν μεταξύ τους, αλλά και με τους υποδοχείς, σε πολλαπλά σημεία, με αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση της δομής του στρώματος.⁷

B) Οι ιντεγκρίνες (integrins) είναι διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες που υφίστανται ως ετεροδιμερή αποτελούμενες από μία α και μία β αλυσίδα. Το ενδοκυττάριο τμήμα τους πυροδοτεί την παραγωγή σημάτων, όπως τη φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών και τη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού διαμέσου της ενεργοποίησης της οδού ras. Υπάρχουν δύο οικογένειες β ιντεγκρινών που εμπλέκονται στην αιμοποίηση, οι β1 και οι β2 ιντεγκρίνες. Η ειδικότητα πρόσδεσης των ιντεγκρινών καθορίζεται κυρίως από την α αλυσίδα.⁸

Γ) Η οικογένεια των ανοσοσφαιρινών αποτελεί το 50% των γλυκοπρωτεϊνών που βρίσκονται στην επιφάνεια των λευκοκυττάρων. Τα μόρια προσκόλλησης τύπου ανοσοσφαιρίνης, όπως ICAM-1 και 2 (Intracellular Adhesion Molecule) και VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule) που εκφράζονται στα ενδοθηλιακά κύτταρα, καθώς και το ICAM-3 που εκφράζεται στα λευκοκύτταρα, προάγουν την επαφή κυττάρου με κύτταρο διαμέσου της αναγνώρισης ιντεγκρινών στην επιφάνεια των λευκοκυττάρων. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μορίων προσκόλλησης τύπου ανοσοσφαιρίνης, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη διαδικασία αναγνώρισης των αντιγονικών πεπτιδίων στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα από τα T- λεμφοκύτταρα.⁹

Δ) Άλλοι υποδοχείς προσκόλλησης που δρουν ως διαμεσολαβητές μεταξύ των πρωτεϊνών αποτελούν οι καντχερίνες (cadherins), ο υποδοχέας CD36 και το σύστημα GPIIb/IX/V. Οι καντχερίνες διαδραματίζουν ρόλο στην υποστήριξη της αρχιτεκτονικής των ιστών και στην προσκόλληση των κυττάρων κατά την

εμβρυϊκή ανάπτυξη. Το CD36 αποτελεί υποδοχέα πολλών κυτταρικών τύπων, στα αιμοπετάλια, ωστόσο εμπλέκεται ως υποδοχέας κυρίως του κολλαγόνου. Το σύμπλεγμα GPIb/IX/V ανευρίσκεται στα αιμοπετάλια και αποτελείται από υπομονάδες πλούσιες σε λευκίνη.¹⁰

Ε) Η ομάδα των υποδοχέων προσκόλλησης της λεκτίνης, στην οποία περιλαμβάνονται το CD44, οι σελεκτίνες και οι υποδοχείς λεκτίνης που συνδέονται με το σιαλικό οξύ. Το CD44 είναι μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη η οποία εκφράζεται σε πολλά κύτταρα. Καθοριστικό ρόλο για τη δομική και λειτουργική πολυμορφία αυτής της πρωτεΐνης, αποτελεί το εναλλακτικό μάτισμα (alternative splicing). Σε ένα μικρό ποσοστό το CD44 προσκολλάται σε υαλουρονικό οξύ, τροποποιώντας με αυτόν τον τρόπο συγκεκριμένες λειτουργίες των λευκοκυττάρων.¹¹ Οι σελεκτίνες είναι διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες με μια περιοχή πλούσια σε λεκτίνη. Παρεμβάλλονται στην προσκόλληση των κυττάρων στο στρώμα και μεταδίδουν ενδοκυττάρια σήματα. Υπάρχουν τρία στενά συσχετιζόμενα μέλη στην ομάδα των σελεκτινών: η L-σελεκτίνη, (leukocyte selectin), η E-σελεκτίνη (endothelial selectin) και η P-σελεκτίνη (platelet selectin).

1.4 Κυτταροκίνες

Οι αυξητικοί παράγοντες (κυτταροκίνες) που συμμετέχουν στον έλεγχο της αιμοποίησης, ονομάζονται αιμοποιητικοί αυξητικοί παράγοντες. Είναι γλυκοπρωτεΐνες που ρυθμίζουν τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των προγονικών κυττάρων και προάγουν τη λειτουργία των ώριμων κυττάρων. Τα κύτταρα του στρώματος είναι η κύρια πηγή των αυξητικών παραγόντων, εκτός από την ερυθροποιητίνη η οποία κατά 90% συντίθεται στο νεφρό και τη θρομβοποιητίνη της οποίας η σύνθεση λαμβάνει χώρα κατά κύριο λόγο στο ήπαρ. Οι αιμοποιητικοί παράγοντες είναι δυνατόν να ασκούν διεγερτική, ενισχυτική ή ανασταλτική δράση. Αδρά, διαχωρίζονται σε τέσσερις κατηγορίες ανάλογα με την κυτταρική σειρά στην οποία δρουν:

1.Αυξητικοί παράγοντες που δρουν στην κοκκιοκυτταρική και μονοκυτταρική σειρά: SCF, GM-CSF, G-CSF, IL-5, IL-3, IL-6.

2.Αυξητικοί παράγοντες που δρουν στην ερυθροκυτταρική σειρά: IL-3, IL-9, GM-CSF, SCF, EPO, IGF-1.

3.Αυξητικοί παράγοντες που δρουν στη μεγακαρυοκυτταρική σειρά: IL-3, IL-6, GM-CSF, SCF, IL-11, TPO, LIF, EPO.

4.Αυξητικοί παράγοντες που δρουν στην ανάπτυξη των λεμφοκυττάρων: IL-7, SCF, SDF-1 (Stroma Derived Factor-1), FL (*Flt3*-ligand), IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-15.

Στον παρακάτω πίνακα διαχωρίζονται οι αιμοποιητικοί αυξητικοί παράγοντες ανάλογα με το στάδιο ωρίμανσης.(Πίνακας 1)

Πίνακας 1. Αιμοποιητικοί αυξητικοί παράγοντες

Ρόλος	Αιμοποιητικοί αυξητικοί παράγοντες
Δράση στα κύτταρα του στρώματος	IL-1, TNF
Δράση στα πολυδύναμα στελεχιαία κύτταρα	SCF, FLT3-L, VEGF
Δράση στα πολυδύναμα προγονικά κύτταρα	IL-3, GM-CSF, GM-SCF, IL-6, G-CSF, Thrombopoietin
Δράση στα «δεσμευμένα» προγονικά κύτταρα	G-CSF, M-CSF, IL-5, Erythropoietin, Thrombopoietin

Οι αυξητικοί παράγοντες SCF και *FLT3*-ligand δρουν στα στελεχιαία και προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα και στα πρόδρομα κύτταρα της κοκκιδώδους και της λεμφικής σειράς, οι παράγοντες IL-3 και GM-CSF είναι πολυδύναμοι αυξητικοί παράγοντες και η δράση τους εκδηλώνεται σε συνέργεια με άλλες κυτταροκίνες. Οι παράγοντες G-CSF και θρομβοποιητίνη ενισχύουν τη δράση των SCF, FLT3, IL-3 και GM-SCF στην επιβίωση και διαφοροποίηση των πρόδρομων αιμοποιητικών κυττάρων.

Τα αρχέγονα κύτταρα είναι ικανά να ανταποκρίνονται στους αυξητικούς παράγοντες, με διέγερση της παραγωγής μίας ή άλλης κυτταρικής σειράς όταν παραστεί ανάγκη.¹²

1.5 Μεταγραφικοί παράγοντες

Οι μεταγραφικοί παράγοντες είναι πρωτεΐνες οι οποίες προσδένονται σε συγκεκριμένες αλληλουχίες του DNA εντός των περιοχών των διεγερτών ή των ενισχυτών, προκειμένου να επιτευχθεί η μεταγραφή του DNA σε RNA.¹² Η ισορροπία μεταξύ της αυτοανανέωσης και της διαφοροποίησης των στελεχιαίων αιμοποιητικών κυττάρων εξασφαλίζεται με τη συμμετοχή μεταγραφικών παραγόντων διαφορετικών κατηγοριών.¹³ Σημαντικοί για τη φυσιολογία των στελεχιαίων κυττάρων είναι οι: SCL (Stem Cell Leukemia), GATA-2, AML-1 (Acute Myeloid Leukemia-1), LMO-2 (LIM Only Protein-2).

Ο μεταγραφικός παράγοντας SCL ή TAL-1 (T-cell Acute Leukemia Protein-1) παίζει σημαντικό ρόλο στην παραγωγή της ερυθράς σειράς.¹⁴ Ο παράγοντας GATA-2 διαδραματίζει ουσιαστικό ρόλο στην επιβίωση και αυτοανανέωση των στελεχιαίων αιμοποιητικών κυττάρων.¹⁵ Ο παράγοντας LMO-2 συμμετέχει στην ερυθροποίηση και η «παράδοση» έκφρασή του στα T λεμφοκύτταρα οδηγεί στην ανάπτυξη της Οξείας Λεμφοβλαστικής Λευχαιμίας.¹⁶

Ο παράγοντας AML-1 εκφράζεται στον αιμοποιητικό ιστό κατά τη διάρκεια της μυελικής αιμοποίησης.¹⁷

Στα κακοήθη αιματολογικά νοσήματα οι περισσότεροι μεταγραφικοί παράγοντες υπόκεινται σε σωματικές μεταλλάξεις και, ως εκ τούτου, η διαταραχή της φυσιολογικής ανάπτυξης υποδηλώνει την ανάπτυξη κακοήθειας.

1.6 Επιγενετικοί μηχανισμοί

Οι επιγενετικές μεταβολές οδηγούν σε ένα κληρονομήσιμο φαινότυπο που προκύπτει από αλλαγές σε ένα χρωμόσωμα και όχι λόγω αλλαγών στην

αλληλουχία του DNA.¹⁸ Οι επιγενετικές τροποποιήσεις περιλαμβάνουν τη μεθυλίωση του DNA, την αναδιάταξη της χρωματίνης, τροποποιήσεις στις ιστόνες καθώς και μηχανισμούς και μονοπάτια που περιλαμβάνουν μη κωδικοποιούντα RNAs. Με την αλλαγή στη δομή της χρωματίνης, τροποποιείται η έκφραση των γονιδίων που εμπλέκονται στη διατήρηση της ισορροπίας μεταξύ της αυτοανανέωσης και της δημιουργίας κυτταρικών σειρών. Οι επιγενετικές μεταβολές έχουν ενοχοποιηθεί για την παθογένεια των αιματολογικών κακοηθειών. Σε αντίθεση με τις γενετικές μεταλλάξεις, οι επιγενετικές μεταβολές είναι αναστρέψιμες, γεγονός που τις καθιστά ελκυστικούς στόχους για καινοτόμες θεραπείες αιματολογικών κακοηθειών.^{19,20}

Η μεθυλίωση του DNA διαδραματίζει κυρίαρχο ρόλο στην αυτοανανέωση των στελεχιαίων κυττάρων και στη διαφοροποίησή τους. Μέσω της πρόσληψης συμπλεγμάτων πρωτεϊνών, το μεθυλιωμένο DNA οδηγεί σε καταστολή της μεταγραφής των γειτονικών γονιδίων.²¹

Στα κύτταρα των θηλαστικών, η μεθυλίωση του DNA λαμβάνει χώρα στην κυτιδίνη (νουκλεοτίδιο που προκύπτει από τη σύνδεση της κυτοσίνης με ένα δακτύλιο ριβόζης) και πιο συγκεκριμένα στις CpG νησίδες, οι οποίες αποτελούν συσσωματώματα δινουκλεοτιδίων. Σε αιματολογικές κακοήθειες, όπως για παράδειγμα σε καταστάσεις εξέλιξης μυελοδυσπλαστικού συνδρόμου σε οξεία μυελογενή λευχαιμία, οι εν λόγω νησίδες υπόκεινται σε υπερμεθυλίωση και τα γονίδια που εδράζονται σε αυτές, συμπεριλαμβανομένων και των ογκοκατασταλτικών γονιδίων, μεταπίπτουν σε ανενεργή (σιωπηλή) κατάσταση.²²

Η οικογένεια των μεθυλτρανσφερασών περιλαμβάνει τις de novo DNA μεθυλτρανφεράσες DNMT3A (DNA-Methyltransferase 3A) και DNMT3B (DNA-Methyltransferase 3-beta) οι οποίες «εγκαθιστούν» τη μεθυλίωση, ενώ η DNMT1 (DNA Cytosine-5-Methyltransferase 1) διατηρεί τη μεθυλίωση του DNA.²³

Οι ιστόνες είναι μια οικογένεια βασικών πρωτεϊνών στον πυρήνα των ευκαρυωτικών κυττάρων, όπου συνδέονται με το DNA και συμμετέχουν στη διαδικασία συμπύκνωσης της χρωματίνης. Το DNA και οι ιστόνες

δημιουργούν τα νουκλεόσωμα, τα οποία στη συνέχεια σχηματίζουν μία «δέσμη» που ονομάζεται χρωματίνη και ακολούθως οι δύο χρωματίνες σχηματίζουν ένα χρωμόσωμα. Οι ιστόνες εμπλέκονται στην αυτοανανέωση των αιμοποιητικών κυττάρων με υπερέκφραση ή knockout των ρυθμιστών της χρωματίνης.^{24,25}

II. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.ΟΞΕΙΑ ΜΥΕΛΟΓΕΝΗΣ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ

Η πρώτη περιγραφή περιστατικού με οξεία μυελογενή λευχαιμία έγινε το 1827 από τον Alfred-Armand-Louis-Marie Velpeau και αφορούσε σε έναν ανθοπώλη 63 ετών ο οποίος παρουσίαζε μία ασθένεια που χαρακτηριζόταν από πυρετό, αδυναμία, διόγκωση ήπατος και σπληνός και λίθους στην ουροδόχο κύστη. Ο Velpeau παρατήρησε ότι το αίμα του ασθενούς ήταν σαν «χυλός» (gruel), θεωρώντας ότι οφείλεται στην παρουσία λευκών σωματιδίων.²⁶ Το 1845 ένας παθολόγος από το Εδιμβούργο, ο J.H. Bennett, περιέγραψε μια σειρά ασθενών που αποβίωσαν με αλλαγή «στο χρώμα και στην πυκνότητα του αίματος» και σπληνομεγαλία, χρησιμοποιώντας τον όρο «leucocythemia».²⁷

Ο όρος «λευχαιμία» επινοήθηκε από το διάσημο Γερμανό παθολόγο Rudolf Virchow το 1856. Ως πρωτοπόρος στη χρήση του μικροσκοπίου στην παθολογία, ο Virchow ήταν ο πρώτος που περιέγραψε την περίσσεια λευκών αιμοσφαιρίων στους ασθενείς που είχαν περιγραφεί από τους Velpeau και Bennett. Δεδομένου ότι ο Virchow δεν ήταν βέβαιος για την αιτιολογία της περίσσειας των λευκών αιμοσφαιρίων, χρησιμοποίησε τον καθαρά περιγραφικό όρο «λευχαιμία» (στα Ελληνικά «λευκό αίμα» για να αναφερθεί στην πάθηση.²⁸

Το 1877 ο Paul Ehrlich ανέπτυξε μία τεχνική χρώσης σε επιχρίσματα περιφερικού αίματος που του επέτρεψε να περιγράψει λεπτομερώς τα φυσιολογικά και τα παθολογικά λευκά αιμοσφαίρια. Το 1889 ο Wilhelm Ebstein εισήγαγε τον όρο «οξεία λευχαιμία» ώστε να διαχωρίσει τις ταχέως εξελισσόμενες και θανατηφόρες λευχαιμίες από τις χρόνιες λευχαιμίες.²⁹

Η ορολογία «μυελογενής» επινοήθηκε από τον Franz Ernst Christian Neumann το 1869, καθώς ήταν ο πρώτος που αναγνώρισε ότι τα λευκά αιμοσφαίρια προέρχονται από το μυελό των οστών.

Η τεχνική της εξέτασης του μυελού των οστών για τη διάγνωση της λευχαιμίας περιγράφηκε πρώτη φορά το 1879 από τον Mosler.³⁰ Τέλος, ο όρος μυελοβλάστη χρησιμοποιήθηκε για το χαρακτηρισμό των λευχαιμικών κυττάρων από τον Otto Naegeli το 1900, ο οποίος διαχώρισε τις λευχαιμίες σε μυελικής και λεμφικής προέλευσης.³¹

1.1 Το αρχέγονο λευχαιμικό κύτταρο

Η πρώτη απόδειξη προέλευσης της κακοήθειας από αρχέγονο κύτταρο προήλθε από μελέτες σε ασθενείς με οξεία μυελογενή λευχαιμία από τον Blair και τους συνεργάτες το 1977 και στη συνέχεια από τους Bonnet και Dick. Οι μελέτες αυτές κατέδειξαν ότι κατά κανόνα τα λευχαιμικά κύτταρα δεν ήταν ικανά να πολλαπλασιαστούν εκτενώς και ότι ένα υποσύνολο των κυττάρων αποτελούσαν τον παθολογικό κλώνο. Στις μελέτες αυτές ένα μικρό υποσύνολο λευχαιμικών κυττάρων CD34(+), CD38(-) αποδείχτηκε ότι είναι τα μόνα κύτταρα ικανά να αναπτύξουν λευχαιμία όταν μεταφερθούν σε ποντίκια. Τα στελεχιαία αιμοποιητικά κύτταρα παράγουν πολυδύναμα προγονικά κύτταρα, εν δυνάμει ικανά να δημιουργήσουν κύτταρα της μυελικής και λεμφικής σειράς (Progenitors with Lymphomyeloid Potential, LMPPs) τα οποία ορίζονται ως lineage negative CD34(+), CD38(-) κύτταρα, καθώς και πρόδρομα κύτταρα της μυελικής σειράς που εδράζονται σε CD34(+), CD38(+) «διαμερίσματα».³² Μεταξύ των πρόδρομων κυττάρων της μυελικής σειράς, οι πρόδρομες μορφές των κοκκιοκυττάρων-μακροφάγων (Granulocyte-Macrophage Progenitors, GMPs) και των πρόδρομων της μεγακαρυοκυταρικής-ερυθράς σειράς (Megakaryocyte-Erythroid Progenitors, MEPs), μπορούν να διακριθούν βάσει της διαφορικής έκφρασης των CD123 (IL3RA), CD110 (MPL), CD45RA.

Η αρχική παρατήρηση ότι τα κύτταρα που προκαλούν λευχαιμία (Leukemia Initiating Cells, LICs) εδράζονται σε CD34(+), CD38(-) «διαμερίσματα», κατέδειξε ότι τα αρχέγονα λευχαιμικά κύτταρα ανευρίσκονται σπάνια και ομοιάζουν με τα φυσιολογικά αρχέγονα κύτταρα έχοντας ορισμένους κοινούς ανοσοφαινοτυπικούς δείκτες. Εντούτοις, τα επόμενα δεδομένα κατέδειξαν ότι το κύτταρο προέλευσης οποιασδήποτε κακοήθειας μυελικής προέλευσης, χαρακτηρίζεται από έναν συνδυασμό γενετικών και επιγενετικών αλλοιώσεων που συνοδεύουν κάθε ασθενή. Επιπροσθέτως, η ομάδα του Vyas αποκάλυψε ότι υφίστανται δύο πληθυσμοί με λευχαιμική δραστηριότητα στη CD34(+) λευχαιμία. Ο ένας πληθυσμός μοιράζεται τον ανοσοφαινότυπο των φυσιολογικών LMPPs και ο άλλος αντικατοπτρίζει τον πληθυσμό GMPs. Η λευχαιμική δραστηριότητα συγκεκριμένων ογκογονιδίων εξαρτάται άμεσα από το συγκεκριμένο ογκογονίδιο καθώς και από το κύτταρο στόχο³³.

Ως εκ τούτου, τα αρχέγονα λευχαιμικά κύτταρα ορίζονται ευκολότερα για συγκεκριμένα είδη λευχαιμιών, όπως για παράδειγμα χρόνιες λευχαιμίες που χαρακτηρίζονται από συγκεκριμένες αντιμεταθέσεις ή σημειακές μεταλλάξεις, αλλά είναι δυσκολότερο στις οξείες μυελογενείς λευχαιμίες με φυσιολογικό καρυότυπο. Για παράδειγμα, η έκφραση του μεταγράφου AML1-ETO που προκύπτει από την αντιμετάθεση t(8;21) στην οξεία μυελογενή λευχαιμία, ανιχνεύεται όχι μόνο στα λευχαιμικά κύτταρα αλλά και σε φυσιολογικά στελεχιαία αιμοποιητικά κύτταρα στους ασθενείς με οξεία μυελογενή λευχαιμία που βρίσκονται σε ύφεση. Τα κύτταρα αυτά δεν είναι λευχαιμικά και διαφοροποιούνται σε κύτταρα της ερυθράς και της μυελικής σειράς *in vitro*, όπως τα στελεχιαία αιμοποιητικά κύτταρα χωρίς το μετάγραφο AML1-ETO. Μελέτες έχουν δείξει ότι τα στελεχιαία αυτά αιμοποιητικά κύτταρα που εκφράζουν το συγκεκριμένο μετάγραφο, έχουν διαφορετική ικανότητα αυτοανανέωσης, ωστόσο δεν αναπτύσσεται λευχαιμία εάν δεν λάβουν χώρα επιπρόσθετες γενετικές ανωμαλίες. Επίσης, τα κύτταρα αυτά εδράζονται σε lineage negative CD34(+), CD38(-) υποπληθυσμό ο οποίος έχει ίδιο ανοσοφαινότυπο με τα φυσιολογικά στελεχιαία αιμοποιητικά κύτταρα. Σε ποσοστό 30-40% των ασθενών με οξεία μυελογενή λευχαιμία, τα λευχαιμικά κύτταρα δεν εκφράζουν το CD34 και τα αρχέγονα λευχαιμικά κύτταρα σε μια ομάδα ασθενών είναι CD34(-).

Με την εφαρμογή νεότερων τεχνικών για την ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων στους ασθενείς με οξεία μυελογενή λευχαιμία, ανευρέθηκαν νέα γονίδια που εμπλέκονται στη λευχαιμογένεση. Έχει διαπιστωθεί ότι σε ασθενείς με οξεία μυελογενή λευχαιμία ανευρίσκονται στελεχιαία αιμοποιητικά κύτταρα που δεν φέρουν καμία μετάλλαξη από αυτές που ανευρίσκονται στη συγκεκριμένη νόσο, καθώς και στελεχιαία αιμοποιητικά κύτταρα με διάφορους συνδυασμούς γενετικών ανωμαλιών, όμοιες με αυτές που ανευρίσκονται σε ασθενείς με μεγάλο ποσοστό διήθησης από λευχαιμικά κύτταρα. Τα τελευταία αποτελούν τα «προ-λευχαιμικά κύτταρα» που οδηγούν σε οξεία μυελογενή λευχαιμία και είναι δυνατό να ανευρεθούν και μεταγενέστερα, σε δείγματα ασθενών που βρίσκονται σε ύφεση, γεγονός που αποδεικνύει ότι είναι ικανά να επιβιώσουν μετά τη θεραπεία εφόδου^{34,35}.

Πολλές από τις μεταλλάξεις που εμφανίζονται στα «προ-λευχαιμικά κύτταρα» προσδίδουν ιδιότητες ανάπτυξης που τους επιτρέπουν να απωθούν τα φυσιολογικά στελεχιαία αιμοποιητικά κύτταρα και να οδηγούν έτσι σε υποτροπή. Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι μεταλλάξεις που ανευρίσκονται στα «προ-λευχαιμικά κύτταρα» είναι πλούσιες σε γονίδια που ρυθμίζουν τη μεθυλίωση του DNA και σε γονίδια που συμμετέχουν στην τροποποίηση της χρωματίνης (chromatin modification), ενώ η σηματοδότηση ενεργοποίησης γενετικών αλλαγών λαμβάνει χώρα σε μεταγενέστερο στάδιο. Οι μελέτες του DNA ασθενών με οξεία μυελογενή λευχαιμία με NGS (next generation sequencing), κατέδειξαν την κλωνική εξέλιξη στη «de novo» οξεία μυελογενή λευχαιμία καθώς και στην υποτροπή.³⁶

Μελέτες *in vitro* απέδειξαν τη συμβολή των μη αιμοποιητικών κυττάρων (κύτταρα του στρώματος) στην παθογένεια της οξείας μυελογενούς λευχαιμίας. Ωστόσο, όταν χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα του στρώματος από ασθενείς σε ύφεση, αυτά διατηρούσαν την ικανότητα ανάπτυξης των granulocyte-macrophages (GM) αποικιών, όπως στους υγιείς δότες. Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι όταν οι ασθενείς υποτροπιάζαν, χανόταν αυτή η ικανότητα των κυττάρων του στρώματος³⁷.

Η συμβολή του μικροπεριβάλλοντος στην εμφάνιση κακοήθους νόσου, προκύπτει από την παρατήρηση της προκαλούμενης από δότες λευχαιμίας, στην οποία ο λευχαιμικός κλώνος προκύπτει από έναν φυσιολογικό δότη αιμοποιητικών κυττάρων μετά από αλλογενή μεταμόσχευση.³⁸ Βλάβη στο μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών είτε από προηγηθείσα χημειοθεραπεία είτε από σχήματα προετοιμασίας αλλογενούς μεταμόσχευσης, συμβάλλει σημαντικά στην ανάπτυξη της οξείας μυελογενούς λευχαιμίας. Κατά τη μελέτη με μικροσκόπιο των «φωλεών» (niche), διαπιστώθηκε ότι τόσο οι βλάστες της μυελικής όσο και της λεμφικής σειράς είναι ικανές να προκαλέσουν την ελάττωση της έκφρασης του C-X-C motif chemokine 12 (CXCL12) ή αλλιώς Stromal cell-derived factor 1 (SDF 1) στο μυελό των οστών, οδηγώντας στην έξοδο των φυσιολογικών CD34⁺ αιμοποιητικών κυττάρων και, ως εκ τούτου, την εξασθένηση της φυσιολογικής αιμοποίησης. Η διαδικασία αυτή πυροδοτούνταν με συμμετοχή του stem cell factor (SCF) και αντιστρεφόταν από την «εξουδετέρωση» του SCF.³⁹

1.2 Παθοβιολογία της Οξείας Μυελογενούς Λευχαιμίας

Οι νεοπλασίες της μυελικής σειράς είναι μία ετερογενής ομάδα νοσημάτων. Αποτελούν κλωνικές αιμοποιητικές κακοήθειες που επηρεάζουν μία μόνο σειρά, ή μπορούν να προέρχονται από ένα πολυδύναμο προγονικό κύτταρο και μπορεί να επηρεάζουν ακόμα και όλους τους τύπους των κυττάρων του μυελού. Θεμελιώδους σημασίας αποτελεί η κατανόηση του χαρακτήρα των αιματολογικών κακοηθειών, εάν είναι μονοκλωνικής ή πολυκλωνικής αρχής. Οι δείκτες προσδιορισμού της κλωνικότητας χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της προέλευσης της νόσου, το διαχωρισμό του κακοήθους από τον καλοήγη πληθυσμό, την εξέλιξη του νοσήματος, καθώς και για την περιγραφή μονοπατιών που εμπλέκονται στην παθογένεια των αιματολογικών κακοηθειών. Η κλωνική προέλευση των λευχαιμιών μπορεί να εκτιμηθεί είτε από ενδογενείς είτε από εξωγενείς κυτταρικούς δείκτες. Οι ενδογενείς δείκτες είναι ειδικοί για έναν πληθυσμό κυττάρων και είτε συμμετέχουν στα στάδια της κανονικής διαφοροποίησης είτε ως μέρος στη διαδικασία δημιουργίας του κλώνου. Για παράδειγμα, οι ελαφρές αλυσίδες κ και λ που αποτελούν δείκτες των ανοσοσφαιρινών επιφανείας, ή οι T-κυτταρικοί υποδοχείς (T-Cell Receptors, TCR), χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση των νοσημάτων του λεμφικού ιστού. Επίσης, οι κυτταρογενετικές αλλοιώσεις αποτελούν χρήσιμους ενδογενείς παράγοντες για την ανεύρεση παθολογικών κλώνων, καθώς και για την παρακολούθηση της εξέλιξης της νόσου.⁴⁰

1.3 Αιτιολογία της Οξείας Μυελογενούς Λευχαιμίας

α. Φάρμακα

Στην πλειοψηφία των ασθενών που αναπτύσσουν οξεία μυελογενή λευχαιμία δεν προϋπάρχει αιματολογική νόσος, ούτε έχει προηγηθεί χορήγηση χημειοθεραπείας. Για αυτή την κατηγορία ασθενών η νόσος ταξινομείται ως «de novo» και φαίνεται να προκύπτει από τη συσσώρευση επίκτητων σωματικών μεταλλάξεων στα αιμοποιητικά κύτταρα που αυτοανανεώνονται. Ορισμένες περιβαλλοντικές, επαγγελματικές και ιατρογενείς εκθέσεις έχουν ταυτοποιηθεί ότι συμβάλλουν στη δευτεροπαθή οξεία μυελογενή λευχαιμία (secondary AML, s-AML), μέσω τοξικής βλάβης που προκαλείται στα αιματοποιητικά κύτταρα, όπως η έκθεση στο βενζόλιο.

Η οξεία μυελογενής λευχαιμία που αναπτύσσεται σε έδαφος ακτινοθεραπείας ή μετά από χημειοθεραπεία, χαρακτηρίζεται ως «συνδεόμενη με τη θεραπεία οξεία μυελογενής λευχαιμία» (therapy-related AML, t-AML). Μια κατηγορία φαρμάκων που ενοχοποιείται για την ανάπτυξή της, είναι οι αναστολείς της τοποϊσομεράσης II. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν οι ανθρακυκλίνες, όπως η δοξορουμπικίνη, η ινταρουμπικίνη και η δαουνορουβικίνη, καθώς και η ετοποσίδη, φάρμακα τα οποία εμπεριέχονται σε ποικίλα θεραπευτικά πρωτόκολλα τόσο σε συμπαγείς όγκους όσο και σε αιματολογικές κακοήθειες. Συνηθέστερα, παρουσιάζεται 1-3 έτη μετά την έκθεση στους ανωτέρω αναφερόμενους παράγοντες και κατά κανόνα συνοδεύεται από καρυοτυπικές ανωμαλίες, με πιο συχνή την αντιμετάθεση 11q23.

Ο κίνδυνος εμφάνισης της t-AML ποικίλλει ανάλογα με το δοσολογικό χημειοθεραπευτικό σχήμα, τη σωρευτική δόση που έχει ληφθεί, τους πρόσθετους κυτταροτοξικούς παράγοντες και τα υποκείμενα χαρακτηριστικά της νόσου, αλλά γενικά δεν υπερβαίνει το 5% των ασθενών που έχουν λάβει αναστολείς τοποϊσομεράσης II.

Οι αλκυλιούντες παράγοντες αποτελούν τη δεύτερη κατηγορία χημειοθεραπευτικών φαρμάκων με σαφή ρόλο στην παθογένεση της t-AML. Το πρώτο που ενοχοποιήθηκε στην κατηγορία αυτή ήταν οι μουστάρδες αζώτου. Φάρμακα που επίσης έχουν συσχετιστεί είναι η κυκλοφωσφαμίδη, η ιφωσφαμίδη και η μελφαλάνη. Λιγότερο συσχετίζονται άλλοι αλκυλιούντες

παράγοντες όπως η πλατίνα, το θειοτέπα και η βουσουλφάνη. Οι κυτταρογενετικές αλλοιώσεις που παρατηρούνται στις t-AML από αλκυλιούντες παράγοντες, αφορούν σε απώλειες στο μακρύ βραχίονα των χρωμοσωμάτων 5 ή 7, ή και απώλεια ολόκληρου χρωμοσώματος (5 ή 7). Συνήθως παρουσιάζεται 1-7 έτη μετά την έκθεση στους αναφερόμενους παράγοντες, με τον κίνδυνο να ανέρχεται σε ποσοστό 1% των ασθενών και να αυξάνεται με την ηλικία και τη σωρευτική έκθεση στους παράγοντες αυτούς.

Η έκθεση σε ιονίζουσα ακτινοβολία έχει επίσης αναγνωριστεί ως αιτία στη t-AML. Αυτή η συσχέτιση διαπιστώθηκε σε ασθενείς που είχαν εκτεθεί εντόνως σε ακτινοβολία κατά την εποχή ανάπτυξης της ακτινογραφίας, καθώς και σε μαζική έκθεση όπως σε έκρηξη ατομικής βόμβας ή σε καταστροφή πυρηνικών σταθμών. Εκτός από αυτά τα γεγονότα, η θεραπευτική ακτινοθεραπεία σχετίζεται με μια μικρή, ωστόσο σημαντική, αύξηση του κινδύνου για την ανάπτυξη της t-AML.⁴¹

β. Προϋπάρχουσα αιματολογική κακοήθεια

Άλλες αιματολογικές κακοήθειες, συμπεριλαμβανομένων των μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων (ΜΔΣ) και μυελοϋπερπλαστικών νεοπλασμάτων (ΜΥΝ), ενέχουν κίνδυνο εξέλιξης της νόσου σε s-AML ανάλογα με την υποκείμενη ασθένεια. Οι ασθενείς με μυελοϋπερπλαστικά νεοπλασμάτα έχουν περίπου 10% κίνδυνο εξέλιξης της νόσου σε διάστημα 10 ετίας, με το ποσοστό να αγγίζει το 20% στους ασθενείς με μυελοϊνωση.

Υπάρχει σαφής συσχέτιση μεταξύ των θεραπειών που έχουν προηγηθεί για την αντιμετώπιση του ΜΥΝ και συγκεκριμένα, προηγηθείσα θεραπεία με αλκυλιούντες παραγόντες αυξάνει έως και 4 φορές τον κίνδυνο εμφάνισης οξείας μυελογενούς λευχαιμίας. Ένας άλλος μηχανισμός που είναι δυνατόν να συμβάλει στην κλωνική εξέλιξη του νοσήματος και στην πρόοδο νόσου, είναι η χρόνια φλεγμονώδης κατάσταση που συχνά συνοδεύει τα ΜΥΝ. Ενδιαφέρον αποτελεί η μελέτη των μοριακών βλαβών των ασθενών με s-AML με sequencing, καθώς έχει αποκαλύψει επαναλαμβανόμενες μεταλλάξεις στα γονίδια *TET2* (Ten-eleven translocation 2), *JAK2* (Janus kinase 2), *IDH*

(Isocitrate dehydrogenase), *IKZF1* (IKAROS family zinc finger 1) και *ASXL1* (Additional sex-comb like-1). Επιπροσθέτως, ένας αριθμός ασθενών με μυελοϋπερπλαστικό νεόπλασμα και μετάλλαξη στο *JAK2*, είναι δυνατόν να αναπτύξει *JAK2* wild-type οξεία μυελογενή λευχαιμία, η οποία να προέρχεται από έναν προϋπάρχοντα *JAK2* κλώνο ή εξαιτίας της παράλληλης ανάπτυξης ενός ξεχωριστού κλώνου. Στις περιπτώσεις ανάπτυξης οξείας μυελογενούς λευχαιμίας σε έδαφος μυελοϋπερπλαστικού νοσήματος με μετάλλαξη στο *JAK2*, συνήθως έχει προηγηθεί το στάδιο της μυελοϊνωσης, ενώ οι περιπτώσεις χωρίς μετάλλαξη στο *JAK2* συνήθως αναπτύσσονται μετά από χρήση κυτταροτοξικών φαρμάκων.⁴²

γ. Συγγενή σύνδρομα ανεπάρκειας μυελού των οστών

Ένας αριθμός κληρονομικών συνδρόμων ανεπάρκειας μυελού των οστών συσχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης αιματολογικών κακοθηριών. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο «χρόνιο ερεθισμό» εξαιτίας των κυτταροπενιών ή λόγω «ελαττωμάτων» κατά την επιδιόρθωση του DNA. Παρακάτω αναφέρουμε επιγραμματικά τα συχνότερα κληρονομικά σύνδρομα που προκαλούν ανεπάρκεια του μυελού των οστών.

1. Η αναιμία Fanconi. Αποτελεί την πιο συχνή κληρονομούμενη διαταραχή ανεπάρκειας μυελού των οστών και προκαλείται λόγω γενετικών μεταλλάξεων σε παράγοντες που εμπλέκονται στην επιδιόρθωση του DNA.

2. Το σύνδρομο Shwachman-Diamond. Χαρακτηρίζεται από μετάλλαξη στο γονίδιο *SBDS* (Shwachman-Bodian-Diamond syndrome) και κληρονομείται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο χαρακτήρα. Οξεία μυελογενής λευχαιμία αναπτύσσεται στο 1/3 των ασθενών έως το τριακοστό έτος της ηλικίας.

3. Η αναιμία Diamond-Blackfan (Diamond-Blackfan anemia, DBA). Χαρακτηρίζεται από απλασία της ερυθράς σειράς και σχετίζεται με μεταλλάξεις στις πρωτεΐνες των ριβοσωμάτων.

4. Το σύνδρομο Down. Προκαλείται εξαιτίας χρωμοσωμικής βλάβης (τρισωμία 21) και έχει συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης μυελοδυσπλαστικού

συνδρόμου και οξείας μυελογενούς λευχαιμίας, με συχνότερα τον υπότυπο της οξείας μεγακαρυοκυτταρικής λευχαιμίας.⁴³

1.4 Γενετικές μεταβολές στην Οξεία Μυελογενή Λευχαιμία

Η οξεία μυελογενής λευχαιμία χαρακτηρίζεται από μεγάλο αριθμό επαναλαμβανόμενων κυτταρογενετικών και μοριακών βλαβών, καθώς και επιγενετικών τροποποιήσεων, που αντικατοπτρίζουν τον παθοφυσιολογικό ρόλο των επίκτητων σωματικών μεταλλάξεων. Αυτές οι μεταλλάξεις έχουν ενσωματωθεί στις στρατηγικές για τη διατρωμάτωση των ασθενών σε κατηγορίες πρόγνωσης καθώς και στοχευμένης θεραπείας. Η ταξινόμηση κατά WHO (World Health Organization) αναγνωρίζει πλέον μία ομάδα επαναλαμβανόμενων κυτταρογενετικών ανωμαλιών, συμπεριλαμβανομένων των ισορροπημένων αντιμεταθέσεων και αναστροφών, ως χαρακτηριστικές στην οξεία μυελογενή λευχαιμία. Η έγκαιρη κατανόηση της παθογένειας της νόσου, οδήγησε στην εξήγηση ότι για τη δημιουργία της ενοχοποιούνται δύο κατηγορίες μεταλλάξεων: οι κατηγορίας I μεταλλάξεις που ενεργοποιούν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και οι κατηγορίας II, οι οποίες εμποδίζουν τη φυσιολογική λειτουργία μηχανισμών διαφοροποίησης.⁴⁴

α. Χρωμοσωμικές ανωμαλίες

Ο βασικός ρόλος των επίκτητων μεταλλάξεων στην οξεία μυελογενή λευχαιμία αναγνωρίστηκε αρχικά μέσω της ταυτοποίησης επαναλαμβανόμενων κυτταρογενετικών ανωμαλιών στα μέσα του 20^{ου} αιώνα. Οι καρυοτυπικές αλλοιώσεις αποτελούν συχνά ευρήματα και παρουσιάζονται στο 50-60% περίπου των ασθενών κατά τη διάγνωση, έχουν προγνωστική αξία και θεμελιώδη ρόλο ως προς τις θεραπευτικές αποφάσεις, ιδιαίτερα για τους ασθενείς για τους οποίους εξετάζεται το ενδεχόμενο να υποβληθούν σε αλλογενή μεταμόσχευση στην πρώτη πλήρη ύφεση.^{45,46} Οι ασθενείς μπορούν να διαχωριστούν με βάση τον καρυότυπο των βλαστών σε ευνοϊκής, ενδιάμεσης και κακής πρόγνωσης. Τυπικά, ευνοϊκής πρόγνωσης θεωρούνται οι ασθενείς με t(15;17), t(8;21) ή inv(16)t(16;16), ενώ δυσμενούς πρόγνωσης

θεωρούνται οι ασθενείς με τις ακόλουθες βλάβες: inv (3q)/t(3;3), t(6;9), μονοσωμία 7, μονοσωμία 5, απώλεια 5q, 7q, ή 17p, ο σύνθετος καρυότυπος, καθώς βλάβες στο γονίδιο *MLL* το οποίο εδράζεται στο χρωμόσωμα 11q23.^{47,48} Ασθενείς με καρυοτυπικές αλλοιώσεις εκτός των προαναφερθέντων, κατατάσσονται στην κατηγορία της ενδιάμεσης πρόγνωσης, η οποία περιλαμβάνει τους ασθενείς με φυσιολογικό καρυότυπο, και αποτελούν περίπου το 45% όλων των ασθενών με οξεία μυελογενή λευχαιμία.^{49,50}

Ο CBF είναι ένα σύμπλοκο ετεροδιμερούς πρωτεΐνης που εμπλέκεται στη μεταγραφική ρύθμιση της φυσιολογικής αιμοποίησης. Αποτελείται από μια υπομονάδα άλφα και μια υπομονάδα βήτα. Υπάρχουν μέχρι στιγμής 3 υπομονάδες άλφα (*RUNX1-3*) και μία υπομονάδα βήτα (*CBFβ*). Η άλφα υπομονάδα δεσμεύεται με μια αλληλουχία DNA TGT/cGGT και η βήτα υπομονάδα σταθεροποιεί την αλληλεπίδραση μεταξύ της άλφα υπομονάδας και του DNA, αλλά δεν αλληλεπιδρά με το DNA ανεξάρτητα. Η ένωση του *CBFβ* επάγει μια 40-πλάσια αύξηση στη συγγένεια του *RUNX1* να δεσμεύεται στο DNA. Συνεπώς, και οι δύο υπομονάδες απαιτούνται για τη μέγιστη μεταγραφική αποτελεσματικότητα των γονιδίων-στόχων, όπως ο GM-CSF, η ιντερλευκίνη-3 και η μυελοϋπεροξειδάση. Οι μεταλλάξεις στα γονίδια που κωδικοποιούν τον CBF συντελούν στην εξασθένιση της διαφοροποίησης των πρόγονων αιματοποιητικών κυττάρων και ενισχύουν την ανάπτυξη της λευχαιμίας. Παρατηρούνται στο 20% των ασθενών με οξεία μυελογενή λευχαιμία.

Η αντιμετάθεση t(8;21) ανευρίσκεται στο 10% περίπου των OML και δημιουργεί μία συγχώνευση των *RUNX1* (Runt-related transcription factor 1) ή αλλιώς *AML1* (Acute myeloid leukemia 1 protein), που εδράζεται στο χρωμόσωμα 21 και *RUNX1T1* (*RUNX1* Partner Transcriptional Co-Repressor 1) ή αλλιώς *ETO* (Eight- twenty one), που εδράζεται στο χρωμόσωμα 8. Αυτή η αναδιάταξη παρατηρείται συνηθέστερα στην υποομάδα M2 κατά FAB. Η πρωτεΐνη που προκύπτει από τη σύντηξη μεταβάλλει το σύμπλοκο του μεταγραφικού παράγοντα CBF, επιτρέποντάς του την αλληλεπίδραση με τους συν-καταστολείς των πυρήνων SMRT και N-CoR, οδηγώντας με αυτόν τον τρόπο σε μη αποτελεσματική αιμοποιητική διαφοροποίηση. Η πρωτεΐνη σύντηξης *RUNX1-RUNX1T1* έχει κυρίαρχη αρνητική δράση (dominant

negative fashion) στον wild type CBF και ως εκ τούτου αναστέλλει τη διαφοροποίηση. Επιπλέον, οδηγεί σε ενεργοποίηση των *TP53* γονιδίων απόκρισης, γεγονός που μπορεί εν μέρει να εξηγήσει τη χημειοευαισθησία της t(8;21) οξείας μυελογενούς λευχαιμίας. Το *RUNX1* εμπλέκεται και σε άλλες σπάνιες μετατοπίσεις συμπεριλαμβανομένων των t(16;21)(q24;q22) και t(3;21)(q26;q22).⁵¹ Οι χρωμοσωμικές αλλοιώσεις που αφορούν τον CBFb, περιλαμβάνουν τις inv(16) και t(16;16)(p13;q22), οι οποίες δημιουργούν συγχώνευση μεταξύ *CBFb* (Core-binding factor subunit beta) και *MYH11* (Smooth muscle myosin heavy chain 11), το οποίο κωδικοποιεί τη βαριά αλυσίδα της μυοσίνης του λείου μυός 11. Η οξεία μυελογενής λευχαιμία με inv(16) ή t(16;16) έχει συχνά το φαινότυπο FABM4Eo. Το γονιδιακό προϊόν *CBFB-MYH11* ασκεί κυρίαρχη αρνητική επίδραση στο *RUNX1* και είναι δυνατόν να αναστείλει τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων του CBF.⁵²

Αναδιατάξεις στο γονίδιο *MLL* (mixed-lineage leukemia) εμφανίζονται στο 10% περίπου των ασθενών με οξεία μυελογενή λευχαιμία και συνηθέστερα στους ασθενείς με t-AML που έχουν λάβει αναστολείς τοποϊσομεράσης II. Το γονίδιο *MLL* συνδέεται με το DNA προκαλώντας μεθυλίωση της ιστόνης H3K4 μέσω του C-τελικού τμήματος και ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων στόχων, συμπεριλαμβανομένων των homeobox (Hox). Τα HOXA7 και HOXA9 διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στη ρύθμιση της αιμοποίησης και συνήθως εκφράζονται στα πρώιμα αιμοποιητικά κύτταρα. Το αναδιαταχθέν *MLL* γονίδιο διατηρεί το N-τελικό τμήμα όπου δεσμεύεται το DNA, ενώ το C-τελικό τμήμα αντικαθίσταται από ένα άλλο τμήμα με το οποίο συγχωνεύεται (fusion partner).⁵³

Λιγότερο κοινές κυτταρογενετικές ανωμαλίες που εμπλέκονται στην παθογένεια της οξείας μυελογενούς λευχαιμίας, περιλαμβάνουν την αντιμετάθεση t(6;9) που προκαλεί συγχώνευση του ογκογονιδίου *DEK* με το γονίδιο *NUP 214* (Nucleoporin 214) ή *CAN*. Το γονίδιο *DEK* που εδράζεται στο χρωμόσωμα 6p23, κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη που προσδένεται στο DNA και η οποία συμμετέχει στο σχηματισμό του circular DNA. Το γονίδιο *NUP214* το οποίο εδράζεται στο χρωμόσωμα 9q34, κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη απαραίτητη για τον κυτταρικό κύκλο και τη μετακίνηση μακρομορίων μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος. Η αναδιάταξη ανευρίσκεται περίπου στο 1% των ασθενών με οξεία μυελογενή λευχαιμία και σχετίζεται με κακή πρόγνωση.

Συνήθως συμβαίνει ως μοναδική χρωμοσωμική αναδιάταξη, ωστόσο έχουν αναφερθεί περιπτώσεις όπου συνυπάρχουν μεταλλάξεις στο γονίδιο *FLT3*.⁵⁴ Η αντιμετάθεση t(3;3)(9q21q26.2) συμπεριλαμβάνεται στην κατηγορία της WHO «οξεία μυελογενής λευχαιμία με επαναλαμβανόμενες γενετικές ανωμαλίες». Ανευρίσκεται σε ποσοστό περίπου 5% των ασθενών με οξεία μυελογενή λευχαιμία και σχετίζεται με πτωχή πρόγνωση. Στους ασθενείς με τη συγκεκριμένη αντιμετάθεση έχει παρατηρηθεί να προϋπάρχει μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο, με δυσπλασία κυρίως της μεγακαρυοκυτταρικής σειράς.⁵⁵

Η αντιμετάθεση t(8;16)(p11;p13) είναι μία σπάνια αντιμετάθεση που ανευρίσκεται στη de novo οξεία μυελογενή λευχαιμία καθώς και στη t-AML προκαλούμενη από χορήγηση αναστολέων τοποϊσομεράσης II και συχνά έχει εξωμυελικές εντοπίσεις.

Η αντιμετάθεση t(1;22) αποτελεί επίσης σπάνια αντιμετάθεση και ανευρίσκεται στην οξεία μεγακαρυοκυτταρική λευχαιμία.⁵⁶

Στις «επαναλαμβανόμενες γενετικές ανωμαλίες» (recurrent genetic abnormalities) περιλαμβάνονται οι μονοσωμίες καθώς και ο σύνθετος καρυότυπος, ο οποίος ορίζεται ως ο καρυότυπος που φέρει τουλάχιστον 3 διακριτές χρωμοσωμικές ανωμαλίες. Οι κοινές ανωμαλίες περιλαμβάνουν αυτές που αφορούν τα χρωμοσώματα 5 και 7, ιδιαίτερα στην προερχόμενη από μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο οξεία μυελογενή λευχαιμία.

Ενισχυτής του γονιδίου *EZH2* (Zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit), είναι μία μεθυλοτρανσφεράση ιστόνης που μπορεί να διαδραματίσει ρόλο στη λευχαιμογένεση μέσω «απλής ανεπάρκειας» (haplo-insufficiency) της ρύθμισης απώλειας υλικού από το μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 7. Διάμεσες απώλειες του μακρού βραχίονα του χρωμοσώματος 5 στη θέση 5q33.1, σχετίζονται με το σύνδρομο 5q-, το οποίο έχει χαμηλό κίνδυνο εξέλιξης σε οξεία μυελογενή λευχαιμία. Αντίθετα οι απώλειες που αφορούν σε εγγύτερες περιοχές όπως τη θέση 5q31.2, σχετίζονται με υψηλότερο κίνδυνο εξέλιξης σε οξεία μυελογενή λευχαιμία. Οι περισσότερες απώλειες στο χρωμόσωμα 5 στα υψηλού κινδύνου μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα και στις οξείες μυελογενείς λευχαιμίες είναι μεγάλες και περιλαμβάνουν το μεγαλύτερο μέρος του μακρού βραχίονα ή ολόκληρο το χρωμόσωμα.⁵⁷

Η απώλεια του χρωμοσώματος 17p, συμπεριλαμβανομένης της θέσης TP53 στο 17p13, σχετίζεται με σύνθετες κυτταρογενετικές βλάβες καθώς και βλάβες στα χρωμοσώματα 5 και 7. Οι μεταβολές στο 17p παρατηρούνται στους ασθενείς που έχουν αναπτύξει t-AML μετά από θεραπεία με αλκυλιούντα παράγοντα, καθώς και s-AML σε ασθενείς με προϋπάρχον MYN ή ΜΔΣ.⁵⁸

Η τρισωμία 8 είναι η πιο συχνή καρυοτυπική βλάβη που παρατηρείται στην οξεία μυελογενή λευχαιμία και είναι δυνατόν να συμβάλει στη δημιουργία της λευχαιμίας μέσω της ενίσχυσης του γονιδίου MYC, το οποίο εδράζεται στο χρωμόσωμα 8p24 και εμπλέκεται σε διάφορες κακοήθειες.⁵⁹

β .Επαναλαμβανόμενες γενετικές μεταλλάξεις

Έχουν αναγνωριστεί διάφορες μεταλλάξεις που έχουν ως αποτέλεσμα να μεταβάλλουν το σήμα μεταγωγής και να ενισχύουν τον πολλαπλασιασμό των λευχαιμικών κυττάρων και την επιβίωσή τους. Αυτές περιλαμβάνουν μεταλλάξεις στα γονίδια *FLT3*, *RAS* και *KIT*.^{60,61}

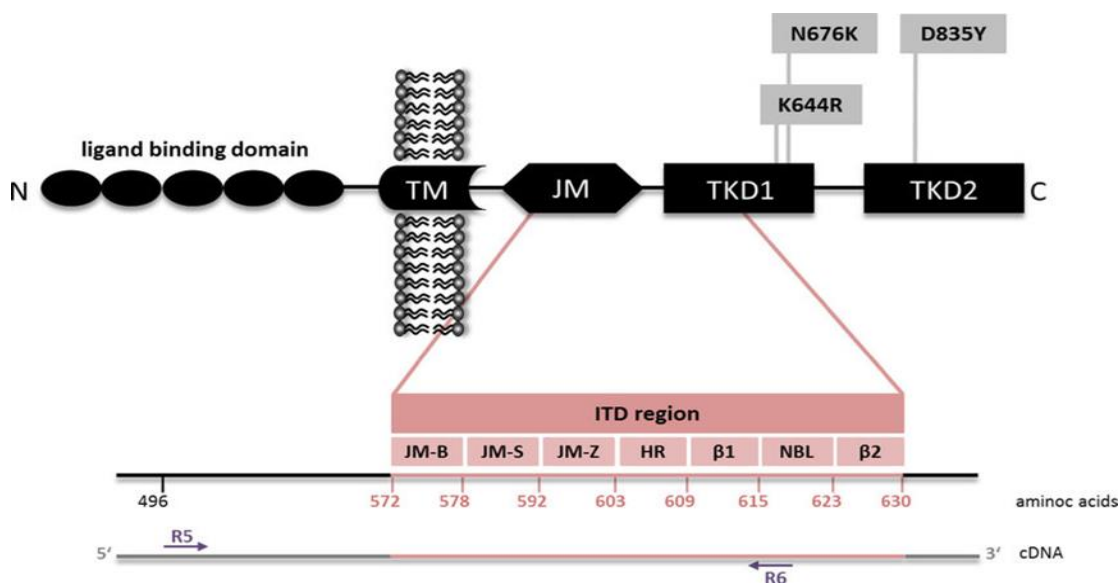
Η Fms like tyrosine kinase 3 (FLT-3) ή CD135, είναι η πρωτεΐνη η οποία στον άνθρωπο κωδικοποιείται από το γονίδιο *FLT3*. Το *FLT3* είναι ένας υποδοχέας κυτοκίνης ο οποίος ανήκει στην τάξη III των υποδοχέων της κινάσης της τυροσίνης και εκφράζεται αποκλειστικά στους λεμφοαιμοποιητικούς ιστούς, (εξαιρέση αποτελούν ο εγκέφαλος και ο πλακούντας). Τα Β προγονικά κύτταρα CD34(+), CD19(+) και τα προγονικά CD34(+), CD14(+), CD64(+) κύτταρα των μονοκυττάρων εκφράζουν *FLT3*, σε αντίθεση με τους ερυθροβλάστες. Επιπλέον ο υποδοχέας *FLT3* εκφράζεται στα Τ προγονικά κύτταρα του θύμου (CD7 high), ενώ τα

μεγακαρυοκύτταρα, τα μονοκύτταρα, τα ηωσινόφιλα, τα ουδετερόφιλα, τα εμπύρηννα ερυθρά, καθώς και τα ώριμα περιφερικά Β και Τ λεμφοκύτταρα, δεν εκφράζουν *FLT3*.⁶²⁻⁶⁴

Όταν αυτός ο υποδοχέας συνδεθεί με τον *FLT3L* (FLT3 Ligand), σχηματίζεται ένα τριμερές σύμπλεγμα, στο οποίο δύο μόρια *FLT3* γεφυρώνονται από ένα (ομοδιμερές) *FLT3L*. Αναλυτικότερα, η πρόσδεση αυτή ενεργοποιεί τις ενδοκυττάρειες οδούς PI3K (phosphatidyl inositol 3-kinase) και RAS, οδηγώντας σε αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και αναστολή της

απόπτωσης. Επιπλέον, η ενεργοποίηση της PI3K προκαλεί φωσφορλίωση της αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης BAD (BCL2 antagonist of cell death), με αποτέλεσμα να αναστέλλεται η απόπτωση. Ο ενεργοποιημένος υποδοχέας *FLT3* αλληλεπιδρά επίσης με την GRB2 μέσω SHC, ενεργοποιώντας έτσι την πρωτεΐνη RAS. Στη συνέχεια η πρωτεΐνη RAS ενεργοποιεί τις πρωτεΐνες-στόχους, όπως την RAF, τις κινάσες MAPK/ERK (MEKs), την ERK κινάση (extracellular-signal-regulated), και την κινάση RSK (ribosomal protein S6 kinase). Οι πρωτεΐνες-στόχοι με τη σειρά τους, ενεργοποιούν τις πρωτεΐνες CREB (cyclic adenosine monophosphate-response element binding protein), ELK και STATs (signal transducer and activators of transcription), που οδηγούν στη μεταγραφή γονιδίων που εμπλέκονται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.⁶⁵⁻⁶⁷(Εικόνα 1).

Εικόνα 1

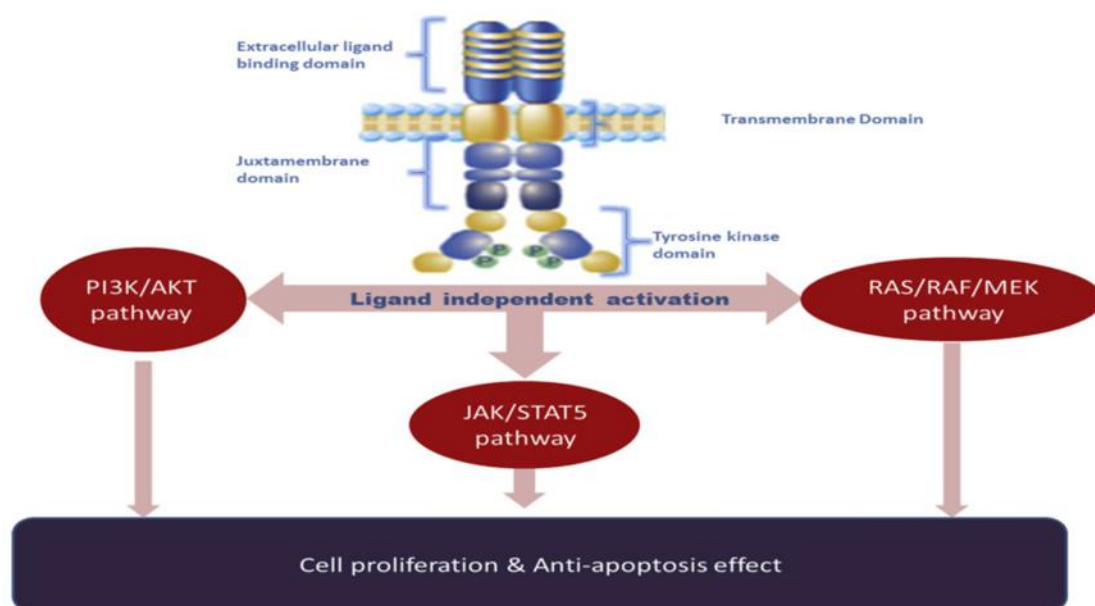


Μεταλλάξεις *FLT3*. Σχηματική απεικόνιση των μεταλλάξεων *FLT3* σύμφωνα με την περιοχή υποδοχέα τους (Clonal heterogeneity of *FLT3-ITD* detected by high-throughput amplicon sequencing correlates with adverse prognosis in acute myeloid-leukemia, Oncotarget, July 2018,)

Το γονίδιο *FLT3* είναι ένα από τα πλέον συχνά μεταλλαγμένα γονίδια στην οξεία μυελογενή λευχαιμία. Εδράζεται στο χρωμόσωμα 13 και συγκεκριμένα στην περιοχή 13q12.2. Οι μεταλλάξεις *FLT3* μπορεί να βρεθούν στο 30% έως 35% των ενηλίκων ασθενών με οξεία μυελογενή λευχαιμία. Περίπου 20% έως 30% θα είναι εσωτερικοί σε σειρά διπλασιασμοί (Internal Tandem Duplication, ITD). Ένα ποσοστό των ασθενών έχουν σημειακές μεταλλάξεις στην

αποκαλούμενη καταλυτική περιοχή (activation loop) του *FLT3*. Οι σημειακές μεταλλάξεις στο κωδικόνιο 835 του γονιδίου *FLT3* (μεταλλάξεις D835) παρατηρούνται σε ποσοτό 5-10% των ενηλίκων με οξεία μυελογενή λευχαιμία. Αυτές οι μεταλλάξεις εντοπίζονται στην καταλυτική περιοχή της δεύτερης περιοχής της κινάσης της τυροσίνης (TKD) του *FLT3* (*FLT3-TKD*). (Εικόνα 2). Οι μεταλλάξεις ITD και Asp835 προκαλούν την απενεργοποίηση των αυτοανασταλτικών μηχανισμών του *FLT3* και οδηγούν στη συνεχή ενεργοποίησή του.^{68,69}

Εικόνα 2



The FMS-like tyrosine kinase 3 (*FLT3*) pathway: Το μονοπάτι του *FLT3*
(Targeting *FLT3* Mutations in Acute Myeloid Leukemia, Cells, January 2018)

Η κλινική και η προγνωστική συνάφεια των μεταλλάξεων *TKD* είναι λιγότερο σαφής. Ωστόσο, υπάρχουν άφθονα δεδομένα σχετικά με την προγνωστική σημασία του *FLT3-ITD*. Οι περισσότερες μελέτες δείχνουν ότι η παρουσία της μετάλλαξης *FLT3-ITD* δεν επηρεάζει το ποσοστό πλήρους ύφεσης με την κλασική χημειοθεραπεία. Ωστόσο, οι ασθενείς με μετάλλαξη *FLT3-ITD* έχουν συχνά περισσότερες πιθανότητες υποτροπής και, ως εκ τούτου, χειρότερο ποσοστό συνολικής επιβίωσης. Η επίδραση της μετάλλαξης *FLT3* μπορεί να επηρεαστεί ή να διαμορφωθεί από το allelic burden ή από έτερες μεταλλάξεις.^{70,71}

Για παράδειγμα, ασθενείς με μετάλλαξη *FLT3-ITD^{low}* (low allelic burden) με μετάλλαξη στο γονίδιο *NPM1*, ανήκουν στην κατηγορία των ασθενών με καλή πρόγνωση. Οι ασθενείς χωρίς μετάλλαξη στο γονίδιο *NPM1* και μετάλλαξη *FLT3-ITD^{low}* χωρίς επιπρόσθετες κακής πρόγνωσης μοριακές μεταλλάξεις, ανήκουν στην κατηγορία ενδιαμέσου κινδύνου. Ενώ οι ασθενείς χωρίς μετάλλαξη στο γονίδιο *NPM1* και μετάλλαξη *FLT3-ITD^{high}*, ανήκουν στην κατηγορία ασθενών με κακή πρόγνωση.⁷²⁻⁷⁴

Οι μεταλλάξεις *KIT* εμφανίζονται συχνότερα στα κωδικόνια D816 ή N822 στην περιοχή της κινάσης της τυροσίνης ή στην εξωκυττάρια περιοχή και διακόπτουν την αυτόματη ανατροφοδότηση, με αποτέλεσμα τη συνεχή δραστηριοποίηση. Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *KIT* εμφανίζονται σε λιγότερο από το 10% των ασθενών. Στους ασθενείς με οξεία μυελογενή λευχαιμία και συνύπαρξη της μετάλλαξης *RUNX1-RUNX1T1*, παρατηρούνται αυξημένα ποσοστά υποτροπής. Οι μεμονωμένες μεταλλάξεις *KIT* έχουν ξεχωριστές προγνώσεις στους ενήλικες με t(8;21) οξεία μυελογενή λευχαιμία. Οι μεταλλάξεις D816 και D820 στο εξόνιο 17, προσδίδουν δυσμενή πρόγνωση, ενώ η μετάλλαξη N822 στο εξόνιο 17 και η μετάλλαξη στο εξόνιο 8, έχουν παρόμοια πρόγνωση με τους ασθενείς που δεν φέρουν μετάλλαξη.⁷⁵

Μεταλλάξεις στα πρωτο-ογκογονίδια *RAS*, συνηθέστερα το *NRAS* και το *KRAS*, ανευρίσκονται σε ποσοστό περίπου 10% και 5% αντίστοιχα των ασθενών με οξεία μυελογενή λευχαιμία. Μέλη της οικογένειας *RAS* αποτελούν μικρού μεγέθους συνδεόμενες με τη μεμβράνη πρωτεΐνες, οι οποίες συμμετέχουν στη σηματοδότηση της τριφωσφατάσης γουανοσίνης και ενεργοποιούν το μονοπάτι MAPK/ERK (Extracellular signal-Related Kinase) που οδηγεί σε κυτταρική ανάπτυξη και επιβίωση.⁷⁶

Η προγνωστική αξία των μεταλλάξεων *RAS* έχει μελετηθεί συστηματικά σε ασθενείς με οξεία μυελογενή λευχαιμία. Ωστόσο, η κλινική τους σημασία παραμένει ελάχιστα καθορισμένη. Η έκφραση των γονιδίων *KRAS* (Kristen Rat Sarcoma virus) και *NRAS* (Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog) βρέθηκε αυξημένη σημαντικά στους ασθενείς με οξεία μυελογενή λευχαιμία με φυσιολογικό καρυότυπο.

