



МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ
“ПРОФ. Д-Р ПАРАСКЕВ СТОЯНОВ“ – ВАРНА
КАТЕДРА ПО МЕДИЦИНСКА ГЕНЕТИКА

д-р Диннар Али Яхя

Изследване на молекулярно-генетични маркери при пациенти с остра миелогенна левкемия

Дисертационен труд
за присъждане на научна и образователна степен „доктор“

Област на висше образование:

4. „Природни науки, математика и информатика“

Професионално направление: „Биологически науки“ Шифър 4.3.

Докторска програма: „Генетика“

Научни ръководители:

Проф. д-р Илина Димитрова Мичева, д.м.

Доц. д-р Трифон Георгиев Червенков, д.б.

Варна

2024 г.

Дисертационният труд е представен в 130 страници, съдържа 15 фигури и 12 таблици. Библиографията обхваща 201 литературни източника, от които 5 на кирилица и 196 на латиница.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита от Катедра по Медицинска генетика, Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна.

Всички включени в дисертационния труд изследвания са извършени в:

- ❖ Катедра по Медицинска генетика към Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна
- ❖ Лаборатория по Медицинска генетика към УМБАЛ „Света Марина“ ЕАД – Варна

Настоящите изследвания са субсидирани частично по проект № 21008 “Молекулярно-генетичен анализ при новодиагностицирани пациенти с Остра миелогенна левкемия“, финансиран от Фонд „Наука“ (конкурсна сесия 2021) към Медицински университет Варна.

Съдържание

1. ВЪВЕДЕНИЕ	8
2. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР.....	11
2.1 Молекулярни основи и същност на ОМЛ.....	11
2.1.1 Генетична характеристика и класификация на ОМЛ.....	11
2.1.2. Стратификация спрямо риск според ELN	36
2.2 Най-често използвани молекулярно-генетични маркери и методи.....	41
2.2.1. Основни положения.....	41
2.2.2. Методи за изследване на молекулярно-генетични маркери.....	42
2.3 Обобщение	52
3. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ НА ИЗСЛЕДВАНЕТО	54
3.1 Цел на изследването.....	54
3.2 Задачи на изследването	54
4. КОНТИНГЕНТ И МЕТОДИ.....	55
4.1 База на провеждане на проучването	55
4.1.1 Контигент	55
4.1.2 Биологичен материал	58
4.2 Методи.....	58
4.2.1 Клинични методи.....	58
4.2.2 Лабораторни методи.....	59
4.2.3 Методи за медико-статистическа обработка на данните.....	61
5. РЕЗУЛТАТИ	62
5.1. Дескриптивно – епидемиологична характеристика на пациентите и доброволците, включени в проучването.....	62
5.1.1 Възрастово-полова характеристика	62
5.1.2 Разпределение по видове показания	63
5.2 Представяне и анализ на резултатите от проведени генетични изследвания	63
5.2.1 Резултати от MLPA	63
5.2.2 Резултати от КЦА и съпоставка с MLPA	67
6. ОБСЪЖДАНЕ	76
6.1 Обсъждане на резултати от дескриптивно – епидемиологична характеристика на участниците в проучването	76
6.2 Обсъждане на резултати от проведени генетични изследвания.....	78
6.2.1 MLPA	78
6.2.2 КЦА.....	87
7. ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ПЕРСПЕКТИВИ ЗА БЪДЕЩА РАБОТА.....	98

8. ИЗВОДИ	101
9. ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....	102
10. БИБЛИОГРАФИЯ	104
11. НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ ПО ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИЯТА	123
12. БЛАГОДАРНОСТИ.....	125
13. ПРИЛОЖЕНИЯ	126
13.1 Приложение 1	126
13.2 Приложение 2	129