Η υψηλή έκφραση του *KRAS* συσχετίστηκε με μεγαλύτερη ηλικία, υψηλότερο αριθμό λευκών αιμοσφαιρίων και αιμοπεταλίων, ενώ η υψηλή έκφραση του

NRAS συσχετίστηκε μόνο με τη μεγαλύτερη ηλικία. Η πλήρης ύφεση και η συνολική επιβίωση των ασθενών με οξεία μυελογενή λευχαιμία επηρεάζονταν αρνητικά από την υπερέκφραση του *KRAS*, αλλά όχι από την υπερέκφραση *NRAS*. Η υπερέκφραση του γονιδίου *KRAS*, ανεξάρτητα από τις μεταλλάξεις στο γονίδιο *RAS*, προσδίδει δυσμενή πρόγνωση στους ασθενείς με φυσιολογικό καρυότυπο.⁷⁷

γ.Μεταγραφικοί Παράγοντες

Οι μεταγραφικοί παράγοντες διαδραματίζουν ουσιαστικό ρόλο στη διαφοροποίηση όλων των κυττάρων συμπεριλαμβανομένων και των αιμοποιητικών. Η ενεργοποίηση τους και η δράση τους ενισχύεται μετά από επίδραση εξωτερικών ερεθισμάτων, όπως οι αυξητικοί παράγοντες, ή εσωτερικών κυτταρικών ερεθισμάτων. Η διαφοροποίηση των προγονικών κυττάρων προκαλείται από το συνδυασμό διαφόρων μεταγραφικών παραγόντων, που συχνά οδηγεί στην έκφραση υποδοχέων αυξητικών παραγόντων.

Στο μυελό των οστών, παράγοντες μεταγραφής όπως *RUNX1*, *C/EBPα* και *PU.1* ελέγχουν βασικά γονίδια ώστε να διατηρείται η φυσιολογική λειτουργία του αιμοποιητικού συστήματος και συμβάλλουν στη συντήρηση, στον προσδιορισμό της διαφοροποίησης και στην ωρίμανση των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων. Μεταλλάξεις, αντιμεταθέσεις ή παρεκκλίνουσες εκφράσεις των μεταγραφικών παραγόντων, είναι δυνατό να οδηγήσουν στην εμφάνιση της οξείας μυελογενούς λευχαιμίας.⁷⁸

Το *RUNX1* είναι ένας παράγοντας μεταγραφής που ρυθμίζει τη διαφοροποίηση στελεχιαίων αιμοποιητικών κυττάρων σε ώριμα κύτταρα. Οι πρωτεΐνες *RUNX* σχηματίζουν ένα ετεροδιμερές σύμπλοκο με *CBFβ*, το οποίο προσδίδει αυξημένη δέσμευση DNA και σταθερότητα στο σύμπλεγμα.

Η πρωτεΐνη *RUNX1* αποτελείται από 453 αμινοξέα. Η ικανότητα δέσμευσης του DNA του *RUNX1* κωδικοποιείται από την περιοχή *runt*, η οποία είναι ομόλογη με την οικογένεια *p53*. Η *runt* περιοχή του *RUNX1* δεσμεύεται στη βασική αλληλουχία του πυρήνα TGTGGNNN (όπου το NNN μπορεί να αντιπροσωπεύει είτε TTT είτε TCA).⁷⁹ Οι μεταλλάξεις στο *RUNX1*

εμφανίζονται σε ποσοστό 5-15% των ασθενών με οξεία μυελογενή λευχαιμία και συχνά συνυπάρχουν με καρυοτυπικές ανωμαλίες όπως τρισωμία 8 ή 13 και προσδίδουν κακή πρόγνωση. Περίπου το 80% των μεταλλάξεων RUNX1 εδράζονται σε μία DNA-binding περιοχή που είναι ομόλογη με την πρωτεΐνη *Drosophila*. Η C-περιοχή του RUNX1 εμπλέκεται στις διαδικασίες μεταγραφής των παραγόντων που ενεργοποιούν ή καταστέλλουν.⁸⁰

Το ανθρώπινο CEBPα/mRNA δημιουργεί δύο πρωτεϊνικά προϊόντα χρησιμοποιώντας δύο διαφορετικές θέσεις έναρξης μετάφρασης. Ως παράγοντας μεταγραφής, η πρωτεΐνη C/EBPα αποτελείται από την περιοχή δέσμευσης DNA (DNA binding domain, DBD) στο καρβοξυτελικό της άκρο (C-terminal), το οποίο διατηρείται μεταξύ των μελών της οικογένειας C/EBPα. Το «θωρακισμένο» C-terminal περιλαμβάνει τον τομέα της βασικής λευκίνης, περιοχή πρόσδεσης του DNA (basic DNA binding leucine zipper domain, bZip), η οποία είναι απαραίτητη για τον ομοδιμερισμό και ετεροδιμερισμό με άλλα μέλη της οικογένειας C/EBP και εμπλέκεται, επίσης, στην αλληλεπίδραση με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες. Μεταλλάξεις στο γονίδιο *CEBPA* παρατηρούνται σε ποσοστό 10% των ασθενών με οξεία μυελογενή λευχαιμία. Οι μεταλλάξεις αυτές λαμβάνουν χώρα στον τομέα της βασικής λευκίνης και έχουν ως αποτέλεσμα την απώλεια της λειτουργίας του γονιδίου. Συνήθως ανευρίσκονται σε ασθενείς με φυσιολογικό καρυότυπο βλαστών και η ευνοϊκή τους πρόγνωση περιορίζεται με την παρουσία μεταλλάξεων και στα δύο αλληλία.⁸¹

Ο μεταγραφικός παράγοντας PU.1 αντιπροσωπεύει έναν μοναδικό ρυθμιστή μεταγραφής του αιμοποιητικού συστήματος, αποτελεί μέλος της οικογένειας Ets (Eight-twenty six) και κατά κύριο λόγο εκφράζεται στα αιμοποιητικά κύτταρα. Οι παράγοντες Ets περιέχουν μία χαρακτηριστική περιοχή στην οποία δεσμεύεται το DNA, περίπου 80 αμινοξέων.

Η πρωτεΐνη PU.1 αποτελείται από 264 αμινοξέα, με την περιοχή δέσμευσης DNA να εδράζεται στο καρβοξυ-τελικό τμήμα της πρωτεΐνης, ενώ το αμινοτελικό άκρο να περιέχει την περιοχή ενεργοποίησης. Ο μεταγραφικός παράγοντας PU.1 είναι απαραίτητος για τη σωστή ανάπτυξη τόσο της μυελικής (μακροφάγων και ουδετεροφίλων) όσο και της λεμφικής σειράς (B και T λεμφοκύτταρα). Επίσης, ρυθμίζει την έκφραση ενός αριθμού γονιδίων,

όπως τον υποδοχέα του παράγοντα διέγερσης αποικιών των μακροφάγων (Macrophage Colony-Stimulating Factor, M-CSF), τον υποδοχέα του παράγοντα διέγερσης αποικιών των κοκκιοκυττάρων (Granulocyte Colony-Stimulating factor, G-CSF) και τον υποδοχέα παράγοντα διέγερσης αποικιών των κοκκιοκυττάρων – μακροφάγων (Granulocyte- Macrophage Colony-Stimulating Factor, GM-CSF).⁸²

δ . Ογκοκατασταλτικά γονίδια

Μεταλλάξεις σε ογκοκατασταλτικά γονίδια ευοδώνουν την ανάπτυξη της οξείας μυελογενούς λευχαιμίας. Παραδείγματα αποτελούν τα ογκοκατασταλτικά γονίδια *TP53* και *WT1* (Wilms tumor 1). Μεταλλάξεις στο *TP53* ανευρίσκονται σε λιγότερο από 10% των περιπτώσεων, ωστόσο παρατηρούνται συχνότερα στους ασθενείς με σύνθετο καρυότυπο. Ο *TP53* είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που ρυθμίζει πολλαπλές οδούς σηματοδότησης ως απάντηση στο κυτταρικό στρες, ικανός να προκαλέσει διακοπή του κυτταρικού κύκλου, γήρανση ή απόπτωση. Οι μεταλλάξεις εμφανίζονται σε όλο το γονίδιο *TP53*, με αποτέλεσμα συνήθως απώλεια της λειτουργίας. Επίσης έχει διαπιστωθεί ότι πάνω από το 50% των περιπτώσεων έχουν απωλέσει την ετεροζυγωτία στο 17p.⁸³

Επαναλαμβανόμενες σωματικές μεταλλάξεις στο γονίδιο *WT1*, φαίνεται να εμφανίζονται περίπου σε ποσοστό 6-15% των ασθενών με de novo οξεία μυελογενή λευχαιμία. Το *WT1* είναι ένας ψευδαργυρικός μεταγραφικός παράγοντας που απαιτείται για τη φυσιολογική ανάπτυξη. Οι μεταλλάξεις είναι δυνατό να εμφανιστούν σε όλο το γονίδιο προκαλώντας απώλεια της λειτουργίας. Ένας μηχανισμός με τον οποίο η απώλεια του *WT1* είναι ικανή να επηρεάσει την ογκογένεση, φαίνεται να σχετίζεται με τη μεθυλίωση του DNA. Μεταλλάξεις στο *WT1* καταλήγουν σε πρότυπο μεθυλίωσης του DNA παρόμοιο με εκείνο του μεταλλαγμένου *TET2* στην οξεία μυελογενή λευχαιμία, λόγω απώλειας αλληλεπίδρασης μεταξύ του *WT1* και του wild-type *TET2*. Εκτός από την απώλεια της λειτουργίας, το *WT1* μπορεί επίσης να έχει και ογκογόνα επίδραση.⁸⁴ Μεταλλάξεις στο γονίδιο *WT1* έχουν συσχετιστεί με τη

συνύπαρξη μεταλλάξεων στα γονίδια *FLT3* και *CEBPA*, και παρατηρούνται συνηθέστερα στους ασθενείς <60 ετών.

ε .Ρυθμιστές της μεθυλίωσης του DNA

Γονίδια που κωδικοποιούν παράγοντες που είτε άμεσα ή έμμεσα εμπλέκονται στη μεθυλίωση ή την απομεθυλίωση του DNA, συμπεριλαμβανομένων των *TET2*, *DNMT3A* και *IDH1* ή *IDH2*, παρουσιάζουν επαναλαμβανόμενες μεταλλάξεις.

Το *DNMT3* κωδικοποιεί μία de novo μεθυλτρανσφεράση, η οποία καταλύει τη μεθυλίωση της κυτοσίνης στα CpG δινουκλεοτίδια. Αυτές οι μεταλλάξεις ανευρίσκονται στο 20% περίπου των ασθενών με de novo οξεία μυελογενή λευχαιμία και σχεδόν στο 30% των ασθενών συνυπάρχουν με φυσιολογικό καρυότυπο των βλαστών. Σχεδόν το 50% των *DNMT3A* μεταλλάξεων είναι ετερόζυγες, missense αντικαταστάσεις στο κωδικόνιο R882 (πιο συχνά στη θέση R882H), με τις υπόλοιπες να αφορούν σε ελλείψεις, σε ετερόζυγες αντικαταστάσεις και frameshifts.⁸⁵ Πρόσφατες έρευνες αναφορικά με την παρουσία μεταλλάξεων στο γονίδιο *DNMT3A*, δείχνουν ότι η μετάλλαξη *DNMT3A R882* ενεργεί με κυρίαρχο αρνητικό τρόπο, με αποτέλεσμα την υπομεθυλίωση σε συγκεκριμένα δινουκλεοτίδια κυτοσίνης-γουανίνης στα βλαστικά κύτταρα και προσδίδει κακή επίδραση στη συνολική επιβίωση των ασθενών με φυσιολογικό καρυότυπο των βλαστών. Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων με μεταλλάξεις στο γονίδιο *DNMT3A*, ανευρίσκονται και μεταλλάξεις στο γονίδιο *NPM1*, κυρίως στους ασθενείς με φυσιολογικό καρυότυπο. Ωστόσο, δεν έχει παρατηρηθεί παρόμοια συσχέτιση με μεταλλάξεις στο γονίδιο *FLT3*. Η ποσοτική ανίχνευση της μετάλλαξης *DNMT3A R882* σε διαφορετικά χρονικά σημεία της νόσου, επιβεβαίωσε την παραμονή του μεταλλαγμένου κλώνου μετά από χημειοθεραπεία και την εξαφάνισή του μετά από αλλογενή μεταμόσχευση, γεγονός που καθιστά την αλλογενή μεταμόσχευση τη βέλτιστη θεραπευτική επιλογή για τους ασθενείς με οξεία μυελογενή λευχαιμία και τη μετάλλαξη *DNMT3A R882* ⁸⁶

Μεταλλάξεις στο γονίδιο *TET2* (ten-eleven-translocation 2), ανευρίσκονται σε ποσοστό 10-30% των ασθενών με οξεία μυελογενή λευχαιμία και συχνότερα

στους ασθενείς στους οποίους προϋπάρχει ΜΔΣ ή ΜΥΝ. Το γονίδιο *TET2* εδράζεται στο χρωμόσωμα 4q24 και μετατρέπει την 5-μεθυλκυτοσίνη (5-methylcytosine, 5 mC) σε 5-υδροξυμεθυλκυτοσίνη (5-hydroxymethylcytosine, 5 hmC), σημαντικό βήμα στην απομεθυλίωση του DNA.⁸⁷ Η υδροξυλίωση των μεθυλιωμένων CpG περιοχών από το *TET2*, ενεργοποιεί μονοπάτια σημαντικά για την κυτταρική διαφοροποίηση, συμπεριλαμβανομένου του συμπλέγματος homebox A. Αντίθετα, οι μεταλλάξεις που οδηγούν στην απώλεια της λειτουργίας του *TET2* σχετίζονται με μειωμένη διαφοροποίηση.⁸⁸ Οι Wang et.al., δημοσίευσαν πρόσφατα πως οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *TET2* προσδίδουν δυσμενή πρόγνωση στους ασθενείς με οξεία μυελογενή λευχαιμία, ακόμα και στους ασθενείς χωρίς κυτταρογενετικές ανωμαλίες. Μεταξύ αυτών των ασθενών, οι ασθενείς <65 ετών με μεταλλάξεις στο γονίδιο *TET2*, είχαν μειωμένη συνολική επιβίωση (Overall Survival, OS) και περιόδους ελεύθερης νόσου (Event-Free Survival, EFS) σε σύγκριση με τους wild-type ασθενείς. Στους ασθενείς ευνοϊκής πρόγνωσης σύμφωνα με τα ELN κριτήρια, οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *TET2* οδήγησαν σε σημαντικά μειωμένα ποσοστά επίτευξης πλήρους ύφεσης (Complete Remission) και μειωμένο OS. Επιπλέον, το μεταλλαγμένο *TET2* είχε δυσμενή επίδραση στο EFS στους ασθενείς ενδιάμεσου κινδύνου, σύμφωνα με τα ELN κριτήρια. Η εμφάνιση των μεταλλάξεων *TET2* αντιπροσωπεύει πρώιμο συμβάν στην ανάπτυξη της οξείας μυελογενούς λευχαιμίας. Εντούτοις, ορισμένοι ασθενείς με μεταλλάξεις στο γονίδιο *TET2*, δεν αναπτύσσουν τη νόσο. Πολλοί ερευνητές πρότειναν τη θεωρία της «κλωνικής αιμοποίησης απροσδιόριστου δυναμικού», η οποία συνδέεται με πολύ χαμηλό ποσοστό ανάπτυξης οξείας μυελογενούς λευχαιμίας και σχετίζεται με την ηλικία.⁸⁹

Οι μεταλλάξεις στα γονίδια *IDH1* και *IDH2* εμπλέκονται επίσης στην απορρύθμιση του *TET2* διαμέσου του 2-υδροξυγλουταρικού ογκομεταβολίτη (2-HG). Μεταλλαγμένα *IDH1* και *IDH2* καταλύουν τη μετατροπή του α-κετογλουταρικού σε 2-HG, με αποτέλεσμα να καταστέλλεται το *TET2* λόγω ανταγωνιστικής αναστολής στο σημείο δέσμευσης του α-κετογλουταρικού. Ο ρόλος τους στην παθογένεια της οξείας μυελογενούς λευχαιμίας θα συζητηθεί αναλυτικότερα παρακάτω.⁹⁰

στ.Γονίδια *IDH1* και *IDH2*

Οι ισοκυτταρικές αφυδρογονάσες (Isocitrate De-Hydrogenases, IDH) είναι ομοδιμερή ένζυμα που εμπλέκονται σε ποικίλες κυτταρικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένης της προσαρμογής στην υποξία. Αμφότερες οι πρωτεΐνες IDH1 και IDH2 καταλύουν την οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση ισοκυτρικού οξέος σε α-κετογλουταρικό (α-Ketoglutarate, α-KG) ώστε να παραχθεί NADPH από NADP⁺. Η παρουσία επαρκών κυτταρικών επιπέδων α-KG είναι απαραίτητη για την κατάλληλη λειτουργία πολλαπλών διοξυγενασών (dioxygenases) που εμπλέκονται στη ρύθμιση μεταβολικών μονοπατιών και επιγενετικών μεταβολών. Η IDH1 βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα (cytoplasm), ενώ η IDH2 εδράζεται στα μιτοχόνδρια. Η πρώτη συσχέτιση μεταξύ των μεταλλάξεων στα γονίδια *IDH* και την κακοήθεια αναφέρθηκε στο γλοίωμα.⁹¹ Οι σωματικές μεταλλάξεις στα γονίδια *IDH1* και *IDH2* παρατηρούνται σε ποσοστό έως και 20% των ασθενών με οξεία μυελογενή λευχαιμία και εμφανίζονται ως πρόωρα κλωνικά συμβάντα στην εξέλιξη της νόσου. Παρόλο που η προγνωστική τους συνάφεια παραμένει ασαφής, η επίδρασή τους στην πρόγνωση των ασθενών φαίνεται να επηρεάζεται από τον τύπο μετάλλαξης και από άλλες συνυπάρχουσες μεταλλάξεις.

Οι μεταλλάξεις *IDH1* και *IDH2* οδηγούν σε μια μεταλλαγμένη πρωτεΐνη με νεομορφική λειτουργία που οδηγεί στην παραγωγή ενός ογκομεταβολίτη, του ονομαζόμενου R-enantiomer of hydroxyglutarate (R-2-HG).^{92,93} Έτσι, τα κύτταρα με μεταλλάξεις στα γονίδια *IDH1* και *IDH2* αναμένεται να έχουν μειωμένο επίπεδο α-KG και αυξημένο επίπεδο R-2-HG, το οποίο υπό φυσιολογικές συνθήκες υπάρχει σε εξαιρετικά χαμηλές συγκεντρώσεις, αλλά μπορεί να συσσωρευθεί σε υψηλά επίπεδα στους όγκους. Ένα βασικό ζήτημα στη μελέτη της επαγόμενης ογκογένεσης από μεταλλάξεις στα *IDH1* και *IDH2*, είναι η παθοφυσιολογική λειτουργία του R-2-HG.^{94,95}

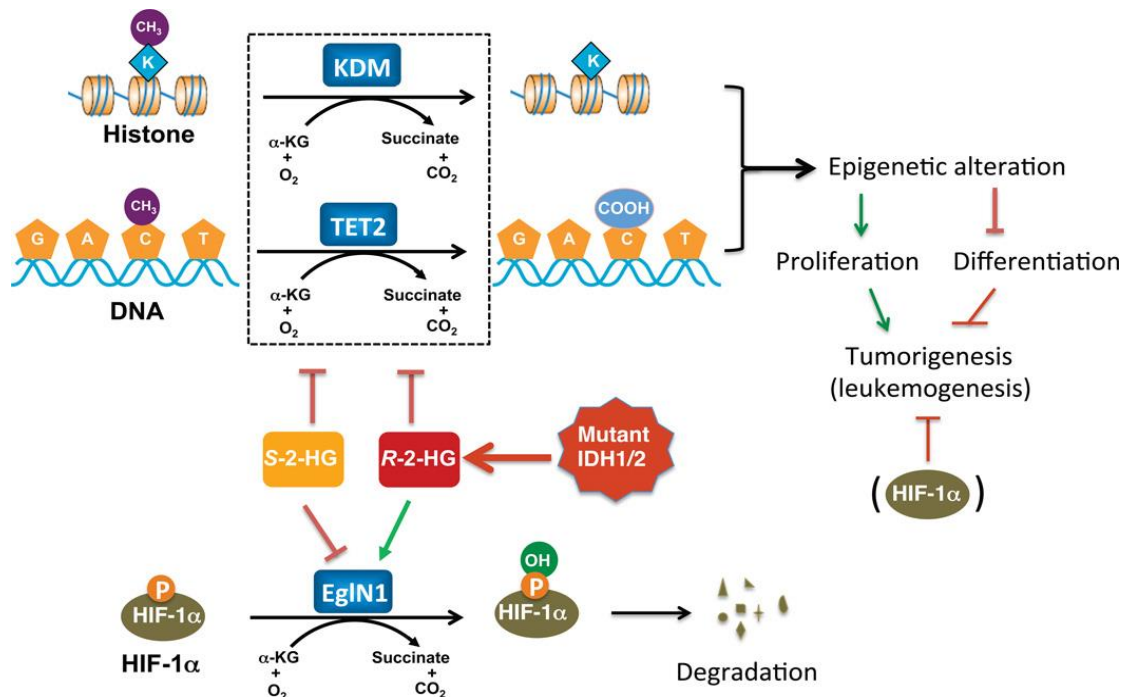
Το R-2-HG είναι δομικά παρόμοιο με το α-KG, με εξαίρεση την κατάσταση οξείδωσης στη θέση άνθρακα C-2, όπου μια ομάδα υδροξυλίου στο 2-HG, αντικαθιστά μια ομάδα κετόνης στο α-KG. Αυτή η δομική ομοιότητα υποδηλώνει την πιθανότητα ότι το R-2-HG δεσμεύεται στις διοξυγενάσες, στο θύλακα όπου δεσμεύεται το α-KG, ενεργώντας έτσι ως ανταγωνιστικός αναστολέας του α-KG.^{96,97,103} Τα ένζυμα αυτά εμπλέκονται σε ένα ευρύ φάσμα

ρυθμίσεων στο κύτταρο, όπως επίνει η απομεθυλίωση του DNA και της ιστόνης και η υδροξυλίωση των πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένης της υδροξυλίωσης και της αποδόμησης του παράγοντα που επάγεται από την υποξία (Hypoxia Inducible Factor 1-α, HIF-1α).⁹⁸⁻¹⁰⁰

Μελέτες έχουν αποδείξει ότι το R-2-HG μπορεί να αναστείλει τη δραστηριότητα πολλαπλών α-KG-εξαρτώμενων διοξυγενασών, μεταξύ των οποίων είναι η περιοχή JmjC που περιέχει απομεθυλάσες της ιστόνης (JmjC domain-containing lysine demethylases, KDMs), καθώς και η οικογένεια *TET* των υδροξυλασών του DNA, με κεφαλαιώδους σημασίας συμμετοχή στην απομεθυλίωση του DNA.^{101,102 103}

Η αναστολή των ενζύμων *TET* από το R-2-HG είναι ιδιαίτερως αξιοσημείωτη επειδή το *TET2* μεταλλάσσεται επίσης συχνά στην οξεία μυελογενή λευχαιμία. Οι μεταλλάξεις των γονιδίων *IDH1*, *IDH2* και *TET2* είναι αμοιβαίως αποκλειόμενες. Επιπλέον, η οξεία μυελογενής λευχαιμία είτε με μεταλλάξεις στα γονίδια *IDH1*, *IDH2* είτε με μεταλλάξεις στο γονίδιο *TET2*, εμφανίζει παρόμοια προφίλ μεθυλίωσης του DNA και γονιδιακής έκφρασης, υποδεικνύοντας ότι το *TET2* είναι στόχος του R-2-HG. Ως εκ τούτου, οι επιγενετικές μεταβολές θεωρούνται πλέον ένας κύριος μηχανισμός που υποκινεί την ογκογένεση και σχετίζονται με μεταλλάξεις στα γονίδια *IDH1* και *IDH2*.^{104,105} (Εικόνα 3)

Εικόνα 3



Ένα προτεινόμενο μοντέλο για το ρόλο του R-2-HG στην ογκογένεση:

Το R-2-HG που παράγεται από το μεταλλαγμένο *IDH1 / 2* προάγει την ογκογένεση αναστέλλοντας τις 5mC hydroxylase (*TET2*) και lysine demethylases (*KDM*), οδηγώντας σε απομεθυλίωση του DNA και της ιστόνης αντίστοιχα. Οι επιγενετικές μεταβολές που σχετίζονται με μεταλλάξεις *IDH1 / 2* έχουν ως αποτέλεσμα αλλαγές στην έκφραση γονιδίων και την ογκογένεση. Το R-2-HG διεγείρει το EglN1, το οποίο προάγει την αποδόμηση του HIF1 α μέσω υδροξυλίωσης.

(Shenghong , R-2-hydroxyglutarate as the key effector of IDH mutations promoting oncogenesis ,Cancer Cell 2013)

Οι Kaelin et.al. περιγράφουν ότι το R-2-HG είναι πράγματι ένας ογκομεταβολίτης, ικανός να διεγείρει τον πολλαπλασιασμό και να καταστείλει τη διαφοροποίηση, δύο ιδιότητες που είναι υποχρεωτικές για την ογκογένεση. Για τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση TF-1 (Transcription Factor-1) κυτταρικών σειρών από ασθενείς με ερυθρολευχαιμία, απαιτούνται GM-CSF και Epo αντίστοιχα. Χρησιμοποιώντας αυτό το μοντέλο κυτταρικής γραμμής, οι Kaelin et.al. διαπίστωσαν ότι η έκφραση του μεταλλαγμένου *IDH1 R132H*, αλλά όχι του wt *IDH1*, προήγαγε τον πολλαπλασιασμό TF-1 κυτάρων ακόμη και απουσία του GM-CSF και ανέστειλε την επαγόμενη από την ερυθροποιητίνη (Erythropoietin, EPO) διαφοροποίηση.¹⁰⁶⁻¹⁰⁷

Επιπλέον, το μεταλλαγμένο *IDH1 R132H* που δεν μπορεί να παράγει R-2-HG, δεν επάγει το μετασχηματισμό των κυττάρων TF-1. Αυτά τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι το R-2-HG λειτουργεί ως ένας ογκομεταβολίτης, προάγοντας την ανεξάρτητη από κυτταροκίνη ανάπτυξη και εμποδίζοντας την επαγόμενη από την ερυθροποιητίνη διαφοροποίηση.

Η ογκογόνος λειτουργία του R-2-HG αποδείχτηκε μέσω κατεργασίας TF-1 κυττάρων με ένα διαπερατό στο κύτταρο R-2-HG ανάλογο. Τα TF-1 κύτταρα που διαπερνούσαν το κύτταρο μέσω του R-2-HG, αποκτούσαν ανεξάρτητη από κυτταροκίνη ανάπτυξη και δεν διαφοροποιούνταν περαιτέρω ως απόκριση στην ερυθροποιητίνη, φαινοτύποι παρόμοιοι με εκείνους που προκαλούνται από την έκφραση της μετάλλαξης *IDH1 R132H*.

Οι Losman et al. κατέδειξαν το *TET2* ως την πιο πιθανή, βασική α-KG εξαρτώμενη διοξυγενάση, υπεύθυνη για την ογκογονική λειτουργία του R-2-HG.

Υπάρχουν δύο τύποι του 2-HG: το R-2-HG και το S-2-HG. Μόνο το R-2-HG παράγεται από μεταλλάξεις στα γονίδια *IDH1* και *IDH2*. Και οι δύο τύποι αναστέλλουν πολλές α-KG- εξαρτώμενες διοξυγενάσες, με το R-2-HG να είναι σημαντικά λιγότερο ισχυρό από το S-2-HG.¹⁰⁸⁻¹¹⁰

Παραδόξως, οι Losman et al. ανακάλυψαν ότι το R-2-HG, αλλά όχι το S-2-HG, προήγαγε τον λευχαιμικό μετασχηματισμό, με τρόπο εξαρτώμενο από τη δόση και τη διέλευση. Γεννήθηκε λοιπόν το ερώτημα πώς θα μπορούσε το S-2-HG, ως ισχυρότερος αναστολέας του *TET2*, να είναι αναποτελεσματικό στην προώθηση του ογκογονικού μετασχηματισμού;

Οι Kaelin et.al. είχαν προηγουμένως αναφέρει ότι το R-2-HG διεγείρει τη δραστηριότητα EglN1, το οποίο προάγει την αποδόμηση του HIF 1α μέσω υδροξυλίωσης, ενώ το S-2-HG αναστέλλει το EglN1. Οι συγγραφείς έδειξαν ότι η αναστολή του EglN1 από το S-2-HG, πιθανόν να καταστέλλει την ικανότητά του EglN1 να προάγει την ανεξάρτητη από την κυτταροκίνη ανάπτυξη και να αναστέλλει την επαγόμενη από την ερυθροποιητίνη διαφοροποίηση. Αυτό το συμπέρασμα προκάλεσε έκπληξη, δεδομένου του γεγονότος ότι το HIF-1α συνδέεται με την προαγωγή του όγκου και όχι με την αναστολή του. Τα δεδομένα από τους Losman et.al. υποδηλώνουν ότι η αναστολή του EglN1 και συνεπώς η συσσώρευση του HIF-1α, δεν συνάδουν

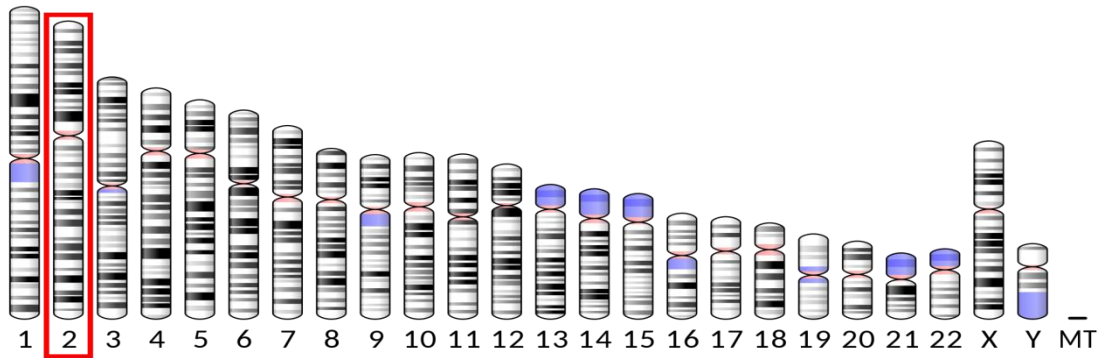
με τη λευχαιμία που προκαλείται από την αναστολή του *TET2* από το R-2-HG.^{105,107}

Η λειτουργία του R-2-HG στην παρεμπόδιση της διαφοροποίησης, είναι συμβατή με μια προηγούμενη αναφορά που υποστηρίζει ένα ρόλο του μεταλλαγμένου *IDH1* στην καταστολή της αιμοποιητικής διαφοροποίησης.

Εκτός από την τροποποιημένη μεθυλίωση του DNA, η αυξημένη μεθυλίωση της ιστόνης συσχετίστηκε, επίσης, με την έκφραση της σχετιζόμενης με τον καρκίνο *IDH1* μετάλλαξης. Επομένως, η αναστολή της JmjC οικογένειας των απομεθυλασών της ιστόνης, ενδεχομένως να συμβάλλει επίσης στην ογκογένεση. Μία ενιαία υπόθεση για την ογκογένεση που προκαλείται από μετάλλαξη στα μεταβολικά ένζυμα, είναι ότι η αναστολή των α-KG εξαρτώμενων διοξυγενασών οδηγεί σε επιγενετικές αλλοιώσεις τόσο στο DNA όσο και στην ιστόνη, μεταβάλλοντας έτσι την γονιδιακή έκφραση και προάγοντας την ογκογένεση. Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο, αμφότερα τα ένζυμα KDM και TET αναστέλλονται από δύο μεταβολίτες, succinate και fumarate, οι οποίοι είναι δομικά παρόμοιοι με το α-KG και συσσωρεύονται σε κύτταρα που εκφράζουν μεταλλάξεις στα γονίδια *SDH* (Succinate Dehydrogenase) και *FH* (Fumarate Hydratase) αντίστοιχα, τα οποία σχετίζονται με τον καρκίνο.¹¹¹

Το ένζυμο IDH1 κωδικοποιείται από το γονίδιο *IDH1* το οποίο εδράζεται στο χρωμόσωμα 2 και συγκεκριμένα στη θέση 2q33.(Εικόνα 4). Σε αιματολογικές κακοήθειες, οι μεταλλάξεις *IDH1* συχνότερα περιλαμβάνουν αντικατάσταση της αργινίνης στη θέση R132 από κυστεΐνη (cysteine, R132C) ή από ιστοιδίνη (hystidine,R132H).

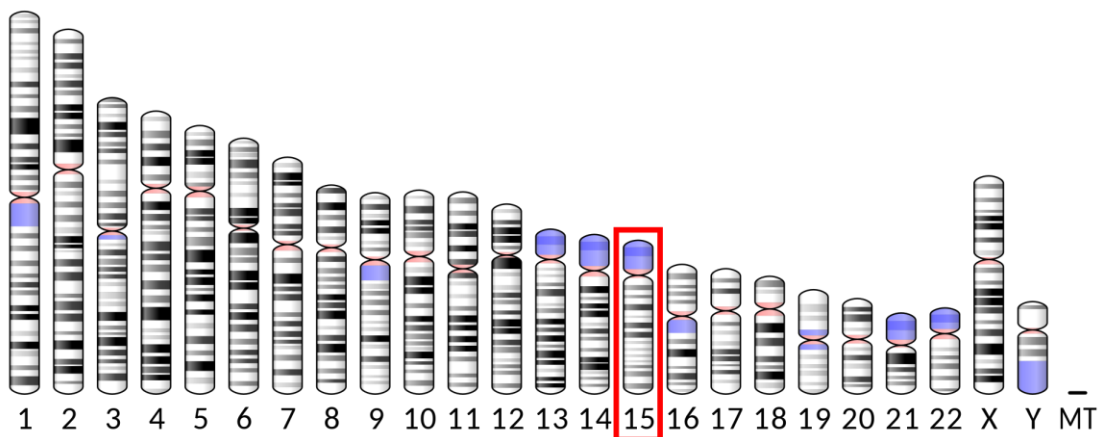
Εικόνα 4



IDH1 gene location at chromosome 2

Το γονίδιο *IDH2* που κωδικοποιεί το ένζυμο IDH2 εδράζεται στο χρωμόσωμα 15 και συγκεκριμένα στη θέση 15q26.1 (Εικόνα 5). Η πρωτεΐνη *IDH2* αποτελεί κεφαλαιώδους σημασίας συστατικό του κύκλου του Krebs. Στις *IDH2* μεταλλάξεις η αργινίνη αντικαθίσταται συνηθέστερα από γλουταμίνη στο υπόλειμμα 140 (Residue 140, *R140Q*) και από λυσίνη στο υπόλειμμα 172 (*R172K*). Οι μεταλλάξεις *IDH2-R140* παρουσιάζονται συχνότερα από τις μεταλλάξεις *IDH2-R172* και αντιπροσωπεύουν το 80% των μεταλλάξεων *IDH2* στην οξεία μυελογενή λευχαιμία.

Εικόνα 5



IDH2 gene location at chromosome 15

Οι μεταλλάξεις *IDH1* και *IDH2* τείνουν να είναι αμοιβαία αποκλειόμενες. Οι οξείες μυελογενείς λευχαιμίες με μεταλλάξεις στα γονίδια *IDH1* και *IDH2* αντιπροσωπεύουν περίπου το 20% όλων των οξείων μυελογενών λευχαιμιών και διέπονται από κοινά κλινικά χαρακτηριστικά. Αφορούν στην πλειοψηφία σε ηλικιωμένους ασθενείς, που τείνουν να έχουν υψηλότερο αριθμό αιμοπεταλίων, υψηλότερο αριθμό βλαστών στο μυελό των οστών και στο περιφερικό αίμα και μεγαλύτερο βαθμό ουδετεροπενίας κατά τη διάγνωση. Μεταλλάξεις στα γονίδια *IDH1* και *IDH2*, παρατηρούνται συνήθως σε ασθενείς με καρυοτυπικές βλάβες που τους κατατάσσουν στην κατηγορία του ενδιάμεσου κινδύνου, συμπεριλαμβανομένης της τρισωμίας 8 και του φυσιολογικού καρυοτύπου. Επιπλέον, αντιπροσωπεύουν πρώιμα συμβάντα στην παθογένεση και την εξέλιξη της νόσου, καθώς βρίσκονται σε κυρίαρχους κλώνους και παραμένουν ακόμα και μετά τη χημειοθεραπεία ή τη στιγμή της υποτροπής ή της εξέλιξης της νόσου.¹¹⁰ Οι μεταλλάξεις *IDH1* είναι λιγότερο συχνές από τις μεταλλάξεις *IDH2* στην οξεία μυελογενή λευχαιμία και το μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο.^{101,112-114.}

ζ. Το Πολυκλωνικό Σύμπλεγμα (Polycomb Complex)

Το πολυκλωνικό σύμπλεγμα διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη σίγαση της μεταγραφής κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης. Μεταλλάξεις στα γονίδια ή στους ρυθμιστές έχουν αναγνωριστεί σε πολλούς καρκίνους, συμπεριλαμβανομένης της οξείας μυελογενούς λευχαιμίας. Το *ASXL1* (Additional Sex Combs-Like 1) αποτελεί ενισχυτή του πολυκλωνικού συμπλέγματος και διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στην έκφραση γονιδίου *HOX* κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης. Μεταλλάξεις στο *ASXL1* έχουν ως αποτέλεσμα την απώλεια της λειτουργίας του γονιδίου και εμφανίζονται σε ποσοστό 10-20% των ασθενών με οξεία μυελογενή λευχαιμία και ειδικότερα σε ασθενείς στους οποίους προϋπάρχει μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο.

Το *ASXL2* εμπλέκεται επίσης στη ρύθμιση της καταστολής του πολυκλωνικού συμπλέγματος και οι μεταλλάξεις στο *ASXL2* ανευρίσκονται σε ποσοστό μεγαλύτερο του 20% των ασθενών με οξεία μυελογενή λευχαιμία που

υποκρύπτουν την αντιμετάθεση *RUNX1/RUNX1T1*, οι οποίες είναι αμοιβαία αποκλειόμενες με τις μεταλλάξεις στο *ASLX1*.

Το γονίδιο *NSD1* (Nuclear receptor binding SET domain protein 1) κωδικοποιεί μία μεθυλτρανσφεράση ιστόνης, η οποία συμμετέχει στη φυσιολογική ανάπτυξη. Η αντιμετάθεση *t(5;11)(q35;p15;5)* προκαλεί τη συγχώνευση του γονιδίου *NSD1* με το γονίδιο *NUP 98*. Η αντιμετάθεση αυτή παρατηρείται σε ποσοστό 15% περίπου στους παιδιατρικούς ασθενείς με οξεία μυελογενή λευχαιμία, αλλά σε ποσοστό λιγότερο από το 5% στους ενήλικες και σχετίζεται με κακή ανταπόκριση στη θεραπεία. Αυτή η πρωτεΐνη σύντηξης συνδέεται με ρυθμιστικά στοιχεία του πολυκλωνικού συμπλέγματος και οδηγεί στην ενεργοποίηση του *HOX* γονιδίου.¹¹⁵

η .Το σύμπλοκο spliceosome

Το σύμπλοκο spliceosome αποτελείται από έναν αριθμό πρωτεϊνών γύρω από ένα πυρήνα μικρού ριβονουκλεϊκού οξέος (small nuclear RNA, snRNA), το οποίο αναγνωρίζει μοντέλα ματίσματος (splicing) στο pre-mRNA, αφαιρώντας ιντρόνια και επανασυνδέοντας εξόνια προς δημιουργία μίας ποικιλίας ισομορφών m-RNA από κάθε κωδικοποιημένο γονίδιο. Επαναλαμβανόμενες μεταλλάξεις έχουν αναγνωρισθεί σε αιματολογικές κακοήθειες και συχνότερα επηρεάζουν τα *SF3B1* (Splicing factor 3b), *U2AF1* (U2 Small Nuclear RNA Auxiliary Factor 1), *SRSF2* (Serine And Arginine Rich Splicing Factor 2) ή *ZRSR2* (Zinc Finger CCCH-Type, RNA Binding Motif And Serine/Arginine Rich 2). Αυτές οι μεταλλάξεις ανιχνεύονται σε ποσοστό 15% των ασθενών με οξεία μυελογενή λευχαιμία, είναι τυπικά ετερόζυγες και τείνουν να είναι αμοιβαίως αποκλειόμενες.¹¹⁶

θ . Το σύμπλοκο Cohesin

Το σύμπλοκο cohesin διαδραματίζει σημαντικό ρόλο κατά τη διάρκεια της μετάφρασης διατηρώντας ενωμένες τις αδελφές χρωματίδες, διασφαλίζοντας το διαχωρισμό τους σε αντίθετους πόλους κατά τη διάρκεια της μίτωσης και της μείωσης. . Επιπλέον, το σύμπλοκο cohesin συμμετέχει στην επιδιόρθωση του DNA και έχει ρυθμιστικό ρόλο στην έκφραση των γονιδίων. Ο πυρήνας αποτελείται από τις πρωτεΐνες SMC1, SMC3 (Structural Maintenance of Chromosomes proteins) και τα αντιγόνα στρωμαλίνης STAG1 ή STAG2. Επαναλαμβανόμενες μεταλλάξεις των γονιδίων αυτού του συμπλέγματος του πυρήνα, έχουν εντοπιστεί σε ποσοστό 15% περίπου των ασθενών με οξεία μυελογενή λευχαιμία.¹¹⁷

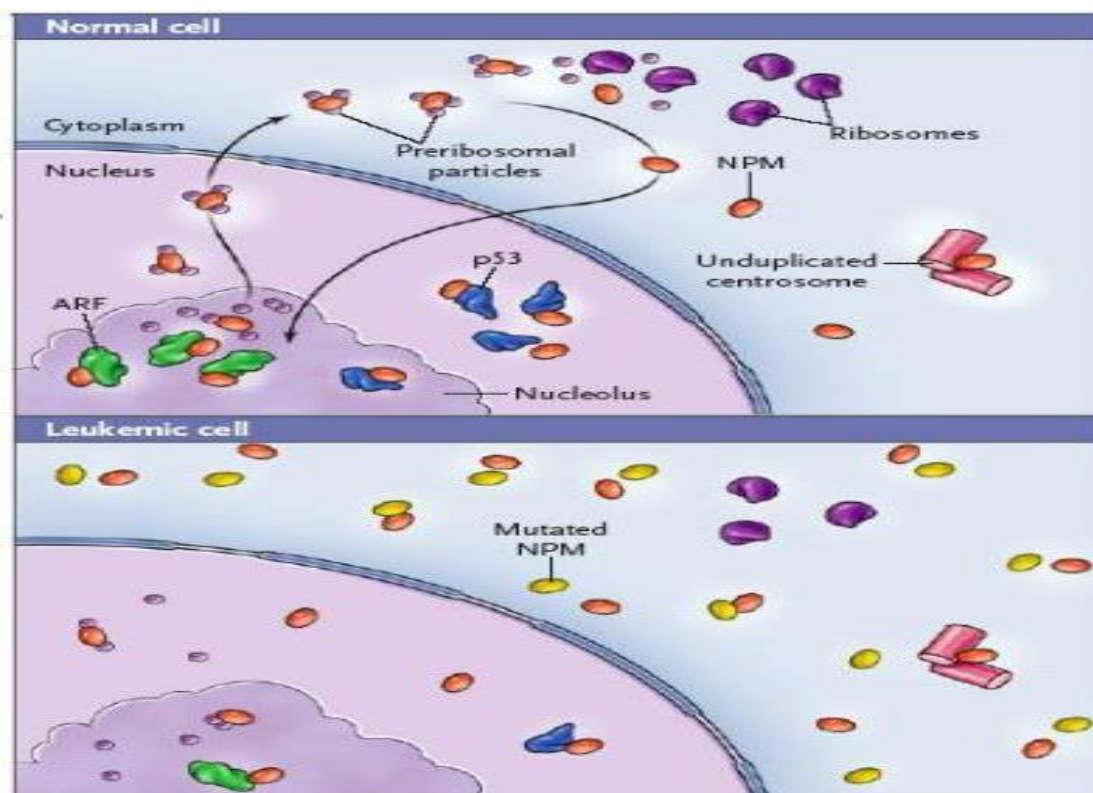
ι . Nucleophosmin

Το Nucleophosmin (*NPM1*) είναι ένα συνοδευτικό μόριο με πολλαπλές λειτουργίες, συμπεριλαμβανομένης της βιοσύνθεσης των ριβοσωμάτων ως RNA-δεσμευτική πρωτεΐνη και το διπλασιασμό των κεντρομεριδίων κατά τη μίτωση, την παρεμπόδιση της συσσωμάτωσης των πρωτεϊνών του πυρήνα και τη ρύθμιση του ογκοκατασταλτικού γονιδίου *TP53*. Μεταλλάξεις στο γονίδιο *NPM1* εμφανίζονται περίπου στο 1/3 των ασθενών με οξεία μυελογενή λευχαιμία και συνηθέστερα στους ασθενείς με φυσιολογικό καρυότυπο βλαστών. Οι μεταλλάξεις στο *NPM1* αποτελούν πρώιμα γεγονότα στην ανάπτυξη της οξείας μυελογενούς λευχαιμίας.

Η Nucleophosmin ή αλλιώς nucleolar phosphoprotein B23 ή numatrin, είναι η πρωτεΐνη η οποία στον άνθρωπο κωδικοποιείται από το γονίδιο *NPM1*. Η πρωτεΐνη εντοπίζεται στον πυρήνα και υπόκειται σε φωσφορυλίωση και εδράζεται στο χρωμόσωμα 5 και συγκεκριμένα στην περιοχή 5q35.1. Το *NPM1* εντοπίζεται σε δομές πυρηνικής ριβονουκλεοπρωτεΐνης και δεσμεύει single-stranded και double-stranded νουκλεϊκά οξέα, ωστόσο, κατά «προτίμηση», δεσμεύει τα νουκλεϊκά οξέα που σχηματίζουν τετραπλή σύντηξη. Συμμετέχει στη βιογένεση των ριβοσωμάτων καθώς και τη μεταφορά στο κυτταρόπλασμα pre-ribosomal σωματιδίων, διαμέσου της πυρηνικής

μεμβράνης. Επιπλέον, διαδραματίζει κύριο ρόλο στον έλεγχο του διπλασιασμού των κεντροσωμάτων κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου και συμμετέχει στη ρύθμιση των ογκοκατασταλτικών μονοπατιών. Ιδιαίτερη σημασία έχει η συμμετοχή του *NPM1* στην οξεία μυελογενή λευχαιμία όπου εντοπίζεται, εσφαλμένα, μεταλλαγμένη πρωτεΐνη στο κυτταρόπλασμα των ασθενών, η οποία δεν φέρει αναδίπλωση του C-terminal domain (*NPM1c+*). Αυτός ο παρεκκλίνων εντοπισμός έχει συνδεθεί με την ανάπτυξη της νόσου και σχετίζεται με καλή πρόγνωση. Έχει επίσης αποδειχθεί ότι στο πλαίσιο κλωνικής αιμοποίησης απροσδιόριστης σημασίας που φέρει τη μετάλλαξη *DNMT3A*, μεταγενέστερες μεταλλάξεις *NPM1* οδηγούν την εξέλιξη σε μυελοϋπερπλαστικό νεόπλασμα.¹¹⁸ (Εικόνα 6)

Εικόνα 6



Ρόλος του *NPM1*: Συμμετοχή του *NPM1* στη μεταφορά pre-ribosomal σωματιδίων διαμέσου της πυρηνικής μεμβράνης στο κυτταρόπλασμα, ελέγχει το διπλασιασμό των κεντροσωμάτων κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, ρυθμίζει ογκοκατασταλτικά μονοπάτια. Το μεταλλαγμένο *NPM1* εντοπίζεται εσφαλμένα στο κυτταρόπλασμα, δημιουργώντας διμερή με το wild type *NPM1*, με αποτέλεσμα τη «μη αποδέσμευση» από το κυτταρόπλασμα. *NPM1*: Nucleolar phosphoprotein, Nucleus: πυρήνας, Nucleolus: πυρηνίσκος, Ribosomes: ριβοσώματα, Pre-ribosomal particles: «pre-ribosomal» σωματίδια, Unduplicated centrosome: κεντρόσωμα που δεν έχει υποστεί διπλασιασμό (Qin Zou et al., . *NPM1* Mutant Mediated PML Delocalization and Stabilization Enhances Autophagy and Cell Survival in Leukemic Cells. Theranostics 2017; 7(8):2289-2304)

1.3 Επιγενετικές μεταβολές στην Οξεία Μυελογενή Λευχαιμία

Η οξεία μυελογενής λευχαιμία χαρακτηρίζεται από επιγενετικές αλλοιώσεις, όπως τις τροποποιήσεις στο DNA, τη δυσλειτουργία στην έκφραση των μικρών και μεγάλων μη κωδικοποιημένων RNAs, καθώς και μεταβολές στις μακροπρόθεσμες αλληλεπιδράσεις με το DNA, με αποτέλεσμα την αλλοιωμένη έκφραση των γονιδίων. Μεθυλίωση της κυτοσίνης στο DNA σε θέσεις CpG οι οποίες εμπλουτίζονται σε περιοχές γονιδιακού υποκινητή, αποτελεί ένα βασικό ρυθμιστή της γονιδιακής έκφρασης.

Επαναλαμβανόμενες μεταλλάξεις τύπου missense στο *DNMT3A*, είναι πιθανό να λειτουργούν με κυρίαρχο αρνητικό τρόπο και να οδηγούν, εστιακά, σε μειωμένη μεθυλίωση του DNA. Οξειδωση της 5-μεθυλκυτοσίνης σε 5- υδροξυ-μεθυλ-κυτοσίνη από τα ένζυμα TET, είναι ένα ενδιάμεσο βήμα προς την επακόλουθη μεθυλίωση. Αναστολή του *TET2* είτε μέσω μετάλλαξης που οδηγεί σε απώλεια της λειτουργίας, είτε μέσω παραγωγής 2-HG στο πλαίσιο μεταλλάξεων στα γονίδια *IDH1* και *IDH2*, έχει ως αποτέλεσμα την ανώμαλη υδροξυμεθυλίωση.

Η μεθυλίωση του DNA και η τροποποίηση της ιστόνης είναι αποτέλεσμα συντονισμού ποικίλων μονοπατιών. Για παράδειγμα, το *EVI1* (Ecotropic Viral Integration Site-1) συμμετεχει στη μεθυλίωση του DNA, αλλά επίσης συνεργάζεται με αποακετυλάσες των ιστονών και μεθυλτρανσφεράσες. Το πολυκλωνικό κατασταλτικό σύμπλεγμα 2 (Polycomb Repressive Complex 2, PRC2) καταλύει τη μεθυλίωση της ιστόνης H3K27, έχοντας ως αποτέλεσμα τη σίγαση των γονιδίων.¹¹⁹

1.6 Βιολογία της Οξείας Μυελογενούς Λευχαιμίας

α . Ο ρόλος του μικροπεριβάλλοντος του μυελού των οστών

Η οξεία μυελογενής λευχαιμία αποτελεί διαταραχή των αιμοποιητικών κυττάρων που βρίσκονται εγκατεστημένα στο μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών, γνωστό ως «φωλεά», όπου η στρωματική υποδομή βοηθά στην επιβίωση των λευχαιμικών κυττάρων. Η αναγνώριση ότι ορισμένες μεταλλάξεις μπορεί να χαθούν ή να αποκτηθούν σε υποτροπή (π.χ *FLT3-ITD*), ενώ άλλες ανευρίσκονται στη διάγνωση και παραμένουν σταθερές (π.χ αναδιατάξεις *NPM1*, *CBF*), υποδηλώνουν ότι ξεχωριστοί κλωνικοί πληθυσμοί μπορούν να συνυπάρχουν σε ένα δείγμα ασθενούς με οξεία μυελογενή λευχαιμία. Η ταξινόμηση σειριακά λαμβανόμενων δειγμάτων αποκάλυψε μία κλωνική ιεραρχία στην οξεία μυελογενή λευχαιμία, ξεκινώντας με έναν αρχικό, «ιδρυτικό» κλώνο, που αντιπροσωπεύει τον αρχικό πληθυσμό που κυριαρχεί στο μυελό των οστών. Ο κλώνος αυτός δύναται να τροφοδοτήσει την ανάπτυξη υποκλώνων, οι οποίοι διατηρούν τις μεταλλάξεις του αρχικού κλώνου, αλλά αποκτούν στη συνέχεια επιπρόσθετες μεταλλάξεις που προσφέρουν πλεονέκτημα επιβίωσης. Μελέτη δειγμάτων των ασθενών με οξεία μυελογενή λευχαιμία που τέθηκαν σε μορφολογική ύφεση μετά από κυτταροτοξική θεραπεία και στη συνέχεια υποτροπίασαν, αποκάλυψαν ότι ο κυρίαρχος κλώνος στην υποτροπή διατηρεί τις θεμελιώδεις μεταλλάξεις του αρχικού κλώνου. Οι παρατηρήσεις αυτές εγείρουν την υπόθεση ότι οι θεραπείες που στοχεύουν στην εξάλειψη των “drivers” του αρχικού κλώνου, ίσως να είναι αποτελεσματικότερες από τις θεραπείες που στοχεύουν τους υποκλώνους.

Οι σωματικές μεταλλάξεις (somatic mutations) συσσωρεύονται κατά τρόπο εξαρτώμενο από την ηλικία στους υγιείς, χωρίς να διαταράσσεται η αιμοποίηση στις περισσότερες περιπτώσεις. Ωστόσο, μελέτες αλληλουχιών σε υγιή άτομα άνω των 65 ετών έχουν αποδείξει ότι μέχρι το 10% των φαινομενικά υγιών ατόμων έχουν ανιχνεύσιμους κλωνικούς πληθυσμούς, που χαρακτηρίζονται από σωματικές μεταλλάξεις σε γονίδια που είναι μεταλλαγμένα στους ασθενείς με οξεία μυελογενή λευχαιμία (ιδιαίτερα σε επιγενετικούς ρυθμιστές όπως *DNMT3*, *TET2* και *ASXL1*).¹²⁰

Συχνά, ένας δεδομένος τύπος μετάλλαξης δεν είναι ικανός να προκαλέσει τον πλήρη φαινότυπο της λευχαιμίας και μία δεύτερη σειρά μεταλλάξεων είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη του λευχαιμικού κυττάρου.

Αυτή η άποψη δημιούργησε το “two-hit model” της λευχαιμογένεσης, το οποίο περιλαμβάνει δύο κατηγορίες μεταλλάξεων : α) μεταλλάξεις που ενεργοποιούν τις οδούς επαγωγής σήματος και οδηγούν σε ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό και επιβίωση και β) μεταλλάξεις που επηρεάζουν τους μεταγραφικούς παράγοντες ή άλλα στοιχεία μεταγραφής, προκαλώντας διαταραχή της διαφοροποίησης των αιμοποιητικών στοιχείων και παρεκκλίνουσα απόκτηση ιδιοτήτων ανανέωσης. Από την αρχική δημοσίευση αυτού του μοντέλου το 2002, η μελέτη ολόκληρου του γονιδιώματος (whole genome sequencing) αναγνώρισε πολλές άλλες γονιδιακές μεταλλάξεις που εμπλέκονται στην παθολογία της οξείας μυελογενούς λευχαιμίας. Αν και τα πρόσφατα περιγραφέντα γονίδια δεν έχουν καταταγεί σε κάποια από τις δύο κατηγορίες μεταλλάξεων, εντούτοις η αρχή της συνεργιστικής δραστηριότητας στη διαδικασία της εξαλλαγής παραμένει έγκυρη. Τα λευχαιμικά κύτταρα αφού υποστούν γενετικές μεταλλάξεις στο πλαίσιο των ευνοϊκών αλληλεπιδράσεων με το περιβάλλον, είναι ικανά να συσσωρεύσουν ταχέως επιπλέον βλάβες και αυτή η γονιδιακή αστάθεια οδηγεί στην εξέλιξη του κλώνου.

1.4 Κριτήρια Αξιολόγησης Οξείας Μυελογενούς Λευχαιμίας

Ο ακρογωνιαίος λίθος της διάγνωσης της οξείας μυελογενούς λευχαιμίας παραμένει η μορφολογική εκτίμηση. Στις τρέχουσες οδηγίες του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (World Health Organization, WHO), η διήθηση του μυελού από μυελοβλάστες πρέπει να είναι τουλάχιστον 20%, εκτός από τις περιπτώσεις που ανευρίσκονται συγκεκριμένες αναδιατάξεις όπως $t(8;21)$, $t(16;16)/inv16$, ή $t(15;17)$, οι οποίες θέτουν τη διάγνωση της οξείας μυελογενούς λευχαιμίας ανεξάρτητα από τον αριθμό των βλαστών. Επιπροσθέτως, τα προμυελοκύτταρα στην οξεία μονοκυτταρική λευχαιμία, οι μεγακαρυοβλάστες στην οξεία μεγακαρυοβλαστική λευχαιμία και τα παθολογικά προμυελοκύτταρα στην οξεία προμυελοκυτταρική λευχαιμία, υπολογίζονται στο ποσοστό των βλαστών. Στην περίπτωση της

ερυθρολευχαιμίας, αρχικά οι ερυθροβλάστες συμπεριλαμβάνονταν στην καταμέτρηση των βλαστών και οι βλάστες της μυελικής σειράς υπολογίζονταν στα non-erythroid cells, ενώ πλέον στη νέα ταξινόμηση οι μυελοβλάστες υπολογίζονται πάντα ως ποσοστό των συνολικών κυττάρων του μυελού.

Η κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιεί πολυπαραμετρική ανάλυση προκειμένου να εκτιμηθεί η κοκκίωση, το μέγεθος των κυττάρων καθώς και τα αντιγόνα που εκφράζονται στην επιφάνειά τους. Η συνέκφραση συγκεκριμένων δεικτών επιφανείας μπορεί να βοηθήσει στην επιβεβαίωση της προέλευσης των κυττάρων της μυελικής σειράς και να προσδιορίσει τα άωρα βλαστικά κύτταρα, τα οποία τυπικά εκφράζουν τους δείκτες CD34 και CD117 και επίσης να διακρίνει μικρούς πληθυσμούς βλαστών που δεν ανιχνεύονται μορφολογικά. Για το λόγο αυτό, η μέθοδος αυτή καθιερώθηκε ως η βασική για την παρακολούθηση της υπολειπόμενης νόσου.

Θεμελιώδους σημασίας για τη διαστρωμάτωση των ασθενών με οξεία μυελογενή λευχαιμία σε καλής, ενδιάμεσης και κακής πρόγνωσης, αποτελεί η μελέτη του καρυοτύπου των βλαστών.

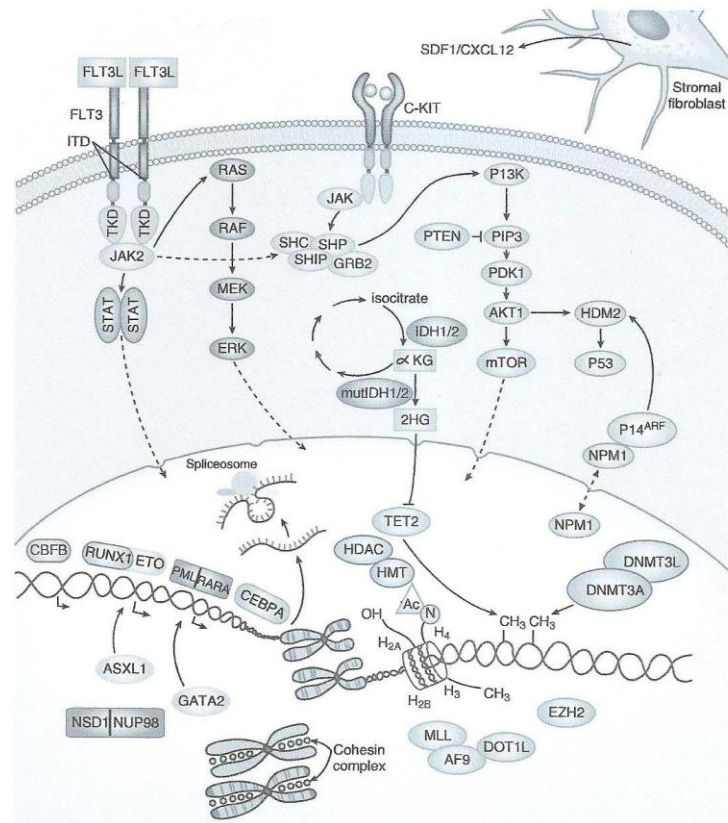
Η ανίχνευση των σημειακών μεταλλάξεων διαδραματίζει ρόλο στην αρχική ταξινόμηση των ασθενών σε κατηγορίες κινδύνου. Επιπλέον, η εφαρμογή στοχευμένων θεραπειών εξαρτάται αποκλειστικά από την ανίχνευση συγκεκριμένων μεταλλάξεων.

Δεδομένου του ταχύτατα αναπτυσσόμενου αριθμού των γονιδίων που αναγνωρίζονται ως στόχοι των επαναλαμβανόμενων σημειακών μεταλλάξεων στην οξεία μυελογενή λευχαιμία, μεγαλύτερο προφίλ μεταλλάξεων αρχίζει να εισέρχεται στη συνήθη κλινική πρακτική. Η ανίχνευση γονιδιακών μεταλλάξεων με next generation sequencing, προσφέρει πλεονεκτήματα όσον αφορά στην ευαισθησία, το κόστος και την αποτελεσματικότητα, συγκριτικά με τις παραδοσιακές μεθόδους, όπως την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR).

Οι μεταλλάξεις στην οξεία μυελογενή λευχαιμία συνήθως επηρεάζουν τις οδούς που σχετίζονται με την κυτταρική σηματοδότηση, τη διαφοροποίηση, τις δευτερογενείς τροποποιήσεις στο DNA και τα ογκοκατασταλτικά γονίδια.

Συλλογικά, αυτές οι βλάβες παρεμβαίνουν στην αυτοανανέωση, στη διαφοροποίηση και στις οδούς επιβίωσης (Εικόνα 7).^{121, 122}

Εικόνα 7



Μονοπάτια που μεταβάλλονται στην Οξεία Μυελογενή Λευχαιμία

Ac, acetyl; *AF9*, ALL1-fused gene from chromosome 9 protein;

α-KG, α -ketoglutarate; *ARF*, ADP-ribosylation factor; *AKT1*, AKT serine/threonine kinase 1; *ASXL1*, additional sex Combs-like 1; *CBFB*, core binding factor b; *CEBPA*, CCAAT/enhancer binding protein- α ; *CH₃*, methyl; *CXCL12*, CXC-chemokine ligand 12; *DNMT3A*, DNA methyltransferase 3A; *DNMT3L*, DNAmethyltransferase 3 like; *DOT1L*, disruption of telomeric silencing 1-like; *ERK*, Extracellular signal-related kinase; *ETO*, eight twenty one or RUNX1T1; *EZH2*, Enhancer of zeste homolog 2; *FLT3L*, FMS-like tyrosine kinase-3 ligand; *GATA1*, GATA binding protein 1; *GRB2*, growth factor receptor-bound protein 2; *H*, histone; *HDAC*, histone deacetylase; *HDM2*, human homolog of double minute 2, P53-binding protein; *HMT*, histone methyltransferase; *IDH1/2*, isocitrate dehydrogenase-1/2; *ITD*, internal tandem duplication; *JAK*, Janus-activated kinase; *MEK*, mitogen-activated protein kinase kinase; *MLL*, mixed lineage leukemia; *mTOR*, mammalian target of rapamycin; *N*, nitrogen; *NPM1*, nucleophosmin; *NSD1*, nuclear receptor binding SET domain protein 1; *Nup98*, nucleoporin 98; *OH*, hydroxyl; *P14^{ARF}*, cyclin-dependent kinase inhibitor 2A; *p53*, tumor protein p53; *RARA*, retinoic acid receptor α ; *PDK1*, phosphoinositide-dependent kinase-1; *PI3K*, phosphatidylinositol 3-kinase; *PIP3*, phosphoinositide-3,4,5-trisphosphate; *PML*, promyelocytic leukemia; *PTEN*, phosphatase and tensin homolog; *RAF*, RAF kinase family; *RAS*, RAS family kinase; *RUNX1*, runt-related transcription factor 1; *SDF-1*, stromal cell-derived factor 1; *SHC*, Src Homology 2 Domain-Containing; *SHIP*, SH2-containing inositol phosphatase; *SHP*, small heterodimer partner; *STAT*, signal transducer and activator of transcription; *TET2*, TET oncogene family member 2; *TKD*, tyrosine kinase domain

Clinical Cancer Research

Οι Paraemmanuil et.al. δημοσίευσαν αποτελέσματα από μελέτη 1.540 ασθενών με οξεία μυελογενή λευχαιμία και αναγνώρισαν 5.234 «driver» μεταλλάξεις που περιελάμβαναν 76 γονίδια ή περιοχές. Οι σημειακές μεταλλάξεις αντιπροσώπευαν το 73% όλων των driver μεταλλάξεων (3.824 από τις 5.234) και συχνότερα ανευρίσκονταν στους ασθενείς ενδιάμεσου κινδύνου, σύμφωνα με τις ισχύουσες οδηγίες. Αναγνωρίστηκε τουλάχιστον μία driver μετάλλαξη σε 1.478 από τα 1.540 δείγματα (ποσοστό 96%) και 2 ή περισσότερες driver μεταλλάξεις στο 86% των δειγμάτων. Αν και τα πρότυπα συνυπαρχουσών μεταλλάξεων και αμοιβαίας αποκλειστικότητας έχουν περιγραφεί προηγουμένως στην οξεία μυελογενή λευχαιμία, εντούτοις το μέγεθος του δείγματος έδωσε μια πιο ολοκληρωμένη ανάλυση, η οποία αναγνώρισε πολλούς νέους γονιδιακούς συνδυασμούς σε ζεύγη. Επίσης διαπιστώθηκαν διαφορές στα πρότυπα των συνυπαρχουσών μεταλλάξεων, στα «hot spots» εντός των γονιδίων. Το *NPM1* για παράδειγμα, ανευρίσκεται συνδεδεμένο στις περισσότερες περιπτώσεις με το *NRASG12/13* αλλά όχι με το *NRASQ61*. Μοτίβα συνύπαρξης μεταλλάξεων παρατηρήθηκαν επίσης για τις μεταλλάξεις *IDH2R140* και *IDH2R172* και για τις μεταλλάξεις *FLT3-ITD* και *FLT3-TKD*.

Οι μεταλλάξεις στα γονίδια *DNMT3A*, *ASXL1*, *IDH1*, *IDH2* και *TET2*, που κωδικοποιούν επιγενετικούς τροποποιητές, αποκτώνται συνήθως νωρίτερα. Αυτά τα γονίδια συχνά μεταλλάσσονται σε ηλικιωμένα άτομα με κλωνική εξέλιξη της νόσου και προσδίδουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης αιματολογικών καρκίνων. Στον πληθυσμό που μελετήθηκε, οι μεταλλάξεις σε αυτά τα γονίδια ήταν συνήθως στον κλώνο που επιβίωσε και σχεδόν ποτέ δεν βρέθηκαν μεμονωμένα, υποδηλώνοντας ότι δεν επαρκούν για την εμφάνιση της λευχαιμίας.

Οι μεταλλάξεις στα γονίδια της οδού RAS τυπικά εμφανίζονται σε μεταγενέστερο στάδιο. Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *NPM1* είναι συνήθως δευτερεύοντα συμβάντα, που συχνά εμφανίζονται μετά τις μεταλλάξεις *DNMT3A*, *IDH1* ή *NRAS*. Αυτά τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι η ανάπτυξη της οξείας μυελογενούς λευχαιμίας ακολουθεί συγκεκριμένες εξελικτικές τροχιές.¹²³

1.8 Κλινικές εκδηλώσεις στην Οξεία Μυελογενή Λευχαιμία

Τα σημεία και τα συμπτώματα της οξείας μυελογενούς λευχαιμίας αντικατοπτρίζουν το αποτέλεσμα των κυτταροπενιών. Οι ασθενείς παρουσιάζουν συνήθως ένα σύντομο ιστορικό (1-8 εβδομάδες) με γενικά συμπτώματα όπως κόπωση, αίσθημα κακουχίας και εφιδρώσεις, αιμορραγικές εκδηλώσεις (όπως ουλορραγία, επίσταξη, εκχυμώσεις ή μηνορραγία) ή ακόμα και εμπύρετο. Ο πυρετός εκ νόσου παραμένει διάγνωση εξ' αποκλεισμού. Εξωμυελικές εντοπίσεις στα ούλα, το δέρμα, ή άλλα όργανα είναι δυνατό να παρατηρηθούν. Οστικά άλγη παρατηρούνται σπάνια και θα και πρέπει να εγείρουν την υποψία οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας (ΟΛΛ), ιδιαίτερος σε παιδιά. Η συμμετοχή του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ) είναι σπάνια, με εξαίρεση την οξεία μυελογενή λευχαιμία με μονοκυτταρική / μονοβλαστική διαφοροποίηση ή σε οποιαδήποτε οξεία μυελογενή λευχαιμία με σημαντική λευκοκυττάρωση ($WBC > 100K/\mu L$).

Η εργαστηριακή αξιολόγηση πρέπει να περιλαμβάνει τη γενική αίματος με αξιολόγηση του επιχρίσματος του περιφερικού αίματος, βιοχημικό έλεγχο ο οποίος να περιλαμβάνει μέτρηση ηλεκτρολυτών, ουρίας, κρεατινίνης, ολικής χολερυθρίνης καθώς και άμεσης και έμμεσης χολερυθρίνης, τρανσαμινάσες, ουρικό οξύ, γαλακτική αφυδρογονάση (LDH). Απαραίτητος είναι ο έλεγχος πήκτικότητας, οποίος πρέπει να περιλαμβάνει μέτρηση του χρόνου προθρομβίνης (prothrombin time, PT), του χρόνου μερικής θρομβοπλαστίνης (partial thromboplastin time, PTT), επίπεδα ινωδογόνου και μέτρηση δ-διμερών (d-dimers). Υψηλός αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων ανευρίσκεται συνηθέστερα σε ασθενείς με μυελομονοκυτταρική διαφοροποίηση.

Λευκοκυττάρωση με αριθμό λευκών $100K/\mu L$ ή υψηλότερο, επιτάσσει την άμεση έναρξη κυτταρομείωσης, καθώς είναι αυξημένος ο κίνδυνος λευκόστασης, με καταστροφικές συνέπειες οργάνων στόχων (όπως πνεύμονα ή εγκέφαλο). Επιπλέον, μπορεί να πυροδοτηθεί συστηματική φλεγμονώδης αντίδραση με σοβαρή δευτερογενή βλάβη οργάνου (π.χ. διάχυτη κυψελιδική αιμορραγία ή ηπατική ανεπάρκεια). Ωστόσο, δεν υπάρχει πάντα συσχέτιση μεταξύ του αριθμού των λευκοκυττάρων και των κλινικών εκδηλώσεων.

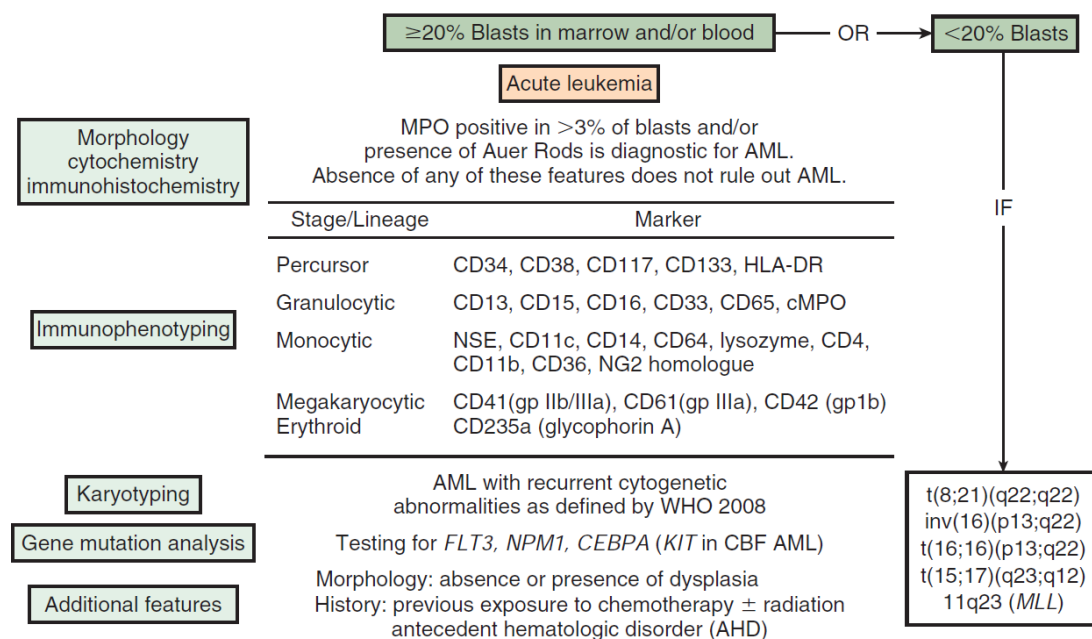
Ακόμα και πολύ χαμηλότερα επίπεδα WBC μπορεί να προκαλέσουν απειλητική για τη ζωή συμπτωματολογία.

Συχνά παρατηρείται διάχυτη ενδοαγγειακή πήξη (ΔΕΠ) σε ασθενείς μονοκυτταρικό στοιχείο, οξεία προμυελοκυττατική λευχαιμία και σε οποιοδήποτε λευχαιμία με υψηλό αριθμό λευκών. Σε πολλές περιπτώσεις παρατηρείται υποκλινική ΔΕΠ, η οποία μπορεί να επιδεινωθεί με την έναρξη της χημειοθεραπείας. Οι μελέτες απεικόνισης δεν βοηθούν πολύ στη διάγνωση, αποτελούν ωστόσο «εργαλείο» για την αξιολόγηση των επιπλοκών.¹²⁴

1.9 Διάγνωση της Οξείας Μυελογενούς Λευχαιμίας

Η διάγνωση της οξείας μυελογενούς λευχαιμίας βασίζεται στη μορφολογική αξιολόγηση, τον ανοσοφαινότυπο με κυτταρομετρία ροής, καθώς και την αξιολόγηση του καρυότυπου και των μοριακών βλαβών. (Εικόνα 8)

Εικόνα 8



ΑΛΓΟΡΙΘΜΟΣ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗΣ ΟΜΛ: Η διαγνωστική προσέγγιση της ΟΜΛ αποτελείται από εκτίμηση επιχρισμάτων μυελού και περιφερικού αίματος, ανοσοφαινότυπο με κυτταρομετρία ροής και αξιολόγηση του καρυότυπου των βλαστών, καθώς και των γονιδιακών μεταλλάξεων. Η μορφολογική εκτίμηση από μόνη της δεν επαρκεί για να τεθεί η διάγνωση της ΟΜΛ και η κυτταρομετρία ροής θα επιβεβαιώσει τη διάγνωση. Αντιγόνα που εκφράζονται στη μυελική και στη λεμφική σειρά συνυπάρχουν σε έναν πληθυσμό βλαστών (διφαινοτυπική λευχαιμία) ή σε ξεχωριστούς πληθυσμούς βλαστών (δικλωνική λευχαιμία, bilineal). Η μελέτη καρυότυπου και γονιδιακών μεταλλάξεων μπορεί να προσθέσει διαγνωστικές πληροφορίες σε μορφολογικά ασαφείς καταστάσεις, ωστόσο αποτελούν κριτήρια για τον προσδιορισμό της πρόγνωσης. Επιπλέον πληροφορίες (έκθεση σε προηγούμενη χημειοθεραπεία ή / και ακτινοθεραπεία, ιστορικό προηγούμενης αιματολογικής διαταραχής, δυσπλασία) αποτελεί τη βάση για την αναθεωρημένη ταξινόμηση κατά WHO του 2008. AHD: Adecedent Hematologic Disorder (Προγενέστερη αιματολογική διαταραχή). ΟΜΛ: οξεία μυελογενή λευχαιμία. CBF: Core Binding Factor, MPO: μυελοϋπεροξειδάση, WHO: Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας.

Το ποσοστό της διήθησης προσδιορίζεται σωστότερα από την καταμέτρηση 500 κυτάρων στο επίχρισμα μυελού των οστών, η μελέτη του οποίου πραγματοποιείται μετά από χρώση των επιχρισμάτων με May-Grünwald-Giemsa. Οστεομυελική βιοψία πραγματοποιείται όταν δεν είναι δυνατή η αναρρόφηση μυελού των οστών (μυελός «dry tap»). Τα επιχρίσματα ή τα αποτυπώματα μυελού των οστών βοηθούν στην τυποποίηση της κυτταρικής σειράς με τη βοήθεια κυτταροχημικών χρώσεων (MPO: myeloperoxidase, NSE: non specific esterase, PAS: periodic acid–Schiff, SBB: Sudan black B). Η ανοσοφαινοτυπική μελέτη επιτυγχάνεται καλύτερα με πολυπαραμετρική κυτταρομετρία ροής σε αίμα ή αναρρόφημα μυελού των οστών. Ο καρυότυπος είναι πολύ σημαντικός προγνωστικός δείκτης και θα πρέπει να εκτελείται σε όλους τους ασθενείς κατά τη διαγνωστική αναρρόφηση μυελού των οστών. Κυτταρικά εναιωρήματα μυελού των οστών που συλλέγονται σε EDTA θα πρέπει να συντηρούνται στους -80°C για περαιτέρω μοριακές μελέτες .

Περιγράφονται αδρά τρεις τύποι μυελοβλαστών με βάση τα κοκκία και τα χαρακτηριστικά του πυρήνα: ο τύπος 1 χαρακτηρίζεται από βλάστες με βασεόφιλο κυτταρόπλασμα χωρίς κοκκία, πυρήνα με λεπτή δομή χρωματίνης και δύο έως τέσσερα πυρήνια, ο τύπος 2 χαρακτηρίζεται από βασεόφιλο κυτταρόπλασμα με 20 ή λιγότερα κοκκία και παρόμοια χαρακτηριστικά του πυρήνα με τον 1^ο τύπο και ο τύπος 3 που χαρακτηρίζεται από βασεόφιλο κυτταρόπλασμα με περισσότερα από 20 κοκκία, αν και η μορφολογική ποικιλία των βλαστών υπερβαίνει τις ανωτέρω αναφερόμενες κατηγορίες.

Τα προμυελοκύτταρα έχουν μετρίως βασεόφιλο κυτταρόπλασμα με πολυάριθμα αζουρόφιλα κοκκία και οι μονοβλάστες και τα προμυελοκύτταρα συνήθως εμφανίζουν αναδιπλωμένους πυρήνες με πυρήνια. Τα προμυελοκύτταρα, όπως και τα προμυελοκύτταρα και οι προμυελοβλάστες θεωρούνται ισοδύναμα βλαστών στην οξεία προμυελοκυτταρική λευχαιμία και την οξεία μονοβλαστική λευχαιμία αντίστοιχα.

Η εμφανής δυσπλασία μπορεί να υποδηλώνει προϋπάρχουσα διάγνωση μυελοδυσπλαστικού συνδρόμου, αλλά μπορεί επίσης να βρεθεί σε ασθενείς με de novo οξεία μυελογενή λευχαιμία, όπου η προγνωστική σημασία των δυσπλαστικών αλλοιώσεων είναι λιγότερο σαφής. Οι περιπτώσεις στις οποίες ανευρίσκεται εκτεταμένη ίνωση μπορεί να υποδεικνύουν προγενέστερο μυελοϋπερπλαστικό νεόπλασμα ή οξεία μεγακαρυοκυτταρική λευχαιμία.^{120,124}

1.10 Συστήματα ταξινόμησης της Οξείας Μυελογενούς Λευχαιμίας

Η οξεία μυελογενής λευχαιμία χαρακτηρίζεται από αξιοσημείωτη ετερογένεια, ωστόσο μέχρι προσφάτως δεν είχε σημειωθεί σημαντική πρόοδος ως προς την αντιμετώπισή της. Επανάσταση αποτελεί η προσθήκη νέων παραγόντων στη φαρέτρα των «όπλων» για την καταπολέμηση της νόσου, οι οποίοι στοχεύουν σε μοριακές βλάβες, όπως οι αναστολείς του γονιδίου *FLT3* στους ασθενείς με μεταλλάξεις στο εν λόγω γονίδιο.

Η ταξινόμηση κατά FAB (French-American-British) της οξείας μυελογενούς λευχαιμίας που συντάχθηκε το 1976, με την επακόλουθη αναθεώρησή της το 1985, αποτέλεσε την πρώτη δομημένη ταξινόμηση της νόσου, η οποία βασιζόταν κυρίως στα μορφολογικά χαρακτηριστικά των βλαστών και απαιτούσε για τον ορισμό της διήθηση μυελού των οστών από βλαστικά κύτταρα σε ποσοστό 30% στο σύνολο των εμπυρήνων κυττάρων. Στη συνέχεια, η ανοσοφαινοτυπική μελέτη των βλαστών επέτρεψε την καλύτερη μελέτη και ταυτοποίηση των πρόδρομων κυττάρων της κοκκιδώδους σειράς και προστέθηκαν οι κατηγορίες της μεγακαρυοβλαστικής λευχαιμίας και της οξείας μυελογενούς λευχαιμίας με ελάχιστη διαφοροποίηση.

Στην αναθεωρημένη FAB ταξινόμηση αναφέρονταν 7 υπότυποι οξείας μυελογενούς λευχαιμίας, όπως παραθέτονται στον παρακάτω πίνακα. (Πίνακας 2).¹²⁵

Πίνακας 2

Ταξινόμηση της Οξείας Μυελογενούς Λευχαιμίας κατά FAB

M0	Βλάστες >90% των κυττάρων του μυελού (πλην της ερυθράς σειράς). MPO (-)
M1	Βλάστες >90% των κυττάρων του μυελού (πλην της ερυθράς σειράς). MPO θετική σε >3% των βλαστών
M2	Βλάστες >30% και <90% των κυττάρων του μυελού (πλην της ερυθράς σειράς). MPO θετική σε >3% των βλαστών. Μονοκυτταρικό στοιχείο<20%
M3	Επικράτηση M3 βλαστών (παθολογικά προμυελοκύτταρα). MPO έντονα θετική.
M3v	Απουσία χαρακτηριστικών προμυελοκυττάρων. Βλάστες με απουσία κοκκίων, εντομή πυρήνα που μπορεί να θυμίζει μονοκύτταρο. MPO έντονα θετική.
M4	Βλάστες >30% των κυττάρων του μυελού (πλην της ερυθράς σειράς). Μονοκυτταρικό στοιχείο >20%.
M5a	Βλάστες μονοκυτταρικής σειράς >30%. Μονοβλάστες >80% των βλαστών.
M5b	Βλάστες μονοκυτταρικής σειράς >30%. Μονοβλάστες <80% των βλαστών.
M6	Ερυθροβλάστες >50% των εμπύρηνων κυττάρων του μυελού. Βλάστες > 30% των κυττάρων του μυελού (πλην ερυθράς σειράς.)
M7	Μεγακαρυοβλάστες >30% των κυττάρων του μυελού (πλην της ερυθράς σειράς)

Ωστόσο, η ανακάλυψη των γενετικών ανωμαλιών που σχετίζονταν με την οξεία μυελογενή λευχαιμία και που αναγνωρίστηκαν για πρώτη φορά στη δεκαετία του '80, φάνηκαν να παρέχουν σημαντικές πληροφορίες προγνωστικής αξίας, οι οποίες δεν συσχετίζονταν πάντα με τις οντότητες της FAB ταξινόμησης. Με την μελέτη και την κατανόηση της επίπτωσης των κυτταρογενετικών ανωμαλιών στην παθογένειά της νόσου, σχεδιάστηκαν και εφαρμόστηκαν νέα συστήματα ταξινόμησης που βασίζονταν αποκλειστικά στην «ευνοϊκής», «ενδιάμεσης» και «κακής» πρόγνωσης κυτταρογενετικές ανωμαλίες.

Η ταξινόμηση της WHO που δημοσιεύτηκε το 2001 επαναπροσδιόριζε τον ορισμό της οξείας μυελογενούς λευχαιμίας και απαιτούσε την ύπαρξη

βλαστικών κυττάρων στο μυελό των οστών ή στο περιφερικό αίμα σε ποσοστό 20% και υπογράμμισε τη σημασία των συνυπαρχουσών κυτταρογενετικών ανωμαλιών. Η αλλαγή αυτή προέκυψε από την παρατήρηση ότι οι ασθενείς που προηγουμένως είχαν ταξινομηθεί στην κατηγορία των Μυελοδυσπλαστικών Συνδρόμων και πιο συγκεκριμένα στον υπότυπο της ανθεκτικής αναιμίας με περίσσεια βλαστών σε μετατροπή (Refractory anemia with excess of blasts in transformation, RAEB-T), είχαν παρόμοια έκβαση με τους ασθενείς με οξεία μυελογενή λευχαιμία και έχρηζαν θεραπειάς. Επιπλέον, κατέστη υποχρεωτική η μελέτη του καρυοτύπου των βλαστών, καθώς η συμπερίληψή του στην ταξινόμηση της οξείας μυελογενούς λευχαιμίας σε υποκατηγορίες, αναγνώρισε σημαντικές πληροφορίες όχι μόνο ως προς την παθογένειά της, αλλά και την πρόγνωση της έκβασης. Ωστόσο, η ταξινόμηση της WHO αναγνώρισε ότι δεν καθορίζονται όλες οι λευχαιμίες με βάση τις κυτταρογενετικές ανωμαλίες και ορισμένες θα οριστούν με βάση τα μορφολογικά ευρήματα. Ως εκ τούτου, αναγνωρίστηκαν τέσσερις μεγάλες κατηγορίες:

-οξεία μυελογενής λευχαιμία με «επαναλαμβανόμενες» κυτταρογενετικές ανωμαλίες (AML with recurring cytogenetic abnormalities)

- οξεία μυελογενής λευχαιμία σχετιζόμενη με θεραπεία (therapy-related AML)

-οξεία μυελογενής λευχαιμία με δυσπλασία πολλαπλών σειρών (AML with multilineage dysplasia) και τέλος

-οξεία μυελογενής λευχαιμία που δεν εντάσσονταν σε άλλη κατηγορία (AML not otherwise categorized, NOS).

Η αναθεώρηση της ταξινόμησης το 2008 υπογράμμισε τη σημασία της διαστρωμάτωσης των ασθενών και ως εκ τούτου εφαρμόστηκαν ορισμένες αλλαγές. Η κατηγορία των οξείων μυελογενών λευχαιμιών με κυτταρογενετικές ανωμαλίες επεκτάθηκε και συμπεριλήφθηκαν και λιγότερο συχνές βλάβες. Επιπροσθέτως, δημιουργήθηκαν οντότητες που ορίζονται από μεταλλάξεις που συχνά εμφανίζονται σε περιπτώσεις χωρίς κυτταρογενετικές ανωμαλίες και συγκεκριμένα οι μεταλλάξεις στα γονίδια *NPM1* και *CEBPA*, οντότητες που χαρακτηρίστηκαν ως «provisional». Στην

ταξινόμηση του 2008 προσδιορίστηκαν περισσότεροι από 25 υπότυποι. Η εφαρμογή νεότερων μεθόδων όπως single-nucleotide polymorphism array karyotyping και next generation sequencing, είχε ως αποτέλεσμα την αναγνώριση νέων driver μεταλλάξεων, οι οποίες ανευρίσκονται κυρίως στους ασθενείς με οξεία μυελογενή λευχαιμία και φυσιολογικό καρυότυπο των βλαστών, σε ποσοστό 40-50% περίπου και έχουν ενσωματωθεί στην κλινική πράξη για την εκτίμηση της ανταπόκρισης στη θεραπεία καθώς και την πρόγνωση. Σημαντικές μεταλλάξεις αποτελούν οι ακόλουθες: *FLT3*, *NPM1*, *KIT*, *CEBPA*, *TET2*, *DNMT3A* και *IDH1*.

Με την ανάπτυξη πιο ευαίσθητων μεθόδων ανάλυσης, ο διαχωρισμός των ασθενών σε υποκατηγορίες έχει γίνει πιο λεπτομερής. Στην αναθεωρημένη ταξινόμηση του 2016, περιλαμβάνεται ο υπότυπος της οξείας μυελογενούς λευχαιμίας με *BCR-ABL*, που συνοδεύεται από ελλείμματα στους αντιγονικούς υποδοχείς και συγκεκριμένα αναδιατάξεις στη βαριά αλυσίδα της ανοσοσφαιρίνης, διαταραχή που παρατηρείται κυρίως στις de novo οξείες μυελογενείς λευχαιμίες. Επιπλέον, αναγνωρίζεται ο υπότυπος με μεταλλάξεις και στα δύο αλληλία στο γονίδιο *CEBPA* (biallelic mutations), καθώς και ο υπότυπος με μεταλλάξεις στο γονίδιο *RUNX1*, χωρίς να καταστήσει την ταξινόμηση υπερβολικά πολύπλοκη¹²⁶. (Πίνακας 3).

Πίνακας 3

Ταξινόμηση της Οξείας Μυελογενούς Λευχαιμίας- WHO 2016

Μυελογενείς νεοπλασίες με γενετική προδιάθεση, OML και σχετιζόμενα «precursor» νεοπλάσματα και OML «διφορούμενης γενεαλογίας» (ambiguouslineage)
Μυελογενείς νεοπλασίες με γενετική προδιάθεση*
Μυελογενείς νεοπλασίες με γενετική προδιάθεση χωρίς προϋπάρχουσα διαταραχή ή δυσλειτουργία οργάνων
OML με μετάλλαξη στο <i>CEBPA</i>
Μυελογενείς νεοπλασίες με μετάλλαξη στο <i>DDX41</i> ⚡
Μυελογενείς νεοπλασίες με γενετική προδιάθεση και προϋπάρχουσα διαταραχή των αιμοπεταλίων
Μυελογενείς νεοπλασίες με μετάλλαξη στο <i>RUNX1</i> ⚡
Μυελογενείς νεοπλασίες με μετάλλαξη στο <i>ANKRD26</i> ⚡
Μυελογενείς νεοπλασίες με μετάλλαξη στο <i>ETV2</i> ⚡

Μυελογενείς νεοπλασίες με γενετική προδιάθεση και άλλη δυσλειτουργία οργάνων
Μυελογενείς νεοπλασίες με μετάλλαξη στο <i>GATA2</i>
Μυελογενείς νεοπλασίες σχετιζόμενες με σύνδρομο ανεπάρκειας μυελού των οστών
Νεανική μυελομονοκυτταρική λευχαιμία σχετιζόμενη με νευροϊνωμάτωση, σύνδρομο Noonan, ή διαταραχές τύπου συνδρόμου Noonan
Μυελογενείς νεοπλασίες σχετιζόμενες με σύνδρομο Noonan
Μυελογενείς νεοπλασίες σχετιζόμενες με σύνδρομο Down
Οδηγός για μοριακές εξετάσεις±
1. Προδιάθεση για μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο ή ΟΜΛ <i>CEBPA, DDX41, RUNX1, ANKRD26, ETV6, GATA2, SRP72, 14q32.2 genomic duplication (ATG2B/GSKIP)</i>
2. Σύνδρομο που προδιαθέτουν την ανάπτυξη κακοήθειας§ Σύνδρομο Li Fraumeni (<i>TP53</i>) Μεταλλάξεις στα γονίδια <i>BCRA1</i> και <i>BCRA2</i>
3. Σύνδρομο ανεπάρκειας μυελού των οστών Συγγενής δυσκεράτωση (<i>TERC, TERT</i>) Αναιμία Fanconi

* Η αναγνώριση οικογενών μυελοειδών νεοπλασμάτων απαιτεί από τους γιατρούς να πάρουν ένα λεπτομερές ιστορικό ασθενούς και οικογενειακού ιστορικού για να αξιολογήσουν τα τυπικά σημεία και τα συμπτώματα γνωστών συνδρόμων, συμπεριλαμβανομένων των δεδομένων για κακοήθειες και προηγούμενων επεισοδίων αιμορραγίας, για τον τρόπο ταυτοποίησης, εξετάσεων και συμβουλευτικής, ασθενών ύποπτων για μυελογενή νεοπλασία με γενετική προδιάθεση.

⚡ Λεμφογενή νεοπλάσματα επίσης αναφέρονται

± Τα μοριακά γενετικά διαγνωστικά καθοδηγούνται από λεπτομερές ιστορικό των ασθενών και των οικογενειών. Θα πρέπει να διεξάγονται σε στενή συνεργασία με έναν γενετικό σύμβουλο. Οι ασθενείς με υποψία κληρονομικού μυελογενούς νεοπλάσματος αρνητικού για τα γνωστά γονίδια προδιάθεσης, θα πρέπει ιδανικά να εισαχθούν σε μια ερευνητική μελέτη, για να διευκολύνουν την ανακάλυψη νέων συνδρόμων.

§ Μεταλλάξεις γονιδίων που σχετίζονται με προδιάθεση για ανάπτυξη κακοήθειας όπως *TP53* και *BCRA1* και *BCRA2*, φαίνεται να ανευρίσκονται συχνά σε μυελογενή νεοπλάσματα σχετιζόμενα με προηγηθείσα θεραπεία.

ΟΜΛ και σχετιζόμενα νεοπλάσματα
ΟΜΛ με επαναλαμβανόμενες γενετικές ανωμαλίες
ΟΜΛ με t(8;21)(q22;q22.1); <i>RUNX1-RUNX1T1</i>
ΟΜΛ με inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i>
Οξεία προμυελοκυτταρική λευχαιμία με <i>PML-RARA</i> *
ΟΜΛ με t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>MLLT3-KMT2A</i> ⚡
ΟΜΛ με t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i>
ΟΜΛ με inv(3)(q21.3q26.2) ή t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2, MECOM (EVI1)</i>
ΟΜΛ (μεγακαρυοβλαστική) με t(1;22)(p13.3;q13.3); <i>RBM15-MKL1</i> ±
«Provisional» οντότητα: ΟΜΛ με <i>BCR-ABL1</i>
ΟΜΛ με μεταλλαγμένο <i>NPM1</i> §

OML με biallelic μεταλλάξεις του <i>CEBPA</i> §
«Provisional» οντότητα: OML με μεταλλαγμένο <i>RUNX1</i>
OML με μυελοδυσπλαστικού τύπου αλλοιώσεις II
Μυελογενή νεοπλάσματα σχετιζόμενα με θεραπεία ¶
Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία, μη περαιτέρω προσδιοριζόμενη (NOS)
OML και σχετιζόμενα νεοπλάσματα
OML με επαναλαμβανόμενες γενετικές ανωμαλίες
OML με t(8;21)(q22;q22.1); <i>RUNX1-RUNX1T1</i>
OML με inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i>
Οξεία προμυελοκυτταρική λευχαιμία με <i>PML-RARA</i> *
OML με t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>MLLT3-KMT2A</i> ⚡
OML με t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i>
OML με inv(3)(q21.3q26.2) ή t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2, MECOM (EVI1)</i>
OML (μεγακαρυοβλαστική) με t(1;22)(p13.3;q13.3); <i>RBM15-MKL1</i> ±
«Provisional» οντότητα: OML με <i>BCR-ABL1</i>
OML με μεταλλαγμένο <i>NPM1</i> §
OML με biallelic μεταλλάξεις του <i>CEBPA</i> §
«Provisional» οντότητα: OML με μεταλλαγμένο <i>RUNX1</i>
OML με μυελοδυσπλαστικού τύπου αλλοιώσεις II
Μυελογενή νεοπλάσματα σχετιζόμενα με θεραπεία ¶
Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία, μη περαιτέρω προσδιοριζόμενη (NOS)
Οξεία μυελογενής λευχαιμία με ελάχιστη διαφοροποίηση
Οξεία μυελογενής λευχαιμία χωρίς ωρίμανση
Οξεία μυελογενής λευχαιμία με ωρίμανση
Οξεία μυελομονοκυτταρική λευχαιμία
Οξεία μονοβλαστική/μονοκυτταρική λευχαιμία
Αμιγής ερυθροκυτταρική λευχαιμία #
Οξεία μεγακαρυοβλαστική λευχαιμία
Οξεία βασεοφιλική λευχαιμία
Οξεία πανμυέλωση με μυελοίνωση
Μυελοειδές σάρκωμα
Μυελογενείς υπερπλασίες που σχετίζονται με το σύνδρομο Down
Παροδική μη φυσιολογική μυελοποίηση (Transient abnormal myelopoiesis, TAM)
Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία σχετιζόμενη με το σύνδρομο Down
Βλαστική μορφή πλασμοκυτταρικού νεοπλάσματος δενδριτικών κυττάρων
Οξεία Λευχαιμία «ambiguous lineage»
Οξεία λευχαιμία αδιαφοροποίητη
Μεικτού φαινοτύπου Οξεία Λευχαιμία (Mixed Phenotype Acute Leukemia, MPAL) με t(9;22)(q34.1;q11.2); <i>BCR-ABL1</i> **
MPAL με t(v;11.q23.3); <i>KMT2A</i> σε αναδιάταξη
MPAL, Β/μυελογενής, μη περαιτέρω προσδιοριζόμενη
MPAL, Τ/μυελογενής, μη περαιτέρω προσδιοριζόμενη

Για τη διάγνωση της OML απαιτείται διήθηση μυελού από βλαστικά κύτταρα σε ποσοστό $\geq 20\%$, με εξαίρεση την OML με τις επαναλαμβανόμενες γενετικές ανωμαλίες t(15; 17), t (8; 21), inv(16) ή t(16;16).

MPAL, mixed phenotype acute leukemia; NK, natural killer.

*Άλλες επαναλαμβανόμενες αντιμεταθέσεις που αφορούν στο *RARA* πρέπει να αναφερθούν, για παράδειγμα: OML με t(11;17)(q23;q12) *ZBTB16-RARA*, OML με t(11;17)(q13;q12) *NUMA1-RARA*, OML με t(5;17)(q35;q12) *NPM1-RARA*. ή OML με *STAT5B-RARA* (το τελευταίο έχει φυσιολογικό χρωμόσωμα 17 στη συμβατική κυτταρογενετική ανάλυση).

⚡ Θα πρέπει να αναφερθούν και άλλες μετατοπίσεις με συμμετοχή του γονιδίου *KMT2A* (MLL): για παράδειγμα, OML με t (6;11)(q27;q23.3) *MLLT4-KMT2A*, OML με t(11;19) (q23.3;p13.3) *KMT2A-MLLT1*, OML με t(11;19) (q23.3;p13.1) *KMT2A-ELL*, OML με t(10;11) (p12;q23.3) *MLLT10-KMT2A*.

± Σπάνια λευχαιμία που εμφανίζεται συχνότερα σε βρέφη.

§ Η διάγνωση γίνεται ανεξάρτητα από την παρουσία ή την απουσία δυσπλασίας.

|| Παρουσία βλαστικών κυττάρων σε ποσοστό τουλάχιστον 20% στο περιφερικό αίμα ή μυελό των οστών και οποιοδήποτε από τα ακόλουθα: προηγούμενο ιστορικό MDS ή MDS / MPN. σχετιζόμενη με μυελοδυσπλασία κυτταρογενετική ανωμαλία, δυσπλασία περισσοτέρων σειρών, Απουσία προηγούμενης κυτταροτοξικής θεραπείας για μη σχετιζόμενη ασθένεια και τις προαναφερθείσες επαναλαμβανόμενες γενετικές ανωμαλίες. Οι κυτταρογενετικές ανωμαλίες που επαρκούν για τη διάγνωση της OML με σχετιζόμενες με μυελοδυσπλασία αλλοιώσεις, είναι οι εξής: Σύνθετος καρυότυπος (οριζόμενος ως 3 ή περισσότερες χρωμοσωμικές ανωμαλίες, απουσία από μία από τις επαναλαμβανόμενες αντιμεταθέσεις ή αναστροφές που ορίζονται από τη WHO, δηλαδή, t (8; 21), inv(16) ή t(16;16), t(9;11), t(v;q23.3), t(6;9), inv(3) ή t (3;3). OML με *BCR-ABL1*. Μη ισορροπημένες ανωμαλίες: 27 ή del (7q). 25 ή del (5q), i(17q) ή t(17p), 213 ή del (13q), del (11q), del (12p) ή t (12p), Εξισορροπημένες ανωμαλίες: t(11;16)(q23.3; p13.3), t (3;21)(q26.2;q22.1), t(1;3)(p36.3, q21.2), t(2;11)(p21;q23.3), t(5;12)(q32;p13.2), t(5;7)(q32;q11.2), t (5;17) (q32;p13.2), t (5;10) (q32;q21.2), t (3; 5)(q25.3;q35.1).

¶ Οι περιπτώσεις θα πρέπει να ταξινομούνται ανάλογα με τη γενετική ανωμαλία που διαπιστώνεται στη διάγνωση.

Η πρώην υποομάδα της οξείας ερυθροβλαστικής λευχαιμίας, ερυθροειδούς / μυελοειδούς τύπου (ερυθροβλάστες στο μυελό των οστών σε ποσοστό 50% και μυελοβλάστες σε ποσοστό 20% μεταξύ των non-erythroid cells) αφαιρέθηκε, οι μυελοβλάστες τώρα υπολογίζονται πάντα ως ποσοστό των συνολικών κυττάρων μυελού. Η υπόλοιπη υποκατηγορία OML, NOS, αμιγής ερυθρολευχαιμία, απαιτεί την παρουσία 80% προδρόμων κυττάρων της ερυθράς σειράς, με παρουσία ερυθροβλαστών σε ποσοστό 30%.

** Η λευχαιμία *BCR-ABL1* μπορεί να εμφανίζεται ως MPAL και η θεραπεία θα πρέπει να περιλαμβάνει έναν αναστολέα κινάσης της τυροσίνης.

1.11 Πρόγνωση της Οξείας Μυελογενούς Λευχαιμίας

Η πρόγνωση της οξείας μυελογενούς λευχαιμίας εξαρτάται από τον ασθενή και τους σχετιζόμενους με τη νόσο παράγοντες. Η πιθανότητα επιβίωσης κατά τη θεραπεία εφόδου επηρεάζεται σημαντικά από την ηλικία, τη φυσική κατάσταση (performance status), καθώς και την άρτια λειτουργία των ζωτικών οργάνων (ηπατική, νεφρική, καρδιακή). Δεν υπάρχει τυποποιημένο εργαλείο αξιολόγησης γι' αυτό και εφαρμόζονται ποικίλα προγνωστικά scores, όπως ο δείκτης συννοσηρότητας Charlson (Charlson comorbidity index) και ο δείκτης συννοσηρότητας μεταμόσχευσης αιμοποιητικών κυττάρων (hematopoietic cell transplantation comorbidity index). Οι δείκτες συννοσηρότητας είναι ιδιαίτερα χρήσιμοι σε ηλικιωμένους ασθενείς, όπου ο προβληματισμός ανάμεσα στη χορήγηση εντατικής χημειοθεραπείας έναντι ηπιότερων θεραπειών είναι εντονότερος. Παράγοντες που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο, όπως προγενέστερες αιματολογικές διαταραχές (π.χ. ΜΔΣ), προηγούμενη έκθεση σε χημειοθεραπεία ή ακτινοθεραπεία (t-AML) καθώς και τα βιολογικά χαρακτηριστικά των βλαστών, με σημαντικότερο προγνωστικό παράγοντα τον καρυότυπο των βλαστών, διαχωρίζουν τους ασθενείς σε τρεις κατηγορίες, όπως έχει προαναφερθεί:

α) σε ασθενείς με ευνοϊκή πρόγνωση [Λευχαιμίες CBF που σχετίζονται με τις αντιμεταθέσεις t(8;21) και inv(16) ή t(16;16)] και APL με t(15;17),

β) σε ασθενείς με δυσμενή πρόγνωση (σύνθετος καρυότυπος και μονοσωμίες) και

γ) σε ασθενείς ενδιάμεσης πρόγνωσης (κυρίως διπλοειδείς).¹²⁷

Η αξιολόγηση των ασθενών συμπληρώνεται με τη μελέτη μοριακών δεικτών. Ενώ η πρόγνωση δεν επηρεάζεται καθόλου από τη μελέτη γονιδιακών μεταλλάξεων στους ασθενείς με ευνοϊκό καρυότυπο, δεν ισχύει το ίδιο στην ομάδα ασθενών ενδιάμεσου κινδύνου, η οποία χαρακτηρίζεται από μεγάλη ετερογένεια γι αυτό και η μελέτη των προγνωστικών δεικτών έχει μεγαλύτερη σημασία σε αυτήν την κατηγορία ασθενών. Η έγκαιρη ταυτοποίηση των μεταλλαγμένων γονιδίων που εντοπίζονται συχνότερα (*FLT3*, *NPM1*, *CEBPA*) έχουν αποτελέσει τη βάση για την αναθεώρηση των ταξινομήσεων και τη

διαστρωμάτωση των ασθενών σε κατηγορίες κινδύνου. Αυτό οδήγησε στην ταυτοποίηση των ασθενών με ευνοϊκή πρόγνωση (π.χ. διπλοειδίες και *NPM1* mutated / *FLT3-ITD* wild-type ή *CEBPA* double allele mutated / *FLT3-ITD* wild-type) και στους ασθενείς με δυσμενή πρόγνωση (*FLT3-ITD* mutated, *KIT* mutated σε CBF AML). Οι συνεχιζόμενες προσπάθειες για μελέτη όλου του γονιδιώματος με whole-genome sequencing, έχουν συμβάλει στην αναγνώριση επιπρόσθετων μεταλλαγμένων γονιδίων που λαμβάνονται υπόψη στην εκτίμηση, όπως των γονιδίων *KIT*, *IDH1* και *IDH2*, *MLL-PTD*, *TET2*, *DNMT3A*, *ASXL1*, *RUNX1*, *TP53*). Στη γενική πρακτική, συνιστάται μελέτη για μεταλλάξεις των γονιδίων *NPM1*, *CEBPA* και *FLT3* σε όλους τους νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς με οξεία μυελογενή λευχαιμία και του γονιδίου *KIT* σε ασθενείς με CBF οξεία μυελογενή λευχαιμία. ^{128,129}

Το European Leukemia Net (ELN) δημοσίευσε έναν αναθεωρημένο αλγόριθμο διερεύνησης και διαστρωμάτωσης των ασθενών σε κατηγορίες κινδύνου, βασισμένο στην αξιολόγηση των πληροφοριών από τη μελέτη του καρυότυπου και των γονιδιακών μεταλλάξεων (Πίνακας 4).^{130,131}

Πίνακας 4

ELN 2017 ταξινόμηση με βάση το μοριακό προφίλ

Προγνωστική κατηγορία*	Γενετικές βλάβες
Ευνοϊκή	t(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i> inv(16)(p13.1q22) ή t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i> Μεταλλαγμένο <i>NPM1</i> χωρίς <i>FLT3-ITD</i> ή με <i>FLT3-ITD</i> ^{low†} Biallelic μεταλλαγμένο <i>CEBPA</i>
Ενδιάμεση	Μεταλλαγμένο <i>NPM1</i> και <i>FLT3-ITD</i> ^{high†} Wild-type <i>NPM1</i> χωρίς <i>FLT3-ITD</i> ή <i>FLT3-ITD</i> ^{low†} (χωρίς δυσμενείς κυτταρογενετικές βλάβες) t(9;11)(p22;q23); <i>MLL3-KMT2A</i> [‡] Κυτταρογενετικές ανωμαλίες που δεν ταξινομούνται ως ευνοϊκές ή δυσμενείς
Δυσμενής	t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i> t(v;11q23.3); <i>KMT2A</i> αναδιάταξη

	<p>t(9;22)(q34.1;q11.2); <i>BCR-ABL1</i> inv(3)(q21.3q26.2) ή t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2, MECOMEV11</i> -5 or del(5q); -7;-17/abn(17p) Σύνθετος καρυότυπος[§], μονοσωμικός καρυότυπος Wild type <i>NPM1</i> και <i>FLT3-ITD</i>^{high†} Μεταλλαγμένο <i>RUNX1</i>[§] Μεταλλαγμένο <i>ASXL1</i>[§] Μεταλλαγμένο <i>TP53</i>[#]</p>
--	--

Οι συχνότητες, τα ποσοστά ανταπόκρισης και τα αποτελέσματα θα πρέπει να αναφέρονται ανά κατηγορία κινδύνου και εάν υπάρχουν επαρκείς αριθμοί, με συγκεκριμένες γενετικές αλλοιώσεις που υποδεικνύονται.

*Η Προγνωστική επίδραση ενός δείκτη εξαρτάται από τη θεραπεία και ενδεχομένως να αλλάξει με νεότερες θεραπείες.

†Low, low allelic ratio (<0.5); high, high allelic ratio (≥0.5);, ποσοτική εκτίμηση του *FLT3-ITD* allelic ratio (χρησιμοποιώντας DNA fragment analysis) προσδιορίζεται ως αναλογία της περιοχής κάτω από την καμπύλη "*FLT3-ITD*", διαιρούμενη με την περιοχή κάτω από την καμπύλη "*FLT3-wild type*". πρόσφατες μελέτες υποδεικνύουν ότι η ΟΜΛ με μετάλλαξη *NPM1* και *FLT3-ITD* low allelic ratio, μπορεί επίσης να έχουν μια ευνοϊκότερη πρόγνωση και οι ασθενείς αυτοί δεν θα πρέπει κανονικά να υποβάλλονται σε αλλογενή ΗCT.

‡Η ύπαρξη βλάβης στον καρυότυπο t(9;11)(p21.3;q23.3) υπερέχει έναντι συντρεχουσών δυσμενούς πρόγνωσης γονιδιακών μεταλλάξεων.

§Τρεις ή περισσότερες χρωμοσωμικές ανωμαλίες, εκτός από τις επαναλαμβανόμενες αντιμεταθέσεις ή αναστροφές που έχουν οριστεί από τον WHO και οι οποίες είναι, η t(15;17), η t(8;21), η inv(16) ή η t(16;16), η t(9;11), η t(v;11)(v;q23.3), η t(6;9), η inv(3) ή t(3;3), ΟΜΛ με *BCR-ABL1*.

||Ορίζεται από την παρουσία 1 μονής μονοσωμικής βλάβης (εξαιρουμένης της απώλειας του X ή Y), σε συνδυασμό με τουλάχιστον μία επιπλέον μονοσωμία ή δομική ανωμαλία χρωμοσωμάτων (εξαιρουμένου της core-binding factor ΟΜΛ).

¶Αυτοί οι δείκτες δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται ως ανεπιθύμητοι προγνωστικοί δείκτες εάν συνυπάρχουν με υποτύπους ευνοϊκής πρόγνωσης ΟΜΛ.

Μεταλλάξεις στο *TP53* σχετίζονται με ΟΜΛ με σύνθετο ή μονοσωμικό καρυότυπο.

1.12 Θεραπεία της Οξείας Μυελογενούς Λευχαιμίας

Η έναρξη θεραπείας στην οξεία μυελογενή λευχαιμία πρέπει να είναι άμεση, οι γιατροί καλούνται να αντιμετωπίσουν πληθώρα επιπλοκών, καθώς η κατάσταση του ασθενούς είναι δυνατό να επιδεινωθεί ταχύτατα μετά την έναρξη της θεραπείας.

Εκτός από τον υπότυπο της οξείας μυελογενούς λευχαιμίας, προσοχή θα πρέπει να καταβάλλεται στη συνολική αξιολόγηση της φυσικής κατάστασης. Οι ασθενείς άνω των 65 ετών συχνά χαρακτηρίζονται "ακατάλληλοι" για

έναρξη εντατικής χημειοθεραπείας και ως εκ τούτου η θεραπευτική προσέγγιση είναι διαφορετική. Ωστόσο, αυτό το όριο ηλικίας θεωρείται, όλο και περισσότερο, ανεπαρκές κριτήριο για την αξιολόγηση της κατάστασης του ασθενούς.

Τα αποτελέσματα από την κυτταρογενετική μελέτη θα πρέπει να λαμβάνονται κατά προτίμηση εντός 5 έως 7 ημερών. Τα αποτελέσματα των μοριακών εξετάσεων για ανίχνευση μεταλλάξεων στα γονίδια *NPM1* και *FLT3*, θα πρέπει να είναι διαθέσιμα εντός 48 έως 72 ωρών (τουλάχιστον σε ασθενείς που είναι κατάλληλοι για χημειοθεραπεία).

Η θεραπεία της οξείας μυελογενούς λευχαιμίας συνίσταται στη θεραπεία εφόδου και θεραπεία συντήρησης. Σύμφωνα με τα ELN κριτήρια, ακολουθείται ο παρακάτω θεραπευτικός αλγόριθμος (Πίνακας 5)^{132,133}

Πίνακας 5

Επιλεγμένα θεραπευτικά πρωτόκολλα για τη θεραπεία της οξείας μυελογενούς λευχαιμίας

Ασθενείς κατάλληλοι για εντατική χημειοθεραπεία	
Θεραπεία εφόδου (όλες οι ηλικίες) (“7+3”)^{†,‡}	3 ημέρες ενδοφλέβιας έγχυσης μιας ανθρακυκλίνης: daunorubicin τουλάχιστον 60 mg /m ² , idarubicin 12 mg / m ² ; ή mitoxandrone 12 mg/m ² και 7 ημέρες aracytin 100-200 mg/m ² , 24h
Θεραπεία συντήρησης^{‡,§}	
Ασθενείς νεότερης ηλικίας (18-60/65 ετών)	
<ul style="list-style-type: none"> Ευνοϊκής πρόγνωσης μοριακές βλάβες 	2-4 κύκλους ενδιάμεσης δόσης (Intermediatedose, IDAC) ,1000-1500 mg/m ² 3h έγχυσης q12h, d1-3, ή 1000-1500 mg/m ² IV 3h έγχυση, d1-5 ή 6)
<ul style="list-style-type: none"> Ενδιάμεσης πρόγνωσης μοριακές βλάβες 	<ul style="list-style-type: none"> Αλλογενής μεταμόσχευση από συμβατό συγγενή ή μη συγγενή δότη 2-4 κύκλους IDAC (1000-1500 mg/m² IV 3h έγχυση q12h, d1-3, ή 1000-1500 mg/m² IV, 3 h έγχυση, d1-5 or 6)
<ul style="list-style-type: none"> Κακής πρόγνωσης μοριακές βλάβες 	Αλλογενής μεταμόσχευση από συμβατό συγγενή ή μη συγγενή δότη
Ασθενείς μεγαλύτερης ηλικίας (>60/65 ετών)	
<ul style="list-style-type: none"> Ευνοϊκής πρόγνωσης μοριακές βλάβες 	2-3 κύκλους IDAC (500-1000 mg/m ² IV, 3h έγχυση q12h, d1-3 ή 500-1000 mg/m ² 3h έγχυση (d1-5 ή 6)
<ul style="list-style-type: none"> Ενδιάμεσης/ Κακής πρόγνωσης μοριακές βλάβες 	Δεν έχει αποδειχθεί η υπεροχή εντατικών σχημάτων θεραπείας συντήρησης. Σχεδιασμός αλλογενούς μεταμόσχευσης σε ασθενείς χωρίς συννοσηρότητες, ή ένταξη σε ερευνητικό πρωτόκολλο

Ασθενείς ακατάλληλοι για εντατική χημειοθεραπεία[†]	
Azacitidine [†]	75 mg/m ² , SC, d1-7, q4 wk, μέχρι την πρόοδο νόσου
Decitabine [#]	20 mg/m ² , IV, d1-5, q4 wk, μέχρι προόδου νόσου
Low-dose cytarabine ^{**}	Low-dose cytarabine (20 mg q12h, SC, d1-10, q4 wk; μέχρι προόδου νόσου), δεν προτιμάται σε ασθενείς με κακής πρόγνωσης κυτταρογενετικές ανωμαλίες
Best supportive care	Συμπεριλαμβάνεται η χορήγηση hydroxyurea. Μέγιστη υποστήριξη μόνο εφαρμόζεται στους ασθενείς που δεν μπορούν να ανεχτούν οποιαδήποτε θεραπεία ή σε εκείνους που δεν επιθυμούν να λάβουν θεραπεία
Θεραπεία διάσωσης σε ασθενείς που δεν ανταποκρίνονται στη θεραπεία εφόδου ή σε ασθενείς που υποτροπιάζουν και που είναι υποψήφιοι για εντατική θεραπεία	
IDAC ^{††} (with or without anthracycline)	IDAC (1000-1500 mg/m ² 3h έγχυση q12 h, d1-3 [500-1000 mg/m ² στους ασθενείς >60 y], ή 1000-1500 mg/m ² 3h έγχυση d1-5 ή 6 [500-1000 mg/m ² σε ασθενείς >60y]), +/- daunorubicin 45-60 mg/m ² , d1-3; idarubicin 8-10 mg/m ² , d3-5, ή mitoxantrone 8-10 mg/m ² , d1-3
FLAG-IDA ^{‡‡}	Fludarabine 30 mg/m ² , d2-6, cytarabine 1500-2000 mg/m ² 3h έγχυση, έναρξη 4h μετά την έγχυση του fludarabine, d2-6, idarubicin 10 mg/m ² , d2-4, G-CSF 5 μg/kg, SC, d1-5, επιπλέον ο G-CSF είναι δυνατό να χορηγηθεί 7d μετά το τέλος της χημειοθεραπείας έως ότου ο αριθμός WBC >500/uL. Ελάττωση της δόσης >60 y: fludarabine 20 mg/m ² ; cytarabine 500-1000 mg/m ² ; idarubicin 8 mg/m ²
MEC	Mitoxantrone 8 mg/m ² , d1-5, etoposide 100 mg/m ² , d1-5, cytarabine 1000 mg/m ² , d1-5
Allogeneic HCT	Αλλογενής μεταμόσχευση στους πρωτοπαθώς ανθεκτικούς ασθενείς. Στους ασθενείς η 2 ^o CR ή σε αυτούς που έχει ελαττωθεί ο αριθμός των βλαστών, ωστόσο δεν έχει εξαληφθεί μετά τη θεραπεία διάσωσης Εγκαίρως HLA-typing (HLA τυποποίηση)

Οι ασθενείς θα πρέπει να εντάσσονται σε κλινική μελέτη εάν αυτό είναι εφικτό.

EMA: Ευρωπαϊκός Οργανισμός Φαρμάκων (European Medicines Agency), FLAG-AMSA: FLAG + amsacrine, FLAG-MITO: FLAG + mitoxantrone, q: κάθε, SC: υποδορίως (subcutaneously).

*Σχήματα που περιέχουν υψηλότερες δόσεις cytarabine, θεωρούνται γενικά ως η καλύτερη επιλογή για τους ασθενείς που δεν ανταποκρίνονται σε ένα πρώτο κύκλο «7 + 3»

†Οι ηλικιωμένοι ασθενείς (γενικά > 65 ετών) και οι ασθενείς με κακής πρόγνωσης κυτταρογενετικές βλάβες, είναι λιγότερο πιθανό να ανταποκριθούν στη θεραπεία εφόδου και μπορεί να λάβουν υπομεθυλιωτικούς παράγοντες ή, κατά προτίμηση, να ενταχθούν σε ερευνητικό πρωτόκολλο.

‡Ασθενείς ηλικίας 18 έως 60 ετών, με denovo OML και FLT3 μεταλλάξεις μπορούν να λάβουν επιπροσθέτως midostaurin.

§Τα αποτελέσματα παρακολούθησης της MRD αμβάνονται υπόψιν για την επιλογή της κατάλληλης θεραπείας συντήρησης.

||[¶]Έχει εγκριθεί από το FDA και το EMA για ενήλικες ασθενείς που δεν είναι επιλέξιμοι για HCT με OML με ποσοστό βλαστών 20%-30%. Επιπροσθέτως, εγκρίθηκε από το EMA για ασθενείς που δεν είναι κατάλληλοι για αλλογενή μεταμόσχευση με ποσοστό βλαστών > 30%.

[#]Εγκεκριμένο από το EMA (όχι από το FDA) για ασθενείς με denovo ή δευτεροπαθή OML, οι οποίοι δεν είναι υποψήφιοι για κλασική χημειοθεραπεία εφόδου.

^{**}Σε ορισμένες χώρες χρησιμοποιείται σε δόση 20 mg / m² SC άπαξ ημερησίως.

^{††}Τα στοιχεία από φαρμακολογικές μελέτες και κλινικές μελέτες σε θεραπεία πρώτης γραμμής, υποδεικνύουν ότι δόσεις υψηλότερες από 1500 mg / m² είναι πάνω από το όριο της μέγιστης θεραπευτικής δράσης. Χορήγηση IDAC δεν πρέπει να επιλέγεται σε ασθενείς που παρουσιάζουν υποτροπή εντός 6 μηνών, μετά τη θεραπεία συντήρησης με υψηλότερες δόσεις cytarabine.