Често използвани съкращения

Съкращения на кирилица

ДНК - Дезоксирибонуклеинова киселина

КМ - Костен мозък

КЦА - Конвенционален цитогенетичен анализ

МДС - Миелодиспластичен синдром

МПН - Миелопролиферативни неоплазми

НК - Нормален кариотип

ОЛЛ – Остра лимфобластна левкемия

ОММЛ - Остра миеломоноцитна левкемия

ОМЛ - Остра миелогенна левкемия

ОПЛ - Остра промиелоцитна левкемия

РНК - Рибонуклеинова киселина

ТХСК - Трансплантация на хематопоеични стволови клетки

ХМЛ - Хронична миелогенна левкемия

ХСК - Хематопоеични стволови клетки

Съкращения на латиница

АЕВР2 - AE Binding Protein 2

AR - Allele Ratio

ASXL1 - Additional Sex comb-like 1

ATM - Ataxia-Telangiectasia Mutated

bp - base pairs

CBFB - Core Binding Factor Beta Subunit

CHIP - Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential

CHOP - Clonal Hematopoiesis with substantial Oncogenic Potential

CMA - Chromosomal Microarray Analysis

CUX1 - Cut Like Homeobox 1

DIC – Disseminated intravascular coagulation

DNMT3A - DNA Methyltransferase 3 alpha

EFS - Event-free survival

ELN - European Leukemia Net

ETV6 - ETS Variant Transcription Factor 6

EZH2 - Enhancer of zeste Homolog 2

FAB – French-American-British

FISH - Fluorescent In Situ Hybridization

FLT3 - FMS-like Tyrosine kinase 3

ICC - International Consensus Classification

IDH1,2 - Isocitrate Dehydrogenase 1 & 2

IKZF1 - IKAROS Family Zinc Finger 1

JARID2 - Jumonji And AT-Rich Interaction Domain Containing 2

KMT2A - Lysine Methyltransferase 2A

MLPA - Multiplex Ligase-dependent Probe Amplification

MRD - Minimal/measurable Residual Disease

MYH11 - Myosin Heavy Chain 11

NCCN - National Comprehensive Cancer Network

NF1 - Neurofibromin 1

NGS - Next-generation Sequencing

NOS - Not Otherwise Specified

NPM1 – Nucleophosmin 1

OGM - Optical Genome Mapping

PCR - Polymerase Chain Reaction

PML - Promyelocytic leukemia

RARA - Retinoic Acid Receptor Alpha

RUNX1 - Runt-related Transcription Factor 1

SF3B1 - Splicing factor 3b, subunit 1

SUZ12 - SUZ12 Polycomb Repressive Complex 2 Subunit

TAM - Transient Abnormal Myelopoiesis

TET2 - Ten-Eleven Translocation methylcytosine dioxygenase 2

TP53 – Tumor Protein 53

qPCR - Quantitative (Real-time) PCR

WHO - World Health Organization

1. ВЪВЕДЕНИЕ

Острата миелогенна левкемия (ОМЛ) представлява хетерогенна група заболявания, дължащи се на абнормна пролиферация на прогениторни клетки от миелоидния клетъчен ред. Тя е особено характерна за индивиди над 45-годишна възраст и съставлява около 80% от случаите на левкемия сред възрастни. Въпреки това, ОМЛ е рядко заболяване, с обща честота 4,2 на 100000 души, като се наблюдава лека предрекция на мъже спрямо жени (1).

На базата на установените механизми на етиология и патогенеза се знае, че на клетъчно ниво това е едно основно генетично по природа заболяване, свързано с широка гама генетични мутации и епигенетични модификации. Генетичните мутации биват най-често придобити и водят до нарушения в хематопоезата по отношение на пролиферация, диференциация, матурация, контрол върху клетъчния цикъл и апоптоза. ОМЛ се характеризира с изключителна генетична хетерогенност, бърз клиничен ход и вариабилна прогноза. Тези особености от една страна усложняват процеса на диагностика и изискват прецизна и ефикасна колаборация между специалисти от сферите клинична хематология, медицинска генетика, клинична имунология, клиничната патология и т.н. От друга страна, охарактеризирането на конкретните генетични събития, довели до даден случай на заболяването, е определящо за поставянето на точна диагноза, прогнозиране на хода му и предикция по отношение на терапевтичния отговор (1).

В диагностичен план базово място заема конвенционалният цитогенетичен анализ (КЦА), който има решаващо значение за класифицирането на случаите и тяхното стратифициране по риск. Първите стъпки в онкоцитогенетиката са свързани с откриване на малката Филадельфийска хромозома в клетки на пациенти с Хронична миелогенна левкемия (ХМЛ) през 1960 г в едноименния Американски щат (2), но методът има приложение и до днес, за което говори и последната поправка на European Leukemia Net (ELN) от 2022 (3). Предвид добре познатите му недостатъци и рискове като ниска резолюция, трудоемка ръчна работа, продължително технологично време и вероятност за липса на метафазни пластинки, обаче, той се допълва от по-детайлни и съвременни молекулярни изследвания.

Флуоресцентната ин ситу хибридизация (FISH) е метод от групата на молекулярно-цитогенетичните, който превъзхожда КЦА по разделителна способност и технологично

време, както и по липсата на зависимост от налични дялящи се клетки. Въведен през 80-те години на миналия век, той намира широко приложение в различни области на медицината и биологията и до днес. По отношение на ОМЛ обаче има разнородни мнения във връзка с неговата ефикасност (4,5). По тази причина използването на FISH в диагностиката на това заболяване е сравнително ограничено - най-вече за потвърждаване на цитогенетични находки и при необходимост от бързи резултати (6).

Важна стъпка в еволюцията на генетичните методи, а оттам и на диагностичния процес при ОМЛ, е разработването на полимеразната верижна реакция (PCR) също през 80-те години на 20-ти век (7). Откритието на Kary W. Mullis позволява бърз, чувствителен и високо специфичен скрининг на по-често срещани мутации в гени с доказано участие в етиологията и патогенезата на разглежданото заболяване. Методът е от особено значение и за избора на подход при вече диагностицирани пациенти предвид отчитането на известни прогностични и предиктивни маркери. Не по-маловажна е и възможността за проследяване на заболяването, оценката на терапевтичния отговор и на наличието на Минимална/измерима резидуална болест (MRD) – наличие на субклинични нива на левкемичен процес по време на ремисия (8). Съществуват множество разработени във времето вариации на метода в зависимост от конкретната цел. Обикновено PCR скринингът се прилага заедно с КЦА и е информативен при аберантен, и още повече при нормален кариотип (НК) (9).