^{‡‡}Η Idarubicin μπορεί να αντικατασταθεί από mitoxantrone 10 mg/m², d2-4 (FLAG-MITO) ή από amsacrine 100 mg/m², d 2-4 (FLAG-AMSA).

α. Θεραπεία εφόδου

Ο στόχος της θεραπείας εφόδου είναι η επίτευξη πλήρους ύφεσης, ώστε να διατηρηθεί με τις επόμενες θεραπείες. Οι ασθενείς που επιτυγχάνουν πλήρη ύφεση σε οποιαδήποτε στιγμή μετά την έναρξη της θεραπείας, έχουν μεγαλύτερα ποσοστά επιβίωσης από τους ασθενείς που είναι ανθεκτικοί στη θεραπεία, την αντίστοιχη περίοδο.

Με το κλασικό χημειοθεραπευτικό σχήμα «7+3», επιτυγχάνεται πλήρης ύφεση σε ποσοστό 60%-80% των ασθενών που είναι κάτω των 60 ετών και στο 40%-60% των ασθενών που είναι άνω των 60 ετών.

Δοσολογία ανθρακυκλίνης: Αν και στις αρχές της δεκαετίας του 1990 αρκετές τυχαιοποιημένες μελέτες που αφορούσαν στη θεραπεία εφόδου έδειξαν υπεροχή της ινταρουβικίνης, μιτοξανδρόνης, amsacrine έναντι της δαουνορουβικίνης, ωστόσο δεν υπάρχουν επαρκή στοιχεία που να αποδεικνύουν ότι οι μελέτες αυτές αντικατοπτρίζουν πραγματικό βιολογικό πλεονέκτημα παρά μια έλλειψη ισοδυναμίας των δόσεων. Έχει πλέον διαπιστωθεί ότι η κλασική εγκεκριμένη δόση της δαουνορουβικίνης (45 mg/m² για 3 ημέρες) δεν είναι πλέον η κατάλληλη θεραπεία εφόδου για την οξεία μυελογενή λευχαιμία. Μεταγενέστερες τυχαιοποιημένες μελέτες σε ασθενείς ηλικίας κάτω των 60 ετών, ανέφεραν σημαντικά υψηλότερα ποσοστά επίτευξης πλήρους ύφεσης στους ασθενείς που έλαβαν δαουνορουβικίνη 90 mg/m² σε σύγκριση με αυτούς που έλαβαν 45 mg/m². Η ολική επιβίωση ήταν επίσης μεγαλύτερη στην ομάδα ασθενών που έλαβε υψηλότερη δόση daunorubicin. Ως εκ τούτου, το σχήμα εφόδου για την αντιμετώπιση της οξείας μυελογενούς λευχαιμίας, καθιερώθηκε ο συνδυασμός χορήγησης δαουνορουβικίνη τουλάχιστον 60 mg/m² για 3 ημέρες ή ινταρουβικίνης 12mg/m² και κυταραβίνης 100-200 mg/m² για 7 ημέρες (24ωρης χορήγησης), γνωστό ως χημειοθεραπευτικό σχήμα «3+7».¹³⁴⁻¹³⁶

Δοσολογία cytarabine: Πρόσφατες μελέτες επιβεβαιώνουν την αυξημένη τοξικότητα, χωρίς ωστόσο βελτίωση της αποτελεσματικότητας, με τη χορήγηση υψηλότερης δόσης κυταραβίνης (2000-3000 mg/m²). Μια τυχαιοποιημένη μελέτη έδειξε ότι ο συνδυασμός χορήγησης φλουνταραμπίνης μαζί με ινταρουβικίνης, υψηλή δόση κυταραβίνης και G-CSF (FLAG-IDA), όχι

μόνο παρουσίασε χαμηλότερο ρυθμό υποτροπής από το συνδυασμό δαουνορουβικίνης και κυταραβίνης με ή χωρίς την προσθήκηετοπιοσίδης, αλλά σχετίστηκε με περισσότερους θανάτους, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα παρόμοια ολική επιβίωση.

Μόνο μία τυχαιοποιημένη μελέτη έδειξε παρατεταμένη συνολική επιβίωση (52% έναντι 43% στα 6 έτη) με κυταραβίνη στα 3000 mg/m² (κάθε 12 ώρες, ημέρες 1, 3, 5, 7) σε σύγκριση με 100-200mg/m² χορηγούμενα για 7 ημέρες στον κύκλο I της θεραπείας εφόδου, αλλά μόνο σε ασθενείς ηλικίας κάτω των 46 ετών και όχι σε ασθενείς ηλικίας 46-60 ετών.¹³⁷⁻¹³⁹

β. Θεραπεία συντήρησης

Μετά την ολοκλήρωση της θεραπείας εφόδου, οι ασθενείς με κακή πρόγνωση θα υποβληθούν σε αλλογενή μεταμόσχευση. Η συζήτηση σχετικά με το ποιοι ασθενείς θα πρέπει να λάβουν χημειοθεραπεία έναντι αλλογενούς μεταμόσχευσης, εστιάζεται κυρίως στους ασθενείς ενδιάμεσου κινδύνου. Η λευχαιμία βρίσκεται στην πρώτη γραμμή της ανάπτυξης στοχευμένων θεραπειών, κυρίως με φάρμακα που στρέφονται εναντίον καθορισμένων ενδοκυττάρων πρωτεϊνών (π.χ. κινάσες). Δεδομένου του αυξανόμενου αριθμού των μοριακών βλαβών και την αναγνώριση διαφόρων ενδοκυττάρων μονοπατιών κατά τη λευχαιμογένεση, το φάσμα των «εξατομικευμένων θεραπειών» κερδίζει έδαφος, ως προσέγγιση για τη θεραπεία της οξείας μυελογενούς λευχαιμίας.

Η θεραπεία συντήρησης συνίσταται σε επαναλαμβανόμενους κύκλους χημειοθεραπειών με υψηλές δόσεις κυταραβίνης (2000-3000 mg/m²) για 3 ημέρες (σε ασθενείς >60 ετών 1000 mg/m²), έως 4 κύκλους. Πρόσφατες μελέτες αμφισβήτησαν την ανάγκη για τέτοιες υψηλές δόσεις. Μία μελέτη τυχαιοποίησε 933 ασθενείς, ηλικίας 15-60 ετών, μεταξύ συντήρησης με μιτοξανδρόνη και κυταραβίνη (σε δοσολογία 3000 mg/m² (q12h,d1-6)), έναντι ενός παρόμοιου συνδυασμού χημειοθεραπείας, αλλά με ενδιάμεση δόση κυταραβίνης (Intermediate Dose ARA-C, IDAC) στα 1000 mg/m², χωρίς στατιστικά σημαντική διαφορά στην επιβίωση. Μία μελέτη σε 781 ασθενείς

που βρίσκονταν σε πλήρη ύφεση, ηλικίας 15-64 ετών, απέτυχε να αποδείξει όφελος για 3 κύκλους κυταραβίνης στα 2000 mg/m² (q12h, d1-5), σε σύγκριση με 4 κύκλους συνδυασμένης χημειοθεραπείας που περιείχε κυταραβίνη (200 mg/m², 24h, d 1-5). Καμία από αυτές τις μελέτες δεν έχει αποδείξει κάποιο όφελος από τα υψηλά δοσολογικά σχήματα κυταραβίνης στους ασθενείς με κυτταρογενετικές βλάβες ευνοϊκού κινδύνου.¹⁴⁰⁻¹⁴²

γ. Θεραπεία διάσωσης

Ως πρότυπο για τη θεραπεία πρωτοπαθώς ανθεκτικής ή υποτροπιάζουσας οξείας μυελογενούς λευχαιμίας, δεν έχει αναφερθεί κανένας συγκεκριμένος συνδυασμός θεραπείας διάσωσης.

Σε νεαρούς ενήλικες (16-49 ετών), μια δεύτερη CR μπορεί να επιτευχθεί με εντατική θεραπεία διάσωσης σε περίπου 55% απουσία προηγούμενης αλλογενούς μεταμόσχευσης. Τα 2/3 των ασθενών θα προχωρήσουν σε αλλογενή μεταμόσχευση όντας σε CR2 και το 40% αυτών, θα επιτύχει 5ετές OS. Το όφελος μπορεί επίσης να προκύψει από αλλογενή HCT παρουσία ενεργού νόσου, με το CR2 να επιτυγχάνεται σε 42% και μακροπρόθεσμη επιβίωση παρατηρήθηκε στο 9% έως 22%.

Τα αποτελέσματα για ασθενείς που υποτροπιάζουν μετά από αλλογενή μεταμόσχευση κατά τη διάρκεια της πρώτης ή δεύτερης CR, είναι ιδιαίτερα κακές.

Το Κέντρο Διεθνών Ερευνών Μεταμόσχευσης Αίματος και Μυελού (Center for International Blood and Marrow Transplant Research, CIBMTR) διαπίστωσε ότι το 3ετές OS ήταν 4%, 12%, 26% και 38% για υποτροπές εντός 1-6 μηνών, 6 μηνών-2 ετών, 2 έως 3 ετών, και ≥ 3 χρόνια μετά από αλλογενή HCT, αντίστοιχα.¹⁴³⁻¹⁴⁵

δ. Ανάλογα πουρινών

Στη μελέτη AML16 η οποία αφορούσε σε ηλικιωμένους ασθενείς, (μέση ηλικία 67 ετών), η Συνεργατική Ομάδα του Εθνικού Ινστιτούτου Ερευνών για τον Καρκίνο (National Cancer Research Institute Cooperative Group, NCRI)

τυχαιοποίησε 806 ασθενείς σε δύο σκέλη. Στο ένα σκέλος οι ασθενείς έλαβαν δαουνουρβικίνη (50 mg/m², d1-3) και κυταραβίνη (100 mg/m², d 1-10) και στο άλλο σκέλος έλαβαν δαουνουρβικίνη (50 mg/m², d1-3) και κλοφαραμπίνη (20 mg/m², d 1-5). Τα ποσοστά επίτευξης πλήρους ύφεσης, υποτροπής και ολικής επιβίωσης ήταν ουσιαστικά πανομοιότυπα. ¹⁴⁶⁻¹⁴⁸

1.13 Νεότερες θεραπείες στην οξεία μυελογενή λευχαιμία

α.Αναστολείς FLT3

Οι αναστολείς της *FLT3* βρίσκονταν σε κλινικές δοκιμές εδώ και πολλά χρόνια. Στη μελέτη CALGB 10603 (RATIFY) τυχαιοποιήθηκαν 717 ασθενείς ηλικίας 18 έως 60 ετών με νεοδιαγνωσθείσα *FLT3*-mutated (*ITD* και *TKD*) οξεία μυελογενή λευχαιμία, για να λάβουν κλασική χημειοθεραπεία «3+7» μόνο ή σε συνδυασμό με μιντοσταυρίνη. Τα τελικά αποτελέσματα της μελέτης παρουσιάστηκαν το 2016. Αν και η προσθήκη της μιντοσταυρίνης δεν βελτίωσε τα ποσοστά ύφεσης, εντούτοις στην ομάδα που χορηγήθηκε αναστολέας *FLT3* παρατηρήθηκε σημαντική βελτίωση στο OS και το EFS. Έτσι, στις 28 Απριλίου 2017, η Αμερικανική Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) ενέκρινε τη midostaurin (Rydapt®; Novartis Pharmaceuticals, Inc) για τη θεραπεία ενηλίκων ασθενών με νεοδιαγνωσθείσα *FLT3*-mutated οξεία μυελογενή λευχαιμία. ¹⁴⁹⁻¹⁵¹

Στη μελέτη ADMIRAL τυχαιοποιήθηκαν 371 ασθενείς με υποτροπιάζουσα ή ανθεκτική οξεία μυελογενή λευχαιμία με μετάλλαξη στο γονίδιο *FLT3*, σε αναλογία 2:1, είτε να λάβουν gilteritinib (σε δοσολογία 120mg ημερησίως), είτε θεραπεία διάσωσης. Στους ασθενείς που χορηγήθηκε το gilteritinib παρατηρήθηκε μεγαλύτερη επιβίωση και υψηλότερα ποσοστά επίτευξης πλήρους ύφεσης. Έτσι, το Νοέμβριο του 2018, η Αμερικανική Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (Food and Drug Administration, FDA) ενέκρινε το gilteritinib (Xospata®, Astellas Pharma) για τη θεραπεία ενηλίκων ασθενών με υποτροπιάζουσα ή ανθεκτική οξεία μυελογενή λευχαιμία με μετάλλαξη στο γονίδιο *FLT3*.

Κλινικές μελέτες του gilteritinib ως μέρος της θεραπείας εφόδου ή συντήρησης, αλλά και μονοθεραπεία μετά τη θεραπεία συντήρησης ή μετά την αλλογενή μεταμόσχευση, βρίσκονται σε εξέλιξη, προκειμένου να εκτιμηθεί ο ρόλος της προσθήκης του αναστολέα *FLT3* ως προς τη βελτίωση των αποτελεσμάτων της θεραπείας.¹⁵²

Διάφοροι παράγοντες επηρεάζουν τη δραστηριότητα των αναστολέων *FLT3*. Βλάστες με χαμηλό μεταλλαγμένο αλληλόμορφο φορτίο *FLT3-ITD* μπορεί να είναι λιγότερο εξαρτώμενοι από την οδό σηματοδότησης *FLT3*. Το φάσμα δραστηριότητας των περισσότερων αναστολέων *FLT3* επεκτείνεται σε άλλες κινάσες.

β.Gemtuzumab ozogamicin

Το Gemtuzumab ozogamicin είναι ένα εξανθρωπισμένο IgG4 μονοκλωνικό αντίσωμα συζευγμένο με μία τοξίνη, την καλιχεαμικίνη (calicheamicin). Δρα έναντι του CD33, το οποίο είναι ένας διαμεμβρανικός υποδοχέας που εκφράζεται έντονα στα βλαστικά κύτταρα, με φθίνουσα έκφραση καθώς ωριμάζει το κύτταρο.

Το Gemtuzumab ozogamicin συνδέεται με τον επιφανειακό υποδοχέα CD33 και στη συνέχεια εσωτερικεύεται γρήγορα. Η κυτταροτοξικότητα της καλιχεαμικίνης μεταδίδεται μέσω της δέσμευσής της στην αύλακα του DNA, οδηγώντας στη διάσπαση της διπλής έλικας του DNA και τελικά τον κυτταρικό θάνατο.

Το Gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg®, Wyeth Pharmaceuticals) εγκρίθηκε για πρώτη φορά το 2000 από το FDA με accelerated approval, ως single-agent στην πρώτη υποτροπή, σε ασθενείς με οξεία μυελογενή λευχαιμία με έκφραση του CD33, που ήταν άνω των 60 ετών και δεν θεωρούνταν υποψήφιοι για άλλη εντατική θεραπεία.

Ως μέρος της επιταχυνόμενης πορείας έγκρισης, χρειάστηκε να ολοκληρωθεί μια επιπλέον μελέτη, η SWOGS01106, η οποία δεν απέφερε τα αναμενόμενα επιβεβαιωτικά αποτελέσματα το 2010 η Pfizer απέσυρε εθελοντικά το gemtuzumab ozogamicin από την αγορά.

Τον Σεπτέμβριο του 2017, το gemtuzumab ozogamicin επανήλθε στην κυκλοφορία και λίγο αργότερα εντάχθηκε στις οδηγίες κλινικής πρακτικής του

National Comprehensive Cancer Network (NCCN) με βάση τα αποτελέσματα των μελετών ALFA 0701 και AML18, για τους ασθενείς με de novo οξεία μυελογενή λευχαιμία σε συνδυασμό με την κλασική χημειοθεραπεία, καθώς και σε ασθενείς με ανθεκτική ή υποτροπιάζουσα νόσο, όπου η προσθήκη του Mylotarg φάνηκε να οφελεί και να οδηγεί σε αυξημένα ποσοστά υφέσεων. Στη συνέχεια, έλαβε έγκριση από τον FDA και για τους ασθενείς με de novo οξεία μυελογενή λευχαιμία οι οποίοι δεν είναι κατάλληλοι για εντατική χημειοθεραπεία, με βάση τα αποτελέσματα μελέτης AML 19, όπου το Mylotarg φάνηκε να υπερέχει έναντι της υδροξουρίας ή της βέλτιστης υποστήριξης αυτής της κατηγορίας ασθενών.¹⁵³⁻¹⁵⁵

γ.CPX-351

Το CPX-351 συνίσταται σε διπλό φάρμακο σε λιποσωμική «encapsulated» μορφή κυταραβίνης και δασουνορουβικίνης, που παρέχει συνεργική αναλογία φαρμάκου 5: 1 σε λευχαιμικά κύτταρα, σε μεγαλύτερο βαθμό από τα φυσιολογικά κύτταρα του μυελού των οστών. Μελέτες φάσεως 2, κατέδειξαν ευεργετική επίδραση του παράγοντα στην θεραπεία δευτεροπαθούς και σχετιζόμενης με τη θεραπεία οξείας μυελογενούς λευχαιμίας, καθώς και στους ασθενείς με υποτροπή της νόσου. Μια μετέπειτα μελέτη φάσεως 3 που έλαβε χώρα στις ΗΠΑ και στον Καναδά, τυχαιοποίησε σε 2 σκέλη 309 ασθενείς ηλικίας 60-75 ετών με οξεία μυελογενή λευχαιμία «υψηλού κινδύνου», (ορίστηκε ως η λευχαιμία με μεταβολές σχετιζόμενες με μυελοδυσπλασία ή με θεραπεία). Το ένα σκέλος έλαβε το CPX-351 και το άλλο το «3+7». Παρατηρήθηκε μεγαλύτερο ποσοστό ανταπόκρισης στο σκέλος που έλαβε το CPX-351 και μεγαλύτερο OS. Ως εκ τούτου, στις 3 Αυγούστου 2017 το CPX-351 (Vyxeos®, Jazz Pharmaceuticals) έλαβε έγκριση από τον FDA για την θεραπεία ενηλίκων ασθενών με de novo οξεία μυελογενή λευχαιμία, καθώς και οξεία μυελογενή λευχαιμία σχετιζόμενη με μυελοδυσπλαστικού τύπου αλλοιώσεις (myelodysplasia-related changes, AML-MRC) ή σχετιζόμενη με θεραπεία (t-AML).¹⁵⁶⁻¹⁵⁷

δ.Αναστολείς IDH

Σωματικές μεταλλάξεις στα γονίδια *IDH1* και *IDH2* παρατηρούνται σε ποσοστό έως και 20% των ασθενών με οξεία μυελογενή λευχαιμία και εμφανίζονται ως πρόωρα κλωνικά συμβάντα στην εξέλιξη της νόσου. Αν και η προγνωστική τους συσχέτιση παραμένει ασαφής, ο αντίκτυπός τους στην πρόγνωση των ασθενών φαίνεται να επηρεάζεται από το σημείο της μετάλλαξης και από άλλες συνυπάρχουσες μεταλλάξεις.^{158,159}

Το Ivosidenib (Tibsono[®], Agios Pharmaceuticals) είναι ο πρώτος εγκεκριμένος *IDH1* αναστολέας για τη θεραπεία ασθενών με υποτροπιάζουσα ή ανθεκτική οξεία μυελογενή λευχαιμία, οι οποίοι έχουν μετάλλαξη στο γονίδιο *IDH1*. Η έγκριση αυτή βασίστηκε στα αποτελέσματα της κλινικής μελέτης AG120-C-001, η οποία συμπεριέλαβε 174 ενήλικες ασθενείς με υποτροπιάζουσα ή ανθεκτική οξεία μυελογενή λευχαιμία και μετάλλαξη στο γονίδιο *IDH1*. Σε μια μέση παρακολούθηση των 8,3 μηνών, αναφέρθηκαν πλήρεις υφέσεις με ή χωρίς μερική αιματολογική ανάκτηση, σε ποσοστό 32,8% των ασθενών. Από τους 110 ασθενείς που χρειάστηκαν μεταγγίσεις αίματος ή αιμοπεταλίων στην αρχή της μελέτης, το 37% δεν χρειάστηκε μετάγγιση για τουλάχιστον 56 ημέρες μετά τη λήψη του Ivosidenib. Στις 20 Ιουλίου 2018 λοιπόν, το Ivosidenib έλαβε έγκριση από τον FDA για τους ασθενείς με υποτροπιάζουσα ή ανθεκτική οξεία μυελογενή λευχαιμία με μετάλλαξη στο γονίδιο *IDH1*. Στις 2 Μαΐου 2019, το Ivosidenib έλαβε έγκριση για τους νεοδιανωσθέντες ασθενείς με οξεία μυελογενή λευχαιμία με μετάλλαξη στο γονίδιο *IDH1*, οι οποίοι είναι άνω των 75 ετών ή έχουν σοβαρές συννοσηρότητες, που αποκλείουν τη χορήγηση εντατικής χημειοθεραπείας ως τη θεραπεία εκλογής.^{160,161}

Την 1η Αυγούστου 2017 ο FDA ενέκρινε το Enasidenib (Idhifa[®], Celgene), τον πρώτο *IDH2* αναστολέα, για τη θεραπεία ενηλίκων με υποτροπιάζουσα ή ανθεκτική οξεία μυελογενή λευχαιμία και μετάλλαξη στο γονίδιο *IDH2*. Η έγκριση αυτή βασίστηκε στα αποτελέσματα της μελέτης AG221-C-001, η οποία περιελάμβανε 199 ασθενείς με υποτροπιάζουσα ή ανθεκτική οξεία μυελογενή λευχαιμία, οι οποίοι είχαν μεταλλάξεις στο γονίδιο *IDH2* όπως ανιχνεύτηκαν με Real Time *IDH2* Assay. Η μελέτη μέτρησε το ποσοστό των ασθενών που πέτυχαν πλήρη ύφεση με πλήρη ανάκτηση των αιματολογικών παραμέτρων,

καθώς και τους ασθενείς που πέτυχαν πλήρη ύφεση με μερική ανάκτηση των αιματολογικών παραμέτρων (Complete Remission with partial hematologic recovery, CRh). Λαμβάνοντας τουλάχιστον έξι μήνες θεραπείας, το 19% των ασθενών εμφάνισαν πλήρη ύφεση για μέσο διάστημα 8,2 μήνες και το 4% των ασθενών εμφάνισαν CRh για μέσο διάστημα 9,6 μήνες. Από τους 157 ασθενείς που χρειάστηκαν μεταγγίσεις αίματος ή αιμοπεταλίων λόγω του νοσήματος κατά την έναρξη της μελέτης, το 34% των ασθενών δεν χρειαζόταν πλέον μεταγγίσεις, μετά από τη θεραπεία με το Enasidenib.¹⁶²

ε. Glasdegib

Η αναστολή της οδού Hedgehog η οποία είναι «ενεργής» σε πολλές κακοήθειες και στην οξεία μυελογενή λευχαιμία, αύξησε σημαντικά την ευαισθησία των λευχαιμικών κυττάρων στα κυτταροτοξικά φάρμακα. Στη Μελέτη BRIGHT AML 1003, χορηγήθηκε το glasdegib σε συνδυασμό με χαμηλή δόση κυταραβίνης (Low Dose ARA-C, LDAC) και έδειξε σημαντική μείωση της θνησιμότητας κατά 54% σε σύγκριση με το LDAC, στους ασθενείς με οξεία μυελογενή λευχαιμία. Το 2018, η Αμερικανική Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων ενέκρινε το glasdegib (Daurismo[®], Pfizer Labs) σε συνδυασμό με το LDAC, για τη θεραπεία των νεοδιαγνωσθέντων ασθενών με οξεία μυελογενή λευχαιμία άνω των 75 ετών, ή που έχουν συννοσηρότητες και ως εκ τούτου είναι ακατάλληλη για εντατική χημειοθεραπεία.¹⁶³

στ. Venetoclax

Το Venetoclax προσκολλάται στην πρωτεΐνη Bcl-2 (B-cell lymphoma-2), οδηγώντας σε προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Αυτή η πρωτεΐνη εντοπίζεται στην εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων και αναστέλλει τη δράση των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών. Ως εκ τούτου, παίζει ουσιαστικό ρόλο στην επιβίωση των λευχαιμικών κυττάρων και τα καθιστά ανθεκτικά στα χημειοθεραπευτικά. Στις 21 Νοεμβρίου 2018, ο FDA χορήγησε ταχεία έγκριση στον venetoclax (Venclexta[®], AbbVie Inc. και Genentech Inc.) σε συνδυασμό με αζακιτιδίνη ή δεσιταβίνη ή χαμηλή δόση κυταραβίνης για τη θεραπεία των ασθενών με της νεοδιαγνωσθείσα οξεία μυελογενή λευχαιμία άνω των 75

ετών ή που έχουν συννοσηρότητες και καθίσταται αδύνατη η χορήγηση εντατικής χημειοθεραπείας.

Η έγκριση βασίστηκε σε δύο ανοιχτές μη τυχαιοποιημένες κλινικές μελέτες στην ανωτέρω κατηγορία ασθενών. Η αποτελεσματικότητα καθορίστηκε με βάση τα ποσοστά επίτευξης πλήρους ύφεσης, καθώς και της διάρκειας αυτής.

Η μελέτη M14-358 ήταν μια μη τυχαιοποιημένη, ανοιχτή κλινική μελέτη του venetoclax σε συνδυασμό με αζακιτιδίνη ή δεσιταβίνη και περιελάμβανε συνολικά 80 ασθενείς. Στους 67 ασθενείς χορηγήθηκε το venetoclax σε συνδυασμό με αζακιτιδίνη και σε 13 ασθενείς χορηγήθηκε το venetoclax σε συνδυασμό με δεσιταβίνη. Από τους 67 ασθενείς που έλαβαν venetoclax σε συνδυασμό με αζακιτιδίνη, πλήρης ύφεση παρατηρήθηκε στους 25 (ποσοστό 37%), για μέσο διάστημα 5,5 μήνες, ενώ 16 επιπλέον ασθενείς πέτυχαν πλήρη ύφεση με μερική ανάκτηση των αιματολογικών παραμέτρων. Από τους 13 ασθενείς που έλαβαν venetoclax σε συνδυασμό με δεσιταβίνη, πλήρης ύφεση παρατηρήθηκε στους 7 (ποσοστό 54%), με μέση διάρκεια διατήρησης της ύφεσης τους 4,7 μήνες ενώ ένας επιπλέον ασθενής πέτυχε πλήρη ύφεση με μερική ανάκτηση των αιματολογικών παραμέτρων.¹⁶⁴

Η μελέτη M14-387 ήταν μια μη τυχαιοποιημένη, ανοιχτή κλινική μελέτη του venetoclax σε συνδυασμό με χαμηλή δόση κυταραβίνης σε νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς με οξεία μυελογενή λευχαιμία, συμπεριλαμβανομένων των ασθενών με προηγούμενη έκθεση σε έναν παράγοντα υπομεθυλίωσης για αιματολογική διαταραχή. Περιελάμβανε 61 ασθενείς από τους οποίους οι 13 (ποσοστό 21%) παρουσίασε πλήρη ύφεση, για διάστημα περίπου 6 μηνών, ενώ επιπλέον 13 ασθενείς πέτυχαν πλήρη ύφεση με μερική ανάκτηση των αιματολογικών παραμέτρων.¹⁶⁵

Σύμφωνα με τις οδηγίες του National Comprehensive Cancer Network (NCCN) για τη θεραπεία της οξείας μυελογενούς λευχαιμίας σε ασθενείς κάτω των 60 ετών, εφαρμόζεται ο ακόλουθος αλγόριθμος. (Πίνακας 6)

Πίνακας 6

Ασθενείς κάτω των 60 ετών

ΚΑΛΗΣ ΠΡΟΓΝΩΣΗΣ ΚΑΡΥΟΤΥΠΟΣ	7 ημέρες cytarabine 100-200 mg/m ² 24h έγχυση και 3 ημέρες ενδοφλέβιας έγχυσης μιας ανθρακυκλίνης: daunorubicin τουλάχιστον 60 mg /m ² , ή idarubicin 12 mg / m ² H 7 ημέρες Cytarabine 200 mg/m ² 24h έγχυση και 3 ημέρες daunorubicin 60 mg/m ² και gemtuzumab ozogamicin 3 mg/m ² d 1,4,7 (CD33+)
ΕΝΔΙΑΜΕΣΗΣ ΠΡΟΓΝΩΣΗΣ ΚΑΡΥΟΤΥΠΟΣ ΚΑΙ FLT3-mutated (ITD/TKD)	7 ημέρες Cytarabine 200 mg/m ² 24h έγχυση και 3 ημέρες daunorubicin 60 mg/m ² και για τις ημέρες 8-21 midostaurin 50mg q12h (FLT3- mutated)
t-AML, προϋπάρχον ΜΔΣ/ΧΜΜΛ, κυταρογενετικές ανωμαλίες σχετιζόμενες με ύπαρξη (AML-Myelodysplasia Related Changes, MRC)	7 ημέρες Cytarabine 100-200 mg/m ² 24h έγχυση και 3 ημέρες idarubicin 12mg/m ² ή daunorubicin 60-90 mg/m ² H Ημέρες 1,3,5 Vyxeos για 1 κύκλο
ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΑ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ ΓΙΑ ΕΝΔΙΑΜΕΣΗΣ Η ΚΑΚΗΣ ΠΡΟΓΝΩΣΗΣ ΟΜΛ	7 ημέρες Cytarabine 100-200 mg/m ² 24h έγχυση και 3 ημέρες idarubicin 12mg/m ² ή daunorubicin 60-90 mg/m ² H 7 ημέρες Cytarabine 200 mg/m ² 24h έγχυση και 3 ημέρες daunorubicin 90 mg/m ² και cladribine 5 mg/m ² x5d H 7 ημέρες Cytarabine 200 mg/m ² 24h έγχυση και 3 ημέρες daunorubicin 60 mg/m ² x 3d και μία δόση gemtuzumab ozogamicin 3 mg/m ² d 1 ή 2 ή 3 ή 4 (CD33+, ενδιαμέσου κινδύνου) H 6 ημέρες HiDAC 2g/m ² q12h, ή 4 ημέρες 3g/m ² q12h και 3 ημέρες idarubicin 8 mg/m ² ή daunorubicin 60 mg/m ² H FLAG-IDA (Fludarabine 30 mg/m ² , d2-6, cytarabine 1500-2000 mg/m ² 3h έγχυση, έναρξη4 h μετά την έγχυση του fludarabine, d2-6, idarubicin 10 mg/m ² , d2-4, G-CSF5 μg/kg, SC, d1-5, επιπλέον ο G-CSF είναι δυνατό να χορηγηθεί 7d μετά το τέλος της χημειοθεραπείαςέως ότου ο αριθμός WBC>500/uL. Ελάττωση της δόσης>60 y: fludarabine 20 mg/m ² ; cytarabine 500-1000 mg/m ² ;idarubicin 8 mg/m ²)

NCCN κατευθυντήριες οδηγίες 2020, ενήλικες<60 ετών, θεραπεία εφόδου

Μετά τη θεραπεία εφόδου οι ασθενείς υποβάλλονται σε εξέταση μυελού των οστών 14-21 ημέρες μετά την έναρξη της θεραπείας και ανάλογα με τα ευρήματα εφαρμόζεται ο ακόλουθος αλγόριθμος (Πίνακας 7):

Πίνακας 7

Σημαντική υπολειπόμενη νόσος χωρίς υποκυτταρικό μυελο	6 ημέρες Cytarabine 1.5-3 g/m ² q12h H 7 ημέρες Cytarabine 100-200 mg/m ² 24h έγχυση και 3 ημέρες idarubicin 12mg/m ² ή daunorubicin 60-90 mg/m ² H 7 ημέρες Cytarabine 100-200 mg/m ² 24h έγχυση και 3 ημέρες idarubicin 12mg/m ² ή daunorubicin 60-90 mg/m ² και midostaurin (BM exam on d21, FLT3 mutated, ITD/TKD) H Ημέρες 1,3 Vyxeos για 1 κύκλο σε t-AML, προϋπάρχον ΜΔΣ ή ΧΜΜΛ, AML- MRC
Ελαττωμένη κυτταροβρίθεια με χαμηλό ποσοστό βλαστών	7 ημέρες Cytarabine 100-200 mg/m ² 24h έγχυση και 3 ημέρες idarubicin 12mg/m ² ή daunorubicin 60-90 mg/m ² H 7 ημέρες Cytarabine 100-200 mg/m ² 24h έγχυση και 3 ημέρες idarubicin 12mg/m ² ή daunorubicin 60-90 mg/m ² και midostaurin (BM exam on d21, FLT3 mutated, ITD/TKD)
Υποπλαστικό μυελός	Αναμονή

NCCN κατευθυντήριες οδηγίες 2020, ενήλικες <60 ετών, θεραπευτικός αλγόριθμος μετά τη θεραπεία εφόδου

Στους ασθενείς που έχουν επιτύχει πλήρη ύφεση ακολουθείται θεραπεία συντήρησης, ενώ οι ασθενείς με υπολειπόμενη νόσο θα υποβληθούν σε αλλογενή μεταμόσχευση.

Μετά τη θεραπεία εφόδου οι ασθενείς υποβάλλονται σε θεραπεία συντήρησης, σύμφωνα με τον ακόλουθο αλγόριθμο (Πίνακας 8):

Πίνακας 8

ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ ΚΙΝΔΥΝΟΥ	ΘΕΡΑΠΕΙΑ
CBF, no <i>KIT</i> mutation	<p>Ημέρες 1,3,5 ή 1,2,3 HiDAC 3g/m²q12h για 3-4 κύκλους και 1 δόση gemtuzumab ozogamicin 3mg/m² την d1 για 2 κύκλους (CD33+)</p> <p>Ή</p> <p>Ημέρες 1-4 Cytarabine 1g/m²q12h και daunorubicin μία δόση 60mg/m²d1 (C1) ή 2 δόσεις d1-2 (C2) και μία δόση gemtuzumab ozogamicin 3mg/m²d1 για 2 κύκλους (CD33+)</p>
Ενδιαμέσης πρόγνωσης καρυότυπος, μοριακές βλάβες	<p>Αλλογενής μεταμόσχευση</p> <p>Ή</p> <p>Ημέρες 1,3,5 ή 1,2,3 HiDAC 1,5-3g/m²q12h για 3-4 κύκλους</p> <p>Ή</p> <p>Ημέρες 1,3,5 ή 1,2,3 HiDAC 1,5-3g/m²q12h με midostaurin q12h d8-21 για 4 κύκλους (<i>FLT3</i> mutated)</p> <p>Ή</p> <p>Ημέρες 1-4 Cytarabine 1g/m²q12h και μία δόση daunorubicin 60mg/m²d1 (C1) ή 2 δόσεις d1-2 (C2) και μία δόση gemtuzumab ozogamicin 3mg/m²d1 για 2 κύκλους (CD33+)</p>
t-AML, κακής πρόγνωσης καρυότυπος, μοριακές βλάβες	<p>Αλλογενής μεταμόσχευση</p> <p>Ή</p> <p>Ημέρες 1,3,5 ή 1,2,3HiDAC 1,5-3g/m²q12h για 3-4 κύκλους</p> <p>Ή</p> <p>Ημέρες 1,3,5 ή 1,2,3 HiDAC 1,5-3g/m²q12h με midostaurin q12h d8-21 για 4 κύκλους (<i>FLT3</i> mutated)</p> <p>Ή</p> <p>Ημέρες 1,3 Vyxeos για 1-2 κύκλους σε t-AML, προϋπάρχον ΜΔΣ ή ΧΜΜΛ, AML-MRC</p>

NCCN κατευθυντήριες οδηγίες 2020, ενήλικες <60 ετών, θεραπεία συντήρησης

Για τους ασθενείς άνω των 60 ετών που είναι δυνατό να υποβληθούν σε εντατική χημειοθεραπεία, ακολουθείται ο παρακάτω θεραπευτικός αλγόριθμος (Πίνακας 9):

Πίνακας 9

Ασθενείς άνω των 60 ετών

ΚΑΡΥΟΤΥΠΟΣ ΚΑΛΗΣ ΠΡΟΓΝΩΣΗΣ	7 ημέρες Cytarabine 200 mg/m ² 24h έγχυση και 3 ημέρες daunorubicin 60 mg/m ² και μία δόση gemtuzumab ozogamicin 3 mg/m ² d 1,4,7 (CD33+) Ή 7 ημέρες Cytarabine 100-200 mg/m ² 24h έγχυση και 3 ημέρες idarubicin 12mg/m ² ή daunorubicin 60-90 mg/m ² ή mitoxantrone 12mg/m ²
FLT3 mutated (ITD/TKD)	7 ημέρες Cytarabine 200 mg/m ² 24h έγχυση και 3 ημέρες daunorubicin 60 mg/m ² και για τις ημέρες 8-21 midostaurin 50mg q12h (<i>FLT3</i> - mutated)
t-AML, προϋπάρχον ΜΔΣ/ΧΜΜΛ, κυτταρογενετικές ανωμαλίες σχετιζόμενες με ύπαρξη (AML-Myelodysplasia Related Changes, MRC)	Ημέρες 1,3,5 Νυχτεος για 1 κύκλο
ΚΑΚΗΣ ΠΡΟΓΝΩΣΗΣ ΚΑΡΥΟΤΥΠΟΣ	Venetoclax 400mg ημερησίως και Decitabine 20mg/m ² d1-5 q28d Ή Venetoclax 400mg ημερησίως και azacitidine 75 mg/m ² d1-7 q28d Ή Venetoclax 600mg ημερησίως και low dose cytarabine 20mg/m ² SCd1-10 q28d
ΕΝΔΙΑΜΕΣΗ-ΚΑΚΗ ΠΡΟΓΝΩΣΗ	7 ημέρες Cytarabine 100-200 mg/m ² 24h έγχυση και 3 ημέρες idarubicin 12mg/m ² ή daunorubicin 60-90 mg/m ² ή mitoxantrone 12mg/m ² Ή 7 ημέρες Cytarabine 200 mg/m ² 24h έγχυση και 3 ημέρες daunorubicin 60 mg/m ² x 3d και μία δόση gemtuzumab ozogamicin 3 mg/m ² d 1 ή 2 ή 3 ή 4 (CD33+, ενδιάμεσου κινδύνου)

NCCN κατευθυντήριες οδηγίες 2020, ενήλικες >60 ετών, θεραπεία εφόδου

Στη συνέχεια οι ασθενείς υποβάλλονται σε εξέταση μυελού των οστών 14-21 ημέρες μετά την έναρξη της θεραπείας και ανάλογα με τα ευρήματα εφαρμόζεται ο ακόλουθος αλγόριθμος (Πίνακας 10):

Πίνακας 10

Σημαντική υπολειπόμενη νόσος χωρίς υποκυτταρικό μυελο	7 ημέρες Cytarabine 100-200 mg/m ² 24h έγχυση και 3 ημέρες idarubicin 12mg/m ² ή daunorubicin 60-90 mg/m ² ή mitoxantrone 12mg/m ² H 7 ημέρες Cytarabine 200 mg/m ² 24h έγχυση και 3 ημέρες daunorubicin 60 mg/m ² και για τις ημέρες 8-21 midostaurin 50mgq12h (<i>FLT3- mutated</i>) H Ημέρες 1,3 Vyxeos για 1-2 κύκλους H Ημέρες 1,3,5 ή 1,2,3 Intermediate dose cytarabine 1,5-2g/m ² q12h για 3-4 κύκλους H Reduced-Intensity allogeneic HCT (RIC)
Υποπλασία	Αναμονή

NCCN κατευθυντήριες οδηγίες 2020, ενήλικες >60 ετών, θεραπευτικός αλγόριθμος μετά τη θεραπεία εφόδου

Οι ασθενείς που θα λάβουν θεραπεία λόγω υπολειπόμενης νόσου θα υποβληθούν στη συνέχεια σε εξέταση μυελού των οστών, σε διάστημα 4 με 6 εβδομάδων μετά την αποκατάσταση των αιματολογικών παραμέτρων. Ανάλογα με τα ευρήματα ακολουθείται ο παρακάτω αλγόριθμος (Πίνακας 11):

Πίνακας 11

ΠΛΗΡΗΣ ΥΦΕΣΗ	Αλλογενής μεταμόσχευση H 7 ημέρες Cytarabine 100-200 mg/m ² 24h έγχυση και 3 ημέρες idarubicin 12mg/m ² ή daunorubicin 60-90 mg/m ² H Intermediatedosecytarabine 1,5-2g/m ² /d για 4-6 δόσεις για 1-2 κύκλους H Ημέρες 1,3 Vyxeos για 1-2 κύκλους H Ημέρες 1,3,5 Intermediate dose cytarabine 1,5-2g/m ² q12h και για τις ημέρες 8-21 midostaurin 50mg q12h (<i>FLT3- mutated</i>) H Cytarabine 1g/m ² d1-4 και daunorubicin 60 mg/m ² d1 για τον 1 ^ο κύκλο και d1-2 για τον 2 ^ο και gemtuzumab ozogamicin 3 mg/m ² d 1 για 2 κύκλους (CD33+) Azaitidine ή decitabine μέχρι προόδου νόσου
--------------	--

ΑΠΟΤΥΧΙΑ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΕΦΟΔΟΥ	Azaitidine ή decitabine	Ή
	Gilteritinib	Ή
	Ivosidenib	Ή
	Enasidenib	Ή
	Azacididine ή decitabine	Ή
	Venetoclax-based θεραπεία	Ή

NCCN κατευθυντήριες οδηγίες 2020, ενήλικες >60 ετών, θεραπευτικός αλγόριθμος μετά τη θεραπεία λόγω υπολειπόμενης νόσου

Για τους ασθενείς που η φυσική τους κατάσταση καθιστά αδύνατη τη λήψη εντατικής χημειοθεραπείας, ακολουθείται ο παρακάτω θεραπευτικός αλγόριθμος (Πίνακας 12):

Πίνακας 12

ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΟΜΛ ΧΩΡΙΣ ΑΝΕΥΡΕΣΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ	Venetoclax 400mg ημερησίως και decitabine 20mg/m ² d1-5 q28d Ή Venetoclax 400mg ημερησίως και azacididine 75 mg/m ² d1-7 q28d Ή Venetoclax 600mg ημερησίως και low dose cytarabine 20mg/m ² SCd1-10 q28d Ή Glesdegib 100mg ημερησίως και low dose cytarabine 20mgSCx2 (d1-10) Ή Gemtuzumab ozogamicin 6 mg/m ² d 1 και 6 mg/m ² d8 (CD33+, ενδιάμεσου κινδύνου)
ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ IDH1	Ivosidenib Ή Azacididine ή decitabine Ή Venetoclax-based θεραπεία
ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ IDH2	Enasidenib Ή Azacididine ή decitabine Ή Venetoclax-based θεραπεία
ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ FLT3	Azacididine ή decitabine και sorafenib (FLT3 +) Ή Venetoclax-based θεραπεία

NCCN κατευθυντήριες οδηγίες 2020, ενήλικες >60 ετών, ακατάλληλοι για εντατική χημειοθεραπεία

Στη συνέχεια οι ασθενείς υποβάλλονται σε εξέταση μυελού προκειμένου να εκτιμηθεί η ανταπόκριση της νόσου στη θεραπεία, η περίοδος επανεκτίμησης εξαρτάται από τον εκάστοτε νεότερο παράγοντα που θα έχουν λάβει.

Ανάλογα με την ανταπόκριση της νόσου στη θεραπεία, ακολουθείται ο παρακάτω θεραπευτικός αλγόριθμος (Πίνακας 13):

Πίνακας13

ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΣΗ	Azacitidine ή decitabine q4-6-w μέχρι προόδου νόσου Ή Ivosidenib Ή Enasidenib Ή Venetoclax 400mg ημερησίως και decitabine 20mg/m ² d1-5 q28d Ή Venetoclax 400mg ημερησίως και azacitidine 75 mg/m ² d1-7 q28d Ή Venetoclax 600mg ημερησίως και low dose cytarabine 20mg/m ² SCd1-10 q28d Ή Glesdegib 100mg ημερησίως και low dos cytarabine 20mg SCx2 (d1-10) Ή Azacitidine ή decitabine και sorafenib (FLT3 +) Ή Gemtuzumab ozogamicin mg/m ² d 1 q4w για έως 8 κύκλους (CD33+, ενδιαμέσου κινδύνου)
ΜΗ ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΣΗ Ή ΠΡΟΟΔΟΣ ΝΟΣΟΥ	Aacaitidine ή decitabine Ή Gilteritinib Ή Ivosidenib Ή Enasidenib Ή Azacitidine ή decitabine Ή Venetoclax-based θεραπεία

NCCN κατευθυντήριες οδηγίες 2020, ενήλικες >60 ετών, ακατάλληλοι για εντατική χημειοθεραπεία, μετά την εκτίμηση ανταπόκρισης

Η αξιολόγηση της ανταπόκρισης μετά τη θεραπεία παρέχει επιπροσθέτως σημαντικές πληροφορίες. Βασικά κριτήρια όπως η επίτευξη πλήρους μορφολογικής ύφεσης μετά από τη θεραπεία εφόδου διατηρούν τη

σπουδαιότητά τους, ενώ άλλες, όπως η εκτίμηση της πρώιμης ανταπόκρισης με βάση την αξιολόγηση του μυελού στη μέση του κύκλου κατά τη διάρκεια της θεραπείας εφόδου, είναι πιο περιορισμένης σπουδαιότητας.

Ο πιο ισχυρός προγνωστικός παράγοντας μετά τη θεραπεία είναι η μέτρηση της ελάχιστης υπολειπόμενης νόσου (Minimal Residual Disease, MRD). Η MRD ορίζεται ως ανίχνευση νόσου κάτω από το όριο ανίχνευσης με κυτταρομετρία ροής και μορφολογικά. Υπολογίζεται ότι στους ασθενείς που βρίσκονται σε πλήρη ύφεση (Complete Remission, CR) μορφολογικά και ανοσοφαινοτυπικά, εξακολουθεί να υποκρύπτεται ένας λευχαιμικός πληθυσμός (έως και 10^{-9} λευχαιμικών κυττάρων), τα οποία αποτελούν σημαντική δεξαμενή για μεταγενέστερες υποτροπές.¹¹⁸

Δύο προσεγγίσεις μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση της MRD, η κυτταρομετρία ροής πολλαπλών παραμέτρων (Multiparameter flow cytometry, MFC) και των μοριακών τεχνικών, συμπεριλαμβανομένων της ποσοτικής PCR (Real-time quantitative PCR, RT-qPCR), της ψηφιακής PCR καθώς και τεχνικές που βασίζονται στο next generation sequencing. Κάθε μεθοδολογία διαφέρει ως προς την αναλογία των ασθενών στους οποίους μπορεί να εφαρμοστεί και την ευαισθησία της για την ανίχνευση της MRD. Αναμένεται ότι η εκτίμηση της MRD θα αποτελέσει κεφαλαιώδους σημασίας κριτήριο για τον περαιτέρω σχεδιασμό της θεραπείας των ασθενών με οξεία μυελογενή λευχαιμία.

Η MRD μπορεί να αξιολογηθεί σε πρώιμα χρονικά σημεία, για παράδειγμα, μετά από τη θεραπεία εφόδου ή τη θεραπεία συντήρησης, ώστε να εκτιμηθεί η κατάσταση ύφεσης και να προσδιοριστεί η κινητική της ανταπόκρισης της νόσου μετά τη χορηγούμενη χημειοθεραπεία. Επιπλέον, μπορεί να εκτιμάται μετά τη θεραπεία συντήρησης, ανά τακτά διαστήματα, για την ανίχνευση επικείμενης μορφολογικής υποτροπής. Η κατάσταση της ύφεσης όπως εκτιμάται με την κυτταρομετρία ροής, παρέχει έναν πιο αξιόπιστο προγνωστικό παράγοντα για την έκβαση της νόσου από την συμβατική αξιολόγηση της ύφεσης, βάσει της μορφολογίας. Η κυτταρομετρία ροής μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση της "CR χωρίς MRD"(CR_{MRD}). (Πίνακας 14)

Πίνακας 14

Κριτήρια ανταπόκρισης στην οξεία μυελογενή λευχαιμία (2017 ELN recommendations)

ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ	ΟΡΙΣΜΟΣ	ΣΧΟΛΙΟ
Ανταπόκριση		
Πλήρης ύφεση χωρίς ελάχιστη υπολειπόμενη νόσο [CR without minimal residual disease (CR _{MRD} -)]	Εάν έχει μελετηθεί πριν από τη θεραπεία, η CR με αρνητικότητα για έναν γενετικό δείκτη μεRT-qPCR ή CR με αρνητικότητα μεMFC	Οι ευαισθησίες ποικίλλουν ανάλογα με το δείκτη παρακολούθησης, καθώς και τη μέθοδο. Συνεπώς, πρέπει να αναφέρεται η μέθοδος και η ευαισθησία της ανάλυσης. Οι αναλύσεις θα πρέπει να γίνονται σε έμπειρα εργαστήρια (συγκεντρωτική διάγνωση)
Πλήρης ύφεση (Complete remission, CR)	Βλάστες μυελού των οστών <5%, απουσία κυκλοφορούντων βλαστών και βλαστών με ραβδία Auer, απουσία εξωμυελικής νόσου, ANC $\geq 1,0 \times 10^9 / L$ (1000 / μL), αριθμός αιμοπεταλίων $\geq 100 \times 10^9 / L$ (100 000 / μL)	MRD*ή άγνωστη
CR με ελλιπή αιματολογική ανάκτηση (CR with incomplete hematologic recovery, CRi)	Όλα τα κριτήρια CR, εκτός από ουδετεροπενία ($<1,0 \times 10^9 / L$ [1000 / μL]) ή θρομβοπενία ($<100 \times 10^9 / L$ [100.000 / μL])	
Μορφολογική κατάσταση χωρίς λευχαιμία (Morphologic leukemia-free state, MLFS)	Βλάστες μυελού των οστών <5%; απουσία βλαστών με ραβδία Auer, απουσία εξωμυελικής νόσου, δεν απαιτείται αιματολογική ανάκτηση	Ο μυελός δεν πρέπει να είναι "απλαστικός". τουλάχιστον 200 κύτταρα θα πρέπει να απαριθμούνται ή η κυτταροβρίθεια να είναι τουλάχιστον 10%
Μερική ύφεση, (Partial remission, PR)	Όλα τα αιματολογικά κριτήρια της CR. μείωση του ποσοστού των βλαστών στο μυελό των οστών στο 5% έως 25% και μείωση του αρχικού ποσοστού των βλαστών στο μυελό των οστών πριν από την αγωγή, κατά τουλάχιστον 50%	Ιδιαίτερα σημαντική στο πλαίσιο των κλινικών δοκιμών φάσης 1-2
Αποτυχία θεραπείας		
Πρωτοπαθώς ανθεκτική νόσος	Δεν υπάρχουν CR ή CRi μετά από 2 κύκλους εντατικής θεραπείας εφοδου, αποκλείοντας τους ασθενείς που αποβίωσαν κατά την απλασία ή εξαιτίας άοριστης αιτίας	Σχήματα που περιέχουν υψηλότερες δόσεις κυτταραβίνης θεωρούνται γενικά ως η καλύτερη επιλογή για τους ασθενείς που δεν ανταποκρίνονται σε πρώτο κύκλο «3+7», η

		πιθανότητα ανταπόκρισης σε αυτά τα σχήματα είναι χαμηλότερη μετά την αποτυχία ενός πρώτου
Θάνατος κατά την απλασία	Θάνατοι που συμβαίνουν ≥ 7 ημέρες μετά την ολοκλήρωση της αρχικής θεραπείας ενώ ο ασθενής είναι είναι πениκός. με έναν απλαστικό ή υποπλαστικό μυελό των οστών που λαμβάνεται εντός 7 ημερών από το θάνατο, χωρίς στοιχεία ανθεκτικής λευχαιμίας	
Θάνατος από αόριστη αιτία	Θάνατοι που εμφανίζονται πριν από την ολοκλήρωση της θεραπείας ή < 7 ημέρες μετά την ολοκλήρωσή της. ή θανάτων που συμβαίνουν ≥ 7 ημέρες μετά την ολοκλήρωση της αρχικής θεραπείας χωρίς βλάστες στο αίμα, αλλά δεν υπάρχει διαθέσιμη εξέταση μυελού των οστών	
Υποτροπή		
Αιματολογική υποτροπή (μετά από CR _{MRD-} , CR, CR _i)	Ποσοστό βλαστών στο μυελό των οστών $\geq 5\%$; ή επανεμφάνιση βλαστών στο αίμα. ή ανάπτυξη εξωμυελικής νόσου	
Μοριακή υποτροπή (μετά CR _{MRD-})	Εάν είχε μελετηθεί πριν τη θεραπεία, επανεμφάνιση της MRD όπως εκτιμήθηκε με RT-qPCR ή με MFC	Η μέθοδος, η ευαισθησία της ανάλυσης και οι τιμές αναφοράς πρέπει να αναφέρονται. Οι αναλύσεις θα πρέπει να γίνονται σε έμπειρα εργαστήρια (συγκεντρωτική διάγνωση)

Διαδοχικά δείγματα για παρακολούθηση της MRD, κατέδειξαν ότι η παραμονή θετικής PCR ή η αύξηση των μεταγράφων των λευχαιμικών κυττάρων μετά από μια αρχική μοριακή ανταπόκριση, προμηνύουν υποτροπή. Ως εκ τούτου, η παρακολούθηση της MRD, είναι δυνατό να αποτελέσει σημαντικό «όπλο» στον περαιτέρω σχεδιασμό της θεραπευτικής προσέγγισης στους ασθενείς με οξεία μυελογενή λευχαιμία.

Ωστόσο, απαιτούνται μελέτες για να διαχωριστούν οι μεταλλάξεις ενδεικτικές των λευχαιμικών κλώνων που σχετίζονται με κλινική υποτροπή, από τις μεταλλάξεις που σχετίζονται με προλευχαιμικούς κλώνους (π.χ., *DNMT3A*,

IDH1/2) με ελάχιστη πρόγνωση της υποτροπής, που παραμένουν σε υψηλά επίπεδα μετά τη χημειοθεραπεία και κατά τη διάρκεια της ύφεσης.

III. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η οξεία μυελογενής λευχαιμία δεν είναι ένα νόσημα αλλά μία ετερογενής ομάδα νεοπλασματικών διαταραχών που χαρακτηρίζεται από τον πολλαπλασιασμό και τη συσσώρευση άωρων αιμοποιητικών κυττάρων στο μυελό των οστών και στο αίμα. Τα κακοήθη αυτά κύτταρα, σταδιακά αντικαθιστούν και αναστέλλουν την ανάπτυξη και την ωρίμανση των φυσιολογικών προβαθμίδων της ερυθράς σειράς, της κοκκιδώδους και των μεγακαρυοκυττάρων. Η οξεία μυελογενής λευχαιμία παρουσιάζει σημαντική φαινοτυπική και γονοτυπική ετερογένεια.

Ο σκοπός της μελέτης είναι η αναζήτηση των μεταλλάξεων των γονιδίων *FLT3* και *NPM1* (και συγκεκριμένα η μετάλλαξη *FLT3-ITD* και μεταλλάξεις του εξωνίου 12 του *NPM1* αντίστοιχα), στους νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς με οξεία μυελογενή λευχαιμία, καθώς και μεταλλάξεις στο γονίδιο *IDH1* (και συγκεκριμένα οι μεταλλάξεις R132C, R132G, R132H, R132L, R132P, R132S) και μεταλλάξεις στο γονίδιο *IDH2*, προκειμένου να μελετηθεί η συσχέτισή τους με τους ισχύοντες προγνωστικούς παράγοντες, στα ποσοστά ύφεσης, υποτροπής και ολικής επιβίωσης.

Η μελέτη των γονιδιακών μεταλλάξεων αποσκοπεί στον καλύτερο διαχωρισμό των ασθενών με οξεία μυελογενή λευχαιμία σε προγνωστικές υποκατηγορίες. Επιπλέον, η ανεύρεση στοχευμένων μοριακών θεραπειών σηματοδοτεί την αφετηρία της “χρυσής εποχής” για τη θεραπεία της οξείας μυελογενούς λευχαιμίας.

Επιλέξαμε να μελετήσουμε αναλυτικότερα την επίπτωση των μεταλλάξεων των γονιδίων *IDH1* και *IDH2* στη θεραπευτική προσέγγιση και επιβίωση των ασθενών που έλαβαν κλασική χημειοθεραπεία, δεν ήταν υποψήφιοι για αλλογενή μεταμόσχευση και η νόσος τους δεν χαρακτηρίστηκε ως πρωτοπαθώς ανθεκτική.

III. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΑΣΘΕΝΕΙΣ, ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1.5 ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Προκειμένου να επιτευχθεί ο αρχικός στόχος της μελέτης χρησιμοποιήθηκε αρχειακό υλικό από ασθενείς με de novo οξεία μυελογενή λευχαιμία. Συγκεκριμένα από το 1995 έως το 2010, απομονώθηκαν, προς φύλαξη σε αρχείο, δείγματα γενωμικού DNA από αίμα ή από μυελό των οστών. Τα δείγματα φυλάσσονταν στο Αιματολογικό Εργαστήριο της Α΄ Προπαιδευτικής Παθολογικής Κλινικής σε θερμοκρασία -80°C . Οι αιμοληψίες και οι αναρροφήσεις μυελού των οστών πραγματοποιήθηκαν στα πλαίσια διαγνωστικής προσέγγισης των ασθενών αυτών. Το υλικό της διδακτορικής διατριβής, σύμφωνα με το πρωτόκολλο, αποτελούν δείγματα αίματος, μυελού των οστών με «de novo» οξεία μυελογενή λευχαιμία. Τα δείγματα αυτά προέρχονται από ασθενείς που παρακολουθούνταν στο Αιματολογικό Τμήμα της Α΄ Προπαιδευτικής Παθολογικής Κλινικής και στο Αιματολογικό Τμήμα της Αιματολογικής Κλινικής. Συνολικά συγκεντρώθηκαν δείγματα αίματος και μυελού των οστών από 126 ασθενείς. Μετά την συλλογή των δειγμάτων ακολούθησε η απομόνωση γενωμικού DNA.

1.6 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ DNA

Έχει πραγματοποιηθεί σε 126 ασθενείς.

Η απομόνωση του γενωμικού DNA από αίμα και μυελό των οστών έγινε με τη χρήση του QIAmp DNA Mini kit (QIAGEN).

QIAmp DNA Mini kit (QIAGEN):

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην επιλεκτική σύνδεση του DNA σε μεμβράνη πυριτίου παρουσία χαοτροπικών αλάτων. Στη συνέχεια τα κύτταρα του δείγματος υφίστανται πέψη με πρωτεϊνάση K στους 55°C με τη βοήθεια ενός βελτιστοποιημένου διαλύματος πέψης που βοηθά στη μετουσίωση των πρωτεϊνών και ενισχύει τη δραστηριότητα της πρωτεϊνάσης K. Τυχόν

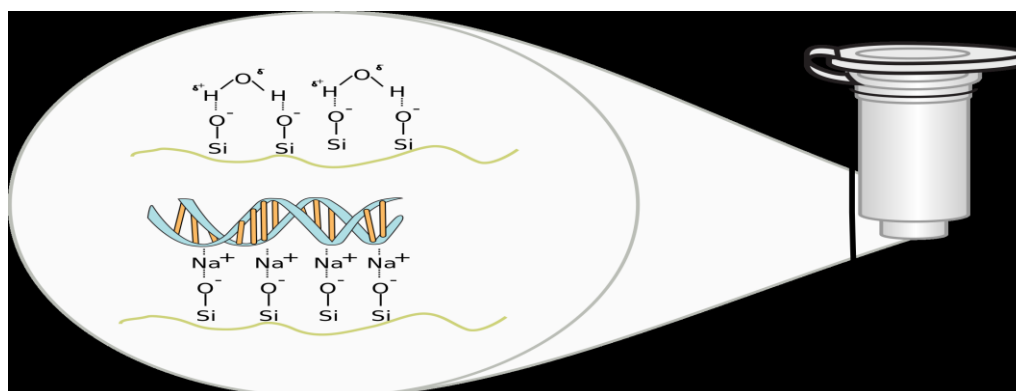
υπόλοιπο RNA απομακρύνεται από την πέψη με RNase A πριν από τη δέσμευση στη μεμβράνη πυριτίου. Το δείγμα αναμιγνύεται με αιθανόλη και διάλυμα AW1 που επιτρέπει υψηλή δέσμευση του DNA στη στήλη. Η αιθανόλη απομακρύνει τα μόρια του νερού από το DNA και το ιζηματοποιεί. Το DNA συνδέεται με τη μεμβράνη πυριτίου που βρίσκεται στη στήλη και τα κατάλοιπα απομακρύνονται μετά από διεξοδικό πλύσιμο με διαλύματα πλύσης (AW1, AW2). Το γενωμικό DNA εκλούεται στη συνέχεια σε διάλυμα έκλουσης (AE) χαμηλής περιεκτικότητας σε άλας.

Διαδικασία:

Σε αποστειρωμένο σωλήνα μικροφυγοκέντρου (eppendorf, 1,5ml) τοποθετούμε 200μl από το δείγμα αίματος (ή 50 μl μυελού των οστών). Σε περίπτωση που το δείγμα έχει υπερβολική ποσότητα λευκοκυττάρων τότε διαλύουμε λιγότερη ποσότητα σε PBS σε τελικό όγκο 200μl έτσι ώστε ο αριθμός των κυττάρων να μην υπερβαίνει τα 5×10^6 κύτταρα. Προσθέτουμε 20μl πρωτεϊνάσης K (QIAGEN Proteinase), 4μl RNase A και 200μl διαλύματος AL και αναμιγνύουμε σε αναδευτήρα (vortex) για 15 δευτερόλεπτα ώστε να προκύψει ομοιογενές διάλυμα προκειμένου να επιτευχθεί καλύτερη λύση των κυττάρων. Τοποθετούμε το σωληνάριο σε θερμαντική πλάκα στους 56°C για 10 λεπτά, για την προώθηση της πέψης των πρωτεϊνών. Ακολουθεί σύντομη φυγοκέντρηση και στη συνέχεια προσθέτουμε 200μl αιθανόλης (96- 100%) και αναμιγνύουμε σε αναδευτήρα για 15 δευτερόλεπτα. Ακολουθεί σύντομη φυγοκέντρηση. Προσεχτικά τοποθετούμε με πιπέτα το διάλυμα στην ειδική στήλη (QIAmp Spin Column) η οποία τοποθετείται σε σωληνάριο συλλογής (όγκου 2ml) και φυγοκεντρούμε για 1 λεπτό στα 6000 x g (8000rpm). Απορρίπτουμε το σωληνάριο συλλογής με το διήθημα. Τοποθετούμε τη στήλη σε αποστειρωμένο σωληνάριο συλλογής, προσθέτουμε 500μl διαλύματος AW1 και φυγοκεντρούμε για 1 λεπτό στα 6000 x g (8000rpm). Απορρίπτουμε το σωληνάριο συλλογής με το διήθημα. Τοποθετούμε τη στήλη σε νέο αποστειρωμένο σωληνάριο συλλογής, προσθέτουμε 500μl διαλύματος AW2 και φυγοκεντρούμε σε μέγιστη ταχύτητα 20000 x g (14000rpm) για 3 λεπτά. Απορρίπτουμε το σωληνάριο συλλογής με

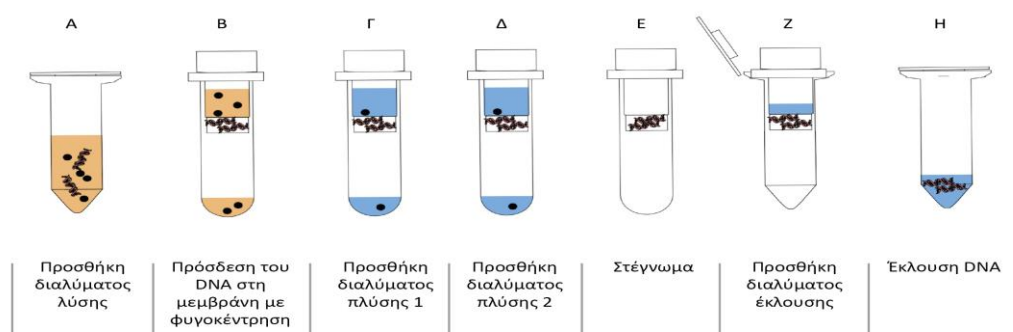
το διήθημα. Τοποθετούμε τη στήλη σε νέο αποστειρωμένο σωληνάριο συλλογής και φυγοκεντρούμε ξανά σε μέγιστη ταχύτητα 20000 x g (14000rpm) για 1 λεπτό προκειμένου να απομακρύνουμε κάθε υπόλειμμα διαλύματος AW2. Απορρίπτουμε το σωληνάριο συλλογής με το διήθημα. Τοποθετούμε τη στήλη σε αποστειρωμένο σωληνάριο errendorf (όγκου 1,5ml) και προσθέτουμε στη στήλη 100μl διαλύματος έκλουσης AE ή αποσταγμένο νερό (dH2O). Επιδιώκουμε τη στήλη σε θερμοκρασία δωματίου για ένα λεπτό και τέλος φυγοκεντρούμε για 1 λεπτό στα 6000 x g (8000rpm). Απορρίπτουμε τη στήλη. Το εκχύλισμα περιέχει γενωμικό DNA έτοιμο προς φωτομέτρηση και εκτέλεση αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)¹⁶⁷. (Εικόνες 9 και 10)

Εικόνα 9



Στη μεμβράνη πυριτίου μιας στήλης δεσμεύονται μόρια νερού (A) και μόρια DNA παρουσία διαλύματος υψηλής αλατότητας (B). Εικόνα: «Qiagen Mini Spin Column» από Squidionius (talk), με άδεια Public Domain. Πηγή: Wikimedia Commons.

Εικόνα10



Στάδια απομόνωσης γενωμικού DNA με στήλες που φέρουν μεμβράνη πυριτίου. Διδακτορική διατριβή κ. Άννας Ευθυμίου

1.7 ΦΩΤΟΜΕΤΡΗΣΗ ΤΟΥ DNA

Τα ανωτέρω 126 δείγματα γενωμικού DNA φωτομετρήθηκαν προκειμένου να υπολογισθεί η συγκέντρωση DNA (C DNA). Η φωτομέτρηση γίνεται σε μήκος κύματος 260/280 nm. Αρχικά αραιώνουμε σε αναλογία 1:100 με αποσταγμένο νερό (5 μl DNA: 500 μl H₂O). Ο λόγος 260/280 πρέπει να είναι περίπου 1,8 προκειμένου να έχουμε DNA υψηλής καθαρότητας. Η συγκέντρωση του DNA υπολογίζεται ως εξής:

C DNA (μgr/μl) = τιμή στα 260 nm X 50 X αραιώση του DNA κατά τη φωτομέτρηση.

Φωτομετρήθηκαν όλα τα δείγματα γενωμικού DNA που απομονώθηκαν από αίμα και βιοψίες μυελού των οστών. Για τη φωτομέτρηση χρησιμοποιήσαμε το Quant-iT™ dsDNA High-Sensitivity Assay Kit, με το φωτόμετρο Qubit™ Fluorometer (Invitrogen). Όλα τα δείγματα περιείχαν ικανή ποσότητα γενωμικού DNA (CDNA : 20-50ng/μl) για περαιτέρω εφαρμογή αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης(PCR).

1.8 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase chain reaction, PCR) είναι ίσως η ευρύτερα χρησιμοποιούμενη μέθοδος της μοριακής βιολογίας, με αναρίθμητες εφαρμογές τόσο σε ερευνητικό όσο και σε διαγνωστικό επίπεδο. Ανακαλύφθηκε το 1983 από τον βιοχημικό Kary Mullis, που εργαζόταν σε μια εταιρεία βιοτεχνολογίας της Καλιφόρνιας. Για την ανακάλυψη αυτή τιμήθηκε 10 χρόνια αργότερα με το βραβείο Νόμπελ. Η PCR είναι μια ενζυμική μέθοδος ενίσχυσης συγκεκριμένων τμημάτων γενετικού υλικού in vitro. Κατά τη διάρκεια μιας τυπικής αντίδρασης PCR, το επιθυμητό τμήμα γενετικού υλικού πολλαπλασιάζεται μέχρι και ένα τρισεκατομμύριο φορές, γεγονός που είναι απαραίτητο για μετέπειτα χειρισμούς, όπως η ηλεκτροφόρηση, η πέψη με ένζυμα περιορισμού, η ανάγνωση της αλληλουχίας βάσεων κ.ά.

1.4.1 Τα συστατικά της PCR

Τα βασικά συστατικά για τη διενέργεια της αντίδρασης PCR είναι:

α. DNA πολυμεράση

Η DNA πολυμεράση είναι ένζυμο που υπάρχει σε όλους τους οργανισμούς (ευκαρυωτικοί, προκαρυωτικοί και ιοί) και συμμετέχει στην αντιγραφή του DNA. Δεν μπορεί να συνθέσει ένα νέο μόριο DNA, μπορεί όμως να αντιγράψει ένα υπάρχον που χρησιμοποιείται ως εκμαγείο. Η πολυμεράση που χρησιμοποιείται στην PCR έχει απομονωθεί από το βακτήριο *Thermus aquaticus* (Taq), το οποίο έχει ως φυσικό περιβάλλον τις θερμές πηγές. Η Taq πολυμεράση έχει τη βασική ιδιότητα να παραμένει δραστική σε υψηλές θερμοκρασίες. Η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της είναι 72°C, ενώ δεν καταστρέφεται από τη θέρμανση ακόμη και στους 95°C για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα. Η DNA πολυμεράση μπορεί να συνθέσει μια συμπληρωματική αλυσίδα DNA χρησιμοποιώντας ένα μονόκλωνο μόριο ως αρχικό εκμαγείο και έναν εκκινητή ως σημείο εκκίνησης. Η κατεύθυνση της σύνθεσης της νέας αλυσίδας είναι 5'-3'. Με την πάροδο των κύκλων της PCR η λειτουργικότητα και η πιστότητα της αντιγραφής φθίνουν και αντίστοιχα αυξάνεται ο αριθμός των λανθασμένων βάσεων που εισάγονται στη νεοσυντιθέμενη αλυσίδα του DNA. Η απλή DNA πολυμεράση κάνει περίπου ένα λάθος στις 100.000 βάσεις. Οι πολυμεράσες υψηλής πιστότητας (Proof reading polymerase), οι οποίες έχουν δραστικότητα 3'-5' εξωνουκλεάσης, μπορούν να διορθώσουν τα λάθη που δημιουργούν κατά τη σύνθεση του μορίου DNA. Έτσι επιτυγχάνουν μικρότερα ποσοστά λαθών, της τάξης του 10⁻⁶.

β. Ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές

Οι εκκινητές (Primers) είναι ολιγονουκλεοτίδια που οριοθετούν το τμήμα DNA που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί. Ο σωστός σχεδιασμός των εκκινητών επηρεάζει σημαντικά το αποτέλεσμα της PCR. Δύο εκκινητές είναι απαραίτητοι για την εκτέλεση της PCR, με αλληλουχία νουκλεοτιδίων συμπληρωματική με αυτή των δύο «άκρων» του υπό μελέτη τμήματος του

DNA. Το μήκος των εκκινητών ποικίλλει, συνήθως κυμαίνεται μεταξύ 18-25 βάσεις (bp).

γ. Γενετικό υλικό – αλληλουχία στόχος

Ως αρχικό υλικό μπορεί να χρησιμοποιηθεί DNA ή RNA το οποίο θα έχει μεταγραφεί στην πιο σταθερή μορφή του, το συμπληρωματικό DNA (Complementary DNA, cDNA). Πολύ μικρές ποσότητες DNA (της τάξης των 25-100 ng ανά αντίδραση τελικού όγκου 50 μl) είναι επαρκείς για τις περισσότερες αντιδράσεις PCR. Μεγάλη ποσότητα DNA μπορεί να αναστείλει την αντίδραση. Για τη βέλτιστη απόδοση της PCR το DNA πρέπει να είναι μακρομοριακό και υψηλής καθαρότητας, απαλλαγμένο από υπολείμματα αιθανόλης ή αλάτων που μπορούν να αναστείλουν την αντίδραση.

δ. Ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης και Mg²⁺

Το διάλυμα της αντίδρασης διατηρεί το pH και τη συγκέντρωση αλάτων στις βέλτιστες συνθήκες διεξαγωγής της αντίδρασης. Περιέχει επίσης ιόντα Mg²⁺, που είναι απαραίτητος συμπαράγοντας της DNA πολυμεράσης. Τα ιόντα Mg²⁺ σχηματίζουν διαλυτά σύμπλοκα με τα dNTPs, το DNA εκμαγείο και τους εκκινητές. Περίσσεια Mg²⁺ οδηγεί σε μη ειδική σύνδεση των εκκινητών με το DNA, αυξάνοντας τα μη ειδικά προϊόντα στην αντίδραση. Επίσης μειώνει την πιστότητα αντιγραφής της Taq πολυμεράσης. Χαμηλές συγκεντρώσεις Mg²⁺ οδηγούν σε μείωση της ποσότητας του παραγόμενου προϊόντος. Η βέλτιστη συγκέντρωση Mg²⁺ για κάθε αντίδραση PCR πρέπει να προσδιορίζεται εμπειρικά με δοκιμή διαδοχικών συγκεντρώσεων από 1 έως 4 mM.

ε. Νουκλεοτίδια (dNTPs)

Τα δομικά μόρια που χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση της νέας αλυσίδας είναι τα τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (deoxy nucleotide triphosphates, dNTPs). Τα dNTPs χρησιμοποιούνται ως ισομοριακό μίγμα των τεσσάρων νουκλεοτιδίων (ATP, TTP, CTP και GTP) σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται στα 80-800 μM .

Η διαδικασία που ακολουθείται για την εκτέλεση μιας αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης ξεκινά από την επιλογή του τμήματος DNA που θέλουμε να πολλαπλασιάσουμε και το οποίο ορίζεται από δύο ολιγονουκλεοτίδια, στο 5' και στο 3' άκρο που χρησιμοποιούνται ως εκκινήτες από τους οποίους ξεκινά και τερματίζει η διαδικασία της αντιγραφής. Η πολυμεράση αντιγράφει με κατεύθυνση 5' \rightarrow 3' χρησιμοποιώντας ως μήτρα μονόκλωνο τμήμα DNA. Ο πολλαπλασιασμός λαμβάνει χώρα σε επαναλαμβανόμενους κύκλους καθένας από τους οποίους αποτελείται από 3 διακριτά στάδια (αποδιάταξη /denaturing, πρόσδεση /annealing, επιμήκυνση/ extension). Στο πρώτο στάδιο έχουμε την αποδιάταξη του μητρικού τμήματος DNA (σε $\theta = 95^{\circ}\text{C}$ για 1 min) και τον διαχωρισμό του σε δύο μονές αλυσίδες. Στη συνέχεια ακολουθεί το δεύτερο στάδιο, η σύνδεση, όπου η θερμοκρασία μειώνεται στους 58-65 $^{\circ}\text{C}$ επιτρέποντας έτσι τον υβριδισμό των εκκινήτων στις συμπληρωματικές αλληλουχίες, που πρέκυψαν από το πρώτο στάδιο. Στο τρίτο στάδιο, η Taq πολυμεράση, αρχίζοντας από τον εκκινήτη παράγει το συμπληρωματικό αντίγραφο της αρχικής μονής αλυσίδας σε $\theta = 72^{\circ}\text{C}$ εντός 1-3 min, χρησιμοποιώντας ως δομικά στοιχεία τα dNTP's που υπάρχουν σε αφθονία στο διάλυμα. Τα παραπάνω στάδια επαναλαμβάνονται από 25 έως 35 φορές. Η θερμοκρασία στην οποία μπορούν να υβριδιστούν οι εκκινήτες εξαρτάται από την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων και συγκεκριμένα την περιεκτικότητά τους σε πουρίνες και πυριμιδίνες. Η σχεδίαση και επιλογή των εκκινήτων είναι από τα πιο σημαντικά στοιχεία στην PCR . Πρέπει να μην παρουσιάζουν ομολογία με άλλες περιοχές του DNA και να μην είναι συμπληρωματικοί μεταξύ τους. Αποτέλεσμα όλων αυτών είναι η εκθετική (σε κάθε κύκλο) αύξηση του αρχικού τμήματος DNA και η παραγωγή ποσότητας μικρογραμμάρων DNA. Το παραγόμενο τμήμα DNA, το μήκος του οποίου

ορίζεται από τους εκκινητές, είναι ορατό όταν το ηλεκτροφορήσουμε σε γέλη αγαρόζης. Η PCR εκτελείται στον θερμικό κυκλοποιητή (Thermal cycler), συσκευή που φέρει θερμαινόμενη πλάκα που μπορεί να εναλλάσσει θερμοκρασίες με ταχύτητα και ακρίβεια. Ο θερμικός κυκλοποιητής είναι μια προγραμματιζόμενη συσκευή, στην οποία μπορούμε να ρυθμίσουμε την επιθυμητή θερμοκρασία και τη διάρκεια κάθε σταδίου αλλά και τη διαδοχή τους. (Εικόνα 11)

Εικόνα 11

Στάδια της PCR	Θερμοκρασία (° C)	Χρόνος
1. Αρχική αποδιάταξη	95	2-5 min
2. Αποδιάταξη	95	30-45 sec
3. Υβριδισμός εκκινητών	55-65	30-45 sec
4. Επιμήκυνση (1 kb/min)	72	45 sec
Επανάληψη σταδίων 2-4 για 30-35 φορές		
5. Τελική επιμήκυνση	72	5 min

Τυπικό πρόγραμμα PCR για τον πολλαπλασιασμό ενός τμήματος DNA μεγέθους 500 bp.

Ένα τυπικό πρόγραμμα PCR στον θερμικό κυκλοποιητή για τον πολλαπλασιασμό ενός τμήματος DNA μεγέθους 500 bp είναι το ακόλουθο: (Εικόνα 12).

Εικόνα 12



Θερμικός κυκλοποιητής όπου πραγματοποιείται η κλασική αντίδραση PCR. Στην οθόνη του μηχανήματος απεικονίζεται το πρόγραμμα των διαδοχικών κύκλων για τη διενέργεια της αντίδρασης. Φωτογραφία: «Θερμικός κυκλοποιητής», Αιματολογικό Εργαστήριο Α' Προπαιδευτικής Παθολογικής Κλινικής, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ. Διανέμεται με άδεια CC-BY-SA 3.0.

Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκε το Hot StarTaq Master Mix Kit (QIAGEN). Στην περίπτωση αυτή χρησιμοποιείται μια Taq πολυμεράση η οποία είναι ανενεργή σε θερμοκρασία δωματίου έτσι ώστε να αποφεύγεται η δημιουργία διμερών των εκκινητών καθώς και η μη συμπληρωματική σύνδεση κατά την προετοιμασία της αντίδρασης. Για να ενεργοποιηθεί η Hot StarTaq πολυμεράση απαιτείται ένα επιπλέον στάδιο (95°C για 15min) που γίνεται μόνο μια φορά πριν αρχίσει η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης. Το Master Mix περιέχει επιπλέον ρυθμιστικό διάλυμα, dNTP's και MgCl₂ ως πηγή Mg¹⁶⁸.

1.4.2 PCR για την ανίχνευση της μεταλλάξεων του γονιδίου *NPM1*

Για κάθε δείγμα DNA πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για την ενίσχυση του γονιδίου *NPM1* και την ανίχνευση μεταλλάξεων. Χρησιμοποιήθηκαν, ένας 5'-3' εκκινητής ο οποίος έχει σημειωθεί με το

φθοριόχρωμα Well RED Dye-labeled Phosphoramidites (D4-PA), χρώματος μπλέ και ένας 3'-5' εκκινητής ο οποίος δεν είναι σημασμένος, για την ενίσχυση του εξονίου 12 του γονιδίου *NPM1*. Οι αλληλουχίες τους είναι οι εξής:

5'-3' D4-PA εκκινητής (φθορίζων):

NPM1-F: 5' – TGTCTATGAAGTGTGTGGTTCCTT- 3'

3'-5' εκκινητής:

NPM1-R: 3 '- CGGTAGGGAAAGTTCTCACTCTG-5'

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης έγινε σε συνολικό όγκο 25μl και περιείχε:

DNA	1,0μl (C _{DNA} :50ng/tube)
Hotstart Taq Mastermix	12,5μl
NPM1-F	0,5μl
NPM1-R	0,5μl
dH ₂ O	10,5μl

Οι συνθήκες της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης για την ενίσχυση του γονιδίου *NPM1* ήταν οι ακόλουθες:

Αρχική αποδιάταξη:	95°C για 15 λεπτά	} 25 κύκλοι
Αποδιάταξη:	95°C για 30 δευτερόλεπτα	
Υβριδισμός εκκινητών:	62°C για 30 δευτερόλεπτα	
Επέκταση PCR προϊόντος:	72°C για 30 δευτερόλεπτα	
Τελική επέκταση PCR προϊόντος:	72°C για 5 λεπτά	

1.4.3 PCR για την ανίχνευση του εσωτερικού σε σειρά αναδιπλασιασμού (Internal Tandem Duplication, ITD) του γονιδίου FLT3.

Για κάθε δείγμα DNA πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για την ενίσχυση του γονιδίου *FLT3* και την ανίχνευση του εσωτερικού σε σειρά αναδιπλασιασμού, *ITD*.

Χρησιμοποιήθηκαν, ένας 5'-3' εκκινητής και ένας 3'-5' εκκινητής για την ενίσχυση των εξονίων 14 και 15 του γονιδίου *FLT3*, με τις ακόλουθες αλληλουχίες:

5'-3' εκκινητής:

FLT3-11F : 5' -GCA ATT TAG GTA TGA AAG CCA GC - 3'

3'-5' εκκινητής:

FLT3-12R: 3' -CTTTCAGCATTGACGGCAACC -5'

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης έγινε σε συνολικό όγκο 25μl και περιείχε:

DNA	1,0μl (C _{DNA} :50ng/tube)
Hotstart Taq Mastermix	12,5μl
FLT3-11F	0,5μl
FLT3-12R	0,5μl
dH ₂ O	10,5μl

Οι συνθήκες της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης για την ενίσχυση του γονιδίου *FLT3* ήταν οι ακόλουθες:

Αρχική αποδιάταξη:	95°C για 15 λεπτά	} 35 κύκλοι
Αποδιάταξη:	95°C για 30 δευτερόλεπτα	
Υβριδισμός εκκινητών:	62°C για 30 δευτερόλεπτα	
Επέκταση PCR προϊόντος:	72°C για 30 δευτερόλεπτα	
Τελική επέκταση PCR προϊόντος:	72°C για 5 λεπτά	

1.4.4 PCR για την ανίχνευση μεταλλάξεων του γονιδίου *IDH1*

Για κάθε δείγμα DNA πραγματοποιήθηκε multiplex αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για την ενίσχυση του γονιδίου *IDH1*.

Χρησιμοποιήθηκαν, ένας 5'-3' εκκινητής και ένας 3'-5' εκκινητής για την ενίσχυση του εξονίου 4 του γονιδίου *IDH1*, καθώς και μείγμα με forward εκκινητές (mastermix) για την ανίχνευση των ακολούθων μεταλλάξεων: R132C, R132G, R132H, R132L, R132P, R132S.

5'-3' εκκινητής:

IDH1 FC:5' -TGAGAAGAGGGTTGAGGAGTTCAAGT- 3'

3'-5' εκκινητής:

IDH1 RC:-3'-AATGTGTTGAGATGGACGCCTATTTGT-5'

Μείγμα forward εκκινητών (mastermix):

IDH1-R132C:TGGATGGGTAAAACCTATCATCATAGATT,

IDH1-R132G:TGGATGGGTAAAACCTATCATCATAGATG,

IDH1-R132H:GGATGGGTAAAACCTATCATCATAGGACA,

IDH1- R132L:GGATGGGTAAAACCTATCATCATAGGACT,

IDH1-R132P:GGATGGGTAAAACCTATCATCATAGGACC,

IDH1-R132S:TGGATGGGTAAAACCTATCATCATAGATA

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης έγινε σε συνολικό όγκο 28μl και περιείχε:

DNA	1,0μl (C _{DNA} :50ng/tube)
Hotstart Taq Mastermix	12,5μl
IDH1 FC	0,5μl
IDH1 RC	0,5μl
Mastermix	3,0μl
dH ₂ O	10,5μl

Οι συνθήκες της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης για την ενίσχυση του γονιδίου IDH1 ήταν οι ακόλουθες:

Αρχική αποδιάταξη:	95°C για 15 λεπτά	} 35 κύκλοι
Αποδιάταξη:	95°C για 30 δευτερόλεπτα	
Υβριδισμός εκκινητών:	62°C για 30 δευτερόλεπτα	
Επέκταση PCR προϊόντος:	72°C για 40 δευτερόλεπτα	
Τελική επέκταση PCR προϊόντος:	72°C για 5 λεπτά	

Στα δείγματα που φέρουν μετάλλαξη του γονιδίου *IDH1* εκτελείται νέα PCR με τους ίδιους forward (FC: TGAGAAGAGGGTTGAGGAGTTCAAGT) και reverse εκκινητές (RC: AATGTGTTGAGATGGACGCCTATTTGT) για την ενίσχυση του εξωνίου 4, χρησιμοποιώντας κάθε φορά έναν από τους forward εκκινητές του προαναφερθέντος μείγματος της multiplex PCR, με σκοπό την ανίχνευση της συγκεκριμένης μετάλλαξης.

1.4.5 PCR για την ανίχνευση μεταλλάξεων του γονιδίου *IDH2*

Για κάθε δείγμα DNA πραγματοποιήθηκε multiplex αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για την ενίσχυση του γονιδίου *IDH2*.

Χρησιμοποιήθηκαν, ένας 5'-3' εκκινητής και ένας 3'-5' εκκινητής για την ενίσχυση του εξονίου 4 του γονιδίου *IDH2*.

5'-3' εκκινητής:

IDH2F: 5'-GGGGTTCAAATTCTGGTTGA-3'

3'-5' εκκινητής:

IDH2R: 3'-CTAGGCGAGGAGCTCCAGT-5'

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης έγινε σε συνολικό όγκο 25μl και περιείχε:

DNA	1,0μl (CDNA:50ng/tube)
HotstartTaqMastermix	12,5μl
IDH2 FC	0,5μl
IDH2 RC	0,5μl
dH2O	10,5μl

Οι συνθήκες της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης για την ενίσχυση του γονιδίου *IDH2* ήταν οι ακόλουθες:

Αρχική αποδιάταξη:	95°C για 15 λεπτά	} 35 κύκλοι
Αποδιάταξη:	95°C για 30 δευτερόλεπτα	
Υβριδισμός εκκινητών:	58°C για 30 δευτερόλεπτα	
Επέκταση PCR προϊόντος:	72°C για 40 δευτερόλεπτα	
Τελική επέκταση PCR προϊόντος:	72°C για 5 λεπτά	

1.5 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΩΝ PCR ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

Η ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος διαχωρισμού και εξακρίβωσης τμημάτων DNA και RNA. Η τεχνική είναι απλή, γρήγορη στην εφαρμογή της και ικανή στην ανάλυση τμημάτων DNA, η οποία είναι αδύνατη με άλλες διαδικασίες.

Η ακριβής εντόπιση της θέσης του DNA στη γέλη επιτυγχάνεται με τη χρήση Βρωμιούχου Αιθιδίου (Ethidium Bromide, 0,1μl/10ml διαλύματος 0,5xTBE) το οποίο έχει την ικανότητα να δεσμεύεται στη μικρή έλικα του DNA και να φθορίζει σε υπεριώδες φως (δημιουργεί δεσμούς υδρογόνου ανάμεσα στις βάσεις με αποτέλεσμα οι μπάντες να γίνονται ορατές κατά την έκθεσή τους σε υπεριώδες φως— ultraviolet light, UV). Εναλλακτικά μπορεί να χρησιμοποιηθεί και Gel Red (Biotium) το οποίο έχει μεγαλύτερη ευαισθησία από το βρωμιούχο αιθίδιο και κυρίως είναι ασφαλές, φιλικό προς το περιβάλλον σε αντίθεση με το βρωμιούχο αιθίδιο το οποίο είναι εξαιρετικά τοξικό και μεταλλαξιογόνο. Η αγαρόζη είναι πολυμερές σακχάρου σε στερεά μορφή (σκόνη), η οποία όταν αναμιχθεί με κατάλληλο διάλυμα σχηματίζει γέλη. Το διάλυμα το οποίο χρησιμοποιήσαμε ήταν το 0,5xTBE (Tris-Borate), το οποίο αποτελείται από 1M Tris base + 1M βορικό οξύ + 20Mm EDTA και έχει pH: 8.3. Για την παρασκευή γέλης αγαρόζης 1%, 1,5% ή 2% διαλύουμε αντίστοιχα 0,6g, 0,9g, ή 1,2g αγαρόζης σε 60ml διαλύματος 0,5xTBE σε γυάλινη φλάσκα. Θερμαίνουμε το διάλυμα στους 60-65°C για 4 λεπτά έως ότου γίνει διαυγές. Στη συνέχεια προσθέτουμε στο διάλυμα 5μl Gel Red και τοποθετούμε στην ειδική για ηλεκτροφόρηση δεξαμενή και περιμένουμε να πήξει (περίπου 45 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου). Η συγκέντρωση της αγαρόζης στη γέλη καθορίζεται από το μέγεθος των προϊόντων της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε ζεύγη βάσεων (base pairs, bp), διότι ο ρυθμός μετακίνησης των τμημάτων του DNA μέσα στη γέλη μετά την τοποθέτηση ηλεκτροδίων που το καθιστούν ηλεκτρικό πεδίο με κίνηση από τον θετικό (+) προς τον αρνητικό (-) πόλο είναι διαφορετικός σε διαφορετικές συγκεντρώσεις αγαρόζης. Έτσι, σε γενικές γραμμές, για προϊόντα 100-300bp είναι 2%, για προϊόντα 300-800bp η συγκέντρωση αγαρόζης είναι 1% ή 1,5% και για προϊόντα >800bp είναι 0,8%.

Σε κάθε κανάλι της ηλεκτροφορητικής γέλης τοποθετούμε ποσότητα DNA και ειδικό διάλυμα χρωστικής ουσίας (loading buffer) σε αναλογία 1:5 και τοποθετούμε τα ηλεκτρόδια στους αντίστοιχους πόλους, με ταχύτητα 5 Volt το εκατοστό για 60min περίπου. Ο προσδιορισμός του μεγέθους των προϊόντων γίνεται με ταυτόχρονη ηλεκτροφόρηση 100 bp DNA Ladder (Invitrogen) ο οποίος αποτελείται από 15 γνωστά τμήματα DNA μεταξύ 100 και 150bp ανά 100bp και ένα επιπλέον τμήμα των 2072bp. Για εύκολη ανάγνωση των αποτελεσμάτων, το τμήμα των 500bp είναι 2-3 φορές πιο έντονο από τα υπόλοιπα.

1.5.1 PCR - *NPM1*

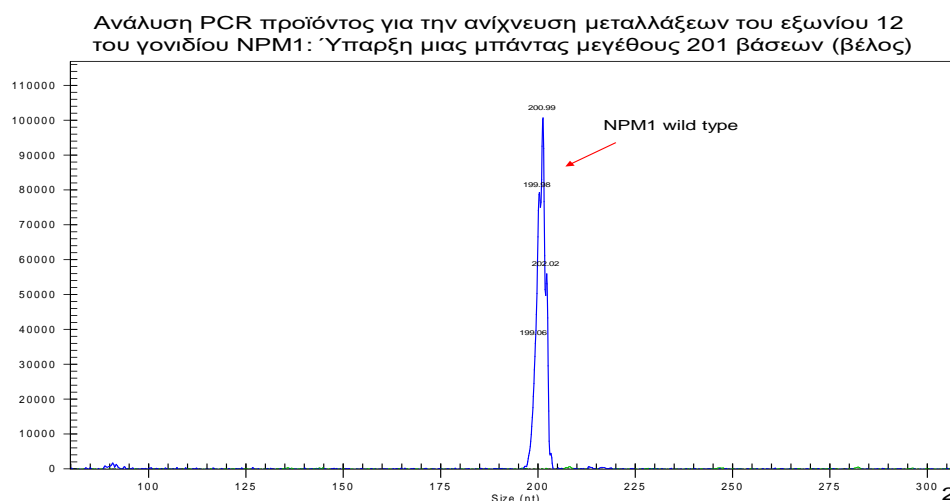
Οι μεταλλάξεις του γονιδίου *NPM1* χαρακτηρίζονται κυρίως από διαφορετικές προσθήκες τεσσάρων ζευγών βάσεων. Την PCR με τον φθορίζοντα 5' - 3' εκκινητή ακολουθεί τριχοειδική ηλεκτροφόρηση των προϊόντων (Beckman Coulter CEQ-8000). Η τριχοειδική ηλεκτροφόρηση (Capillary electrophoresis, CE) είναι μια μέθοδος που χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό ιοντικών τμημάτων (fragments) DNA ανάλογα με το μέγεθός τους.

Κατά την τριχοειδική ηλεκτροφόρηση, τα προϊόντα της PCR (καθώς και τα αρνητικά φορτισμένα μόρια όπως άλατα, μη ενσωματωμένοι εκκινητές καινουκλεοτίδια), εισέρχονται στο τριχοειδές ως αποτέλεσμα μιας ηλεκτροκινητικής μετακίνησης. Όπως και στην ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης, ένα ηλεκτρικό πεδίο υψηλής τάσης ωθεί τα αρνητικά φορτισμένα προϊόντα της PCR μέσα στα τριχοειδή. Τα τμήματα του DNA διαχωρίζονται ανάλογα με το μέγεθος βάσει του συνολικού τους φορτίου. Η ηλεκτροφορητική ικανότητα του δείγματος μπορεί να επηρεαστεί από τον τύπο και τη συγκέντρωση του ρυθμιστικού διαλύματος, το pH, τη θερμοκρασία, την τάση που εφαρμόζεται και τον τύπο του πολυμερούς που χρησιμοποιείται. Λίγο πριν φθάσει στο θετικά φορτισμένο πόλο, το σημασμένο με τη φθορίζουσα χρωστική τμήμα του DNA, διαχωρίζεται ανάλογα με το μέγεθος, περνώντας μέσα από μια δέσμη λέιζερ (laser beam). Η δέσμη λέιζερ προκαλεί τον φθορισμό της χρωστικής που είναι συνδεδεμένη με τα τμήματα του DNA. Τα σήματα των χρωστικών ουσιών διαχωρίζονται από ένα σύστημα περίθλασης

(diffraction system) και μία κάμερα (CCD camera) ανιχνεύει τον φθορισμό. Κάθε χρωστική εκπέμπει φως σε διαφορετικό μήκος κύματος όταν διεγείρεται από το λέιζερ και ως εκ τούτου όλες οι χρωστικές και επομένως όλοι οι τόποι στους οποίους αντιστοιχούν, μπορούν να διαχωρισθούν κατά τη μετακίνηση μέσα σε ένα και μόνο τριχοειδές. Το φθορίζων σήμα μετατρέπεται σε ψηφιακό δεδομένο με τη βοήθεια εφαρμογής λογισμικού ανάλυσης.

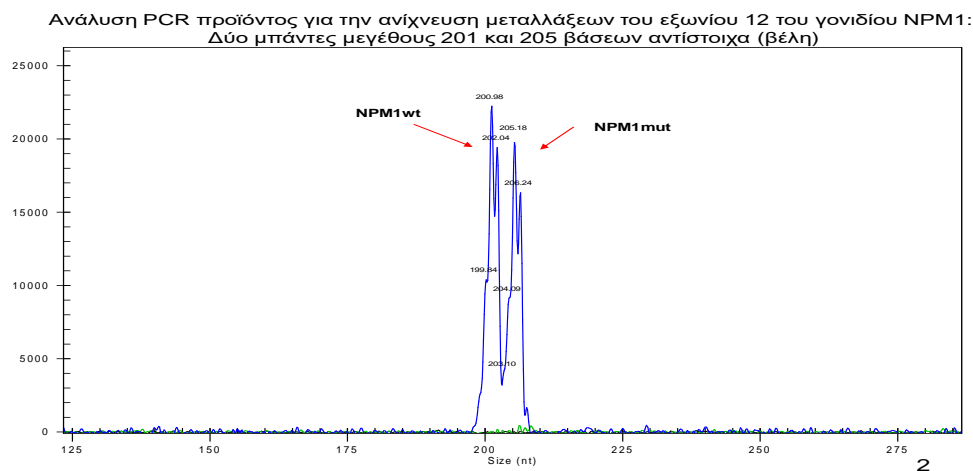
Δείγματα DNA που δεν φέρουν μεταλλάξεις του εξωνίου 12 του γονιδίου NPM1, εμφανίζουν μια μπάντα μεγέθους 201 βάσεων (Εικόνα 13), ενώ τα μεταλλαγμένα δείγματα εμφανίζουν δύο μπάντες μεγέθους, 201 και 205 βάσεων αντίστοιχα (Εικόνα 14).

Εικόνα 13



Τριχοειδική ηλεκτροφόρηση του γονιδίου *NPM1 wt* (Wild Type)

Εικόνα 14

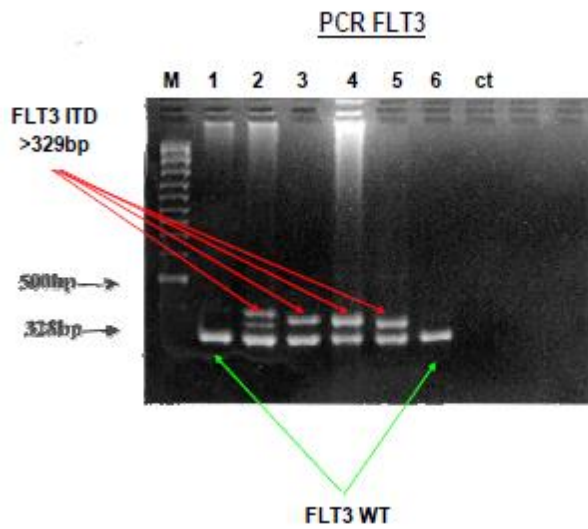


Τριχοειδική ηλεκτροφόρηση του μεταλλαγμένου γονιδίου *NPM1* με την προσθήκη 4 ζευγών βάσεων.

1.5.2 PCR – *FLT3*

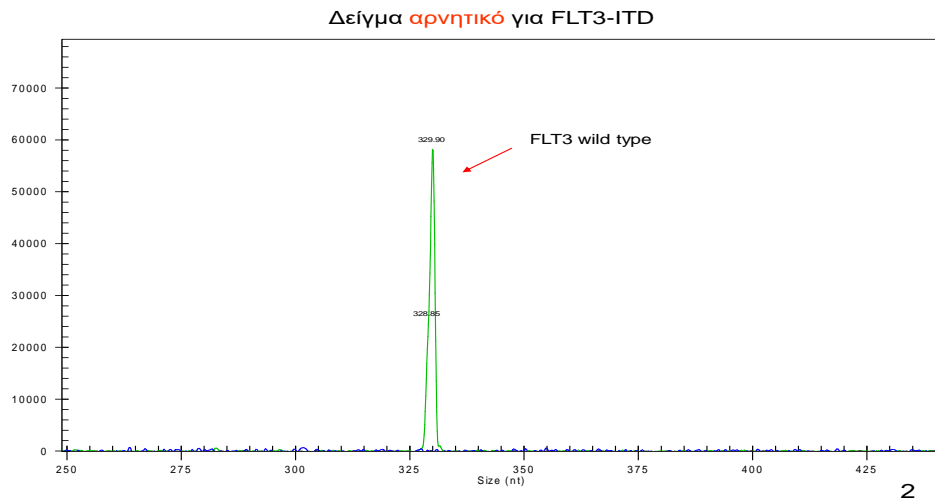
Το προϊόν της PCR για την ενίσχυση του γονιδίου *FLT3* και την ανίχνευση του εσωτερικού σε σειρά αναδιπλασιασμού (Internal Tandem Duplication, ITD), ηλεκτροφορείται σε γέλη αгарόζης 1%. Θετικά θεωρούνται τα δείγματα στα οποία ανιχνεύονταν μία μπάντα 329bp που αντιστοιχεί στο φυσιολογικό γονίδιο (wild type) και μια ή και δύο επιπλέον μπάντες >329bp που αντιστοιχούν στο μεταλλαγμένο γονίδιο (Εικόνες 15, 16 και 17).

Εικόνα 15



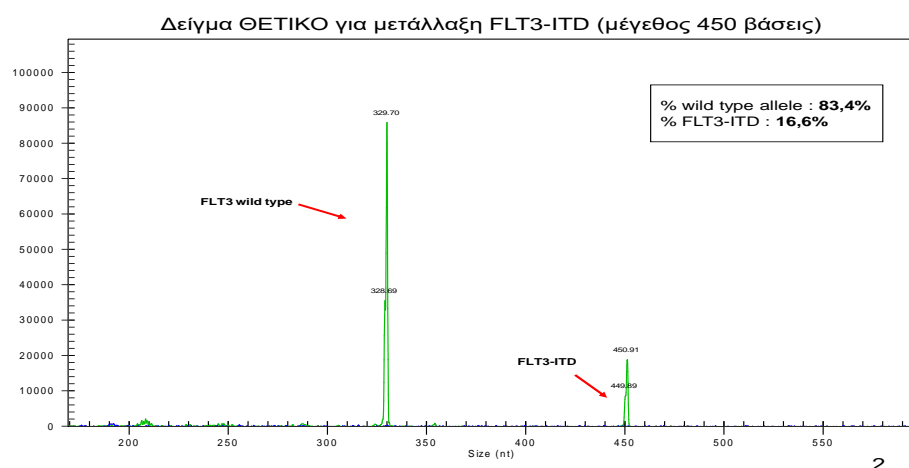
Ηλεκτροφόρηση σε γέλη αгарόζης των προϊόντων της PCR για το γονίδιο *FLT3*. Οι ασθενείς 2,3,4 και 5, φέρουν τον εσωτερικό σε σειρά αναδιπλασιασμό του γονιδίου *FLT3* σε αντίθεση με τους ασθενείς 1 και 6 στους οποίους ανιχνεύεται το γονίδιο *FLT3* (wild type, WT). Με M σημειώνεται ο Marker (Ladder) ενώ με ct σημειώνεται το αρνητικό δείγμα ελέγχου (control).

Εικόνα 16



Τριχοειδική ηλεκτροφόρηση (Capillary electrophoresis, CE) του γονιδίου *FLT3-wt* (Wild Type)

Εικόνα 17



Δείγματα DNA που δε φέρουν μεταλλάξεις *FLT3-ITD*, εμφανίζουν μια μπάντα μεγέθους 329 βάσεων, ενώ τα μεταλλαγμένα δείγματα εμφανίζουν δύο μπάντες: μία μπάντα μεγέθους 329 βάσεων που αντιστοιχεί στο αμετάλλακτο γονίδιο (*wt*) *FLT3* και μία μπάντα με μέγεθος μεγαλύτερο των 329 βάσεων που αντιστοιχεί στον εσωτερικό σε σειρά διπλασιασμό (internaltandemduplication) του γονιδίου *FLT3* (*FLT3-ITD*).

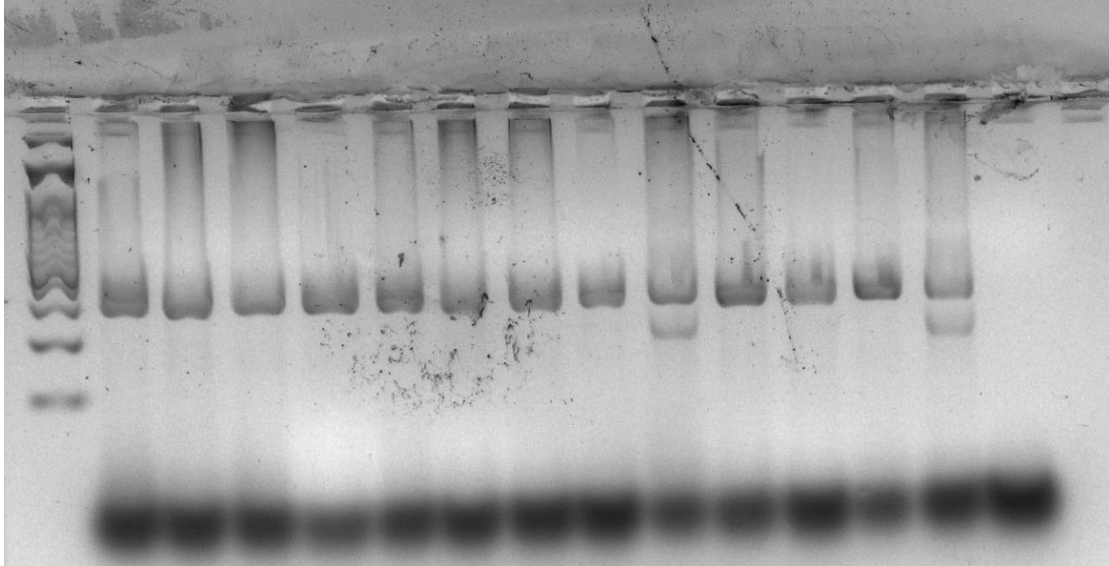
1.5.3 PCR – *IDH1*

Το προϊόν της PCR για την ενίσχυση του γονιδίου *IDH1* ηλεκτροφορεύεται σε γέλη αгарόζης 1%. Θετικά θεωρούνται τα δείγματα στα οποία ανιχνεύεται μία μπάντα που αντιστοιχεί στο φυσιολογικό γονίδιο (wild type) και μια επιπλέον μπάντα που αντιστοιχεί στο μεταλλαγμένο γονίδιο.

Όπως προαναφέρθηκε, στα δείγματα που φέρουν μετάλλαξη του γονιδίου *IDH1*, εκτελείται νέα PCR με τους ίδιους forward και reverse εκκινήτες για την ενίσχυση του εξονίου 4, χρησιμοποιώντας κάθε φορά έναν από τους forward εκκινήτες του προαναφερθέντος μείγματος της multiplex PCR, με σκοπό την ανίχνευση της συγκεκριμένης μετάλλαξης. Στη συνέχεια ακολουθεί η ηλεκτροφόρηση των PCR προϊόντων σε γέλη αгарόζης (Εικόνα 18).

Εικόνα 18

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 ct



Ηλεκτροφόρηση σε γέλη αгарόζης των προϊόντων της PCR για το γονίδιο *IDH1*. Ο ασθενής 9 φέρει μετάλλαξη του εξωνίου 4 του γονιδίου *IDH1*, σε αντίθεση με τους ασθενείς 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11 και 12 στους οποίους ανιχνεύεται το γονίδιο *IDH1* (wildtype, wt). Με M σημειώνεται ο Marker (Ladder), με ct σημειώνεται το αρνητικό δείγμα ελέγχου (control), ενώ ο ασθενής 13 αποτελεί το θετικό δείγμα ελέγχου.

1.5.4 PCR –*IDH2*

Το προϊόν της PCR για την ενίσχυση του γονιδίου *IDH2* υποβάλλεται στη συνέχεια σε καθαρισμό (PCR product purification), σύμφωνα με το πρωτόκολλο NucleoSpin®Extract II (Macherey-Nagel).

Κατόπιν, ακολουθεί ανάγνωση αλληλουχίας βάσεων του PCR προϊόντος (Beckman-Coulter CEQ8000), με direct sequencing και από τις δύο κατευθύνσεις.

1.5.5. Καθαρισμός PCR προϊόντος (PCR product purification)

Το προϊόν της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, εκτός από την επιθυμητή ενισχυμένη ακολουθία, περιλαμβάνει και άλλα στοιχεία όπως τμήματα γενετικού υλικού που δεν έχουν πολλαπλασιαστεί, εκκινητές, dNTPs, ένζυμα, αλλά και άλατα. Ο καθαρισμός του PCR προϊόντος γίνεται με τη φυγοκέντρηση σε ειδική στήλη που δεσμεύει το dsDNA και ταυτόχρονα επιτρέπει την έκπλυση των υπολοίπων μορίων. Η διαδικασία καθαρισμού του PCR προϊόντος περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια.

α. Δέσμευση DNA

Προσθέτουμε 4 όγκους διαλύματος δέσμευσης (Binding Buffer) παρασκευασμένο με ισοπροπανόλη, σε 1 όγκο PCR προϊόντος και αναδεύουμε καλά με πιπέτα. Μεταφέρουμε το δείγμα σε στήλη που παρέχεται από το kit και φυγοκεντρούμε σε θερμοκρασία δωματίου στα 10.000g για 1 min. Απορρίπτουμε το υγρό που πέρασε από τη στήλη και τοποθετούμε ξανά τη στήλη στο σωλήνα συλλογής.

β. Έκλυση DNA

Προσθέτουμε 650 μ l παρασκευασμένου με αιθανόλη διαλύματος πλύσης (Wash Buffer) στη στήλη και φυγοκεντρούμε σε θερμοκρασία δωματίου στα 10.000g για 1 min. Απορρίπτουμε το υγρό που πέρασε από τη στήλη και την τοποθετούμε ξανά στο σωλήνα συλλογής. Φυγοκεντρούμε ξανά τη στήλη σε θερμοκρασία δωματίου στη μέγιστη ταχύτητα για 2-3 min, έτσι ώστε να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα του διαλύματος πλύσης και απορρίπτουμε το σωλήνα συλλογής.

1.5.6. Ανάγνωση της αλληλουχίας βάσεων (Sequencing)

Με τη βοήθεια κατάλληλων μεθόδων μπορούμε να διαβάσουμε βάση προς βάση την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων ενός τμήματος DNA. Η επικρατέστερη μέθοδος αλληλούχησης του DNA ανακαλύφθηκε στα τέλη της δεκαετίας του '70 και χρησιμοποιείται με μικρές μόνο παραλλαγές μέχρι σήμερα. Πρόκειται για την ενζυμική μέθοδο αλληλούχησης με «τερματισμό επιμήκυνσης της αλυσίδας» (chain termination), με τη βοήθεια τροποποιημένων δεοξυνουκλεοτιδίων, που ανακάλυψε ο βρετανός βιοχημικός Frederick Sanger το 1977¹²⁸. Για την ανακάλυψη αυτή, τιμήθηκε με το βραβείο Νόμπελ Χημείας το 1980 μαζί με τον Walter Gilbert, που ανακάλυψε τη χημική μέθοδο αλληλούχησης του DNA, η οποία όμως τελικά δεν βρήκε ευρεία εφαρμογή. Ο Frederick Sanger είναι ένας από τους λίγους επιστήμονες που έχουν τιμηθεί δύο φορές με το βραβείο Νόμπελ. Με την εφαρμογή της μεθόδου του, δημοσιεύθηκε το 1977 η πρώτη πλήρης αλληλούχηση του γονιδιώματος ενός οργανισμού, του βακτηριοφάγου ΦΧ174¹⁶⁹.

Η τεχνική αλληλούχησης κατά Sanger στηρίζεται στη χρήση τροποποιημένων δεοξυνουκλεοτιδίων, των τριφωσφορικών 2',3'-διδεοξυνουκλεοτιδίων (Dideoxynucleotides, ddNTPs), τα οποία φέρουν υδρογόνο αντί υδροξυλίου στην 3' θέση της δεοξυριβόζης. Τα ddNTPs ενσωματώνονται φυσιολογικά κατά τη σύνθεση της νέας αλυσίδας DNA μέσω των 5' τριφωσφορικών ομάδων τους, αλλά εμποδίζουν την ενσωμάτωση του επόμενου δεοξυνουκλεοτιδίου, επειδή δεν διαθέτουν την 3'-OH ομάδα, η οποία είναι απαραίτητη για τη δημιουργία φωσφοδιεστερικού δεσμού.

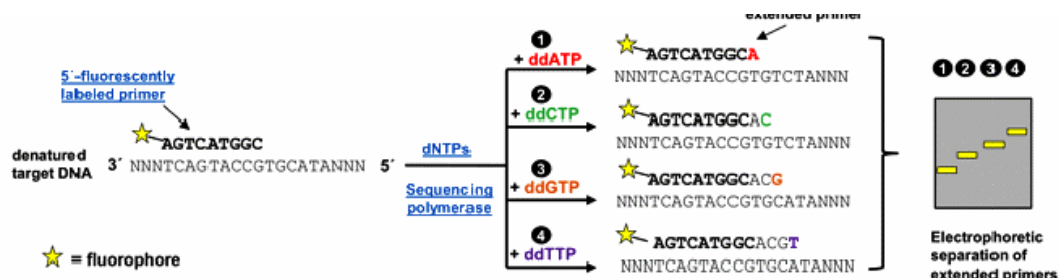
Κάθε δείγμα DNA που πρόκειται να αλληλουχηθεί υποβάλλεται σε μια τροποποιημένη PCR, που αποτελείται από τέσσερις ξεχωριστές αντιδράσεις. Σε κάθε αντίδραση PCR προστίθεται το μόριο DNA προς αλληλούχηση (που λειτουργεί ως εκμαγείο DNA), ένας εκκινητής, πολυμεράση, τα τέσσερα dNTPs και ένα διαφορετικό κάθε φορά ραδιοσημασμένο ddNTP. Καθώς τα dNTPs είναι σε περίσσεια στην αντίδραση, το διδεοξυνουκλεοτίδιο ενσωματώνεται τυχαία σε διάφορες θέσεις του μορίου DNA, με αποτέλεσμα να δημιουργείται ένα μίγμα τμημάτων DNA, το μέγεθος των οποίων εξαρτάται από τη θέση ενσωμάτωσης του ddNTP.

Ο εντοπισμός των τμημάτων γίνεται με χρήση σημασμένου dATP με 32P. Τα προϊόντα των τεσσάρων αντιδράσεων ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (Sequencing gel) μεγάλων διαστάσεων (τυπικά 4-20% πολυακρυλαμίδα, τουλάχιστον μήκους 40 cm και συνήθως πάχους 0,4 mm), έτσι ώστε να μπορούν να διαχωριστούν κομμάτια DNA που διαφέρουν κατά μία μόνο βάση. Στη συνέχεια λαμβάνεται αποτύπωμα του πηκτώματος σε φιλμ αυτοραδιογραφίας και μετά την εμφάνισή του καταγράφονται οι ζώνες των προϊόντων ανάλογα με το μέγεθός τους και το ddNTP που χρησιμοποιήθηκε ανά αντίδραση. Στο τέλος, διαβάζεται η αλληλουχία του μορίου DNA, αναγνωρίζοντας τις ζώνες από το κάτω προς το επάνω μέρος του φιλμ¹⁷⁰.

Είναι προφανές ότι η μέθοδος αλληλούχησης κατά Sanger σε αυτή τη μορφή της είναι ιδιαίτερα χρονοβόρα και επικίνδυνη, αφού χρησιμοποιεί ραδιενέργεια για τη σήμανση των τμημάτων DNA. Λόγω των πολλαπλών εφαρμογών της ανάλυσης της αλληλουχίας βάσεων του DNA και των εξαιρετικών προοπτικών που άνοιγε για τη βιολογία και την επιστήμη γενικότερα, η μέθοδος αλληλούχησης κατά Sanger γρήγορα τροποποιήθηκε, έτσι ώστε να είναι ασφαλής στη χρήση της και αυτοματοποιήσιμη.

Το 1998 κυκλοφόρησε το πρώτο εμπορικά διαθέσιμο αυτόματο σύστημα ανάλυσης αλληλουχίας βάσεων, το οποίο συμμετείχε και στην ολοκλήρωση της αλληλούχησης του ανθρώπινου γονιδιώματος το 2001. Οι δύο βασικές αλλαγές της μεθόδου ήταν η χρήση φθορίζουσών χρωστικών ως μέσων σήμανσης των διδεοξυνουκλεοτιδίων και η χρήση τριχοειδών σωλήνων για την πραγματοποίηση της ηλεκτροφόρησης. Η βασική αρχή της μεθόδου αλληλούχησης παραμένει η ίδια. Τα τέσσερα διδεοξυνουκλεοτίδια (το καθένα σημασμένο με μια διαφορετική φθορίζουσα χρωστική) προστίθενται όλα μαζί στην PCR και ενσωματώνονται τυχαία σε διαφορετικά σημεία της νεοσυντιθέμενης αλληλουχίας (Εικόνα 19).

Εικόνα 19

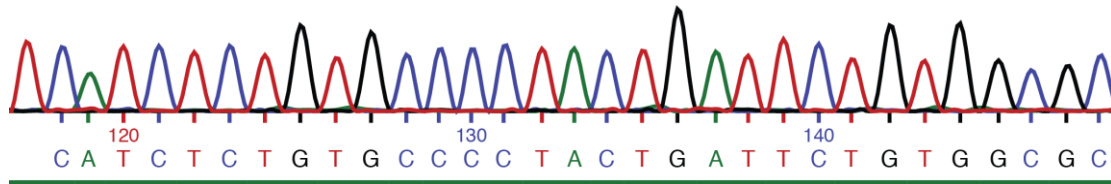


Αναπαράσταση της ενζυμικής μεθόδου αλληλούχησης κατά Sanger. (α) Σε κάθε αντίδραση αλληλούχησης κατά Sanger προστίθεται το μόριο DNA προς αλληλούχηση (που δρα ως εκμαγείο DNA), ένας εκκινητής, πολυμεράση, τα τέσσερα dNTPs και τα φθοριοσημασμένα διδεοξυνουκλεοτίδια. Καθώς τα dNTPs είναι σε περίσσεια στην αντίδραση, τα ddNTPs ενσωματώνονται τυχαία σε διάφορες θέσεις του μορίου DNA, με αποτέλεσμα να δημιουργείται ένα μίγμα τμημάτων DNA, το μέγεθος των οποίων εξαρτάται από τη θέση ενσωμάτωσης του ddNTP. (β) Τα προϊόντα που προκύπτουν υποβάλλονται σε τριχοειδική ηλεκτροφόρηση σε αυτόματους αναλυτές αλληλουχίας. Στο τέλος της ηλεκτροφόρησης το κάθε φθοροσημασμένο προϊόν DNA περνάει από το σύστημα ανίχνευσης, που αναγνωρίζει τη χρωστική (και κατά συνέπεια τη βάση) που φέρει κάθε προϊόν στο 3' άκρο του.

Με την ενσωμάτωσή τους εμποδίζουν την περαιτέρω επέκταση της αλυσίδας DNA. Έτσι, δημιουργούνται κομμάτια DNA που διαφέρουν κατά μία βάση και το καθένα «έχει διαφορετικό χρώμα», ανάλογα με τη χρωστική του ddNTP, που έχει ενσωματωθεί στην τελική βάση. Όλα τα προϊόντα κάθε δείγματος ηλεκτροφορούνται σε ένα τριχοειδές διαμέτρου μικρότερης των 0,5 mm και μήκους περίπου 48 cm, ενώ το υλικό που περιέχουν είναι παρόμοιο με το πολυακρυλαμίδιο που χρησιμοποιείται στα κοινά πηκτώματα, μαζί με ουρία. Οι σύγχρονοι αναλυτές έχουν από 8 έως και 96 τριχοειδή, για την ταυτόχρονη ανάλυση πολλών δειγμάτων. Τα επισημασμένα με φθορίζουσα χρωστική μόρια DNA αναγνωρίζονται αυτόματα σε πραγματικό χρόνο κατά την ηλεκτροφόρηση σε τριχοειδή, καθώς κάθε διαδοχικό τμήμα, το οποίο είναι κατά μία βάση μεγαλύτερο από το προηγούμενο, διέρχεται από το σύστημα ανίχνευσης της συσκευής αλληλούχησης. Το σύστημα ανίχνευσης λειτουργεί με λέιζερ, το οποίο διεγείρει τη χρωστική που είναι προσδεσμένη σε κάθε ddNTP στο άκρο κάθε τμήματος DNA. Η κάθε χρωστική εκπέμπει σε διαφορετικό μήκος κύματος. Ειδικό αισθητήριο καταγράφουν τα σήματα και με χρήση κατάλληλου αλγόριθμου αποδίδεται η βάση που βρίσκεται στο 3' άκρο του τμήματος DNA. Η αλληλουχία του DNA αναπαριστάται σε ένα

χρωματογράφημα, όπου απεικονίζεται η ένταση καθενός από τα φθορίζοντα σήματα ως συνάρτηση του χρόνου ηλεκτροφόρησης (Εικόνα 20). Κάθε βάση αναπαριστάται ως μια καμπύλη διαφορετικού χρώματος^{171,172}.

Εικόνα 20



Χρωματογράφημα αλληλούχησης κατά Sanger με ηλεκτροφόρηση σε τριχοειδή αυτόματου αναλυτή. Κάθε βάση αναπαριστάται με μια καμπύλη που προκύπτει ως συνάρτηση της έντασης του σήματος φθορισμού και του χρόνου ηλεκτροφόρησης. Καθένα από τα τέσσερα χρώματα (κόκκινο, πράσινο, μπλε και μαύρο) αντιστοιχεί σε διαφορετική βάση του DNA (αδενίνη, γουανίνη, θυμίνη και κυτοσίνη).

2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

2.1 Χαρακτηριστικά ασθενών που μελετήθηκαν

Όπως αναφέρθηκε και στο κεφάλαιο «ασθενείς και μέθοδοι», μελετήθηκαν αναδρομικά 126 ασθενείς με «de novo» οξεία μυελογενή λευχαιμία, από δύο Κλινικές. Υπήρξε ίση κατανομή μεταξύ των δύο φύλων (άρρηνες 63/126 και θήλυ 63/126). Το 52% των ασθενών ήταν ηλικίας <60 ετών (65/126) και το 48% ήταν ηλικίας ≥ 60 ετών (61/126). Ο υπότυπος M2 σύμφωνα με την ταξινόμηση FAB, ήταν ο πιο συχνός υποτύπος (40%) και εξαιρέθηκε ο υπότυπος M3 από τα αποτελέσματα. Φυσιολογικός καρυότυπος των βλαστών ανευρέθηκε στους 62/126 ασθενείς (53% των ασθενών), ενώ οι 54/126 ασθενείς (47%) είχαν κυτταρογενετικές ανωμαλίες. Οι ασθενείς ταξινομήθηκαν σε ομάδες κινδύνου σύμφωνα με τις κριτήρια ELN 2017, σε ευνοϊκής , ενδιάμεσης και κακής πρόγνωσης, σε ποσοστό 30% (37/126), 56% 71/126), και 14% (18/126) αντίστοιχα.

Όπως αναφέρθηκε, έγινε έλεγχος σε όλους τους ασθενείς προς ανίχνευση μεταλλάξεων στα γονίδια *NPM1*, *FLT3* καθώς και στα γονίδια *IDH1* και *IDH2*.

Οι μεταλλάξεις *NPM1* ανιχνεύθηκαν σε 39/126 (31% της ομάδας μελέτης), ενώ οι μεταλλάξεις *FLT3-ITD* ανιχνεύθηκαν σε 24/126 (19%). Μεταλλάξεις στα *IDH* γονίδια ανιχνεύθηκαν σε 17/126 (13.5%). Συγκεκριμένα, μεταλλάξεις στο γονίδιο *IDH1* ανιχνεύθηκαν σε 6/126 (4.8%), ενώ μεταλλάξεις στο γονίδιο *IDH2* ανιχνεύθηκαν σε 9/26 (7.1%). Συνύπαρξη των δύο μεταλλάξεων (dual mutations) ανιχνεύτηκε σε 2/126 ασθενείς (1.6%). Η μετάλλαξη R132H ήταν η πιο συχνή *IDH1* μετάλλαξη, ενώ η R140Q ήταν πιο συχνή *IDH2* μετάλλαξη. Τα ανωτέρω αναφερόμενα αποτελέσματα συνοψίζονται παρακάτω. (Πίνακας15)

Πίνακας 15

ΑΣΘΕΝΕΙΣ	NPM1	FLT3	IDH1/IDH2
1	neg	neg	wt/wt
2	neg	neg	wt/wt
3	neg	neg	wt/wt
4	pos	neg	R132H/wt
5	pos	neg	R132H/R172
6	neg	neg	wt/wt
7	pos	pos	wt/wt
8	neg	neg	wt/wt
9	neg	neg	wt/wt
10	neg	neg	wt/wt
11	neg	neg	wt/wt
12	pos	neg	wt/wt
13	pos	neg	wt/wt
14	neg	neg	wt/wt
15	neg	neg	wt/R172K
16	neg	neg	wt/wt
17	pos	neg	C>T(105)/wt
18	neg	neg	wt/wt
19	neg	pos	wt/R140Q
20	pos	neg	wt/wt
21	neg	pos	wt/wt
22	neg	pos	wt/wt
23	neg	neg	wt/wt
24	pos	pos	wt/wt
25	neg	neg	wt/wt
26	neg	neg	wt/wt
27	neg	pos	wt/wt
28	neg	neg	wt/wt

29	neg	neg	wt/R172K
30	neg	neg	wt/wt
31	pos	pos	wt/wt
32	pos	neg	wt/wt
33	pos	pos	wt/wt
34	neg	neg	wt/wt
35	neg	neg	wt/wt
36	neg	neg	wt/wt
37	neg	neg	wt/wt
38	neg	neg	wt/ R140F
39	neg	neg	wt/wt
40	pos	pos	wt/wt
41	pos	pos	wt/wt
42	neg	neg	wt/R140Q
43	pos	neg	C>T/ R140Q
44	neg	neg	wt/wt
45	neg	neg	wt/wt
46	neg	neg	wt/wt
47	pos	neg	wt/wt
48	neg	neg	wt/wt
49	pos	neg	wt/wt
50	neg	neg	wt/wt
51	pos	neg	wt/wt
52	neg	neg	wt/R140Q
53	neg	neg	wt/wt
54	pos	neg	wt/wt
55	pos	pos	wt/wt
56	neg	neg	wt/wt
57	neg	neg	wt/wt
58	neg	neg	wt/wt
59	neg	neg	wt/wt
60	pos	neg	wt/R140Q

61	neg	neg	wt/wt
62	neg	neg	wt/wt
63	pos	pos	wt/wt
64	neg	neg	wt/wt
65	neg	neg	wt/wt
66	neg	pos	wt/wt
67	pos	neg	wt/R140Q
68	neg	neg	wt/wt
69	neg	neg	wt/wt
70	neg	neg	wt/wt
71	pos	neg	wt/wt
72	pos	pos	wt/wt
73	neg	neg	wt/wt
74	neg	neg	wt/wt
75	neg	pos	wt/wt
76	pos	neg	wt/wt
77	neg	neg	wt/wt
78	neg	neg	wt/wt
79	neg	pos	wt/wt
80	neg	neg	wt/wt
81	neg	neg	wt/wt
82	pos	neg	wt/wt
83	neg	neg	wt/wt
84	pos	pos	wt/wt
85	neg	neg	wt/wt
86	neg	neg	wt/wt
87	neg	pos	wt/wt
88	neg	neg	wt/wt
89	neg	neg	wt/wt

90	neg	pos	wt/wt
91	neg	neg	wt/wt
92	neg	pos	wt/wt
93	neg	neg	wt/wt
94	neg	neg	wt/wt
95	pos	neg	R132H/wt
96	neg	neg	wt/wt
97	neg	neg	wt/wt
98	pos	neg	wt/wt
99	neg	neg	wt/wt
100	pos	pos	wt/wt
101	neg	neg	wt/wt
102	neg	neg	wt/wt
103	neg	neg	wt/wt
104	neg	neg	wt/
105	pos	pos	C>T(105)/wt
106	neg	neg	wt/wt
107	pos	pos	R132H/wt
108	neg	neg	wt/R140Q
109	pos	neg	wt/wt
110	pos	neg	R132/wt
111	pos	neg	wt/wt
112	neg	neg	wt/wt
113	pos	pos	wt/wt
114	pos	neg	wt/wt
115	neg	neg	wt/wt
116	neg	neg	wt/wt
117	neg	neg	wt/wt
118	neg	neg	wt/wt

119	pos	neg	wt/wt
120	neg	neg	wt/wt
121	neg	neg	wt/wt
122	neg	neg	wt/wt
123	neg	neg	wt/wt
124	neg	neg	wt/wt
125	pos	neg	wt/wt
126	neg	neg	wt/wt

Η παρουσία μεταλλάξεων *IDH* δεν συσχετίστηκε με το φύλο (άρρηνες έναντι θήλυ, $p = 0,118$) ή με την ηλικία (<60 έναντι ≥ 60 , $p = 0,508$). Επιπρόσθετα, οι μεταλλάξεις *IDH* δεν συσχετίστηκαν με κανένα υποτύπο FAB ($p = 0,526$) και δεν συσχετίστηκαν με τον καρυότυπο των βλαστών ($p = 0,168$), εντούτοις, συσχετίστηκαν με την παρουσία μετάλλαξης *NPM1*. Παρατηρήθηκαν *IDH* μεταλλάξεις σε 10/39 *NPM1* μεταλλαγμένους ασθενείς ($p = 0,017$), ενώ δεν υπήρξε συσχέτιση με την παρουσία μεταλλάξεων *FLT3-ITD*, μεταλλάξεις *IDH* ανευρέθηκαν σε 3/24 ασθενείς με *FLT3-ITD* μετάλλαξη ($p = 1,0$). Επιπλέον, δεν υπήρξε σημαντική συσχέτιση μεταξύ του *IDH* status και των αναφερόμενων ομάδων κινδύνου. Στον ακόλουθο πίνακα συνοψίζονται τα ανωτέρω αποτελέσματα. (Πίνακας 16)

Πίνακας 16

Πίνακας 5. Χαρακτηριστικά ασθενών (Σύνολο N=126)	
Φύλο Άρρεν Θήλυ	63(50%) 63(50%)
Age <60 έτη >60έτη	65(51.6%) 61(48.4%)
FABΤαξινόμηση N= 114 (απουσιάζουν: 12)	M0: 10(8.8%), M1:17(14.9%), M2: 50 (43.9%), M4:24(21.1%), M5: 7(6.1%), M6:5(4.4%), M7:1(0.9%)
Karyotype (N=116) (απουσιάζουν:10)	Normal: 63(53.4%) Abnormal: 54(46.6%)
NPM1 status (N=126)	WT: 87(69%) MT:39(31%)
FLT3 status (N=126)	WT:102(81%) MT:24(19%)
Ταξινόμηση σε ομάδες κινδύνου σύμφωνα με τα ELN2017 κριτήρια (σε 10 ασθενείς χωρίς μελέτη καρυότυπου, θεωρήθηκε φυσιολογικός ο καρυότυπος) (N=126)	Ευνοϊκής: 37(29.4%) Ενδιάμεσης: 71(56.3%) Κακής: 18(14.3%)

FAB: French American British, NPM1: nucleophosmine 1, WT: wild type, MT: mutated type, FLT3: fms-like tyrosine kinase 3, ELN: European Leukemia Net

Οι μεταλλάξεις της *IDH* δεν φάνηκε να επηρεάζουν την πορεία των ασθενών που έλαβαν εντατική χημειοθεραπεία και κατέληξαν κατά τη θεραπεία εφόδου ($p = 1,0$), ούτε την ανθεκτικότητα της νόσου στη χημειοθεραπεία ($p = 1,0$).

Επιλέξαμε να πραγματοποιήσουμε ανάλυση επιβίωσης στην υποομάδα των ασθενών που έλαβε κλασική χημειοθεραπεία, οι οποίοι δεν πέθαναν κατά τη θεραπεία εφόδου και δεν είχαν επιλεγεί εκ των προτέρων για αλλογενή μεταμόσχευση και που η νόσος τους δεν είχε χαρακτηριστεί ως πρωτοπαθώς ανθεκτική, προκειμένου να αξιολογηθεί κατά πόσον οι μεταλλάξεις στα γονίδια *IDH* είναι δυνατό να επηρεάσουν την προσέγγιση θεραπείας σε αυτή την υποομάδα ασθενών. Ο σχεδιασμός της θεραπείας στη συγκεκριμένη ομάδα ασθενών, εξακολουθεί να εγείρει έντονο προβληματισμό. Διαπιστώσαμε ότι το *IDH* status δεν σχετίζεται σημαντικά με το RFS ή το OS σε αυτή την υποομάδα των ασθενών.

(Καμπύλη 1, $p = 0.753$ και Καμπύλη 2, $p = 0.852$, αντίστοιχα).

Όταν διεξήχθη πολυπαραγοντική ανάλυση, διαπιστώσαμε ότι η μετάλλαξη *FLT3-ITD* και η ηλικία (≥ 60 ετών), αποτελούσαν ανεξάρτητους προγνωστικούς παράγοντες για το RFS και το OS σε αυτή την ομάδα ασθενών. Συνεπώς, ερευνήσαμε κατά πόσον το *IDH* status συσχετίζεται με το RFS ή το OS σε ασθενείς χωρίς μετάλλαξη στο γονίδιο *FLT3* και ηλικίας < 60 ετών. Διαπιστώθηκε ότι οι ασθενείς με μεταλλάξεις στα γονίδια *IDH* έχουν οριακά κατώτερο RFS, σε σύγκριση με τους ασθενείς χωρίς μεταλλάξεις στα γονίδια *IDH* (Καμπύλη 3, $p = 0,092$), ενώ δεν υπήρχε σημαντική διαφορά ως προς το OS (Καμπύλη 4, $p = 0,491$).

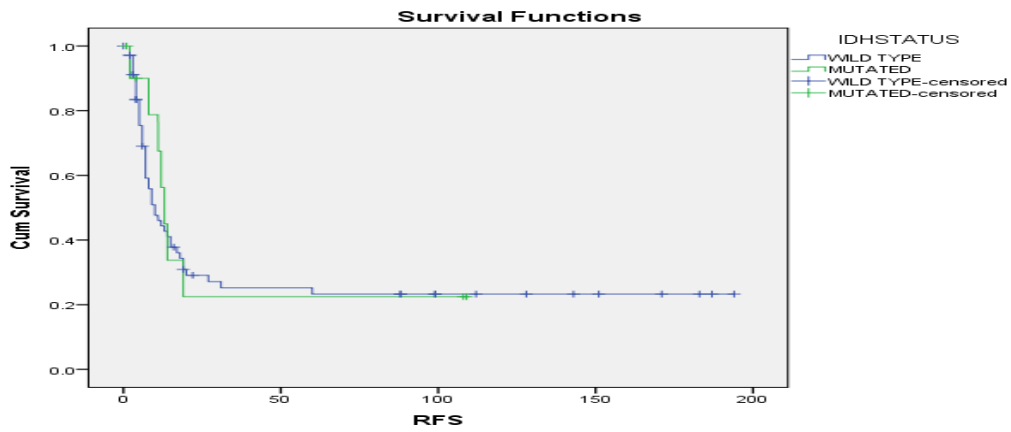
Αναλύσαμε περαιτέρω την επίδραση των μεμονωμένων μεταλλάξεων *IDH* στο RFS και OS στην προαναφερθείσα υπό μελέτη ομάδα. Όταν συγκρίναμε τους ασθενείς με μετάλλαξη στο γονίδιο *IDH1* με τους ασθενείς με μετάλλαξη στο γονίδιο *IDH2* ή μη μεταλλαγμένους *IDH* ασθενείς, φάνηκε οι πρώτοι να έχουν κατώτερο RFS (Καμπύλη 5, $p = 0,203$) καθώς και OS (Καμπύλη 6, $p = 0,219$). Αναλύσαμε μόνο την υποομάδα των ασθενών με μεταλλάξεις *IDH1* και φάνηκε να έχουν δυσμενέστερη πρόγνωση όσον αφορά το RFS (Καμπύλη 7, $p = 0,1$) και το OS (Καμπύλη 8, $p = 0,255$) συγκριτικά με τους μη μεταλλαγμένους ασθενείς, αν και τα αποτελέσματα δεν ήταν στατιστικώς σημαντικά.

Όταν αναλύσαμε μόνο την υποομάδα των ασθενών με μεταλλάξεις *IDH2*, παρατηρήσαμε να έχουν ευνοϊκότερη πρόγνωση όσον αφορά το RFS (Καμπύλη 9, $p = 0,542$) και το OS (Καμπύλη 10, $p = 0,626$) συγκριτικά με τους μη μεταλλαγμένους ασθενείς, αν και δεν ήταν στατιστικά σημαντική η διαφορά.

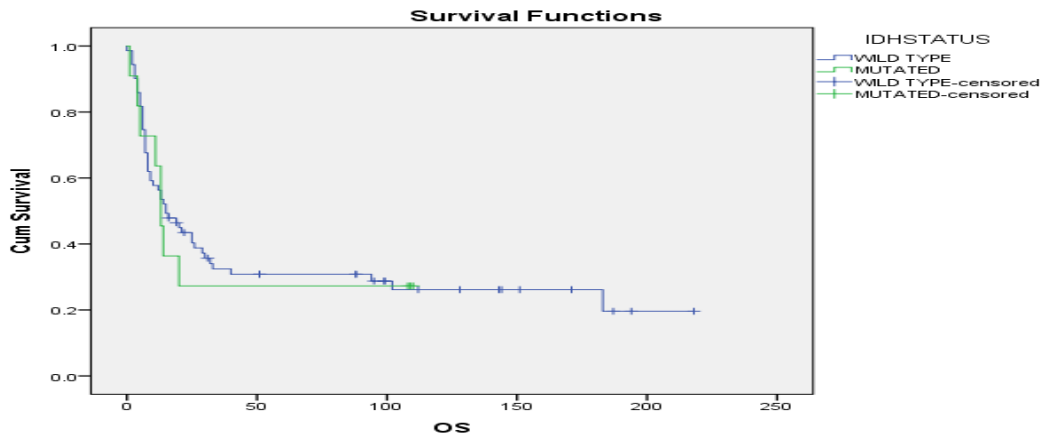
Όταν συγκρίναμε τους ασθενείς με μεταλλάξεις στο γονίδιο *IDH1* με τους ασθενείς με μεταλλάξεις στο γονίδιο *IDH2*, παρατηρήσαμε στατιστικά σημαντική ευνοϊκότερη έκβαση στο RFS (Καμπύλη 11, $p = 0,005$) και όχι στατιστικά σημαντική ευνοϊκή έκβαση στο OS (Καμπύλη 12, $p = 0,456$) των ασθενών με μεταλλάξεις στο γονίδιο *IDH2*.

Τέλος συγκρίναμε ξεχωριστά τους ασθενείς με μεταλλάξεις στο γονίδιο *IDH2* έναντι του wild type και παρατηρήσαμε ότι οι ασθενείς με μεταλλάξεις *IDH2* *R172* και *IDH2* *R140Q* παρουσίασαν την πιο ευνοϊκή πρόγνωση (Καμπύλη 13, $p = 0,188$).

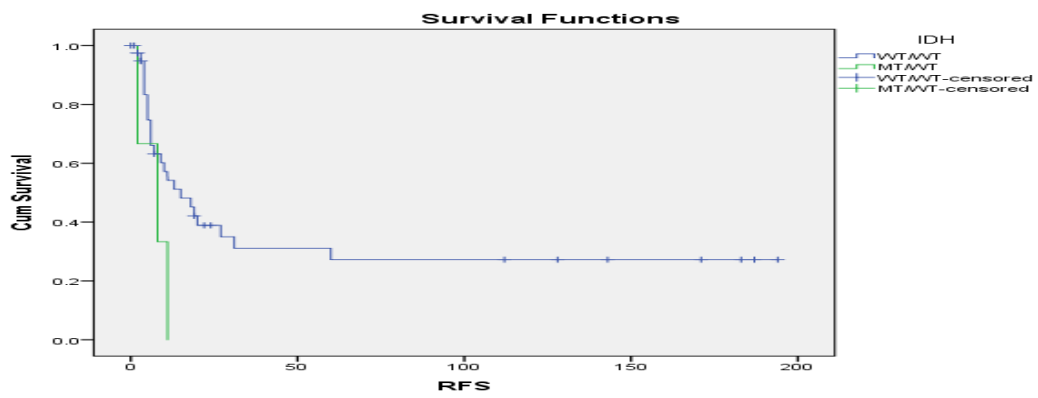
Καμπύλη 1



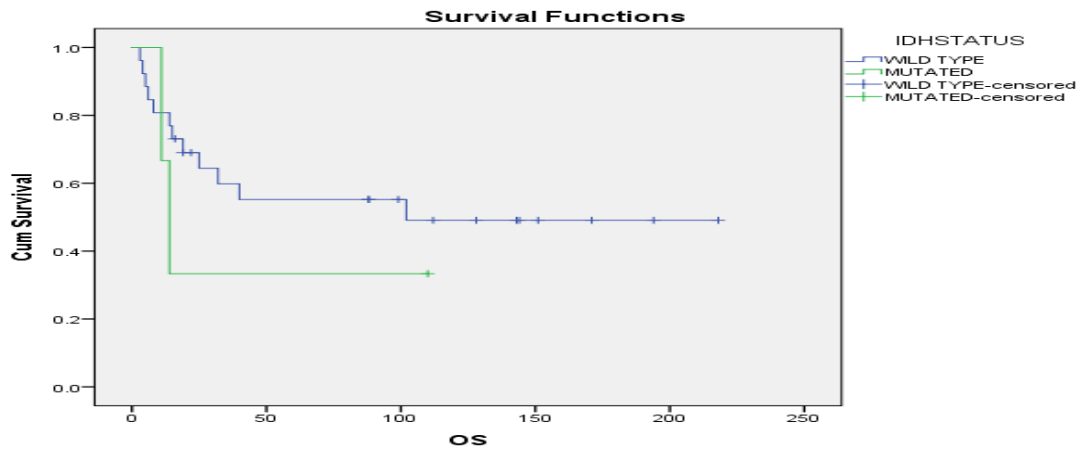
Καμπύλη 2



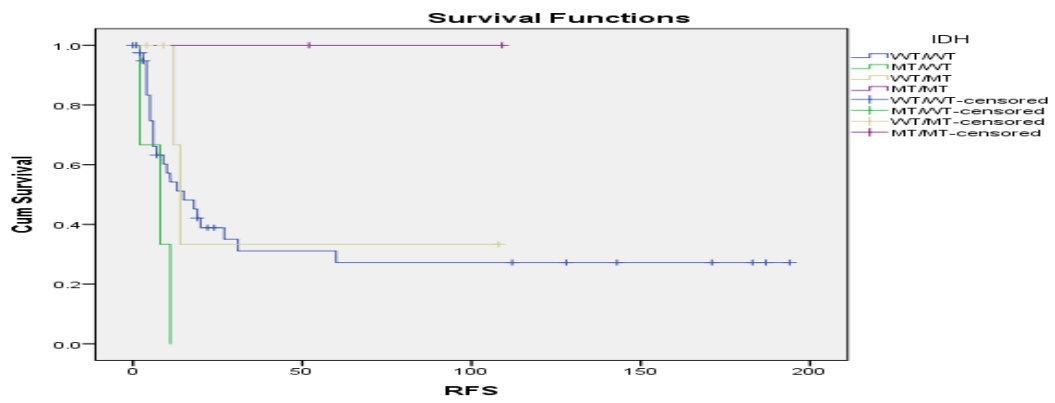
Καμπύλη 3



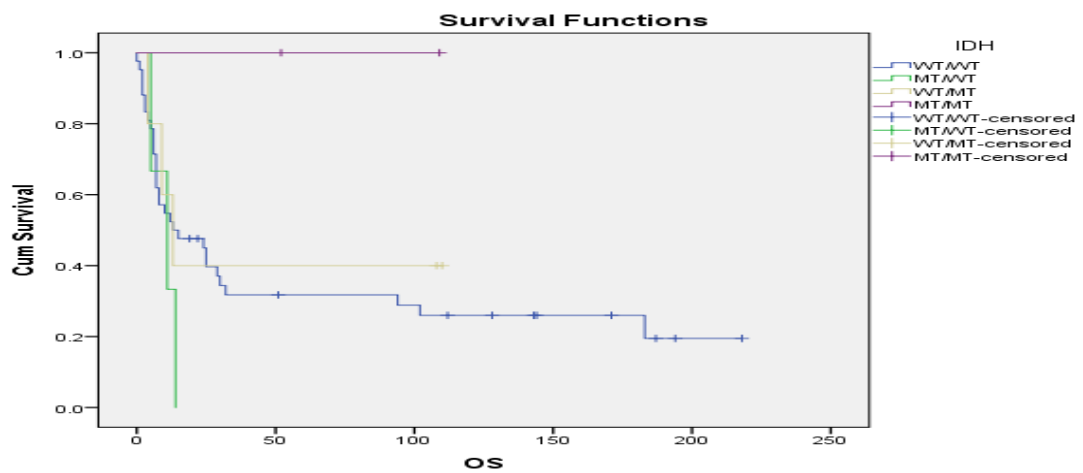
Καμπύλη 4



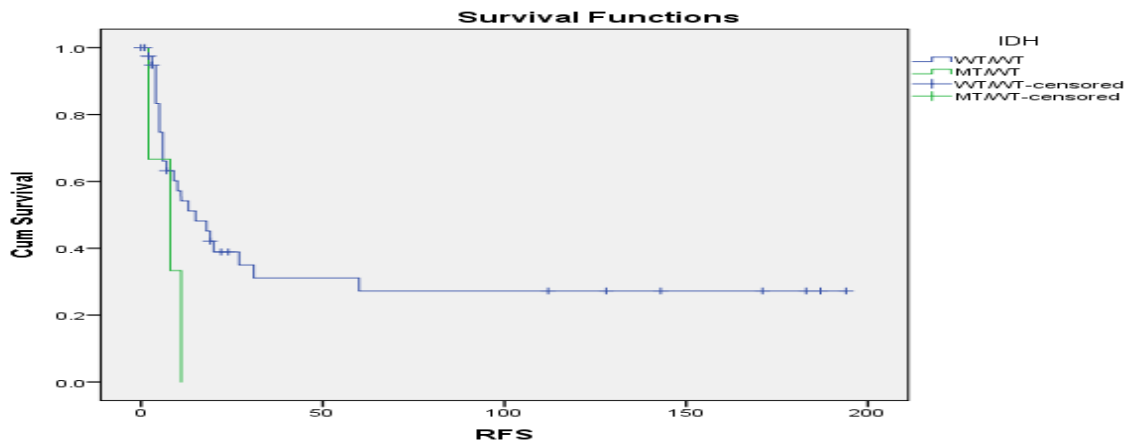
Καμπύλη 5



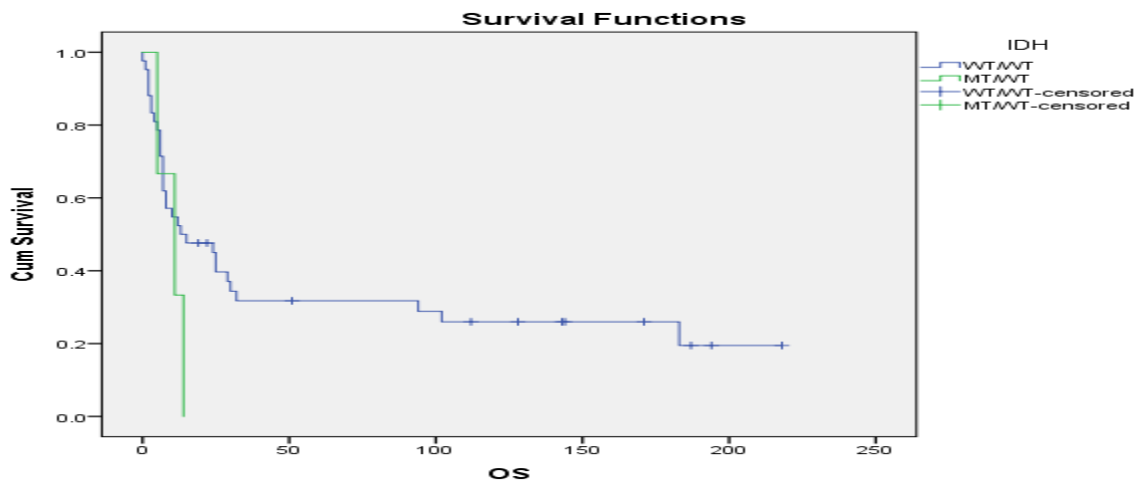
Καμπύλη 6



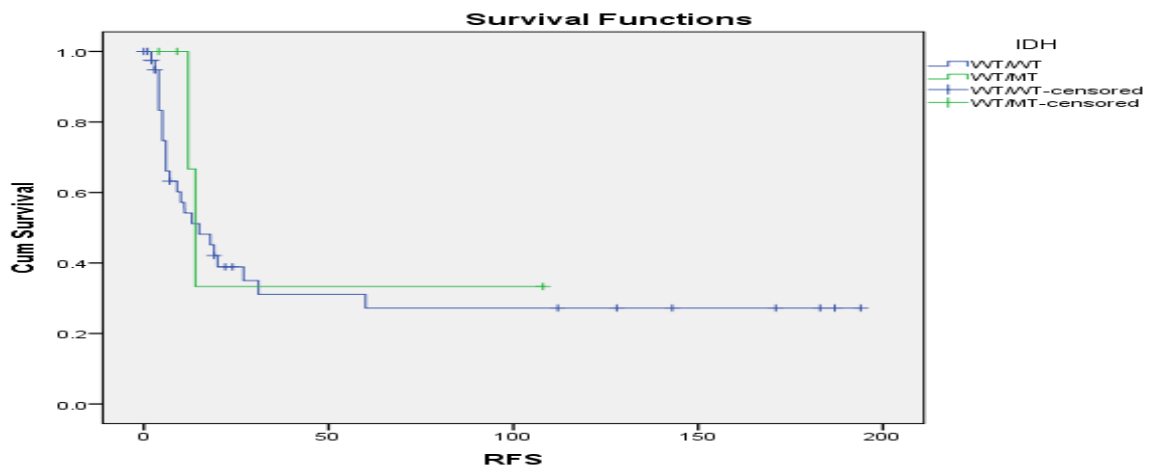
Καμπύλη 7



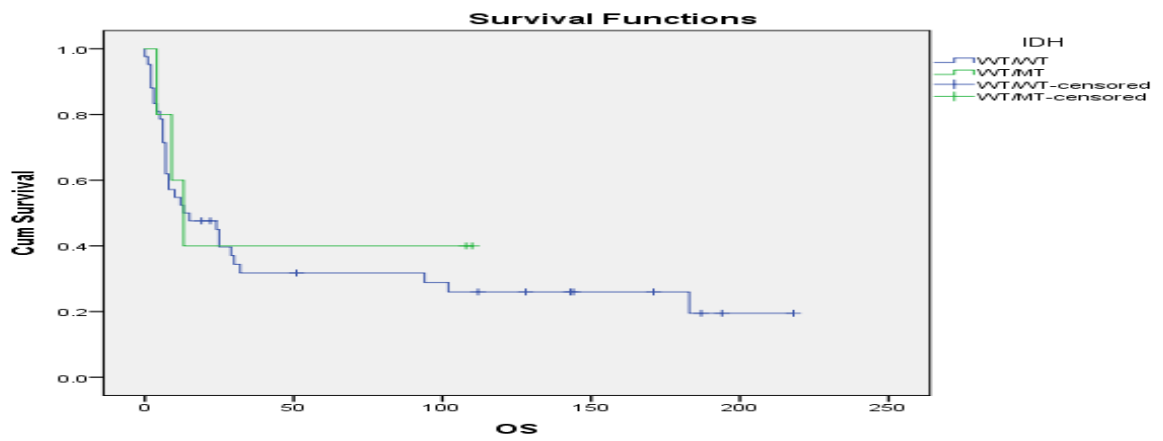
Καμπύλη 8



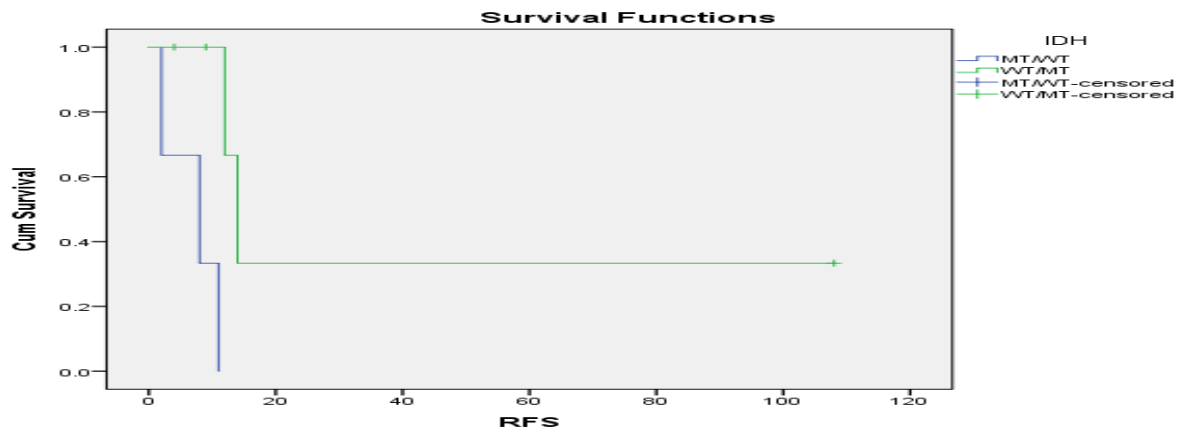
Καμπύλη 9



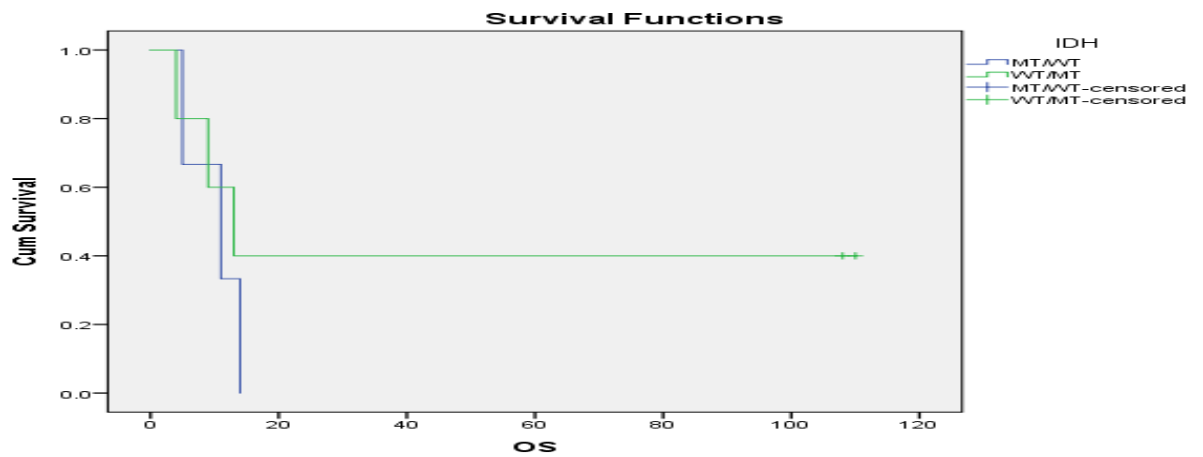
Καμπύλη 10



Καμπύλη 11

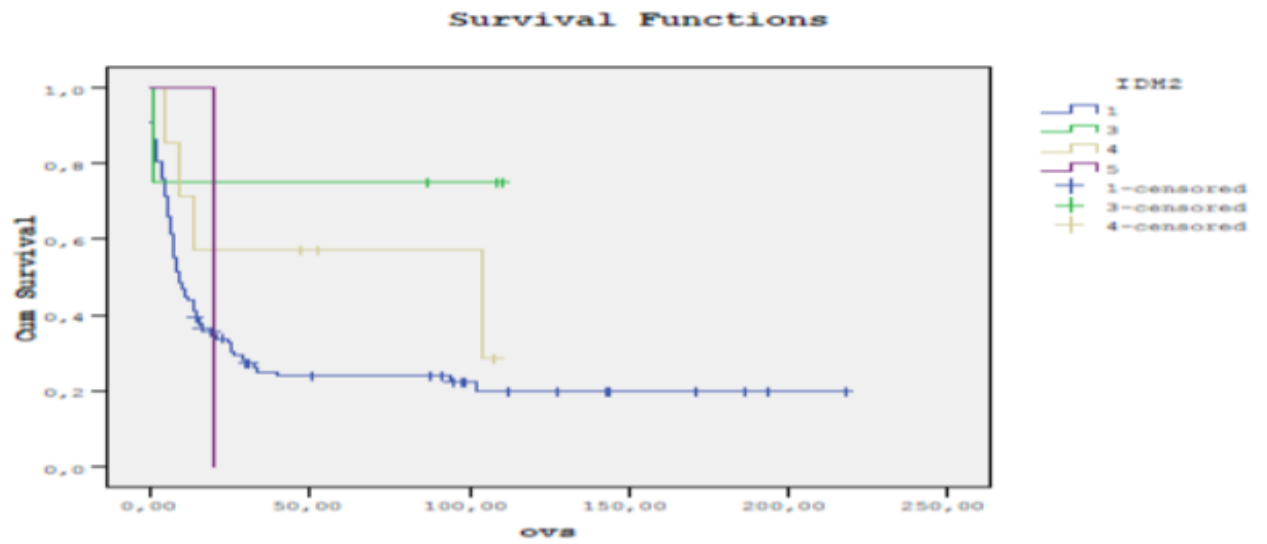


Καμπύλη 12



Καμπύλη 13

1: wt, 3: R172, 4: R140Q, 5: R140F



3. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η οξεία μυελογενής λευχαιμία δεν είναι ένα νόσημα, αλλά μια ετερογενής ομάδα νεοπλασματικών διαταραχών που χαρακτηρίζεται από τον πολλαπλασιασμό και τη συσσώρευση άωρων αιμοποιητικών κυττάρων στο μυελό των οστών και στο αίμα.

Η πρώτη απόδειξη προέλευσης της κακοήθειας από αρχέγονο κύτταρο, προήλθε από μελέτες σε ασθενείς με οξεία μυελογενή λευχαιμία από τον Blair και τους συνεργάτες το 1977 και στη συνέχεια από τους Bonnet και Dick. Οι μελέτες αυτές κατέδειξαν ότι κατά κανόνα τα λευχαιμικά κύτταρα δεν ήταν ικανά να πολλαπλασιαστούν εκτενώς και ότι ένα υποσύνολο των κυττάρων αποτελούσαν τον παθολογικό κλώνο.

Η οξεία μυελογενής λευχαιμία χαρακτηρίζεται από μεγάλο αριθμό επαναλαμβανόμενων κυτταρογενετικών και μοριακών βλαβών, καθώς και επιγενετικών τροποποιήσεων, που αντικατοπτρίζουν τον παθοφυσιολογικό ρόλο των επίκτητων σωματικών μεταλλάξεων. Κυτταρογενετικές βλάβες ανευρίσκονται σε ποσοστό 50-60% των ασθενών κατά τη διάγνωση και έχουν προγνωστική αξία και θεμελιώδη ρόλο ως προς τις θεραπευτικές αποφάσεις.

Οι ασθενείς μπορούν να διαχωριστούν με βάση τον καρυότυπο των βλαστών σε ευνοϊκής, ενδιάμεσης και κακής πρόγνωσης. Ευνοϊκής πρόγνωσης θεωρούνται οι ασθενείς με $t(15; 17)$, $t(8; 21)$ ή $inv(16)t(16; 16)$, ενώ δυσμενούς πρόγνωσης θεωρούνται οι ασθενείς με τις παρακάτω βλάβες: $inv(3q)/t(3;3)$, $t(6;9)$, μονοσωμία 7, μονοσωμία 5, απώλεια 5q, 7q, ή 17p, και σύνθετο καρυότυπο (περισσότερες από 3 χρωμοσωμικές ανωμαλίες), καθώς και τις περισσότερες αντιμεταθέσεις που περιλαμβάνει το γονίδιο *MLL* στο χρωμόσωμα 11q23.

Με την εφαρμογή νεότερων τεχνικών για την ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων στους ασθενείς με οξεία μυελογενή λευχαιμία, ανευρέθηκαν νέα γονίδια που εμπλέκονται στη λευχαιμογένεση.

Διαπιστώθηκε ότι σε ασθενείς με οξεία μυελογενή λευχαιμία, ανευρίσκονται στελεχιαία αιμοποιητικά κύτταρα που δεν φέρουν καμία γνωστή μετάλλαξη

καθώς και στελεχιαία αιμοποιητικά κύτταρα με διάφορους συνδυασμούς γενετικών ανωμαλιών, όμοιες με αυτές που ανευρίσκονται σε ασθενείς με μεγάλο ποσοστό διήθησης από λευχαιμικά κύτταρα. Τα τελευταία αποτελούν τα «προ-λευχαιμικά κύτταρα» που οδηγούν σε οξεία μυελογενή λευχαιμία και είναι δυνατό να ανευρεθούν και μεταγενέστερα σε δείγματα ασθενών που βρίσκονται σε ύφεση, γεγονός που αποδεικνύει ότι είναι ικανά να επιβιώσουν μετά τη θεραπεία εφόδου.

Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι μεταλλάξεις που ανευρίσκονται στα «προ-λευχαιμικά κύτταρα» είναι πλούσιες σε γονίδια που ρυθμίζουν τη μεθυλίωση του DNA και σε γονίδια που συμμετέχουν στην τροποποίηση της χρωματίνης, ενώ η σηματοδότηση ενεργοποίησης γενετικών αλλαγών λαμβάνει χώρα σε μεταγενέστερο στάδιο και όχι στο «προ-λευχαιμικό κύτταρο».

Οι μελέτες του DNA ασθενών με οξεία μυελογενή λευχαιμία με NGS, κατέδειξαν την κλωνική εξέλιξη στη de novo οξεία μυελογενή λευχαιμία καθώς και στην υποτροπή.

Έχουν αναγνωριστεί διάφορες μεταλλάξεις που έχουν ως αποτέλεσμα να μεταβάλλουν το σήμα μεταγωγής και να ενισχύσουν τον πολλαπλασιασμό των λευχαιμικών κυττάρων και την επιβίωσή τους. Αυτές περιλαμβάνουν μεταλλάξεις στα γονίδια *FLT3*, *RAS* και *KIT*. Οι μεταλλάξεις *FLT3* μπορεί να βρεθούν στο 30% έως 35% των ενηλίκων ασθενών με οξεία μυελογενή λευχαιμία. Περίπου το 20% έως 30% θα είναι εσωτερικοί σε σειρά διπλασιασμοί (*FLT3-ITD*). Ένα ποσοστό των ασθενών έχουν σημειακές μεταλλάξεις στην αποκαλούμενη καταλυτική περιοχή του *FLT3* (*FLT3-TKD*). Μεταλλάξεις Asp835 έχουν βρεθεί σε ποσοστό 7% των ασθενών με οξεία μυελογενή λευχαιμία. Οι ασθενείς με μετάλλαξη *FLT3-ITD* έχουν συχνά περισσότερες πιθανότητες υποτροπής και, ως εκ τούτου, χειρότερο ποσοστό επιβίωσης. Η επίδραση της μετάλλαξης *FLT3* μπορεί να επηρεαστεί ή να διαμορφωθεί από το φορτίο αλληλίου ή από έτερες μεταλλάξεις.

Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *KIT* εμφανίζονται σε λιγότερο από το 10% των ασθενών και σε ασθενείς με οξεία μυελογενή λευχαιμία και όταν συνυπάρχει με μετάλλαξη *RUNX1-RUNX1T1*, παρατηρούνται αυξημένα ποσοστά

υποτροπής. Οι μεταλλάξεις D816 και D820 στο εξόνιο 17, προσδίδουν δυσμενή πρόγνωση, ενώ η μετάλλαξη N822 στο εξόνιο 17 και μετάλλαξη στο εξόνιο 8, έχουν παρόμοια πρόγνωση με τους ασθενείς που δεν φέρουν μετάλλαξη.

Μεταλλάξεις στα πρωτο-ογκογονίδια *RAS*, συνηθέστερα *NRAS* και το *KRAS*, είναι επίσης επαναλαμβανόμενα γεγονότα στην οξεία μυελογενή λευχαιμία, τα οποία ανευρίσκονται σε ποσοστό 10% και 5% αντίστοιχα. Η έκφραση των γονιδίων *KRAS* και *NRAS* ανευρίσκεται αυξημένη σημαντικά στους ασθενείς με οξεία μυελογενή λευχαιμία και φυσιολογικό καρυότυπο. Η πλήρης ύφεση και η συνολική επιβίωση των ασθενών με οξεία μυελογενή λευχαιμία επηρεάζονται αρνητικά από την υπερέκφραση του *KRAS*, αλλά όχι από την υπερέκφραση *NRAS*. Η υπερέκφραση του γονιδίου *KRAS*, ανεξάρτητα από τις μεταλλάξεις στο γονίδιο *RAS*, προσδίδει δυσμενή πρόγνωση στους ασθενείς με φυσιολογικό καρυότυπο.

Οι μεταγραφικοί παράγοντες διαδραματίζουν ουσιαστικό ρόλο στη διαφοροποίηση όλων των κυττάρων συμπεριλαμβανομένων και των αιμοποιητικών. Στο μυελό των οστών, παράγοντες μεταγραφής, όπως *RUNX1*, *CEBPα* και *PU.1* ελέγχουν βασικά γονίδια ώστε να διατηρείται η φυσιολογική λειτουργία του αιμοποιητικού συστήματος. Οι μεταλλάξεις στο *RUNX1* εμφανίζονται σε ποσοστό 5-15% των ασθενών με οξεία μυελογενή λευχαιμία και συχνά συνυπάρχουν με καρυοτυπικές ανωμαλίες όπως τρισωμία 8 ή 13 και προσδίδουν κακή πρόγνωση. Το γονίδιο *CEBPA* μεταλλάσσεται σε ποσοστό 10% των περιπτώσεων και συνήθως οι μεταλλάξεις ανευρίσκονται σε ασθενείς με φυσιολογικό καρυότυπο βλαστών και η ευνοϊκή τους πρόγνωση περιορίζεται στις περιπτώσεις που οι μεταλλάξεις αφορούν και στα δύο αλληλία.

Μεταλλάξεις σε ογκοκατασταλτικά γονίδια ευοδώνουν την ανάπτυξη της οξείας μυελογενούς λευχαιμίας. Μεταλλάξεις στο *TP53* ανευρίσκονται σε λιγότερο από 10% των περιπτώσεων, ωστόσο παρατηρούνται συχνότερα στους ασθενείς με σύνθετο καρυότυπο και προσδίδουν κακή πρόγνωση. Επαναλαμβανόμενες σωματικές μεταλλάξεις στο γονίδιο *WT1*, φαίνεται να

εμφανίζονται περίπου σε ποσοστό 6-15% των ασθενών με de novo οξεία μυελογενή λευχαιμία.

Γονίδια που κωδικοποιούν παράγοντες που είτε άμεσα ή έμμεσα εμπλέκονται στη μεθυλίωση ή την απομεθυλίωση του DNA, συμπεριλαμβανομένων των *TET2*, *DNMT3A* και *IDH1* ή *IDH2*, παρουσιάζουν επαναλαμβανόμενες μεταλλάξεις.

Μεταλλάξεις στο *DNMT3* ανευρίσκονται σε ποσοτό 20% περίπου των ασθενών με de novo οξεία μυελογενή λευχαιμία και συνήθως συνυπάρχουν με φυσιολογικό καρυότυπο των βλαστών. Η μετάλλαξη *DNMT3A R882* έχει κακή επίδραση στο OS των ασθενών με οξεία μυελογενή λευχαιμία με φυσιολογικό καρυότυπο.

Μεταλλάξεις στο *TET2*, ανευρίσκονται σε ποσοστό 10-30% στους ασθενείς με οξεία μυελογενή λευχαιμία και συχνότερα στους ασθενείς στους οποίους προϋπάρχει μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο ή μυελοϋπερπλαστικό νεόπλασμα. Οι Wang et al., δημοσίευσαν πρόσφατα πως οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *TET2* προσδίδουν δυσμενή πρόγνωση στους ασθενείς με οξεία μυελογενή λευχαιμία, ακόμα και στους ασθενείς χωρίς κυτταρογενετικές ανωμαλίες.

Οι σωματικές μεταλλάξεις στα *IDH1* και *IDH2* γονίδια παρατηρούνται σε έως και 20% των ασθενών με οξεία μυελογενή λευχαιμία και εμφανίζονται ως πρόωρα συμβάντα.

Στις αιματολογικές κακοήθειες, οι μεταλλάξεις *IDH1* συχνότερα περιλαμβάνουν αντικατάσταση της αργινίνης στη θέση R132 από κυστεΐνη (cysteine, R132C) ή από ιστοιδίνη (histidine, R132H).

Στις *IDH2* μεταλλάξεις η αργινίνη αντικαθίσταται συνηθέστερα από γλουταμίνη στο υπόλειμμα 140 (Residue, R140Q) και από λυσίνη στο υπόλειμμα 172 (R172K). Οι μεταλλάξεις *IDH2-R140* παρουσιάζονται συχνότερα από τις μεταλλάξεις *IDH2-R172* και αντιπροσωπεύουν το 80% των μεταλλάξεων *IDH2* στην οξεία μυελογενή λευχαιμία.

Μεταλλάξεις στα γονίδια *IDH1* και *IDH2*, παρατηρούνται συνήθως σε ασθενείς με καρυοτυπικές βλάβες που τους κατατάσσουν στην κατηγορία του

ενδιαμέσου κινδύνου, συμπεριλαμβανομένης της τρισωμίας 8 και του φυσιολογικού καρυότυπου .

Μεταλλάξεις στο γονίδιο *NPM1* εμφανίζονται περίπου στο 1/3 των ασθενών με οξεία μυελογενή λευχαιμία και συνηθέστερα στους ασθενείς με φυσιολογικό καρυότυπο βλαστών και προσδίδουν καλή πρόγνωση.

Η αναγνώριση ότι ορισμένες μεταλλάξεις μπορεί να χαθούν ή να αποκτηθούν σε υποτροπή (π.χ *FLT3-ITD*), ενώ άλλες ανευρίσκονται στη διάγνωση και παραμένουν σταθερές (π.χ. αναδιατάξεις *NPM1,CBF*), υποδηλώνουν ότι ξεχωριστοί κλωνικοί πληθυσμοί μπορούν να συνυπάρχουν σε ένα δείγμα ασθενούς με οξεία μυελογενή λευχαιμία.

Οι μεταλλάξεις στα γονίδια *DNMT3A*, *ASXL1*, *IDH1*, *IDH2* και *TET2*, που κωδικοποιούν επιγενετικούς τροποποιητές, αποκτώνται συνήθως νωρίτερα. Αυτά τα γονίδια συχνά μεταλλάσσονται σε ηλικιωμένα άτομα και προσδίδουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης αιματολογικών καρκίνων.

Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *NPM1* συχνά εμφανίζονται μετά τις μεταλλάξεις *DNMT3A*, *IDH1* ή *NRAS*. Αυτά τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι η ανάπτυξη της οξείας μυελογενούς λευχαιμίας ακολουθεί συγκεκριμένες εξελικτικές τροχιές.

Ο σκοπός της μελέτης είναι η αναζήτηση των μεταλλάξεων των γονιδίων *FLT3* και *NPM1* (και συγκεκριμένα η μετάλλαξη *FLT3-ITD* και μεταλλάξεις του εξονίου 12 του *NPM1* αντίστοιχα), στους νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς με οξεία μυελογενή λευχαιμία, καθώς και μεταλλάξεις στο γονίδιο *IDH1* (και συγκεκριμένα οι μεταλλάξεις R132C, R132G, R132H, R132L, R132P, R132S) και μεταλλάξεις στο γονίδιο *IDH2*, προκειμένου να μελετηθεί η συσχέτισή τους με τους ισχύοντες προγνωστικούς παράγοντες, στα ποσοστά ύφεσης, υποτροπής και ολικής επιβίωσης.

Η μελέτη των γονιδιακών μεταλλάξεων αποσκοπεί στον καλύτερο διαχωρισμό των ασθενών με οξεία μυελογενή λευχαιμία σε προγνωστικές υποκατηγορίες. Επιπλέον, η ανεύρεση στοχευμένων μοριακών θεραπειών σηματοδοτεί την αφετηρία της “χρυσής εποχής” για τη θεραπεία της οξείας μυελογενούς λευχαιμίας.

Σε αυτή την αναδρομική μελέτη των 126 νεοδιαγνωσθέντων ασθενών με οξεία μυελογενή λευχαιμία αξιολογήθηκε η συχνότητα των μεταλλάξεων *IDH*, η

συσχέτισή τους με τα χαρακτηριστικά άλλων ασθενών καθώς και τα καρυοτυπικά και μοριακά δεδομένα και επιπλέον η επίδρασή τους στο RFS και OS. Υπήρξε ίση κατανομή μεταξύ των δύο φύλων. Το 52% των ασθενών ήταν ηλικίας <60 ετών και το 48% ήταν ηλικίας ≥60 ετών. Ο υπότυπος M2 σύμφωνα με την ταξινόμηση FAB ήταν ο πιο συχνός υποτύπος (40%). Φυσιολογικός καρυότυπος των βλαστών βρέθηκε στο 53% των ασθενών, ενώ το 47% είχε κυτταρογενετικές ανωμαλίες. Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν σε ομάδες κινδύνου σύμφωνα με τα κριτήρια ELN 2017. Το 30%, 56%, 14% των ασθενών κατατάχθηκαν στην ευνοϊκή, ενδιάμεση και δυσμενή ομάδα κινδύνου αντίστοιχα. Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *NPM1* ανιχνεύθηκαν στο 31% του συνόλου των ασθενών που μελετήθηκαν, ενώ οι μεταλλάξεις *FLT3-ITD* ανιχνεύθηκαν στο 19%.

Μεταλλάξεις στα γονίδια *IDH1* και *IDH2* παρατηρήθηκαν σε ποσοστό 13,5% των ασθενών. Μεταλλάξεις στο γονίδιο *IDH1* ανιχνεύθηκαν σε ποσοστό 4,8%, στο γονίδιο *IDH2* σε ποσοστό 7,1% και συνύπαρξη μεταλλάξεων και στα δύο γονίδια σε ποσοστό 1,6% των ασθενών. Η μετάλλαξη R132H ήταν η συχνότερη *IDH1* μετάλλαξη, ενώ η μετάλλαξη R140Q ήταν η πιο συχνή *IDH2* μετάλλαξη.

Στους ασθενείς μας, οι μεταλλάξεις *IDH* δεν συσχετίστηκαν ούτε με το φύλο ούτε με την ηλικία. Επιπλέον, οι μεταλλάξεις *IDH* δεν συσχετίστηκαν με κανένα υπότυπο FAB και δεν συσχετίστηκαν με τον καρυότυπο. Επιπλέον, δεν υπήρξε σημαντική συσχέτιση μεταξύ του *IDH* status και των ομάδων κινδύνου. Οι μεταλλάξεις *IDH* δεν συσχετίστηκαν με το *FLT3* status των ασθενών μας, ωστόσο ανευρέθηκε συσχέτιση με την ύπαρξη μετάλλαξης στο γονίδιο *NPM1*.

Επιπροσθέτως, οι μεταλλάξεις της *IDH* δεν φάνηκε να επηρεάζουν την πορεία των ασθενών που έλαβαν εντατική χημειοθεραπεία και κατέληξαν κατά τη θεραπεία εφόδου, ούτε την ανθεκτικότητα της νόσου στη , στους ασθενείς που έλαβαν κλασική χημειοθεραπεία για την οξεία μυελογενή λευχαιμία και που δεν κατέληξαν κατά τη θεραπεία εφόδου.

Παλαιότερες μελέτες, όπως των Pascha et al, είχαν δείξει ότι οι *IDH* μεταλλάξεις προσδίδουν κακή πρόγνωση σε ασθενείς με οξεία μυελογενή λευχαιμία και φυσιολογικό καρυότυπο, με μετάλλαξη στο γονίδιο *NPM1* και χωρίς μετάλλαξη *FLT3-ITD*. Αναλύοντας τα δεδομένα 805 ασθενών με οξεία

μυελογενή λευχαιμία που εντάχθηκαν στις μελέτες AML HD98A and APL HD95 του German-Austrian AML Study Group (AMLSG), είχε διεξαχθεί το συμπέρασμα ότι οι *IDH* μεταλλάξεις επηρέαζαν δυσμενώς το RFS και το OS στην προαναφερθείσα ομάδα ασθενών.¹⁷³

Οι Boissel N. et. al.¹⁷⁴ αναλύοντας τα δεδομένα 520 ασθενών με οξεία μυελογενή λευχαιμία οι οποίοι συμμετείχαν στις μελέτες 9801 and 9802 του French Acute Leukemia French Association (ALFA) και ελάμβαναν κοινό θεραπευτικό πρωτόκολλο, έδειξαν ότι στους ασθενείς ευνοϊκής πρόγνωσης με φυσιολογικό καρυότυπο και μετάλλαξη στο γονίδιο *NPM1* ή *CEBPA* χωρίς μετάλλαξη στο γονίδιο *FLT3*, οι μεταλλάξεις στα γονίδια *IDH1* και *IDH2* προσδίδουν κακή πρόγνωση στο OS σε αυτή την κατηγορία ασθενών και υψηλότερο ποσοστό υποτροπής.

Οι Aref et.al. σε μία μελέτη 211 ασθενών με οξεία μυελογενή λευχαιμία και φυσιολογικό καρυότυπο, έδειξαν ότι ύπαρξη μεταλλάξεων στα γονίδια *IDH1* και *IDH2* αποτελούν αρνητικούς προγνωστικούς παράγοντες στην έκβαση των ασθενών αυτών.¹⁷⁵

Μεταγενέστερες μελέτες όπως των Patel et al, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι οι ασθενείς με τη μετάλλαξη *IDH2 R140Q* είχαν συνολικά ευνοϊκότερη πρόγνωση όταν συνυπήρχε η μετάλλαξη *NPM1*, αναλύοντας τα δεδομένα 398 ασθενών κάτω των 60 ετών με οξεία μυελογενή λευχαιμία, οι οποίοι τυχαιοποιήθηκαν να λάβουν θεραπεία εφόδου με υψηλή ή κανονική δόση δαουνορουβικίνης.¹⁷⁶

Ομοίως, οι Paraemmanuil et al.¹⁷⁷ διαπίστωσαν ευνοϊκότερη πρόγνωση στους ασθενείς με οξεία μυελογενή λευχαιμία που φέρουν τη μετάλλαξη *IDH2 R172*, με έκβαση όμοια με τους ασθενείς με οξεία μυελογενή λευχαιμία και με μετάλλαξη στο γονίδιο *NPM1*.

Στη μελέτη μας, παρατηρήσαμε ότι οι μεταλλάξεις *IDH* δεν φαίνεται να επηρεάζουν σημαντικά το RFS και το OS, στην ομάδα ασθενών που μελετήσαμε. Όταν πραγματοποιήσαμε ανάλυση πολλαπλών μεταβλητών, η μετάλλαξη *FLT3-ITD* και η ηλικία ≥ 60 ετών, βρέθηκαν ανεξάρτητοι προγνωστικοί παράγοντες για το RFS και το OS.

Αναλύσαμε περαιτέρω την επίδραση των μεμονωμένων μεταλλάξεων *IDH* στο RFS και OS και παρατηρήσαμε ότι όταν οι ασθενείς με μετάλλαξη στο γονίδιο *IDH1* συγκρίθηκαν με τους ασθενείς με μεταλλάξεις στο γονίδιο *IDH2* ή με μη

μεταλλαγμένο *IDH* , φάνηκαν να έχουν κατώτερο RFS καθώς και OS, αν και δεν ήταν στατιστικά σημαντικό.

Αναφορικά με τους ασθενείς με μεταλλάξεις στο γονίδιο *IDH2*, παρατηρήσαμε ότι φαίνεται να έχουν ευνοϊκή πρόγνωση όσον αφορά στο RFS και το OS, αν και το αποτέλεσμα δεν ήταν στατιστικά σημαντικό.

Όταν συγκρίναμε μόνο τους ασθενείς με μεταλλάξεις στο γονίδιο *IDH1* με τους ασθενείς με μεταλλάξεις στο γονίδιο *IDH2*, παρατηρήσαμε σημαντικά ανώτερο RFS στους μεταλλαγμένους *IDH2* ασθενείς. Όταν συγκρίναμε τους ασθενείς με μετάλλαξη στο γονίδιο *IDH2* έναντι των ασθενών wild type, παρατηρήθηκε η ευνοϊκότερη πρόγνωση σε αυτούς με τη μετάλλαξη *IDH2 R172* και ακολούθως στους ασθενείς με τη μετάλλαξη *IDH2R140Q*.

Συμπερασματικά, αν και το δείγμα των ασθενών μας είναι μικρό, θα μπορούσαμε να δηλώσουμε ότι παρατηρήσαμε μια θετική επίδραση των μεταλλάξεων *IDH2R172* και *IDH2R140Q* στους ασθενείς με φυσιολογικό καρυότυπο, ανεξαρτήτως ηλικίας, που έλαβαν κλασική χημειοθεραπεία, δεν ήταν υποψήφιοι για αλλογενή μεταμόσχευση και η νόσος τους δεν χαρακτηρίστηκε ως πρωτοπαθώς ανθεκτική. δήλωση που συμβαδίζει με τη μελέτη των Paraemmanuil et. al.

Ο έλεγχος για την ανίχνευση των μεταλλάξεων στα γονίδια *IDH1* και *IDH2* θα εφαρμοστεί σύντομα σε ασθενείς με οξεία μυελογενή λευχαιμία κατά την διάγνωση ή την υποτροπή, λόγω της διαθεσιμότητας του Enasidenib, του προσφάτως εγκεκριμένου από τον FDA πρώτου *IDH2* αναστολέα, στους ασθενείς με υποτροπιάζουσα ή ανθεκτική οξεία μυελογενή λευχαιμία που φέρουν αυτή τη μετάλλαξη, καθώς και της διαθεσιμότητας του, εξίσου, προσφάτως εγκεκριμένου από τον FDA πρώτου *IDH1* αναστολέα, του Ivosidenib, σε ασθενείς με ανθεκτική ή υποτροπιάζουσα οξεία μυελογενή λευχαιμία με μετάλλαξη στο γονίδιο *IDH1* ή νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς με μετάλλαξη στο εν λόγω γονίδιο, οι οποίοι είτε λόγω ηλικίας είτε λόγω συννοσηροτήτων δεν δύναται να λάβουν εντατική χημειοθεραπεία.

V. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η οξεία μυελογενής λευχαιμία χαρακτηρίζεται από σημαντική φαινοτυπική και γενετική ετερογένεια. Κύριο χαρακτηριστικό αποτελεί ο πολλαπλασιασμός άωρων κυττάρων της μυελικής σειράς που προοδευτικά εκτοπίζουν τα φυσιολογικά κύτταρα. Χαρακτηρίζεται από μεγάλο αριθμό επαναλαμβανόμενων κυτταρογενετικών και μοριακών βλαβών, καθώς και επιγενετικών τροποποιήσεων, που αντικατοπτρίζουν τον παθοφυσιολογικό ρόλο των επίκτητων σωματικών μεταλλάξεων. Οι πρώτες μελέτες ασθενών με οξεία μυελογενή λευχαιμία κατέδειξαν ότι κατά κανόνα τα λευχαιμικά κύτταρα δεν ήταν ικανά να πολλαπλασιαστούν εκτενώς και ότι ένα υποσύνολο των κυττάρων αποτελούσαν τον παθολογικό κλώνο. Οι μελέτες του DNA ασθενών με NGS, κατέδειξαν την κλωνική εξέλιξη στη de novo οξεία μυελογενή λευχαιμία καθώς και στην υποτροπή.

Έχουν αναγνωριστεί διάφορες μεταλλάξεις που έχουν ως αποτέλεσμα να μεταβάλλουν το σήμα μεταγωγής και να ενισχύσουν τον πολλαπλασιασμό των λευχαιμικών κυττάρων και την επιβίωσή τους. Αυτές περιλαμβάνουν μεταλλάξεις στα γονίδια *FLT3*, *RAS* και *KIT*.

Οι μεταγραφικοί παράγοντες διαδραματίζουν ουσιαστικό ρόλο στη διαφοροποίηση όλων των κυττάρων συμπεριλαμβανομένων και των αιμοποιητικών. Στο μυελό των οστών, παράγοντες μεταγραφής, όπως *RUNX1*, *CEBPα* και *PU.1* ελέγχουν βασικά γονίδια ώστε να διατηρείται η φυσιολογική λειτουργία του αιμοποιητικού συστήματος.

Γονίδια που κωδικοποιούν παράγοντες που είτε άμεσα ή έμμεσα εμπλέκονται στη μεθυλίωση ή την απομεθυλίωση του DNA, συμπεριλαμβανομένων των *TET2*, *DNMT3A* και *IDH1* ή *IDH2*, παρουσιάζουν επαναλαμβανόμενες μεταλλάξεις.

Στις αιματολογικές κακοήθειες, οι μεταλλάξεις *IDH1* συχνότερα περιλαμβάνουν αντικατάσταση της αργινίνης στη θέση R132 από κυστεΐνη (cysteine, R132C) ή από ιστοιδίνη (histidine, R132H).

Στις *IDH2* μεταλλάξεις η αργινίνη αντικαθίσταται συνηθέστερα από γλουταμίνη στο υπόλειμμα 140 (Residue, R140Q) και από λυσίνη στο

υπόλειμμα 172 (R172K) Οι μεταλλάξεις *IDH2-R140* παρουσιάζονται συχνότερα από τις μεταλλάξεις *IDH2-R172* και αντιπροσωπεύουν το 80% των μεταλλάξεων *IDH2* στην οξεία μυελογενή λευχαιμία.

Μεταλλάξεις στα γονίδια *IDH1* και *IDH2*, παρατηρούνται συνήθως σε ασθενείς με καρυοτυπικές βλάβες που τους κατατάσσουν στην κατηγορία του ενδιάμεσου κινδύνου, συμπεριλαμβανομένης της τρισωμίας 8 και του φυσιολογικού καρυότυπου .

Μεταλλάξεις στο γονίδιο *NPM1* εμφανίζονται περίπου στο 1/3 των ασθενών με οξεία μυελογενή λευχαιμία και συνηθέστερα στους ασθενείς με φυσιολογικό καρυότυπο βλαστών και προσδίδουν καλή πρόγνωση.

Η αναγνώριση ότι ορισμένες μεταλλάξεις μπορεί να χαθούν ή να αποκτηθούν σε υποτροπή (π.χ *FLT3-ITD*), ενώ άλλες ανευρίσκονται στη διάγνωση και παραμένουν σταθερές (π.χ. αναδιατάξεις *NPM1,CBF*), υποδηλώνουν ότι ξεχωριστοί κλωνικοί πληθυσμοί μπορούν να συνυπάρχουν σε ένα δείγμα ασθενούς με οξεία μυελογενή λευχαιμία.

Ο σκοπός της μελέτης είναι η αναζήτηση των μεταλλάξεων των γονιδίων *FLT3* και *NPM1* (και συγκεκριμένα η μετάλλαξη *FLT3-ITD* και μεταλλάξεις του εξωνίου 12 του *NPM1* αντίστοιχα), στους νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς με οξεία μυελογενή λευχαιμία, καθώς και μεταλλάξεις στα γονίδια *IDH1* και *IDH2*, προκειμένου να μελετηθεί η συσχέτισή τους με τους ισχύοντες προγνωστικούς παράγοντες, στα ποσοστά ύφεσης, υποτροπής και ολικής επιβίωσης.

Σε αυτή την αναδρομική μελέτη των 126 νεοδιαγνωσθέντων ασθενών με οξεία μυελογενή λευχαιμία αξιολογήθηκε η συχνότητα των μεταλλάξεων *IDH*, η συσχέτισή τους με τα χαρακτηριστικά άλλων ασθενών καθώς και τα καρυοτυπικά και μοριακά δεδομένα και επιπλέον η επίδρασή τους στο RFS και OS. Υπήρξε ίση κατανομή μεταξύ των δύο φύλων. Το 52% των ασθενών ήταν ηλικίας <60 ετών και το 48% ήταν ηλικίας ≥60 ετών. Ο υπότυπος M2 σύμφωνα με την ταξινόμηση FAB ήταν ο πιο συχνός υπότυπος (40%). Φυσιολογικός καρυότυπος των βλαστών βρέθηκε στο 53% των ασθενών, ενώ το 47% είχε κυτταρογενετικές ανωμαλίες. Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν σε ομάδες κινδύνου σύμφωνα με τα κριτήρια ELN 2017. Το 30%, 56%, 14% των ασθενών κατατάχθηκαν στην ευνοϊκή, ενδιάμεση και δυσμενή ομάδα κινδύνου

αντίστοιχα. Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *NPM1* ανιχνεύθηκαν στο 31% του συνόλου των ασθενών που μελετήθηκαν, ενώ οι μεταλλάξεις *FLT3-ITD* ανιχνεύθηκαν στο 19%.

Μεταλλάξεις στα γονίδια *IDH1* και *IDH2* παρατηρήθηκαν σε ποσοστό 13,5% των ασθενών. Μεταλλάξεις στο γονίδιο *IDH1* ανιχνεύθηκαν σε ποσοστό 4,8%, στο γονίδιο *IDH2* σε ποσοστό 7,1% και συνύπαρξη μεταλλάξεων και στα δύο γονίδια σε ποσοστό 1,6% των ασθενών. Η μετάλλαξη R132H ήταν η συχνότερη *IDH1* μετάλλαξη, ενώ η μετάλλαξη R140Q ήταν η πιο συχνή *IDH2* μετάλλαξη.

Στους ασθενείς μας, οι μεταλλάξεις *IDH* δεν συσχετίστηκαν ούτε με το φύλο ούτε με την ηλικία. Επιπλέον, οι μεταλλάξεις *IDH* δεν συσχετίστηκαν με κανένα υπότυπο FAB και δεν συσχετίστηκαν με τον καρυότυπο. Επιπλέον, δεν υπήρξε σημαντική συσχέτιση μεταξύ του *IDH* status και των ομάδων κινδύνου. Οι μεταλλάξεις *IDH* δεν συσχετίστηκαν με το *FLT3* status των ασθενών μας, ωστόσο ανευρέθηκε συσχέτιση με την ύπαρξη μετάλλαξης στο γονίδιο *NPM1*.

Στη μελέτη μας, παρατηρήσαμε ότι οι μεταλλάξεις *IDH* δεν φαίνεται να επηρεάζουν σημαντικά το RFS και το OS, στην ομάδα ασθενών που μελετήσαμε. Όταν πραγματοποιήσαμε ανάλυση πολλαπλών μεταβλητών, η μετάλλαξη *FLT3-ITD* και η ηλικία ≥ 60 ετών, βρέθηκαν ανεξάρτητοι προγνωστικοί παράγοντες για το RFS και το OS.

Αναλύσαμε περαιτέρω την επίδραση των μεμονωμένων μεταλλάξεων *IDH* στο RFS και OS και παρατηρήσαμε ότι όταν οι ασθενείς με μετάλλαξη στο γονίδιο *IDH1* συγκρίθηκαν με τους ασθενείς με μεταλλάξεις στο γονίδιο *IDH2* ή με μη μεταλλαγμένο *IDH*, φάνηκαν να έχουν κατώτερο RFS καθώς και OS, αν και δεν ήταν στατιστικά σημαντικό.

Αναφορικά με τους ασθενείς με μεταλλάξεις στο γονίδιο *IDH2*, παρατηρήσαμε ότι φαίνεται να έχουν ευνοϊκή πρόγνωση όσον αφορά στο RFS και το OS, αν και το αποτέλεσμα δεν ήταν στατιστικά σημαντικό.

Όταν συγκρίναμε μόνο τους ασθενείς με μεταλλάξεις στο γονίδιο *IDH1* με τους ασθενείς με μεταλλάξεις στο γονίδιο *IDH2*, παρατηρήσαμε σημαντικά ανώτερο RFS στους μεταλλαγμένους *IDH2* ασθενείς. Όταν συγκρίναμε τους ασθενείς με μετάλλαξη στο γονίδιο *IDH2* έναντι των ασθενών wild type,

παρατηρήθηκε η ευνοϊκότερη πρόγνωση σε αυτούς με τη μετάλλαξη *IDH2 R172* και ακολούθως στους ασθενείς με τη μετάλλαξη *IDH2R140Q*.

Συμπερασματικά, αν και το δείγμα των ασθενών μας είναι μικρό, θα μπορούσαμε να δηλώσουμε ότι παρατηρήσαμε μια θετική επίδραση των μεταλλάξεων *IDH2R172* και *IDH2R140Q* στους ασθενείς με φυσιολογικό καρυότυπο, ανεξαρτήτως ηλικίας, που έλαβαν κλασική χημειοθεραπεία, δεν ήταν υποψήφιοι για αλλογενή μεταμόσχευση και η νόσος τους δεν χαρακτηρίστηκε ως πρωτοπαθώς ανθεκτική, δήλωση που συμβαδίζει με τη μελέτη των Paraemmanuilet. al.

VI. SUMMARY

Acute Myeloid Leukemia (AML) is a clonal hematological malignancy characterized by the accumulation of blast cells in the bone marrow, peripheral blood or other tissue. It is a heterogeneous disease clinically, morphologically and genetically. AML development is considered a multistep process that requires the contribution of at least two classes of mutations to evolve to full-blown leukemia. Various mutations have been identified that alter the switching signal and enhance the proliferation of leukemic cells and their survival. These include mutations in the FLT3, RAS and KIT genes.

Transcription factors play an essential role in the differentiation of all cells, including hematopoiesis. In the bone marrow, transcription factors such as RUNX1, CEBP α and PU.1 control key genes to maintain the normal function of the hematopoietic system. Most frequent mutations are those that lead to aberrant regulation of DNA methylation and hydroxymethylation (*DNMT3A*, *TET2* and *IDH1/2*).

In haematological malignancies, IDH1 mutations most often involve replacement of arginine at position R132 by cysteine (cysteine, R132C) or histidine (histidine, R132H). In IDH2 mutations, arginine is most commonly replaced by glutamine at residue 140 (Residue, R140Q) and by lysine at residue 172 (R172K). Mutations in the IDH1 and IDH2 genes are commonly seen in patients with karyotypic abnormalities that classify them as an intermediate risk group, including trisomy 8 and the normal karyotype.

Mutations in the NPM1 gene occur in approximately 1/3 of patients with acute myelogenous leukemia and more commonly in patients with normal stem karyotype and provide a good prognosis.

Recognition that some mutations may be lost or acquired in relapse (e.g. FLT3-ITD), while others are undiagnosed and remain stable (e.g. rearrangements NPM1, CBF), suggests that individual clonal populations may coexist in a sample of a patient with acute myelogenous leukemia.

Identification of somatically acquired gene mutations has provided critical insights into the pathogenesis of acute myeloid leukemia (AML). Gene mutations in AML provide useful markers for diagnosis and for monitoring response to therapy. Additionally, they provide information that are useful in assessing prognosis and making therapeutic decisions.

Mutations in the isocitrate dehydrogenase 1 (*IDH1*) and isocitrate dehydrogenase 2 (*IDH2*) genes are reported recently in AML. One hundred and twenty-six (126) patients diagnosed with AML between 1995 to 2010, were retrospectively studied. All patients were stratified in favorable, intermediate or adverse prognostic subgroup according to ELN risk stratification criteria 2017. The frequencies of the characteristics of the patients, such as age and gender, FAB subtype, karyotype, risk stratification subgroup, *NPM1* mutation and *FLT3* status were evaluated. *IDH1/IDH2* mutations were also evaluated in this study group and were correlated with demographic characteristics of the patients, FAB subtype, the presence of normal or abnormal karyotype, the risk stratification group, *NPM1* and *FLT3* status. (BM) specimens were stored at -80 °C . and were available for retrospective Polymerase Chain Reaction (PCR) analysis for *FLT3-ITD*, *NPM1*, and *IDH1/IDH2* mutations. There was an equal distribution between the two genders (males 63/126 and females 63/126). 52% of patients were <60 years old (65/126) and 48% were ≥60 years old (61/126). M2 AML subtype according to the FAB classification, was the most frequent subtype (40%) excluding M3 subtype from the results. Normal karyotype was found in 62/126 (53% of patients), whereas 54/126 (47%) had cytogenetic abnormalities. Patients were stratified into risk groups according to the 2017 ELN recommendations, 30% (37/126), 56% (71/126), 14% (18/126) of patients were classified in the favorable, intermediate and adverse risk group respectively. *NPM1* mutations were detected in 39/126 (31% of the study group), while *FLT3-ITD* mutations were detected in 24/126 (19%). *IDH* mutations were observed in 17/126 (13.5%). *IDH1* mutations were detected in 6/126 (4.8%), *IDH2* in 9/126 (7.1%) and *IDH1* and *IDH2* mutations (dual mutations) in 2/126 (1.6%). The *R132H* mutation was the most prevalent type of *IDH1* mutation, while the *R140Q* was the most prevalent type of

IDH2 mutation. *IDH* mutations were associated with the presence of *NPM1* mutation (*IDH* mutations were present in 10/39 of *NPM1* mutated patients, $p=0.017$), whereas there is no association with the presence of *FLT3-ITD* mutations (*IDH* mutations were present in 3/24 of *FLT3-ITD* mutated patients ($p=1.0$). When we analysed only the subgroup of patients with *IDH1* mutations, we observed that it seems to have inferior outcome in terms of RFS and OS, although the statistical significance is not significant. When we analysed only the subgroup of patients with *IDH2* mutations, we observed that it seems to have favorable outcome in terms of RFS and OS, although not statistically significant. When we compared *IDH1* mutant patients to *IDH2* ones, we observed significantly superior RFS but not statistically significant favorable outcome in OS in *IDH2* mutant patients. When we compared separately *IDH2* mutated patients vs wild-type, we observed that *IDH2 R172* mutated patients presented the most favorable prognostic impact, followed by *IDH2 R140Q* mutated ones.

VII. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Wineman J et al: Functional heterogeneity of the hematopoietic microenvironment: rare stromal elements maintain long term repopulating stem cells, *Blood*. 1996 May 15;87(10):4082-90.
2. Visser JW et al. : Purification of pluripotent hemopoietic stem cells: past and present, *Exp.Hematol*. 1990 Mar;18(3):248-56
3. Spangrude GJ¹, Smith L et al.: Mouse hematopoietic stem cells, *Blood*. 1991 Sep 15;78(6):1395-402.
4. Lucas D :The Bone Marrow Microenvironment for Hematopoietic Stem Cells, *Adv.Exp Med Biol*. 2017;1041:5-18. doi: 10.1007/978-3-319-69194-7_2.
5. Kaushansky K.: Lineage-specific hematopoietic growth factors, *N Engl J Med*. 2006 May 11;354(19):2034-45.
6. Krebsbach PH, Kuznetsov SA et al.: Bone marrow stromal cells: characterization and clinical application, *Crit Rev Oral Biol Med*. 1999;10(2):165-81.
7. Jane Sottile, Denise C. Hocking, Fibronectin Polymerization Regulates the Composition and Stability of Extracellular Matrix Fibrils and Cell-Matrix Adhesions, *Molecular Biology of the Cell* , Vol. 13, 3546 –3559, October 2002
8. Feng Ye, Chungo Kim and Mark H. Ginsberg Reconstruction of integrin activation, *Blood* 2012 119:26-33.
9. Simmons PJ: Adhesion molecules in hematopoiesis. *Baillieres Clin.Hematol.*, 1997;10(3):485-505.
10. Puch S, Armeanu S, Kibler C, et al. N-cadherin is developmentally regulated and functionally involved in early hematopoietic cell differentiation. *J Cell Sci*. 2001, 114:1567-1577.
11. Demetri GD, Griffin JD: Granulocyte colony stimulating factor and its receptor. *Blood* 1991, 78:2791

12. Spitz F, Furlong EE: Transcription factors: from enhancer binding to developmental control. *Nat. Rev. Genet* 2012, 13:613–626.
13. Wilkinson AC, Gottgens B: Transcriptional regulation of haematopoietic stem cells. *Adv. Exp Med Biol* 2013, 786:187–212.
14. Aifantis I, Raetz E, Buonamici S: Molecular pathogenesis of T-cell leukaemia and lymphoma. *Nat Rev Immunol* 2008, 8:380–390.
15. Collin M, Dickinson R, Bigley V: Haematopoietic and immune defects associated with GATA2 mutation. *Brit J Haematol* 2015, 169:173–187.
16. Ferrando AA, et al: Gene expression signatures define novel oncogenic pathways in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell* 2002, 1:75–87.
17. Imperato MR, Cauchy P, Obier N, et al: The RUNX1-PU.1 axis in the control of hematopoiesis. *Int J Hematol.* 2015, 101:319–329.
18. Berger SL, Kouzarides T, Shiekhattar R, et al: An operational definition of epigenetics. *Genes Dev.* 2009, 23:781–783.
19. Goodell MA: Epigenetics in hematology: introducing a collection of reviews. *Blood* 2013, 121:3059–3060.
20. Cancer Genome Atlas Research N: Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2013, 368:2059–2074.
21. Bock C, et al: DNA methylation dynamics during in vivo differentiation of blood and skin stem cells. *Mol Cell* 2012, 47:633–647
22. Jiang Y, et al: Aberrant DNA methylation is a dominant mechanism in MDS progression to AML. *Blood* 2009, 113:1315–1325.

23. Figueroa ME, et al: DNA methylation signatures identify biologically distinct subtypes in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell* 2010, 17:13–27.
24. Kouzarides T: Chromatin modifications and their function. *Cell* 2007, 128:693–705.
25. Cullen SM, Mayle A, Rossi L, et al: Hematopoietic stem cell development: an epigenetic journey. *Curr Top Dev.Biol.* 2014, 107:39–75.
26. Hoffman et al. 2005, p. 1071.
27. Bennett JH (1845). "Two cases of hypertrophy of the spleen and liver, in which death took place from suppuration of blood". *Edinburgh Med Surg J.* 64: 413.
28. Virchow, R (1856). "Die Leukämie". In Virchow R. *Gesammelte Abhandlungen zur Wissenschaftlichen Medizin* (in German). Frankfurt: Meidinger. p. 190.
29. Ebstein W (1889). "Über die acute Leukämie und Pseudoleukämie". *Deutsch ArchKlin Med.* 44: 343.
30. Mosler F (1876). "Klinische Symptome und Therapie der medullären Leukämie". *BerIKlinWochenschr.* 13: 702.
31. Naegeli O (1900). "Über rothes Knochenmark und Myeloblasten". *Deutsch Med Wochenschr.* 26 (18): 287–290.
32. Majeti R, Park CY, Weissman IL: Identification of a hierarchy of multipotent hematopoietic progenitors in human cord blood. *Cell Stem Cell* 007, 1:635–645.
33. Goardon N, et al: Coexistence of LMPP-like and GMP-like leukemia stem cells in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell* 2011, 19:138–152.

34. Corces-Zimmerman MR, Hong WJ, Weissman IL, et al: Preleukemic mutations in human acute myeloid leukemia affect epigenetic regulators and persist in remission. *Proc.Natl.Acad.Sci USA* 2014, 111:2548–2553.
35. Shlush LI, Zandi S, Mitchell A, et al: Identification of pre-leukaemichaematopoietic stem cells in acute leukaemia. *Nature* 2014, 506:328–333.
36. Jan M, et al: Clonal evolution of preleukemic hematopoietic stem cells precedes human acute myeloid leukemia. *SciTransl Med* 4:149ra118, 2012.
37. Colmone A, et al: Leukemic cells create bone marrow niches that disrupt the behavior of normal hematopoietic progenitor cells. *Science* 2008, 322:1861.
38. Flynn CM, Kaufman DS: Donor cell leukemia: insight into cancer stem cells and the stem cell niche. *Blood* 2007, 109:2688.
39. Bonnet D, Dick JE: Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 1997, 3:730–737.
40. Welch JS, et al: The origin and evolution of mutations in acute myeloid leukemia. *Cell* 150:264–278, 2012. doi: 10.1016/j.cell.2012.06.023.
41. Pedersen-Bjergaard J: Insights into Leukemogenesis from Therapy-Related Leukemia. *N Engl J Med* 2005, 352:1591–1594.
42. Walter MJ, Shen D, Ding L, et al: Clonal architecture of secondary acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2012, 366:1090–1098.
43. Alter BP, Giri N, Savage SA, et al: Malignancies and survival patterns in the National Cancer Institute inherited bone marrow failure syndromes cohort study. *Br J Haematol.* 2010, 150:179–188.

44.H. Mitelman F. An international system for human cytogenetic nomenclature. Basel:Karger, 1995.

45.F.Stölzel, B.Mohr,M.Kramer,U.Oelschlägel, T.Bochtler, WE.Berdel, M.Kaufmann, CD.Baldus,K.SchäferEckart, RStuhlmann, HEinsele, SWKrause, HServe, MHänel, R.Herbst, A.Neubauer,K.Sohlbach, J.Mayer JM.Middeke, U.Platzbecker, M.Schaich, A.Krämer, C.Röllig, J.Schetelig,M.Bornhäuser, G.Ehninger.:Karyotypecomplexityandprognosisinacutemyeloidleukemia, BloodCancerJ. 2016 Jan; 6(1): e386.

46. Byrd JC, Mrózek K, Dodge RK, et al: Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). Blood 2002, 100:4325–4336.

47. Krzysztof Mrózek et al :Complex karyotype in de novo acute myeloid leukemia: typical and atypical subtypes differ molecularly and clinically, Leukemia volume 33, 2019.

48.Marianne Bienz, Madleina Ludwig, BeatriceU. Mueller, Elisabeth OppligerLeibundgut, Daniel Ratschiller, Max Solenthaler, MartinF. Fey and Thomas Pabst: RiskAssessmentinPatientswithAcuteMyeloidLeukemiaandaNormalKaryotype, ClinicalCancerResearch

49. Hillard M. Lazarus and Mark R. Litzow: AML cytogenetics: the complex just got simpler, Blood 2012, 120:2357-2358.

50.Friedrich Stölzel, Brigitte Mohr, Michael Kramer, Christoph Röllig, Tilmann Bochtler, Alwin Krämer, Uta Oelschlägel, JanMoritz Middeke, Uwe Platzbecker Markus Schaich, Johannes Schetelig, Gerhard Ehninger and Martin Bornhäuser:Karyotypic Complexity In Acute Myeloid Leukemia In The Context Of Adverse Prognosis, Blood 2013, 122:489.

51. Liu P, Tarlı SA, Hajra A, et al: Fusion between transcription factor CBF beta/ PEBP2 beta and a myosin heavy chain in acute myeloid leukemia. *Science* 1993, 261:1041–1044.
52. Shigesada K, van de Sluis B, Liu PP: Mechanism of leukemogenesis by the inv(16) chimeric gene CBFβ/PEBP2B-MHY11. *Oncogene* 2004, 23:4297–4307.
53. Scott A. Armstrong :Leukemia gene expression: *MLL* rearrangements in AML and ALL, *Blood* 2004, 104:3423-3424.
54. PilarPalomo Moraleda, Todd A. Alonzo, Robert B. Gerbing, Susana C. Raimondi, BetsyA. Hirsch, Yaddanapudi Ravindranath, Beverly Lange, William G. Woods, Alan S. Gamis and Soheil Meshinchi: Acute Myeloid Leukemia with t(6;9)(p23;q34) Is Associated Poor Outcome in Childhood AML Regardless of FLT3/ITD Status, A Report From Children's Oncology Group. *Blood* 2012, 120:2541.
55. Claudia Haferlach,, Torsten Haferlach, Frank Dicker, Tamara Weiss, Wolfgang Kern and Susanne Schnittger: AML with Inv(3)(q21q26) or t(3;3)(q21;q26) Are Frequently Accompanied by Mutations in *RUNX1* and *NRAS* and Show a High Incidence of *NF1* Deletions: a Study On 40 Cases. *Blood* 2009, 114:273.
56. Diab A, Zickl L, Abdel-Wahab O, Jhanwar S, Gulam MA, Panageas KS, Patel JP, Jurcic J, Maslak P, Paietta E, Mangan JK, Carroll M, Fernandez HF, Teruya-Feldstein J, Luger SM, Douer D, Litzow MR, Lazarus HM, Rowe JM, Levine RL, Tallman MS.: Acute myeloid leukemia with translocation t(8;16) presents with features which mimic acute promyelocytic leukemia and is associated with poor prognosis: *Leuk Res.* 2013 Jan, 37(1):32-6. doi: 10.1016/j.leukres.2012.08.025.
57. Grimwade D, Hills RK, Moorman AV, et al: 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* 116:354–365, 2010.

58. Wong TN, Ramsingh G, Young AL, et al: Role of TP53 mutations in the origin and evolution of therapy-related acute myeloid leukaemia. *Nature* 2015, 518:552–555.

59. Impact of trisomy 8 (+8) on clinical presentation, treatment response, and survival in acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group study Sandra R. Wolman, Holly Gundacker, Frederick R. Appelbaum and Marilyn L. Slovak, *Blood* 2002.

60. Avraham H, Vannier E, Cowley S, Jiang SX, Chi S, Dinarello CA, Zsebo KM, Groopman JE: Effects of the stem cell factor, c-kit ligand, on human megakaryocyte cells. *Blood* 1992, 79:365.

61. Lyman SD, James L, VandenBos T, de Vries P, Brasel K, Gliniak B, Hollingsworth LT, PichaKS, McKenna HJ, Splett RR, Çletcher FF, Maraskovsky E, Farrah T, Foxworthe D, Williams DE, Beckmann MP: Molecular cloning of a ligand for the flt3/flk-2 tyrosine kinase receptor: A proliferative factor for primitive hematopoietic cells. *Cell* 1991, 75:1157.

62. Szabolcs F, Moore MAS, Young JW: Expansion of immunostimulatory dendritic cells among the myeloid progeny of human CD34+ bone marrow precursors cultured with c-kit ligand, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and TNF-. *J Immunol* 1995, 154:5851.

63. Zhang S, Broxmeyer HE. p85 subunit of PI3 kinase does not bind to human Flt3 receptor, but associates with SHP2, SHIP, and a tyrosine-phosphorylated 100-kDa protein in Flt3 ligand-stimulated hematopoietic cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999, 254:440-445.

64. Zhang S, Mantel C, Broxmeyer HE. Flt3 signaling involves tyrosyl-phosphorylation of SHP-2 and SHIP and their association with Grb2 and She in Baf3/Flt3 cells. *J Leukoc Biol.* 1999, 65:372-380 282.
65. Lyman SD, James L, Johnson L, et al. Cloning of the human homologue of the murine flt3 ligand: a growth factor for early hematopoietic progenitor cells. *Blood.* 1994, 83:2795-2801.
66. Weiss A, Schlessinger J. Switching signals on or off by receptor dimerization. *Cell.* 1998, 94:277-280.
67. F. Abu-Duhier FM, Goodeve AC, Wilson GA, et al. FLT3 internal tandem duplication mutations in adult acute myeloid leukaemia define a high-risk group. *Br J Haematol.* 2000, 111:190-195.
68. Gilliland DG, Griffin JD: The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood* 2002, 100(5):1532.
69. Brynne T, Kvinlaug, Wai-In Chan et al: Common and overlapping oncogenic pathways contribute to the evolution of acute myeloid leukemias, *Cancer Res.* 2011 Jun 15, 71(12): 4117–4129.
70. Casteran N, Rottapel R, Beslu N, Lecoq E, Birnbaum D, Dubreuil P. 1994. Analysis of the mitogenic pathway of the FLT3 receptor and characterization in its C terminal region of a specific binding site for PI3' kinase. *Cell Mol. Biol.* 40: 443.
71. Levis M, Tse KF, Smith BD, Garrett E, Small D. A FLT3 tyrosine kinase inhibitor is selectively cytotoxic to acute myeloid leukemia blasts harboring FLT3 internal tandem duplication mutations. *Blood.* 2001, 98:885-887.
72. Kiyoi H, Towatari M, Yokota S, Hamaguchi M, Ohno R, Saito H, Naoe T: Internal tandem duplication of the FLT3 gene is a novel modality of elongation

mutation which causes constitutive activation of the product. *Leukemia* 1998, 12:1333.

73. Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, et al: Genomic classification and prognosis in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2016, 374:2209–2221.

74. Wahlin A, Markev rn B, Golovleva I, Nilsson M, Prognostic significance of risk group stratification in elderly patients with acute myeloid leukaemia, *Br J Haematol.* 2001, 115(1):25.

75. Ya-Zhen Qin, Hong-Hu Zhu, Qian Jiang, Lan-Ping Xu, Hao Jiang, Yu Wang, Xiao-Su Zhao, Yan-Rong Liu, Xiao-Hui Zhang, Kai-Yan Liu, Xiao-Jun Huang : Heterogeneous prognosis among KIT mutation types in adult acute myeloid leukemia patients with t(8;21), *Blood Cancer Journal* volume 8

76. RAS mutation in acute myeloid leukemia is associated with distinct cytogenetic subgroups but does not influence outcome in patients younger than 60 years David T. Bowen, Marion E. Frew, Robert Hills, Rosemary E. Gale, Keith Wheatley, Michael J. Groves, Stephen E. Langabeer, Panagiotis D. Kottaridis, Anthony V. Moorman, Alan K. Burnett and David C. Linch, *Blood* 2005, 106:2113–2119.

77. Jing-Dong Zhou, Dong-Ming Yao, Xi-Xi Li, Ting-Juan Zhang, Wei Zhang, Ji-Chun Ma, Hong Guo, Zhao-Qun Deng, Jiang Lin, Jun Qian, *Oncotarget.* 2017 Sep 12)

78. Ley TJ, Miller C, Ding L, et al: The Cancer Genome Atlas Research Network. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2013, 368:2059–2074.

79. Bowers SR, Calero-Nieto FJ, Valeaux S, Fernandez-Fuentes N, Cockerill PN (October 2010). "Runx1 binds as a dimeric complex to overlapping Runx1 sites within a palindromic element in the human GM-CSF enhancer". *Nucleic Acids Research*.

80. Susanne Schnittger, Frank Dicker, Wolfgang Kern, Nicole Wendland, Jana Sundermann, Tamara Alpermann, Claudia Haferlach and Torsten Haferlach: RUNX1 mutations are frequent in de novo AML with noncomplex karyotype and confer an unfavorable prognosis, *Blood* 2011, 117:2348-2357.

81. Pabst T, Mueller BU, Zhang P, et al. Dominant-negative mutations of CEBPA, encodingCCAAT/enhancer binding protein-alpha (C/EBPalpha), in acute myeloid leukemia. *Nat Genet.*2001, 27:263-270.

82. E.V.Rothenberg, H. Hosokawa, J.Ungerback.,Mechanisms of Action of Hematopoietic Transcription Factor PU.1 in Initiation of T-Cell Development, *Front. Immunol.*, 20 February 2019.

83. MironProkocimer, AlinaMolchadsky, Varda Rotter: Dysfunctional diversity of p53 proteins in adult acute myeloid leukemia: projections on diagnostic workup and therapy, *Blood*. 2017 Aug, 10; 130(6): 699–712.

84. RaajitRampal, Maria E. Figueroa et al:Wilms tumor 1 mutations in the pathogenesis of acute myeloid leukemia*Haematologica*. 2016 Jun; 101(6): 672–679. doi: 10.3324/haematol.2015.141796.

85.Ley TJ, Ding L, Walter MJ, et al: DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2010, 363:2424–2433.

86. Dushyant Kumar, AnuragMehta ,Manoj Kumar Panigrahi , SukantaNath, Kandarpa Kumar Saikia, DNMT3A (R882) mutation features and prognostic effect in acute myeloid leukemia in Coexistent with NPM1 and FLT3 mutations. *Hematology/Oncology and Stem Cell Therapy*, June 2018

87. Olivier Kosmider, Véronique Gelsi, Marion Ciudad, Cindy Racoeuret al: TET2 Gene Mutation Is A Frequent And Adverse Event In Chronic Myelomonocytic Leukemia, *Haematologica* December 2009 94: 1676, 1681; Doi:10.3324/haematol.2009.011205.
88. Tahiliani et al., 2009.
89. Ruiqi Wang, Xiaoning Gao, Li Yu. Wang et al. The prognostic impact of TET oncogene family member 2 mutations in patients with acute myeloid leukemia: a systematic review and meta-analysis, *BMC Cancer* 2019.
90. Figueroa ME, Abdel-Wahab O, Lu C, et al: Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function and impair hematopoietic differentiation. *Cancer Cell* 2010, 18:553–567.
91. Oermann EK, Wu J, Guan KL, Xiong Y: Alterations of metabolic genes and metabolites in cancer. *Semin Cell Dev Biol.* 2012 Jun, 23(4):370-80.
92. K.Dang L, White DW, Gross S, Bennett BD, Bittinger MA, Driggers EM, Fantin VR, Jang HG, Jin S, Keenan MC, Marks KM, Prins RM, Ward PS, Yen KE, Liao LM, Rabinowitz JD, Cantley LC, Thompson CB, Vander Heiden MG, Su SM: Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature.* 2009 Dec 10, 462(7274):739-44.
93. Lyer et al., 2009
94. Loenarz C, Schofield CJ: Expanding chemical biology of 2-oxoglutarate oxygenases, *Nat Chem Biol.* 2008, Mar; 4(3):152-6.
95. Mc Donough MA, Loenarz C, Chowdhury R, Clifton IJ, Schofield CJ. Structural studies on human 2-oxoglutarate dependent oxygenases. *Curr. Opin. Struct Biol.* 2010, Dec; 20(6):659-72.

96. Tahiliani et al., 2009.
97. Clifton et al., 2006.
98. Couture et al., 2007.
99. Islam MS, Leissing TM, Chowdhury R, Hopkinson RJ, Schofield CJ. Annu, 2-Oxoglutarate-Dependent Oxygenases. Rev Biochem. 2018, Jun 20;87:585-620.
100. Simmons et al., 2008.
101. Chowdhury R, Yeoh KK, Tian YM, Hillringhaus L, Bagg EA, Rose NR, Leung IK, Li XS, Woon EC, Yang M, McDonough MA, King ON, Clifton IJ, Klose RJ, Claridge TD, Ratcliffe PJ, Schofield CJ, Kawamura A: The oncometabolite 2-hydroxyglutarate inhibits histone lysine demethylases, EMBO Rep. 2011 May, 12(5):463-9.
102. Xu W, Yang H, Liu Y, Yang Y, Wang P, Kim SH, Ito S, Yang C, Wang P, Xiao MT, Liu LX, Jiang WQ, Liu J, Zhang JY, Wang B, Frye S, Zhang Y, Xu YH, Lei QY, Guan KL, Zhao SM, Xiong Y: Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of α -ketoglutarate-dependent dioxygenases. Cancer Cell. 2011 Jan 18, 19(1):17-30.
103. Figueroa ME, Abdel-Wahab O, Lu C, Ward PS, Patel J, Shih A, Li Y, Bhagwat N, Vasanthakumar A, Fernandez HF, Tallman MS, Sun Z, Wolniak K, Peeters JK, Liu W, Choe SE, Fantin VR, Paietta E, Löwenberg B, Licht JD, Godley LA, Delwel R, Valk PJ, Thompson CB, Levine RL, Melnick A: Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. Cancer Cell. 2010 Dec 14, 18(6):553-67.
104. Oermann EK, Wu J, Guan KL, Xiong Y: Alterations of metabolic genes and metabolites in cancer. Semin Cell Dev Biol. 2012 Jun, 23(4):370-80.

105. Losman JA, Looper RE, Koivunen P, Lee S, Schneider RK, McMahon C, Cowley GS, Root DE, Ebert BL, Kaelin WG J: (R)-2-hydroxyglutarate is sufficient to promote leukemogenesis and its effects are reversible. *Science*. 2013 Mar 29, 339(6127):1621-5.

106. Chowdhury R, Yeoh KK, Tian YM, Hillringhaus L, Bagg EA, Rose NR, Leung IK, Li XS, Woon EC, Yang M, McDonough MA, King ON, Clifton IJ, Klose RJ, Claridge TD, Ratcliffe PJ, Schofield CJ, Kawamura A :Theoncometabolite 2-hydroxyglutarate inhibits histone lysine demethylases. *EMBO Rep*. 2011 May, 12(5):463-9.

107. William G. Kaelin, Jr. Steven L. McKnight, Influence of Metabolism on Epigenetics and Disease, *Cell*. 2013 Mar 28; 153

108. XuW, YangH, LiuY, YangY, WangP, KimSH, ItoS, YangC, WangP, XiaoMT, LiuLX, JiangWQ, LiuJ, ZhangJY, WangB, FryeS, ZhangY, XuYH, LeiQY, GuanKL, ZhaoSM, XiongY: Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of α -ketoglutarate-dependent dioxygenases. *CancerCell*. 2011 Jan 18, 19(1):17-30.

109. Koivunen P, Lee S, Duncan CG, Lopez G, Lu G, Ramkissoon S, Losman JA, Joensuu P, Bergmann U, Gross S, Travins J, Weiss S, Looper R, Ligon KL, Verhaak RG, Yan H, Kaelin WG Jr : Transformation by the (R)-enantiomer of 2-hydroxyglutarate linked to EGLN activation. *Nature*. 2012, Feb 15; 483(7390):484-8.

110. Figueroa ME, Abdel-Wahab O, Lu C, Ward PS, Patel J, Shih A, Li Y, Bhagwat N, Vasanthakumar A, Fernandez HF, Tallman MS, Sun Z, Wolniak K, Peeters JK, Liu W, Choe SE, Fantin VR, Paietta E, Löwenberg B, Licht JD, Godley LA, Delwel R, Valk PJ, Thompson CB, Levine RL, Melnick A: Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer Cell*. 2010 Dec 14, 18(6):553-67.

111. Xiao M, Yang H, Xu W, Ma S, Lin H, Zhu H, Liu L, Liu Y, Yang C, Xu Y, Zhao S, Ye D, Xiong Y, Guan KL :Inhibition of α -KG-dependent histone and DNA demethylases by fumarate and succinate that are accumulated in mutations of FH and SDH tumor suppressors. *Genes Dev.* 2012 Jun 15; 26(12):1326-38.
112. Dinardo CD, Ravandi F, Agresta S et al. Characteristics, clinical outcome, and prognostic significance of IDH mutations in AML. *Am. J. Hematol.* 2015, 90(8), 732–736.
113. Fernandez-Mercado M, Yip BH, Pellagatti A et al. Mutation patterns of 16 genes in primary and secondary acute myeloid leukemia (AML) with normal cytogenetics. *PLoS ONE* 2012, 7(8), e42334.
114. Fathi AT, Sadrzadeh H, Borger DR et al. Prospective serial evaluation of 2-hydroxyglutarate, during treatment of newly diagnosed acute myeloid leukemia, to assess disease activity and therapeutic response. *Blood* 2012, 120(23), 4649–4652.
115. Yogen Sauntharajah, Jaroslaw Maciejewski et al: Polycomb segment myeloid malignancies, *Blood* 2012, 119:1097-1098
116. Will CL, Lührmann R (July 2011). "Spliceosome structure and function". *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 3 (7): a003707. doi:10.1101/cshperspect.a003707
117. Haering CH, Schoffnegger D, Nishino T, Helmhart W, Nasmyth K, Löwe J (September 2004). "Structure and stability of cohesin's Smc1-kleisin interaction". *Molecular Cell*. 15 (6): 951–64. doi:10.1016/j.molcel.2004.
118. Falini B, Mecucci C, Tiacci E, et al: Cytoplasmic nucleophosmin in Acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *NEngl J Med* 2005, 352:254–266.

119. BKuma, MGarcia et al: Acute myeloid leukemia trans forms the bone marrow niche into a leukemia-permissive microenvironment through exosome secretion, *Leukemia* 2018, volume 32, pages 575–587.
120. *Haematology Basic Principles and Practice*, 7th edition 2017.
121. Emmanuel C. Besa (1992). *Hematology*, Volume 487.
122. Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD, The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms, *Blood*. 2002, Oct 1;100(7):2292-302.
123. Papaemmanuil et al.: Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia, *N Engl J Med*. 2016, Jun 9;374(23):2209-2221. doi: 10.1056/NEJMoa1516192.
124. Dohner H, Estey EH, Amadori S, et al: Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* 2010, 115:453–474.
125. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. (August 1976). "Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group". *Br. J. Haematol.* 33 (4): 451–8. doi:10.1111/j.1365-2141.1976
126. Daniel A. Arber, Attilio Orazi et al: The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia, *blood*, 19 May 2016, volume 127
127. Wahlin A, Markevörn B, Golovleva I, Nilsson M : Prognostic significance of risk group stratification in elderly patients with acute myeloid leukaemia, *Br J Haematol.* 2001, 115(1):25.
128. Fröhling S, Schlenk RF, Kayser S, Morhardt M, Benner A, Döhner K, Döhner H, German-Austrian AML Study Group, Cytogenetics and age are

major determinants of outcome in intensively treated acute myeloid leukemia patients older than 60 years: results from AMLSG trial AML HD98-B, *Blood*. 2006, 108(10):3280.

129. Pastore F, Dufour A et al: Combined molecular and clinical prognostic index for relapse and survival in cytogenetically normal acute myeloid leukemia, *J ClinOncol*. 2014 May;32(15):1586-94.

130. Welch JS, Ley TJ, Link DC, et al: The Origin and Evolution of Mutations in Acute Myeloid Leukemia. 2012, *Cell* 150:264–278.

131. Döhner H, Estey E et al: Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel, *Blood*. 2016, 2017;129(4):424.

132. Burnett A, Wetzler M, Löwenberg B: Therapeutic advances in acute myeloid leukemia, *J Clin.Oncol*. 2011 Feb 10, 29(5):487-94. doi: 10.1200/JCO.2010.30.1820.

133. Hervé Dombret, Claude Gardin: An update of current treatments for adult acute myeloid leukemia, *Blood* 2016, 127:53-61

134. Bob Löwenberg, Gert J Ossenkoppele et al., Dutch-Belgian Cooperative Trial Group for Hemato-Oncology (HOVON); German AML Study Group (AMLSG); Swiss Group for Clinical Cancer Research (SAKK) Collaborative Group. High-dose daunorubicin in older patients with acute myeloid leukemia, *N Engl J Med*

135. Hugo F Fernandez, Zhuoxin Sun et al., Anthracycline dose intensification in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2009, Sep 24

136. Je-Hwan Lee, Young-Don Joo et al., Cooperative Study Group A for Hematology. A randomized trial comparing standard versus high-dose daunorubicin induction in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2011 Oct 6.

137. Bob Löwenberg, Thomas Pabst et al., Dutch-Belgian Cooperative Trial Group for Hemato-Oncology (HOVON) and Swiss Group for Clinical Cancer

Research (SAKK) Collaborative Group. Cytarabine dose for acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2011, Mar 17

138. RoelofWillemze , Stefan Suciú et al., High-dose cytarabine in induction treatment improves the outcome of adult patients younger than age 46 years with acute myeloid leukemia: results of the EORTC-GIMEMA AML-12 trial. *J Clin.Oncol.*2014 Jan 20.

139. Bob Löwenberg, Sense and nonsense of high-dose cytarabine for acute myeloid leukemia, *Blood* 2013 Jan 3

140.Schaich M, Röllig C, Soucek S, et al. Cytarabine dose of 36 g/m² compared with 12 g/m² within first consolidation in acute myeloid leukemia: results of patients enrolled onto the prospective randomized AML96 study. *J ClinOncol.* 2011, 29(19):2696-2702.

141. Miyawaki S, Ohtake S, Fujisawa S, et al. A randomized comparison of 4 courses of standard-dose multiagent chemotherapy versus 3 courses of high-dose cytarabine alone in postremission therapy for acute myeloid leukemia in adults: the JALSG AML201 Study. *Blood.* 2011, 117(8):2366-2372.

142. Thomas X, Elhamri M, Raffoux E, et al. Comparison of high-dose cytarabine and timed-sequential chemotherapy as consolidation for younger adults with AML in first remission: the ALFA-9802 study. *Blood.* 2011, 118(7):1754-1762.

143. Sarkozy C, Gardin C, Gachard N, et al. Outcome of older patients with acute myeloid leukemia in first relapse. *Am J Hematol.* 2013, 88(9):758-764.

144. Burnett AK, Goldstone A, Hills RK, et al. Curability of patients with acute myeloid leukemia who did not undergo transplantation in first remission. *J ClinOncol.* 2013, 31(10):1293-1301.

145. Duval M, Klein JP, He W, et al. Hematopoietic stem-cell transplantation for acute leukemia in relapse or primary induction failure. *J ClinOncol.* 2010, 28(23):3730-3738.

146. Holowiecki J, Grosicki S, Giebel S, et al. Cladribine, but not fludarabine, added to daunorubicin and cytarabine during induction prolongs survival of patients with acute myeloid leukemia: a multicenter, randomized phase III study. *J ClinOncol*. 2012, 30(20):2441-2448.
147. Burnett AK, Russell NH, Hills RK, et al. A comparison of clofarabine with ara-C, each in combination with daunorubicin as induction treatment in older patients with acute myeloid leukaemia [published online ahead of print 30 September 2016, *Leukemia*. doi:10.1038/leu.2016.225.
148. Bob Löwenberg, Jacob M. Rowe: Introduction to the review series on advances in acute myeloid leukemia (AML), *Blood* 2016, 127:1.
149. Mei Wu, Chuntuan Li, Xiongpeng Zhu FLT3 inhibitors in acute myeloid leukemia, *Journal of Hematology & Oncology* 2018, volume 11, Article number: 133.
150. Stone RM, et al: The multi-kinase inhibitor midostaurin (M) prolongs survival compared with placebo (P) in combination with Daunorubicin (D)/Cytarabine (C) induction (ind), high-dose C consolidation (consol), and as maintenance (maint) therapy in newly diagnosed acute Myeloid Leukemia (AML) patients (pts) age 18-60 with FLT3 mutations (muts): an international prospective randomized (rand) P-controlled doubleblind Trial (CALGB 10603/RATIFY [Alliance]). *Blood* 16:2015.
151. Pratz K, Levis M: Incorporating FLT3 inhibitors into acute myeloid leukemia treatment regimens. *Leuk Lymphoma* 2008, 49:852–863.
152. Alexander E. Perl et al., Gilteritinib or Chemotherapy for Relapsed or Refractory *FLT3*-Mutated AML, *N Engl J Med* 31 Oct 2019
153. Burnett AK, Russell NH, Hills RK, et al. Addition of gemtuzumabozogamicin to induction chemotherapy improves survival in older patients with acute myeloid leukemia. *J ClinOncol*. 2012, 30(32):3924-3931.

154. Castaigne S, Pautas C, Terré C, et al; Acute Leukemia French Association. Effect of gemtuzumabozogamicin on survival of adult patients with de-novo acute myeloid leukaemia (ALFA-0701): a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet*. 2012, 379(9825):1508-1516.
155. Hills RK, Castaigne S, Appelbaum FR, et al. Addition of gemtuzumabozogamicin to induction chemotherapy in adult patients with acute myeloid leukaemia: a meta-analysis of individual patient data from randomised controlled trials. *Lancet Oncol*. 2014, 15(9):986-996.
156. Cortes JE, Goldberg SL, Feldman EJ, et al. Phase II, multicenter, randomized trial of CPX-351 (cytarabine:daunorubicin) liposome injection versus intensive salvage therapy in adults with first relapse AML. *Cancer*. 2015, 121(2):234-242.
157. Lancet JE, Uy GL, Cortes JE, et al. Final results of a phase III randomized trial of CPX-351 versus 7+3 in older patients with newly diagnosed high risk (secondary) AML [abstract]. *J ClinOncol*. 2016, 34(suppl). Abstract 7000.
158. 151. Hui Yang,¹ Dan Ye,¹ Kun-Liang Guan,^{1,2} and YueXiong: IDH1 and IDH2 mutations in tumorigenesis: mechanistic insights and clinical perspectives, *Clin Cancer Res*. 2012 Oct 15, 18(20): 5562–5571.
159. Mark Levis: Targeting IDH: the next big thing in AML, *Blood* 2013 122:2770-2771
160. Nassereddine S^{1,2}, Lap CJ², Haroun F¹, Tabbara I: The role of mutant IDH1 and IDH2 inhibitors in the treatment of acute myeloid leukemia, *Ann Hematol*. 2017 Dec, 96(12):198
161. Gail J. Roboz, MD, Courtney D et al., .Ivosidenib (AG-120) Induced Durable Remissions and Transfusion Independence in Patients with IDH1-Mutant Untreated AML: Results from a Phase 1 Dose Escalation and Expansion Study, *Blood* November 29 2018.
162. Stephane De Botton, Joseph M Brandwein et al., Improved Overall Survival with Enasidenib Compared with Standard of Care Among Patients with Relapsed or Refractory Acute Myeloid Leukemia and IDH2 Mutations: A Propensity Score Matching Analysis Using Data from the AG221-C-001 Trial

and Two Data Sources from France and Germany, *Blood* November 13 2019.

163. Jorge E. Cortes, Florian H. Heidel et al. Randomized comparison of low dose cytarabine with or without glasdegib in patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia or high-risk myelodysplastic syndrome, *Leukemia* 2019.

164. Courtney D N, Keith Pratz et al., Venetoclax combined with decitabine or azacitidine in treatment-naive, elderly patients with acute myeloid leukemia, *Blood* 2019 Jan 3.

165. Andrew H Wei , Stephen A Strickland Jr et al., Venetoclax Combined With Low-Dose Cytarabine for Previously Untreated Patients With Acute Myeloid Leukemia: Results From a Phase Ib/II Study, *J ClinOncol* 2019 May 20.

166. FarhadRavandi, 1 Roland B. Walter,^{2,3} and Sylvie D. Freeman, Evaluating measurable residual disease in acute myeloid leukemia, *Blood Adv.* 2018 Jun 12, 2(11): 1356–1366.

167. R. P. Hearn and K. E. Arblaster, “DNA extraction techniques for use in education,” *BiochemMolBiolEduc*, vol. 38, no. 3, pp. 161–166, May 2010.

168. J. Winer, C. K. Jung, I. Shackel, et al., “Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes in vitro,” *Anal. Biochem.*, vol. 270, no. 1, pp. 41–49, May 1999. doi: 10.1006/abio. 1999.4085.

169. F. Sanger, S. Nicklen, and A. R. Coulson, “DNA sequencing with chain-terminating inhibitors,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 74, no. 12, pp. 5463–5467, Dec. 1977.

170. F. Sanger, G. M. Air, B. G. Barrell, et al., “Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA,” *Nature*, vol. 265, no. 5596, pp. 687–695, Feb. 1977.

171. L. M. Smith, J. Z. Sanders, R. J. Kaiser, et al., "Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis," *Nature*, vol. 321, no. 6071, pp. 674–679, 1986, doi: 10.1038/321674a0.

172. E. S. Lander, L. M. Linton, B. Birren, et al., "Initial sequencing and analysis of the human genome," *Nature*, vol. 409, no. 6822, pp. 860–921, Feb. 2001. doi: 10.1038/35057062.

173. Paschka P, Schlenk RF et al., IDH1 and IDH2 mutations are frequent genetic alterations in acute myeloid leukemia and confer adverse prognosis in cytogenetically normal acute myeloid leukemia with NPM1 mutation without FLT3 internal tandem duplication, *J Clin Oncol*. 2010 Aug 1.

174. Boissel N. et al. Prognostic impact of isocitrate dehydrogenase enzyme isoforms 1 and 2 mutations in acute myeloid leukemia: a study by the Acute Leukemia French Association group. *J Clin Oncol* 2010.

175. Aref S et al. Prevalence and clinical effect of IDH1 and IDH2 mutations among cytogenetically normal acute myeloid leukemia patients. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2015; 15: 550–555.6.

176. Patel, Mithat Gönen, et al., Prognostic Relevance of Integrated Genetic Profiling in Acute Myeloid Leukemia, *JAMA* 2012 March 22; 306(12): 1079–1089. doi:10.1056/NEJMoa1112304.

177. Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L et al. Genomic classification and prognosis in acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 374(23), 2209–2221 (2016).

VIII. ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

1. ΠΡΟΣΩΠΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

- Επώνυμο : Μπιτσάνη
- Όνομα : Αικατερίνη
- Πατρώνυμο : Αντώνιος
- Οικ. Κατάσταση : έγγαμη, 2 παιδιά
- Εθνικότητα : Ελληνική
- Τόπος γεννήσεως : Αθήνα
- Ημερ. Γεννήσεως : 30 Ιουλίου 1978
- Τηλέφωνο: 2106218955
- Κινητό : 6972714560
- e-mail : kbitsani@gmail.com
- Διεύθυνση κατοικίας : Απτέρου Νίκης 1, Δροσιά (Τ.Κ 14572)

2. ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ- ΔΙΠΛΩΜΑΤΑ

2Α. ΕΓΚΥΚΛΙΕΣ ΣΠΟΥΔΕΣ

1984-1996 : Δημοτικό, Γυμνάσιο, Λύκειο Δροσιάς

2B. ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

1996 – 2002 : Τμήμα Ιατρικής «Grigore.T.Popa University o Medicine and Pharmacy», Ιάσιο

Πτυχίο Ιατρικής με χαρακτηρισμό «Λίαν καλώς» : 18 Οκτωβρίου 2002

Άδεια Άσκησης Ιατρικού Επαγγέλματος από τη Διεύθυνση Δημόσιας Υγείας του Τομέα Ανατολικής Αττικής της Νομαρχίας Αθηνών: 4 Αυγούστου 2004

2Γ. ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

2Γ1. Ειδίκευση στην Αιματολογία

- 21 Αυγούστου 2006 – 22 Μαΐου 2008 : Ειδίκευση στην Παθολογία στη Β΄ Παθολογική Κλινική στο 1^ο Νοσοκομείο ΙΚΑ, τρίμηνη εκπαίδευση στη Μονάδα Ειδικών Λοιμώξεων
- Παράταση παραμονής στο 1^ο Νοσοκομείο ΙΚΑ μέχρι τις 10 Σεπτεμβρίου 2008
- 15 Απριλίου 2009 – 10 Νοεμβρίου 2013 : Ειδίκευση στην Αιματολογία στην Α΄ Προπαιδευτική Παθολογική Κλινική, Γ.Ν.Α Λαϊκό
- Εκπαίδευση στην Αιματολογική – Λεμφωμάτων Κλινική και Μονάδα Μεταμόσχευσης Μυελού των Οστών στο Γ.Ν.Α Ευαγγελισμός από 20 Μαρτίου 2013 έως 20 Σεπτεμβρίου 2013
- Λήψη τίτλου ειδικότητας Αιματολογίας : 19 Μαρτίου 2014

2Γ2. Διδακτορική Διατριβή

Υποψήφια Διδάκτωρ διατριβής που εκπονείται στην Α΄ Προπαιδευτική Παθολογική Κλινική με τίτλο «Μεταλλάξεις γονιδίων στην Οξεία Μυελογενή Λευχαιμία, συσχέτιση με τους ισχύοντες προγνωστικούς παράγοντες στα ποσοστά ύφεσης, υποτροπής, ολικής επιβίωσης.», επιβλέπων Καθηγητής κ. Παναγιώτης Παναγιωτίδης, Καθηγητής Αιματολογίας ΕΚΠΑ

3. ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΥΠΑΙΘΡΟΥ

Ιατρός υπόχρεος Υπηρεσίας Υπαίθρου από 7 Δεκεμβρίου 2004 έως 31 Ιουλίου 2006 στο Περιφερειακό Ιατρείο Γιαννιτσούς-Κέντρο Υγείας Μακρακώμης, το οποίο υπάγεται στο Γενικό Νοσοκομείο Λαμίας.

5. ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΟΥΣ ΣΥΛΛΟΓΟΥΣ ΚΑΙ ΕΝΩΣΕΙΣ

Ελληνική Αιματολογική Εταιρεία

Ιατρικός Σύλλογος Αθηνών (Α.Μ. 061681)

6. ΛΟΙΠΗ ΕΡΓΑΣΙΑΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

- Επιστημονικός Συνεργάτης της Α' Προπαιδευτικής Παθολογικής Κλινικής από 1η Οκτωβρίου 2014 έως 20 Μαΐου 2015
- Επικουρικός Ιατρός στην Α' Προπαιδευτική Παθολογική Κλινική από 21 Μαΐου 2015 έως 31 Δεκεμβρίου 2018
- Ακαδημαϊκή Υπότροφος ΕΚΠΑ από τις 19 Φεβρουαρίου 2019 έως 9 Ιουλίου 2020
- Επικουρική Ιατρός στην Α' Προπαιδευτική Παθολογική Κλινική από 10 Ιουλίου 2020-έως σήμερα
- Συμμετοχή στις ακόλουθες διεθνείς κλινικές μελέτες με κύριο ερευνητή τον Καθηγητή Αιματολογίας κ. Παναγιώτη Παναγιωτίδη: Abbvie M16-043, Chronos 3, Chronos 4, INCMOR 0208-301 inMIND, SYMPATICO PCYC-1143—CA, ACE-536-MF-002, ENERGY MOM-M281-006, TP0003.
- Συμμετοχή στις ακόλουθες διεθνείς κλινικές μελέτες με κύρια ερευνήτρια την Καθηγήτρια Αιματολογίας κ.Μαρία-Χριστίνα Κυρτσώνη : Millenium C16019, Millenium C16020, CC-5013-MM-026, PCYC-1139-CA, EFC14335/ICARIA-MM, CA204-125

7. ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ ΚΑΙ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΑ ΣΕΜΙΝΑΡΙΑ

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. Among Microenvironmental Cytokines With Biologic Activity in MM (IL-6, IL-6R, Syndecan-1, VEGF, bFGF, TGF-BETA, IGF, MIP, OPG RANKL, MMP-2, MMP-9, BlyS), Only Serum Soluble Syndecan-1 Correlates with FLCR; Suggested Role in FLC Secretion Control.

D. Maltezas, E. Koulieris, T. Tzenou, A. Papadogiannis, V. Bartzis, K. Bitsanis, A. Efthymiou, J. Vardouniotis, V. Karali, E. Nikolaou, M. Dimou, N. Stavropoulos, N. Kafassi, X. Papanikolaou, T.P. Vassilakopoulos, M. Kotsopoulou, P. Tsaftaridis, K. Megalakaki, P. Repousis, P. Panayiotidis, G.A. Pangalis, M-C Kyrtsolis.

17th Congress of the European Hematology Association, Amsterdam-The Netherlands, 14-17 June 2012.

Haematologica 2012; 97(s1):0863, p355

2. Prognostic Contribution of Uninvolved Serum Free Light Chains (usFLC) in Multiple Myeloma (MM) Patients. E. Koulieris, D. Maltezas, T. Tzenou, N. Kafassi, A. V. Bartzis, K. Bitsanis, A. Efthymiou, J. Vardouniotis, V. Karali, E. Nikolaou, M. Dimou, P. Tsaftaridis, M.K. Angelopoulou, P. Panayiotidis, G.A. Pangalis, M-C Kyrtsolis, Haematologica 2012; 97(s1):1514, p601

17th Congress of the European Hematology Association, Amsterdam-The Netherlands, 14-17 June 2012.

3. The role of cxc-chemokines IL-6, IL-8 and CXCR2 Receptor in lymphoplasmacytic lymphoma: correlations with microvascular characteristics and clinical features.

Georgia Levidou, Tatiana Tzenou, Marie-Christine Kyrtsolis, Eftychia Nikolaou, Nikolaos Kavantzias, Dimitris Maltezas, Katerina Xirokosta, Efsthios Koulieris, Athanasia Sepsa, Katerina Bitsanis, Ilias Pessach, Vassiliki Bartzis, Maria Dimou, Panayiotis Panayiotidis, Gerassimos A. Pangalis, Efstratios Patsouris, Penelope Korkolopoulou.

18th Congress of the European Hematology Association, Stockholm, Sweden June 13-16, 2013

4. Rare Clinical Manifestations in Waldenstrom's Macroglobulinemia/Lymphoplasmacytic lymphoma

Tatiana Tzenou, Eftychia Nikolaou, E. Bitsani, Vassiliki Bartzis, M. Dimou, M.A. Angelopoulou, Petros Sfikakis, Panayiotis Panayiotidis, G. Pangalis, Marie - Christine Kyrtsionis.

8th International Workshop on Waldenström's Macroglobulinemia and Symposium on Advances in Multiple Myeloma, London, UK August 13-17, 2014

5. Comparison of response duration (RPD) after Thalidomide, Bortezomib and Lenalidomide administration to Multiple Myeloma (MM) Patients; A single center experience.

Marie-Christine Kyrtsionis, Eftychia Nikolaou, Dimitrios Maltezas, Efstathios Koulteris, Theodoros Iliakis, Katerina Sarris, Eleonora Vyniou, Ioanna Vardounioti, Anna Efthymiou, Katerina Bitsani, Vasiliki Karali, Ilias Pessach, Vasiliki Bartzis, Tatiana Tzenou, Maria Dimou, Theodoros Vassilakopoulos, Maria Angelopoulou, Panayiotis Tsaftaridis, Panayiotis Panayiotidis.

19th Congress of the European Hematology Association, Milan-Italy, 12-15 June 2014

6. Markers of Disease Evolution in Smoldering Multiple Myeloma

Eftychia Nikolaou, Tatiana Tzenou, Aikaterini Bitsani, Vasiliki Bartzis, Sotiria Kotsanti, Efstathios Koulteris, Maria Dimou, Dimitrios Maltezas, Theodoros Iliakis, Panayiotis Panayiotidis, Marie-Christine Kyrtsionis.

20th Congress of the European Hematology Association, Vienna-Austria 11-14 June 2015

7. Retrospective Refining of Diagnosis in 286 MGUS and SMM Patients According to the Updated IMGW Criteria. Clinical Implications

Marie-Christine Kyrtsionis, Eftychia Nikolaou, Tatiana Tzenou, Vasiliki Bartzis, Aikaterini Bitsani, Sotiria Kotsanti, Maria Dimou, Theodoros Iliakis, Maria Angelopoulou, Theodoros Vassilakopoulos, Panayiotis Panayiotidis.

20th Congress of the European Hematology Association, Vienna-Austria 11-14 June 2015

8. Serum Free Light Chain (FLC) And Soluble Syndecan-1 Levels are major markers of disease evolution of Smoldering Multiple Myeloma (SMM) Patients

Nikolaou E, Maltezas D, Koulteris E, Iliakis T., Vyniou N.A., Kotsanti S., Bitsani A., Bartzis V., Tzenou T., Dimou M., Panayiotidis P., Kyrtsionis M.C.

7th International Symposium: Clinical Applications of Free Light Chain and

Heavy/Light Chain Analysis, Edinburgh, 16-17 April 2015

9. Immunoglobulin (Ig) Quantitative Measurements By Hevylite in Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) reveal frequently abnormal ratios related to a shorter time to treatment

M-C Kyrtsionis, K. Tsalimalma, E. Koulieris, K. Sarri, E. Nikolaou, S. Kotsanti, A. Dimitrakopoulou, N. Kafasi, V. Bartzis, T. Tzenou, S. Sachanas, K. Bitsani, M. Dimou, T.P. Vassilakopoulos, M. K. Angelopoulou, C. Kalpadakis, C. Matsouka, G.A. Pangalis, P. Panayiotidis.

7th International Symposium: Clinical Applications of Free Light Chain and Heavy/Light Chain Analysis, Edinburgh, 16-17 April 2015

10. European School of Haematology, Acute Leukemias, Budapest, 4-6 May 2018

11. 29^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο, Θεσσαλονίκη, 1-4 Νοεμβρίου 2018

12. 2019 highlights of ASH in the Mediterranean, 15-16 Μαρτίου 2019

13. 24th European Hematology Association Annual Congress, Amsterdam, Netherlands, 13-16 June 2019

14. 2020 Highlights of ASH in the Mediterranean, 21-22 Φεβρουαρίου 2020

ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΕΣ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

1. No impact of systemic hypogammaglobulinemia (SH) and immunosuppression of the same Ig class (ISC) on time to first treatment and overall survival in Waldenstrom's macroglobulinemia (WM) patients.

E. Koulieris, M.A. Dimopoulos, S. Harding, D. Maltezas, T. Tzenou, E. Kastiris, V. Bartzis, A. Efthymiou, C. Mpitsanis, I. Pessach, M. Gavriatopoulou, A.R. Bradwell, P. Panayiotidis, E. Terpos, M.C. Kyrtsionis
Haematologica- The haematology journal, 96: p.156 P-430 Suppl. 1 May 2011

2. Development of Acute Myeloid Leukemia with NPM1 mutation, in Ph-negative clone, during treatment of CML with Imatinib.

George Georgiou, Anna Efthymiou, Ioanna Vardounioti, George Boutsikas, Maria K. Angelopoulou, Theodoros P. Vassilakopoulos, Marie-Christine Kyrtsolis, Eleni Plata, Polydoros Tofas, Aikaterini Bitsani, Vassiliki Bartzi, Ilias Pessach, Maria Dimou, Panayiotis Panayiotidis

Leukemia. 2012 Letter to the Editor Apr;26(4):824-6.

3. Autoimmune hemolytic anemia and autoimmune thrombocytopenia at diagnosis and during follow-up of Hodgkin lymphoma.

Dimou M, Angelopoulou MK, Pangalis GA, Georgiou G, Kalpadakis C, Pappi V, Tsopra O, Koutsoukos K, Zografos E, Boutsikas G, Moschogianni M, Vardounioti I, Petevi K, Karali V, Kanellopoulos A, Ntalageorgos T, Yiakoumis X, Bartzis V, Bitsani A, Pessach E, Efthymiou A, Korkolopoulou P, Rassidakis G, Kyrtsolis MC, Patsouris E, Meletis J, Panayiotidis P, Vassilakopoulos TP.

Leuk Lymphoma. 2012 Aug;53(8):1481

4. Prognostic Contribution of the New Immunoglobulin (Ig) Biomarkers (Freelite™ and Hevylite™) in Waldenstrom's Macroglobulinemia (WM)
- M-C. Kyrtsolis, E. Koulteris, D. Maltezas, T. Tzenou, S. Harding, E. Kastritis, N. Kafassi, V. Bartzis, A. Efthymiou, K. Bitsanis, M. Gavriatopoulou, E. Terpos, C. Kalpadakis, M. K. Angelopoulou, T. P. Vassilakopoulos, A. R. Bradwell, Ph. Beris, G. A. Pangalis, P. Panayiotidis, M. A. Dimopoulos.

American Journal of Medicine and Medical Sciences 2012, 2(6): 136-143

5. Prognostic Contribution of Uninvolved Serum Free Light Chains (usFLC) in Multiple Myeloma (MM) Patients.

E. Koulteris, D. Maltezas, T. Tzenou, N. Kafassi, A. V. Bartzis, K. Bitsanis A. Efthymiou, J. Vardouniotis, V. Karali, E. Nikolaou, M. Dimou, P. Tsaftaris, M.K. Angelopoulou, P. Panayiotidis, G.A. Pangalis, M-C Kyrtsolis.

Haematologica 2012; 97(s1):1514, p601

6. Among Microenvironmental Cytokines With Biologic Activity in MM (IL-6, IL-6R, Syndecan-1, VEGF, bFGF, TGF-BETA, IGF, MIP, OPG RANKL, MMP-2, MMP-9, BLYS), Only Serum Soluble Syndecan-1 Correlates with FLCR; Suggested Role in FLC Secretion Control.

D. Maltezas, E. Koulieris, T. Tzenou, A. Papadogiannis, V. Bartzis, K. Bitsanis, A. Efthymiou, J. Vardouniotis, V. Karali, E. Nikolaou, M. Dimou, N. Stavropoulos, N. Kafassi, X. Papanikolaou, T.P. Vassilakopoulos, M. Kotsopoulou, P. Tsaftaridis, K. Megalaki, P. Repousis, P. Panayiotidis, G.A. Pangalis, M-C Kyrtsionis.

Haematologica 2012; 97(s1):0863, p355

7. The Role of CXC–Chemokines IL-6, IL-8 and CXCR2 Receptor in Lymphoplasmacytic Lymphoma: Correlations with Microvascular Characteristics and Clinical Features. Levidou G, Tzenou T, Kyrtsionis MC, Nikolaou E, Kavantzias N, Maltezas D, Xirokosta K, Koulieris E, Sepsa A, Bitsanis K, Pessach I, Bartzis V, Dimou M, Panayiotidis P, Pangalis Ga, Patsouris E, Korkolopoulou P.

Current Angiogenesis 2013; (2)2: 110-118.

8. Prognostic Significance Of Serum Free Light Chains In Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL). Sarris K, Maltezas D, Koulieris E., Bartzis V., Tzenou T, Sachanas S, Nikolaou E, Efthymiou A, Bitsani K., Dimou M, Vassilakopoulos TP, Siakantaris M, Angelopoulou MK, Kontopidou F, Tsaftaridis P, Kafasi N, Pangalis GA, Panayiotidis P, Harding S, Kyrtsionis MC.

Adv Hematol. 2013;2013:359071. doi: 10.1155/2013/359071. Epub 2013 Oct 29.

9. Aberrant Immunoglobulin Variations as Indicators of Eventual Clonal Changes in Symptomatic Multiple Myeloma Patients' Course.

Nikolaou E, Koulieris E, Maltezas D, Sarris A, Iliakis T, Byniou NA, Vardounioti I, Karali V, Pessach I, Efthymiou A, Bitsani A, Bartzis V, Tzenou T, Dimou M, Vassilakopoulos TP, Angelopoulou MK, Tsaftaridis P, Tsalimalma K, Kafasi N, Panayiotidis P and Kyrtsionis M-C.

Current Cancer Therapy Reviews 2014; (10)2: 90-96

10. Multiple Myeloma and Chronic Myelogenous Leukemia; an Uncommon Coexistence in 2 Patients, with Literature Review
Pessach I, Bartzis V, Tzenou T, Roumelioti M, Palaiologou D, Nikolaou E, Konstantis S, Bitsani K, Panayiotidis P and Kyrtsolis MC.
AnnHematolOncol. 2015;2 (3): 1030
11. Uninvolved Immunoglobulin Suppression Determined by “Hevylite” ASSAY. Strongly Predicts Evolution Of Smoldelirg Myeloma (SMM) to Symptomatic Multiple Myeloma (MM)
Paraskevi Papaioannou, Annita Gkioka, Kallirroï, Tsalimalma, Aspasia Koudouna, Anastasia Kopsaftopoulou, Konstantina Chalmoukou, Ioannis Grafakos, Aikaterini Bitsani, Theodoros Iliakis, Maria Dimou, Nikolitsa Kafassi, Petros Sfikakis, Panayiotis Pnayiotidis, Marie-Christine Kyrtsolis
Blood 2018, 132:5584
12. Efficacy and safety of facilitated subcutaneous immunoglobulin administration for immunoglobulin replacement in patients with secondary immune deficiency due to hematological malignancies. A single-center retrospective analysis.
Dimou Maria; Iliakis Theodoros; Bitsani, Catherin; Maltezas, Dimitris; Kalyva, Sotiria; Koudouna, Aspasia; Kotsanti, Sotiria; Petsa, Panayiota; Papaioannou, Paraskevi; Kyrtsolis, Marie-Christine; Panayiotidis, Panayiotis
Leukemia and Lymphoma 2019
13. Safety and efficacy analysis of long-term follow up real world data with ibrutinib monotherapy in 58 CLL patients treated in a single-center in Greece.
Dimou Maria, Iliakis Theodoros, Pardalis Vasileios, Bitsani Catherin, Vassilakopoulos Theodoros P, Angelopoulou Maria, Tsaftaridis Panagiotis, Papaioannou Paraskevi, Koudouna Aspasia, Kalyva Sotiria, Kyrtsolis Marie-Christine, Panayiotidis Panayiotis
Leukemia and Lymphoma 2019
1. “Prognostic significance of *IDH1* and *IDH2* mutations in Greek patients with newly diagnosed AML”

Aikaterini Bitsani, Anna Efthymiou, Maria Roumelioti, EftychiaStaikou, AggelikiStefanou, DanaiPalaiologou, Georgios Boutsikas, Georgios Georgiou, Maria-Christina Kyrtsonis, Panayiotis Panayiotidis, Haema 2021

8. ΕΠΙΠΛΕΟΝ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

1. Ομιλούμενη γλώσσα : Αγγλικά (Proficiency)
2. Γνώσεις Ηλεκτρονικών Υπολογιστών

IX. ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΗ

Prognostic significance of IDH1 and IDH2 mutations in Greek patients with newly diagnosed AML

Aikaterini Bitsani, Anna Efthymiou, Maria Roumelioti, Eftychia Staikou, Aggeliki Stefanou, Danai Palaiologou, Georgios Georgiou, Georgios Boutsikas, Maria-Christina Kyrtsonis, Panayiotis Panayiotidis

Hematology section, First Department of Propaedeutic Internal Medicine, Laiko General Hospital, National and Kapodistrian University of Athens Medical School

Introduction

Acute Myeloid Leukemia (AML) is a clonal hematological malignancy characterized by the accumulation of blast cells in the bone marrow, peripheral blood or other tissue.¹It is a heterogenous disease clinically, morphologically and genetically. The requisite blast percentage for the diagnosis of AML is at least 20% myeloblasts, monoblasts/promonocytes or megakaryoblasts in the bone marrow. A diagnosis of AML is also established when the blast percentage in the peripheral blood or bone marrow is less than 20%, if there is an associated t(8;21)(q22;q22.1), inv(16)(p13.1q22), or t(16;16)(p13.1;q22) chromosomal abnormality or a *PML-RARA* fusion gene. Conventional karyotype has remained one of the most important prognostic factors in AML.²

The role of genetic alterations in AML has been emphasized by the 2008 revised WHO classification of AML when, for the first time, AML with molecular genetic changes have been incorporated as provisional entities, that is, as AML with mutated *NPM1* and AML with mutated *CEBPA*.³ In the 2016 revised WHO classification of AML a new entity is introduced, which is AML with biallelic mutations of *CEBPA*, and a new provisional entity constitutes AML with mutated *RUNX1*. According to the 2017 ELN AML Recommendations⁴,

as far as *NPM1* and *FLT3* is concerned, patients with *NPM1* mutation and *FLT3-ITD* with a low (<0.5) allelic ratio (*FLT3-ITD*^{low}) have a similar (favorable) outcome as patients with a *NPM1* mutation but no *FLT3-ITD*, thus, both groups are now considered favorable. In contrast, AML with wild type *NPM1* and *FLT3-ITD* with a high (>0.5) allelic ratio (*FLT3-ITD*^{high}) has a poor prognosis and is placed in the adverse risk group⁵.

AML development is considered a multistep process that requires the contribution of at least two classes of mutations to evolve to full-blown leukemia. The “two-hit model” was first described by Gilliland and Griffin⁶. It includes class I mutations that activate signal transduction pathways and allow a proliferation advantage on hematopoietic cells and class II mutations that affect transcription factors and primarily block hematopoietic differentiation.^{7,8} Many of the newly identified genetic alterations, such as those *DNMT3A*, *TET2*, *IDH1*, *IDH2*, *NPM1*, *ASXL1*, had not been classified because the consequences of these mutations were not yet fully identified and the term “unclassified” mutations was used for this category. Recently, Metzeler et al, reported the presence of several recurrently mutated genes in acute myeloid leukemia by performing next generation sequencing and other high-throughput techniques.⁹ Most frequent mutations are those that lead to aberrant regulation of DNA methylation and hydroxymethylation (*DNMT3A*, *TET2* and *IDH1/2*), altered messenger RNA splicing by the U2 complex (*SF3B1*, *SRSF2*, *U2AF1*), modified chromatin architecture (*ASXL1*, *EZH2* and *KMT2A*) and transcriptional deregulation (*CEBPA*, *RUNX1* and *WT1*)¹⁰. Isocitrate dehydrogenases (*IDHs*) are a group of homo-dimeric enzymes that represent one of the epigenetic regulators known to be functionally altered in leukemia. Both *IDH1* and *IDH2* enzymes catalyse the oxidative decarboxylation of isocitrate to α -ketoglutarate (α -KG) to produce NADPH from NADP⁺. The presence of adequate cellular levels of α -KG is essential for the appropriate function of multiple deoxygenases involved in metabolic and epigenetic regulation^{11,12}. In mammalian cells, three classes of IDH isoenzymes exist: mitochondrial NAD-dependent *IDH*, mitochondrial NADP-dependent *IDH*, and cytosolic NADP-dependent *IDH*. *IDH1* is a cytosolic enzyme, while its homolog, *IDH2*, is found in the mitochondria. The

first association between *IDH* mutation and malignancy was reported in gliomas. Somatic mutations in *IDH1* and *IDH2* are observed in up to 20% of patients with AML and occur as early clonal events in disease evolution. Although their prognostic relevance still remains unclear, their impact in patient prognosis seems to be affected by mutation locus and other co-occurring mutational events. *IDH1* and *IDH2* mutations lead to a mutant protein with neomorphic function that results in production of an oncometabolite, named R-enantiomer of hydroxyglutarate (R-2-HG). As a result of this process, inhibition of *TET2* leads to altered DNA and histone methylation and DNA hypermethylation. Altered gene expression through *PU.1*, *RUNX1*, *GATA1*, *CEBPA*, and other transcription factors result in impaired differentiation, cell proliferation and DNA damage. Secretion of R-2-HG by the leukemic cell activates ERK signaling and NFκB in stromal cells leading to production of IL-6, IL-8, and C5, which stimulate leukemic cell proliferation¹³.

The human NADP-dependent *IDH1* enzyme is encoded by the *IDH1* gene at chromosome band 2q33 and is localized in cytoplasm and peroxisomes. The mitochondrial NADP-dependent *IDH2* enzyme is encoded by the *IDH2* gene at chromosome band 15q26.1. Although both *IDH1* and *IDH2* are thought to be involved in the cellular defense of oxidative damage, *IDH1* has also an important role in lipid metabolism. In myeloid malignancies, *IDH1* mutations most often involve a cysteine (R132C) or histidine (R132H) substitution for arginine at residue R132. In *IDH2* mutations, arginine is most often replaced by glutamine at residue 140 (R140Q) and by lysine at residue 172 (R172K). *IDH2*-R140 mutations are more common than *IDH2*-R172 mutations, representing ~ 80% of *IDH2* mutations in AML.

IDH1 and *IDH2* mutations tend to be mutually exclusive. Abnormal gene expression due to *IDH1* and *IDH2* mutations are mediated by several R-2HG-dependent epigenetic mechanisms, including: 1) aberrant DNA hypermethylation secondary to *TET2* inhibition and 2) effects on histone modifications and transcriptional regulation.¹⁴

IDH-mutant AML represents approximately 20% of all AML cases and is characterized by shared clinical features. They are typically present in older patients who tend to have higher platelet count, higher bone marrow and peripheral blast percentage and greater degree of neutropenia at the time of presentation. *IDH* mutations are usually observed in patients with intermediate risk cytogenetics, including trisomy 8 and normal karyotype AML. Additionally, they represent early genomic events in disease pathogenesis and evolution, since they are present in dominant clones and persist even after chemotherapy or at the time of relapse or disease progression.^{15,16} *IDH1* mutations are less common than *IDH2* mutations in AML and in MDS.¹⁷ Finally, a number of studies have evaluated the clinical and prognostic effect of R-2-HG levels, their potential use in screening for *IDH* mutations and their role through therapy and disease evolution.¹⁸ There was a great interest concerning the role of *IDH1* and *IDH2* in leukemogenesis around 2010 and a number of studies tried to assess the frequencies of the above mentioned mutations and to explore their association with clinical, cytogenetic, and molecular characteristics as well as with outcome in younger adults with AML.

Patients and Methods

One hundred and twenty-six (126) newly diagnosed AML patients were retrospectively studied in one Hematology Department of Laiko General Hospital between 1995 and 2010. Medical records were reviewed for demographic and clinical data, FAB classification, karyotypic analysis, treatment strategies and outcome of the patients. Genomic DNA from pretreatment bone marrow was available for all the 126 patients and was analyzed for the *FLT3*, *NPM1* and *IDH1/IDH2* genes.

Detection of *NPM1* mutations was performed by polymerase chain reaction (PCR) and fragment analysis. To amplify the exon 12 of *NPM1*, we used a fluorescently labeled forward primer 5-(dyeD4) TGTCTATGAAGTGTTGTGGTTCCTT-3 (Sigma-Aldrich) and a reverse primer 5-CGGTAGGGAAAGTTCTCACTCTG-3 (Sigma-Aldrich). DNA was amplified using the Hot Star Taq Plus Master Mix Kit (Qiagen). Fluorescent PCR

products were subjected to capillary electrophoresis on denaturing polyacrylamide gel and analyzed by CEQ 8000 Genetic Analysis System (Beckman Coulter). Samples from healthy controls show one peak at 201bp. As all *NPM1* mutations result in the insertion of 4 nucleotides, the mutated profile was defined by the presence of an additional peak at 204 bp.

Detection of *FLT3-ITD* mutations was performed by polymerase chain reaction (PCR) and fragment analysis as previously described. To amplify the exons 14 and 15 of *FLT3*, we used a forward primer 5'-GCAATTTAGGTATGAAAGCCAGC-3' (Sigma-Aldrich) and fluorescently labeled reverse primer 5-(dyeD3): CTTTCAGCATTGACGGCAACC-3' (Sigma-Aldrich). Samples from healthy controls show one peak at 329bp. The amplicons with a size greater than that of wild type were interpreted as positive for the ITD mutation. The *FLT3-ITD* mutant allelic burden was calculated as the ratio of the area under the curve of mutant and wild-type alleles (mutant/total *FLT3*).

IDH1 mutations were detected by multiplex allele-specific PCR (AS-PCR) and agarose gel electrophoresis. To amplify the exon 4 of *IDH1*, we used a forward (internal control) primer 5'-TGAGAAGAGGGTTGAGGAGTTCAAGT-3' (Sigma-Aldrich), a reverse primer 5'-AATGTGTTGAGATGGACGCCTATTTGT-3' (Sigma-Aldrich) and a mix of specific forward primers that are mutant specific for the following mutations R132C, R132G, R132H, R132L, R132P, R132S:

R132C: 5-TGGATGGGTAAAACCTATCATCATAGATT-3,

R132G: 5-TGGATGGGTAAAACCTATCATCATAGATG-3,

R132H: 5-GGATGGGTAAAACCTATCATCATAGGACA-3,

R132L: 5-GGATGGGTAAAACCTATCATCATAGGACT-3,

R132P: 5-GGATGGGTAAAACCTATCATCATAGGACC-3,

R132S: 5-TGGATGGGTAAAACCTATCATCATAGATA-3

DNA was amplified using the Hot StarTaq Plus Master Mix Kit (Qiagen) and PCR products were analyzed by agarose gel electrophoresis. Samples with wild type alleles give a 502-bp product. The amplicons with an extra lower band than that of wild type, were interpreted as positive for one of the specific *IDH1* mutations. In order to further characterize the mutation we repeated the amplification of the DNA sample with 6 separate PCRs, using each time one of mutant specific forward primer and the common reverse.

IDH2 mutations were detected by polymerase chain reaction (PCR) and Sanger sequencing. Amplification and sequencing of *IDH2* exon 4 was performed using the following primers, forward 5'-GGGGTTCAAATTCTGGTTGA -3 (Sigma-Aldrich) and reverse 5'-CTAGGCGAGGAGCTCCAGT -3 (Sigma-Aldrich). The PCR products were sequenced using the CEQ 8000 Genetic Analysis System (Beckman Coulter) and the analysis of the bidirectional sequence traces was performed using Seq Man Pro (DNASTAR, Inc) using as a reference the genomic sequence of the *IDH2* gene (NM_002168).

All patients were stratified in favorable, intermediate or adverse prognostic subgroup according to ELN risk stratification system 2017⁴. The baseline characteristics of the patients, such as age and gender, FAB subtype, karyotype, risk stratification subgroup, *NPM1* mutation and *FLT3* status were evaluated. *IDH1/IDH2* in this study group were correlated with demographic characteristics of the patients, FAB subtype, conventional cytogenetic findings, the risk stratification group, *NPM1* and *FLT3* status.

Furthermore, in patients that received standard chemotherapy with or without allo-SCT (instead of palliative care) for AML, including anthracycline and cytarabine as induction therapy and cytarabine-containing regimens as consolidation, *IDH* mutation status was correlated with the occurrence of death during induction therapy as well as with the resistance of the disease to the treatment.

Survival analysis was restricted to the patients that received standard chemotherapy for AML and who not die during induction therapy, that their disease was not characterized as primary refractory and those who were not

intended for allogeneic stem cell transplantation a priori. The last category includes those patients who were scheduled for allogeneic stem cell transplantation at diagnosis and proceeded at first complete remission.

Survival analysis was restricted to the above mentioned groups of patients, that treatment approach is not considered standardized, in order to investigate the impact of the *IDH* status on RFS and OS. Moreover, since the impact of isolated *IDH* mutations has been extensively studied especially in patients with normal cytogenetics, we studied the correlation of isolated *IDH* mutations with RFS and OS in patients with normal karyotype that were not intended a priori for allo-SCT and were not characterized as primary refractory.

Relapse Free Survival (RFS) was defined as the time between disease diagnosis and relapse or death from any cause or last follow up. Overall Survival (OS) was defined as the time between disease diagnosis and death from any cause or last follow up.

The Chi square test was used for correlations between categorical variables. Cox models were used to identify prognostic values. Kaplan-Meier method was used to estimate the distribution of RFS and OS. All statistical analyses were performed using SPSS package for Windows.

Results

One hundred and twenty-six (126) patients diagnosed with Acute Myeloid Leukemia (AML) in one Greek Hematology Department from 1995 to 2010 were retrospectively analyzed. There was an equal distribution between the two genders (males 63/126 and females 63/126). 52% of patients were <60 years old (65/126) and 48% were ≥60 years old (61/126). M2 AML subtype according to the FAB classification, was the most frequent subtype (40%) excluding M3 subtype from the results. Normal karyotype was found in 62/126 (53% of patients), whereas 54/126 (47%) had cytogenetic abnormalities. Patients were stratified into risk groups according to the 2017 ELN recommendations, 30% (37/126), 56% (71/126), 14% (18/126) of patients were classified in the favorable, intermediate and adverse risk group

respectively. *NPM1* mutations were detected in 39/126 (31% of the study group), while *FLT3-ITD* mutations were detected in 24/126 (19%). The patients' characteristics are summarized in Table 1.

IDH mutations were observed in 17/126 (13.5%). *IDH1* mutations were detected in 6/126 (4.8%), *IDH2* in 9/126 (7.1%) and *IDH1* and *IDH2* mutations (dual mutations) in 2/126 (1.6%). The R132H mutation was the most prevalent type of *IDH1* mutation, while the R140Q was the most prevalent type of *IDH2* mutation. The correlation of the *IDH* status with the patients' characteristics and the corresponding prognostic values is summarized in Table 2.

The presence of *IDH* mutations was not associated neither with gender (male vs female, $p=0.118$) nor with age (<60 vs ≥ 60 , $p=0.508$). Additionally, *IDH* mutations were not correlated with any FAB subtype ($p=0.526$) and were not associated with karyotype ($p=0.168$). *IDH* mutations were associated with the presence of *NPM1* mutation (*IDH* mutations were present in 10/39 of *NPM1* mutated patients, whereas in *NPM1* wild type patients, *IDH* mutations were present in 7/87, $P=0.017$). There is no association with the presence of *FLT3-ITD* mutations (*IDH* mutations were present in 3/24 of *FLT3-ITD* mutated patients ($p=1.0$)). Also, there is no significant correlation between *IDH* status and risk stratification group. Furthermore, *IDH* mutations did not seem to correlate: a) with the occurrence of death during induction therapy ($p=1.0$) in patients that received standard treatment for AML b) with the resistance of the disease in the treatment ($p=1.0$) in patients that received standard treatment for AML and that did not die during induction therapy.

Additionally, survival analysis in the subgroup of patients mentioned above, revealed that *IDH* status is not related significantly with RFS (Figure 1) or OS (Figure 2) in this patients' subgroup ($p=0.753$ and $p=0.852$ respectively).

When we performed multivariate analysis *FLT3-ITD* and age ≥ 60 years were found to be independent prognostic factors for RFS and OS in this group of patients. Consequently, we investigated whether the *IDH* status was correlated with RFS or OS in the subgroup of patients with the aforementioned characteristics that were also *FLT3* unmutated and <60 years old. It was found that patients with mutated *IDH* status have marginally inferior

RFS in comparison with patients with unmutated *IDH* status (Figure 3, $p=0.092$), while there was no significant difference in terms of OS (Figure 4, $p=0.491$). We further analysed the impact of isolated *IDH* mutations on RFS and OS and we observed that when *IDH1* mutated patients compared with *IDH2* mutated or unmutated *IDH* status patients, they seemed to have an inferior RFS (Figure 5, $p=0.203$) as well as OS (Figure 6, $p=0.219$), although not statistically significant. When we analysed only the subgroup of patients with *IDH1* mutations, we observed that it seems have inferior outcome in terms of RFS (Figure 7, $p=0.1$) and OS (Figure 8, $p=0.255$), although the statistical significance is not significant. When we analysed only the subgroup of patients with *IDH2* mutations we observed that it seems to have favorable outcome in terms of RFS (Figure 9, $p=0.542$) and OS (Figure 10, $p=0.626$), although the statistical significance failed to be demonstrated. When we compared *IDH1* mutant patients to *IDH2* ones, we observed significantly superior RFS (Figure 11, $p=0.005$) and but not statistically significant favorable outcome in OS (Figure 12, $p=0.456$) in *IDH2* mutant patients.

We compared separately *IDH2* mutated patients vs wild-type and we observed that patients with mutations *IDH2 R172* and *IDH2 R140Q* presented the most favorable prognostic impact (Figure 13, $p=0.188$).

Discussion

In this retrospective study of one hundred and twenty-six 126 newly diagnosed patients with AML, we evaluated the frequency of *IDH* mutations, their association with other patients' characteristics, as well as, karyotypic and molecular data and additionally their impact on RFS and OS.

There was an equal distribution between the two genders and as far as the age is concerned, 52% of patients were <60 years old and 48% were ≥60 years old. Normal karyotype was found in 53% of patients, whereas 47% had cytogenetic abnormalities. Patients were stratified into risk groups according to the 2017 ELN recommendations, into favorable, intermediate and adverse risk group. *NPM1* mutations were detected in 31% of the study group,

while *FLT3-ITD* mutations were detected in 19%. *IDH* mutations were observed in 13.5%. *IDH1* mutations were detected in 4.8%, whereas *IDH2* mutations in 7.1% and *IDH1* and *IDH2* mutations (dual mutations) in 1.6%. The R132H mutation was the most prevalent type of *IDH1* mutation, while the R140Q was the most prevalent type of *IDH2* mutation.

Earlier studies of Pascha et al¹⁹ had shown that *IDH* mutations were associated with older age, lower WBC, higher platelets, cytogenetically normal (CN) AML and *NPM1* mutations, in particular with the genotype of mutated *NPM1* without *FLT3-ITD*. In patients with CN-AML with the latter genotype, *IDH* mutations adversely impacted RFS and OS, whereas outcome was not affected in patients with CN-AML who lacked this genotype. In CN-AML, multivariable analyses revealed a significant interaction between *IDH* mutation and the genotype of mutated *NPM1* without *FLT3-ITD* (the adverse impact of *IDH* mutation was restricted to this patient subset). All but one *IDH1* mutation caused substitutions of residue R132, *IDH2* mutations caused changes of R140 or R172.

Patel et al²⁰ showed that patients without *FLT3-ITD* mutations and with both mutant *NPM1* and *IDH* represent a favorable-risk subset defined by a specific mutational genotype, whereas patients who were negative for *FLT3-ITD* mutations and had mutant *NPM1* without concurrent *IDH* mutations had a much less favorable outcome — particularly if those patients had concurrent mutations associated with an unfavorable-risk profile.

Papaemmanuil et al.²¹ have reported that although the number of patients in their *IDH2R172* study subgroup was small, the long-term outcomes were broadly similar to those in patients with *NPM1*-mutated AML. Furthermore, they stated that *IDH2* should be considered along with *TP53*, *SRSF2*, *ASXL1*, *DNMT3A*, for incorporation into prognostic guidelines because they are common and exert a strong influence on clinical outcomes.

Green et al.²² reported in 2011 for the first time the favorable outcome associated with an *IDH2R140* mutation. When the results were stratified according to *NPM1* genotype, relapse was reduced in *IDH2R140* cases both with and without an *NPM1* mutation.

In our patients *IDH* mutations were not associated neither with gender nor with age and were not associated with karyotype. Additionally, there was no significant correlation between *IDH* status and risk stratification group. Furthermore, *IDH* mutations were not associated with the *FLT3* status of our patients, however, they were associated with the presence of *NPM1* mutation. Also, *IDH* mutations did not seem to correlate with the occurrence of death during induction therapy in patients that received standard treatment for AML or with the resistance of the disease in the treatment in patients that received standard treatment for AML and that did not die during induction therapy.

In our study we observed that *IDH* mutations did not seem to significantly affect RFS and OS ,concerning the group of patients that received standard treatment (instead of palliative care) for AML, that did not die during induction therapy, that were not intended for allogeneic stem cell transplantation a priori and that their disease was not characterized as primary refractory. When we performed multivariate analysis, *FLT3-ITD* and age ≥ 60 years were found to be independent prognostic factors for RFS and OS in this group of patients. We further analysed the impact of isolated *IDH* mutations on RFS and OS, in subgroup of patients with the aforementioned characteristics, with normal karyotype, irrespective of age, and we observed that when *IDH1* mutated patients compared to patients with *IDH2* mutations or unmutated *IDH* status ones, they seemed to have an inferior RFS as well as OS, although not statistically significant. As far as patients with *IDH2* mutations is concerned, we observed that it seems to have favorable outcome in terms of RFS and OS (Figure 10, $p=0.626$), although the statistical significance is not significant. When we compared only *IDH1* mutant patients to *IDH2* ones, we observed significantly superior RFS in *IDH2* mutant patients. Additionally, when we compared *IDH2* mutant vs wild-type patients , the most favorable prognostic impact was observed in *IDH2 R172* mutant patients, followed by *IDH2 R140Q* mutant ones.

In conclusion, although the frequencies of our study are relative small, however we could make the statement that we observed a positive impact of *IDH2 R172* and *IDH2 R140Q* mutations in our study group, statement in agreement with all above mentioned studies.

Screening for *IDH1* and *IDH2* mutations will be soon applied to AML patients at presentation or relapse, due to availability of recently FDA approved *IDH1* inhibitor ivosidenib, as the first treatment of adult patients with relapsed / refractory AML and an *IDH1* mutation, as well as adult patients with de novo *IDH1* AML unfit for chemotherapy.²² Enasidenib, has recently been FDA approved, as the first oral *IDH2* inhibitor, in relapsed AML patients carrying this mutation.^{23,24}

Table 1. Patients'	Characteristics	(Total N=126)
	Number	%
Patients with available information	114	
Missing information	10 Karyotypes 12 FAB Classif.	
Gender:		
Male	63	50
Female	63	50
Age		
<60	65	51.6
>60	61	48.4
Karyotype		
Normal	62	53.4
Abnormal	54	46.6
NPM1 status		
WT	87	69
MT	39	31
FLT3 status		
WT	102	81
MT	24	19
Risk Stratification according to ELN 2017 (considering 10 cases without karyotype as normal)		
Favorable		
Intermediate	37	29.4
Adverse	71	56.3
	18	14.3

Table 2				
	Number	%	p value	
IDH status				
WT	109	86.5		
MT	17	13.5		
IDH status/ Treatment				
Classic	122	96.8		
Palliative	4	3.2		
IDH status/ Gender				
Male: WT	58	46	p= 0.118	
MT	5	4		
Female: WT	51	40.5		
MT	12	9.5		
IDH status/ FAB (114)				
M0: WT	7	6.1	p= 0.526	
MT	3	2.6		
M1: WT	15	13.1		
MT	2	1.8		
M2: WT	41	36		
MT	9	7.9		
M4: WT	23	20.2		
MT	1	0.9		
M5: WT	7	6.1		
MT	0	0		
M6: WT	5	4.4		
MT	0	0		
M7: WT	1	0.9		
MT	0	0		
IDH status/ Age				
<60: WT	58	46	p= 0.508	
MT	7	5.5		
>60: WT	51	40.5		
MT	10	8		
IDH status/ Karyotype				
Normal: WT	61	48,4	p=0.168	
MT	11	8,7		
Abnorm. WT	50	39,7		
MT	4	3,2		
IDH status/ NPM1				
NPM1 neg: WT	80	63.5	p=0.017	
MT	7	5.6		
NPM1 pos: WT	29	23		
MT	10	7.9		
IDH status/ FLT3				
FLT3 neg: WT	88	69.8	p=1.0	
MT	14	11.1		
FLT3 pos: WT	21	16.7		
MT	3	2.4		
IDH status/ Risk stratification				
Favorable: WT	28	22.2	p=0.120	
MT	9	7.1		
Intermediate: WT	66	52.4		
MT	5	4		
Adverse: WT	16	12.7		
MT	2	1.6		

Figure 1

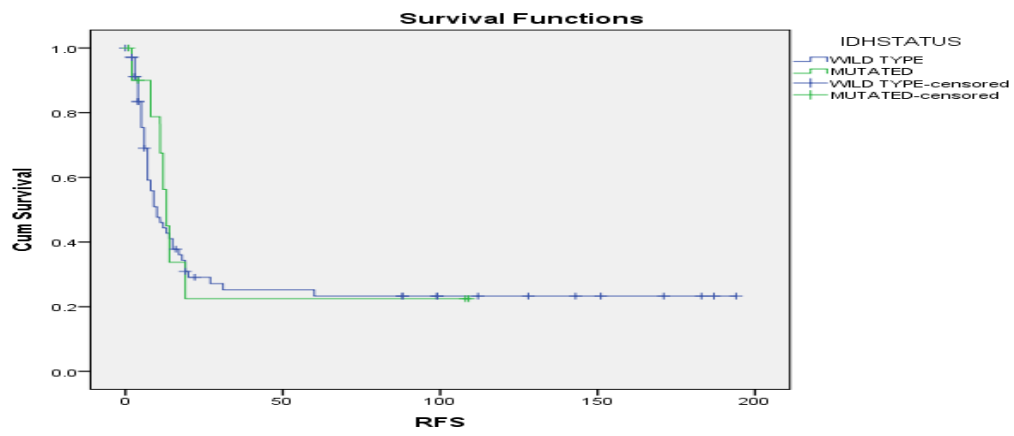


Figure 2

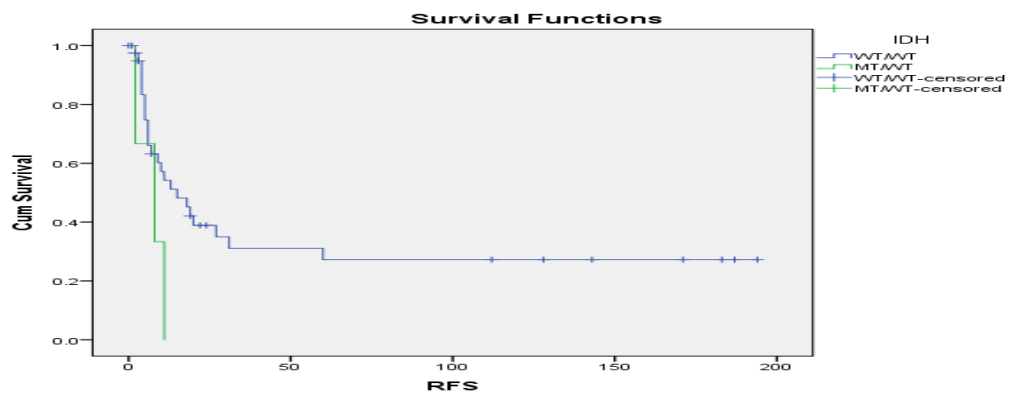
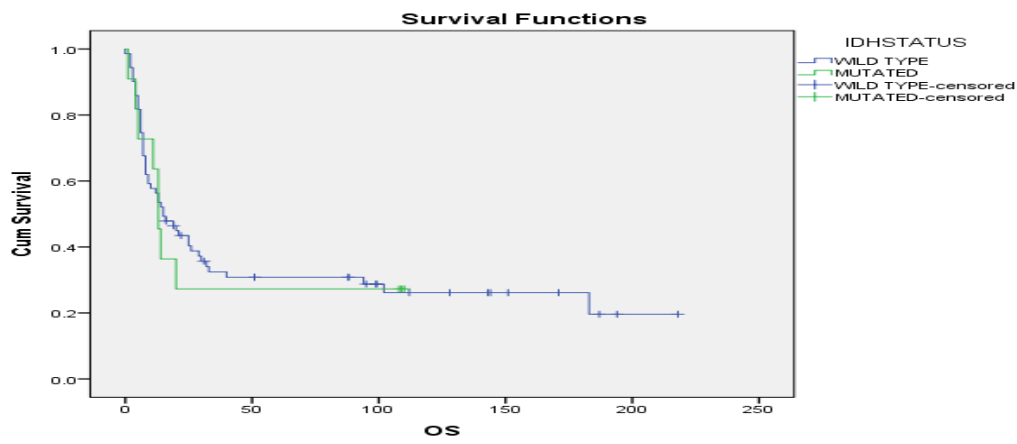


Figure 3

Figure 4

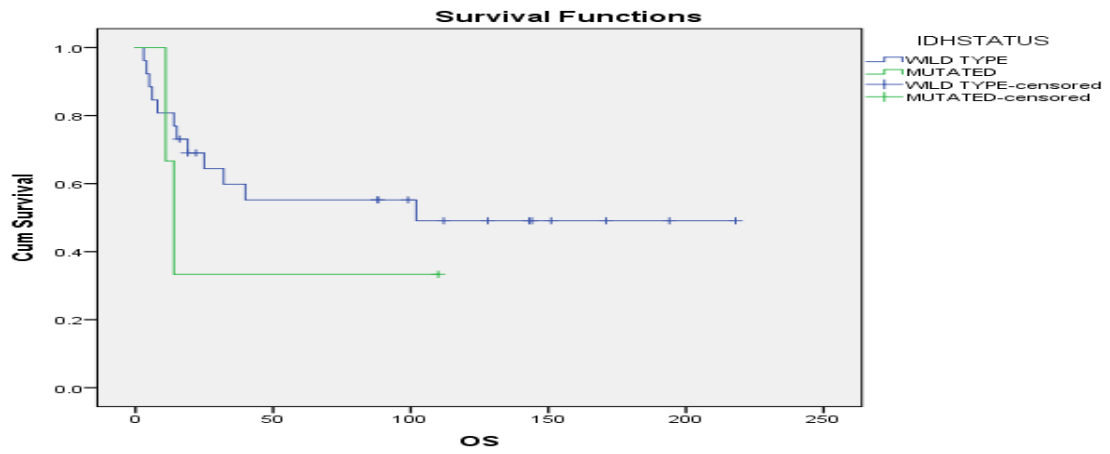


Figure 5

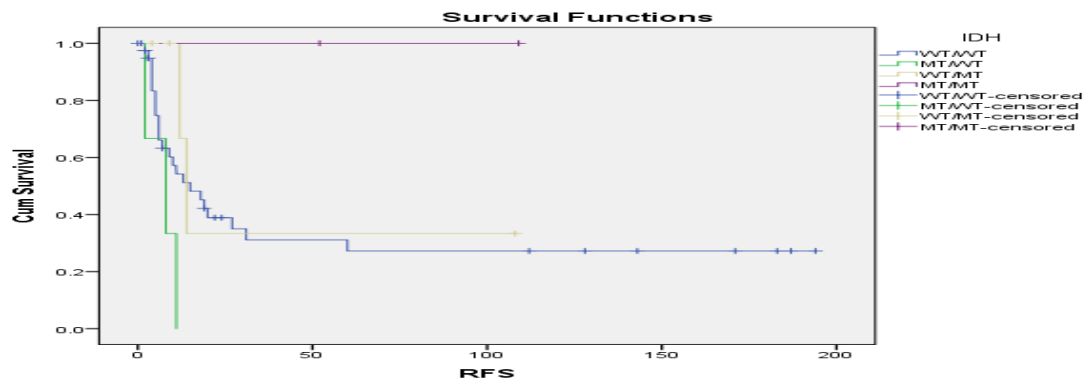


Figure 6

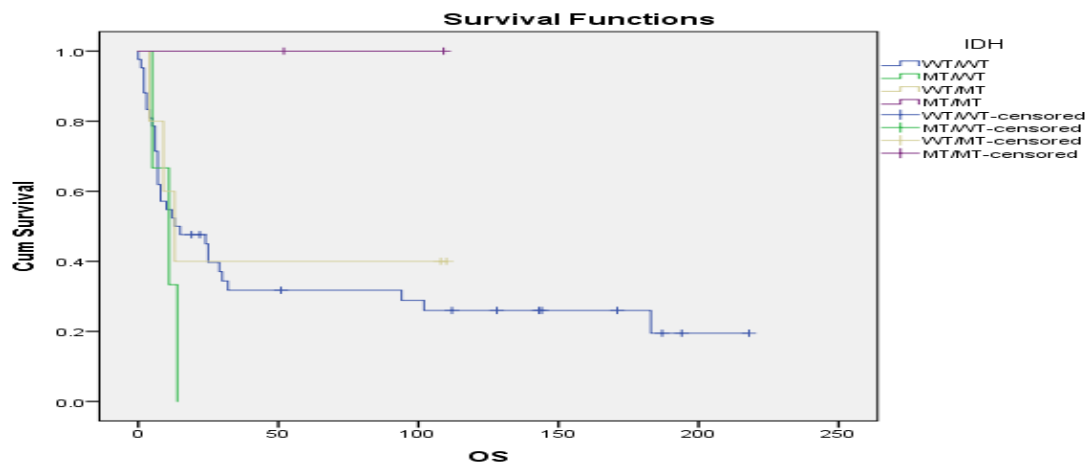


Figure 7

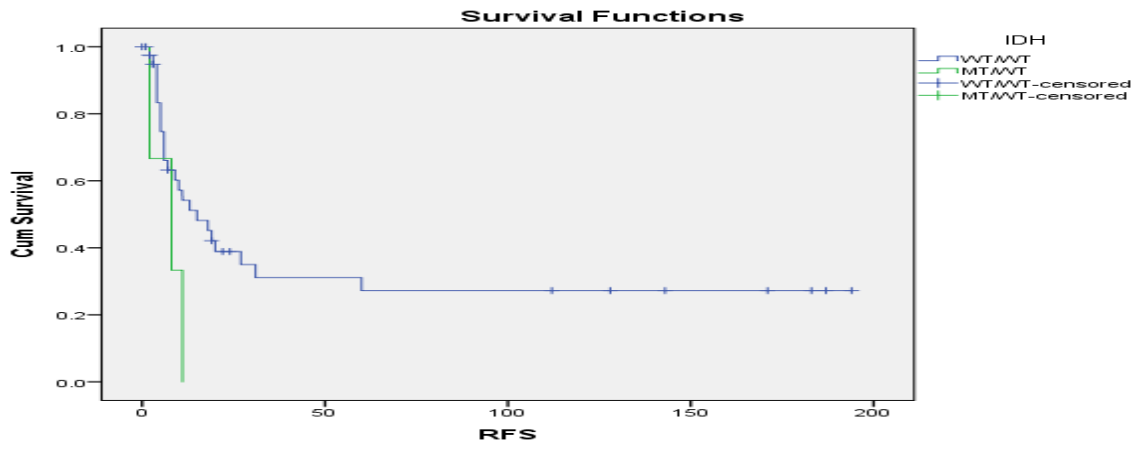


Figure 8

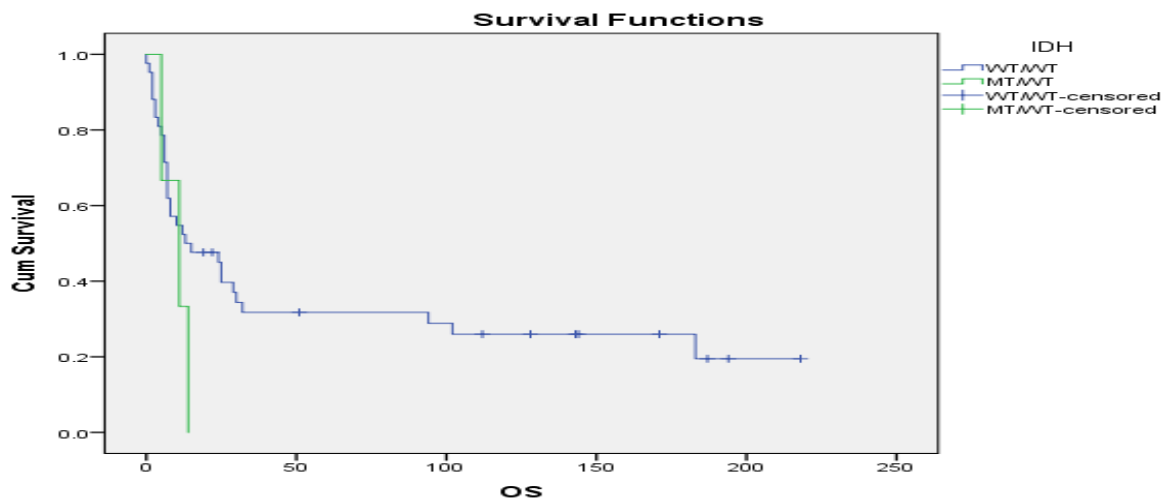


Figure 9

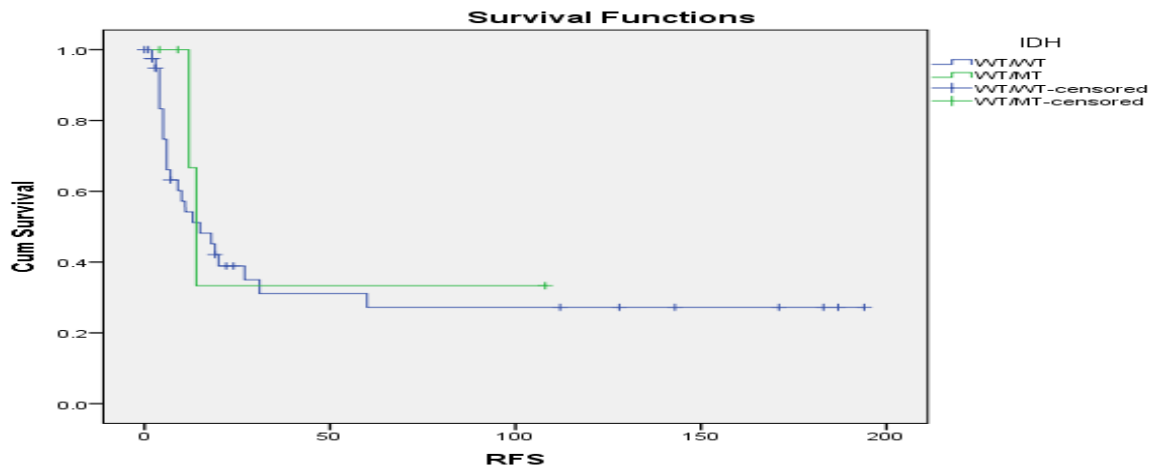


Figure 10

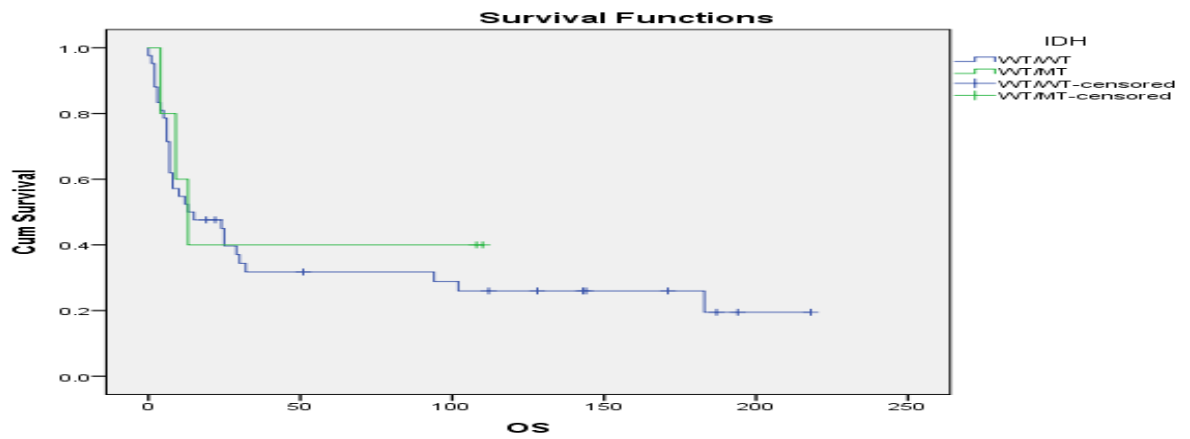


Figure 11

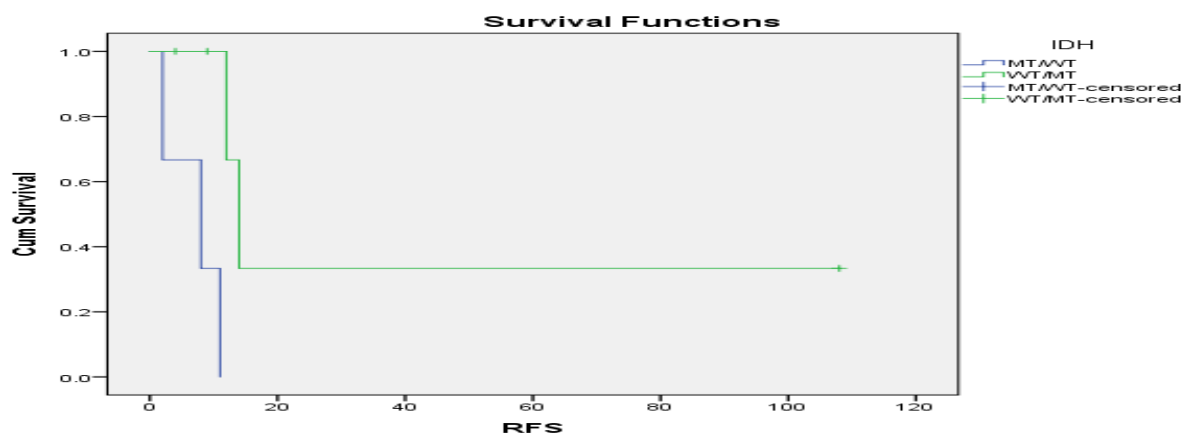


Figure 12

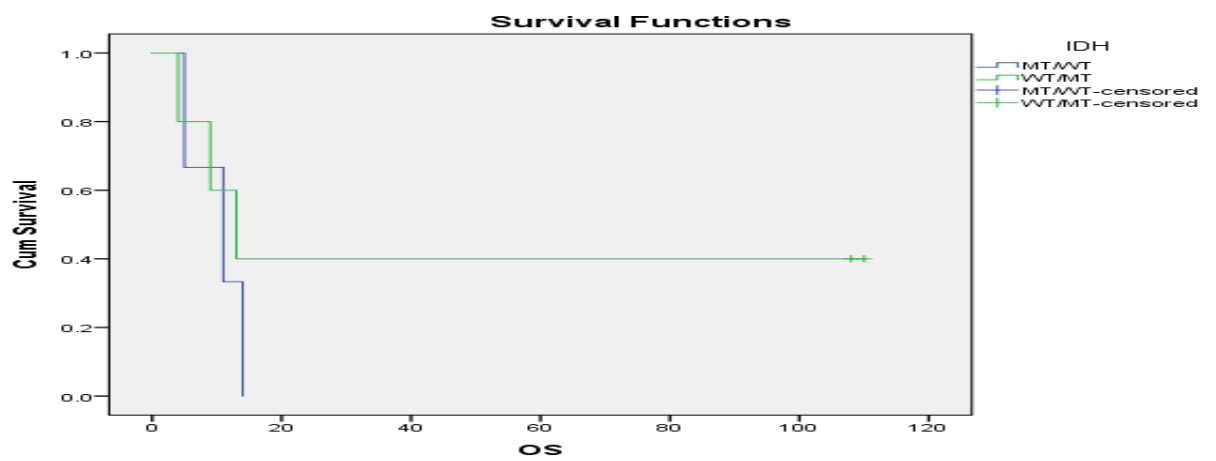
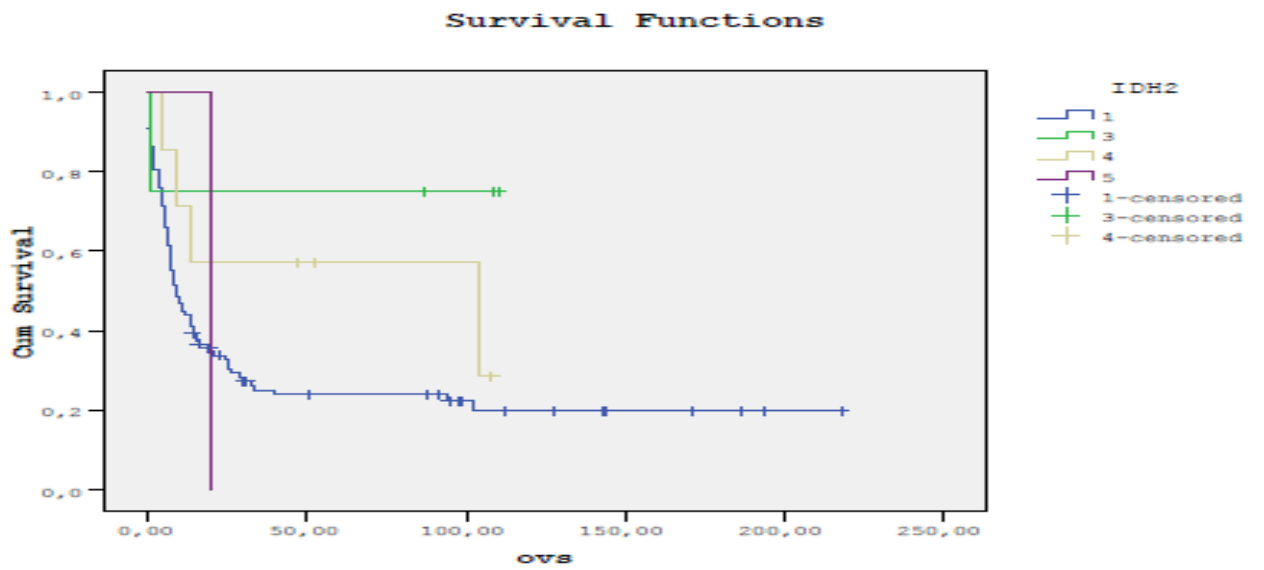


Figure 13



1: wt, 3: R172, 4: R140Q, 5: R140F

References

1. Dohner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD. Acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2015, 373(12), 1136–1152.
2. Grimwade D: The clinical significance of cytogenetic abnormalities in acute myeloid leukaemia. *Best Pract Res Clin.Haematol* 2001, 14:497-529.
3. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. Vardiman JW¹, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, Harris NL, Le Beau MM, Hellström-Lindberg E, Tefferi A, Bloomfield CD. *Blood.* 2009 Jul 30;114(5):937-51. doi: 10.1182/blood-2009-03-209262.
4. Hartmut Döhner, Elihu Estey, David Grimwade, Sergio Amadori, Frederick R. Appelbaum, Thomas Büchner, Hervé Dombret, Benjamin L. Ebert, Pierre Fenaux, Richard A. Larson, Ross L. Levine, Francesco Lo-Coco, Tomoki Naoe, Dietger Niederwieser, Gert J. Ossenkoppele, Miguel Sanz, Jorge Sierra, Martin S. Tallman, Hwei-Fang Tien, Andrew H. Wei, Bob Löwenberg, and Clara D. Bloomfield. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood.* 2017 Jan 26; 129(4): 424–447.
5. Gale RE, Green C, Allen C, et al; Medical Research Council Adult Leukaemia Working Party. The impact of *FLT3* internal tandem duplication mutant level, number, size, and interaction with *NPM1* mutations in a large cohort of young adult patients with acute myeloid leukemia. *Blood.* 2008;111(5):2776-2784.
6. Gilliland DG, Griffin JD: The roles of *FLT3* in hematopoiesis and leukemia. *Blood* 2002, 100:1532-1542.

7. Frohling S, Scholl C, Gilliland DG, Levine RL: Genetics of myeloid malignancies: pathogenetic and clinical implications. *J Clin.Oncol* 2005, 23:6285-6295.
8. Dohner H, Estey EH, Amadori S, et al: Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: Recommendations from an international expert panel, on behalf of the European Leukemia-Net. *Blood* 2010, 115:453-474.
9. Kelly LM, Gilliland DG: Genetics of myeloid leukemias. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2002, 3:179-198.
10. Metzeler KH, Herold T, Rothenberg-Thurley M, Amler S, Sauerland MC, Görlich D, Schneider S, Konstandin NP, Dufour A, Bräundl K, Ksienzyk B, Zellmeier E, Hartmann L, Greif PA, Fiegl M, Subklewe M, Bohlander SK, Krug U, Faldum A, Berdel WE, Wörmann B, Büchner T, Hiddemann W, Braess J, Spiekermann K, AMLCG Study Group Spectrum and prognostic relevance of driver gene mutations in acute myeloid leukemia.*Blood*. 2016 Aug 4;128(5):686-98. doi: 10.1182/blood-2016-01-693879.
11. Caner Saygin, Cassandra Hirsch, BartlomiejPrzychodzen, Mikkael A. Sekeres, Betty K. Hamilton, Matt Kalaycio, Hetty E. Carraway, Aaron T. Gerds, Sudipto Mukherjee, Aziz Nazha, Ronald Sobecks, Christopher Goebe, Donna Abounader, Jaroslaw P. Maciejewski, Anjali S. Advani. Mutations in *DNMT3A*, *U2AF1*, and *EZH2* identify intermediate-risk acute myeloid leukemia patients with poor outcome after CR1.
12. Lu C, Ward PS, Kapoor GS et al. *IDH* mutation impairs histone demethylation and results in a block to cell differentiation. *Nature* 2012, 483(7390), 474–478.
13. Solary E, Bernard OA, Tefferi A, Fuks F, Vainchenker W. The Ten-Eleven Translocation-2 (*TET2*) gene in hematopoiesis and hematopoietic diseases. *Leukemia* 2014, 28(3), 485–496.

14. The role of IDH mutations in acute myeloid Leukemia, Guillermo Montalban-Bravo¹ & Courtney D DiNardo, Department of Leukemia, University of Texas MD Anderson Cancer Center, 1515 Holcombe Blvd, Houston, TX 77030, USA
15. Isocitrate dehydrogenase mutations in myeloid malignancies BC Medeiros, AT Fathi, CD DiNardo, DA Pollyea, SM Chan and R Swords, *Leukemia* 2017, 31, 272–281
16. Dinardo CD, Ravandi F, Agresta S et al. Characteristics, clinical outcome, and prognostic significance of IDH mutations in AML. *Am. J.Hematol.* 2015, 90(8), 732–736.
17. Fernandez-Mercado M, Yip BH, Pellagatti A et al. Mutation patterns of 16 genes in primary and secondary acute myeloid leukemia (AML) with normal cytogenetics. *PLoS ONE* 7(8), e42334 2012.
18. Fathi AT, Sadrzadeh H, Borger DR et al. Prospective serial evaluation of 2-hydroxyglutarate, during treatment of newly diagnosed acute myeloid leukemia, to assess disease activity and therapeutic response. *Blood* 2012, 120(23), 4649–4652.
19. Paschka P, Schlenk RF, Gaidzik VI, Habdank M, Krönke J, Bullinger L, Späth D, Kayser S, Zucknick M, Götze K, Horst HA, Germing U, Döhner H, Döhner K.J. *IDH1* and *IDH2* mutations are frequent genetic alterations in acute myeloid leukemia and confer adverse prognosis in cytogenetically normal acute myeloid leukemia with NPM1 mutation without *FLT3* internal tandem duplication. *ClinOncol.* 2010 Aug 1;28(22):3636-43. doi: 10.1200/JCO.2010.28.3762.
20. Jay P. Patel, Mithat Gönen, Ph.D., Maria E. Figueroa, M.D., Hugo Fernandez, M.D., Zhuoxin Sun, Ph.D., Janis Racevskis, Ph.D., Pieter Van Vlierberghe, Ph.D., Igor Dolgalev, B.S., Sabrena Thomas, B.S., Olga Aminova, B.S., Kety Huberman, B.S., Janice Cheng, B.S., Agnes Viale,

Ph.D., Nicholas D. Socci, Ph.D., Adriana Heguy, Ph.D., Athena Cherry, Ph.D., Gail Vance, M.D., Rodney R. Higgins, Ph.D., Rhett P. Ketterling, M.D., Robert E. Gallagher, M.D., Mark Litzow, M.D., Marcel R.M. van den Brink, M.D., Ph.D., Hillard M. Lazarus, M.D., Jacob M. Rowe, M.D., Selina Luger, M.D., Adolfo Ferrando, M.D., Ph.D., Elisabeth Paietta, Ph.D., Martin S. Tallman, M.D., Ari Melnick, M.D., Omar Abdel-Wahab, M.D., and Ross L. Levine, Prognostic Relevance of Integrated Genetic Profiling in Acute Myeloid Leukemia M.D.N Engl J Med 2012 March 22; 366(12): 1079–1089. doi:10.1056/NEJMoa1112304

21. Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L et al. Genomic classification and prognosis in acute myeloid leukemia. N. Engl. J. Med. 2016, 374(23), 2209–2221.
22. Green CL, Evans CM, Zhao L, Hills RK, Burnett AK, Linch DC, et al. The prognostic significance of *IDH2* mutations in AML depends on the location of the mutation. Blood 2011, 118:409–12.
23. Danielle Golub, Nishanthlyengar, Siddhant Dogra, Taylor Wong, Devin Bready, Karen Tang, Aram S. Modrek, Dimitris G. Placantonakis Mutant Isocitrate Dehydrogenase Inhibitors as Targeted Cancer Therapeutics. Front Oncol. 2019, 9: 417.
24. Amaya ML, Pollyea DA, Targeting the *IDH2* Pathway in Acute Myeloid Leukemia. Clin Cancer Res. 2018 May 16. pii: clincanres.0536.2018. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-18-0536.