Множествената лигазно-зависима амплификация на проби (MLPA) е разработен от MRC Holland метод, за който започва да се говори усилено в научните пространства от първите му споменавания през 2002 (10). Чрез него успешно се отчитат субмикроскопски небалансирани промени като делеции, дупликации и вариации в брой повтори, което от самото му въвеждане е в помощ в диагностиката на множество генетични болести (10,11) Постепенно неговото приложение се разширява, успоредно с възможностите и разновидностите на метода (12,13). Разработката Digital MLPA дори успява да отчете познати при конкретни заболявания точкови мутации, което надминава първоначалните разрешителни способности на метода (14). Днес MLPA се използва за изясняване на генетичната характеристика на широка гама заболявания, включително и неоплазми, засягащи клетките на кръвния ред (14,15).

Несъмнено, едно от най-значимите научни постижения в края на 20-ти и началото на 21-ви век бе успешното завършване на проекта „Човешки геном“. Той не само допринесе за подобреното разбиране на еволюционно инкорпорираната генетична информация, но също така даде тласък на усъвършенстването на молекулярно-генетичния метод

Секвениране по Sanger и прерастването му в Секвениране от следващо поколение (NGS). Последното доведе до увеличаване на скоростта и обема на получената информация, същевременно снижавайки значително себестойността си. Зад това общо название всъщност стоят няколко поколения от различаващи се по техника и протичане на изпълнение методи. Всеки следващ превъзхожда значително предишния, като разработките на нови варианти не спират и до днес (16).

Съвсем естествено, NGS постепенно се интегрира и по отношение на ОМЛ. Позицията му става все по-значима не само в диагностичен план, но също и в последващата оценка на хода на заболяването и подбора на подходяща (таргетна) терапия (17). Дори и съвременната технология на NGS обаче не е перфектна, особено що се отнася до отчитането на MRD. Това предполага допълнителни проучвания и усъвършенстване преди утвърждаването му като базов метод (18).

Настоящият дисертационен труд насочва вниманието към актуален здравен проблем – необходимостта от рутинизиране на информативен молекулярно-генетичен метод за успоредно провеждане с КЦА.

Липсата на достатъчно проучвания за приложимостта на молекулярно-генетичните методи за диагностика на пациенти с ОМЛ в нашата страна на фона на нарастващата роля на генетичните маркери в международните препоръки за работа и системи за оценка на тези пациенти беше предпоставка за разработване на настоящия дисертационен труд.

2. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

2.1 Молекулярни основи и същност на ОМЛ

2.1.1 Генетична характеристика и класификация на ОМЛ

В основата си ОМЛ представлява клонална експанзия на преобразувани хематопоеични стволови клетки (ХСК). Последните, благодарение на придобитите разнородни генетични мутации се „обезсмъртяват“ и размножават без контрол за сметка на способността си да се диференцират правилно. Това води до наличие на огромен брой незрели бласти, които ангажират пространствено костно-мозъчната тъкан и възпрепятстват нормалната хематопоеза. С течение на времето се развива костно-мозъчна недостатъчност със засягане на синтеза на основните клетъчни линии и характерната за това клиника. Същевременно незрелите клетки от миелоидния ред се разпространяват в множество органи и системи, което допълнително обогатява и утежнява експресията на заболяването (19). Тази обща характеристика всъщност обединява подтиповете ОМЛ, различаващи се и по характерните генетични и епигенетични събития, довели до развитието на неопластичния процес.

2.1.1.1 FAB класификация

За възможно най-пълно разбиране на същността на ОМЛ следва да се разгледат двете повсеместно използвани класификации – т.нар FAB (French-American-British) и тази на Световната здравна организация (WHO). Датиращата от 1976-та година FAB класификация се базира на морфологичните белези на бластите при светлинно микроскопско изследване на хистологични препарати (20). Този колаборативен труд описва характеристики, корелиращи с лабораторни и клинични находки, както и с терапевтичен отговор. С негова помощ се отдиференцират Остра лимфобластна левкемия (ОЛЛ) от ОМЛ, а също така и различни подтипове на последната. Класификацията е подходяща само за нелекувани пациенти поради промените, причинени вследствие на прилаганите химиотерапевтични средства. В допълнение, съгласно FAB класификацията миелобластите трябва да наброяват поне 30% от клетъчния състав в костния мозък (КМ) или от този на белите кръвни клетки във венозна кръв. Това се оценява при хистохимично оцветяване на кръвна/костно-мозъчна натривка по Wright или Wright-Giemsa, като се онагледява наличието на един или повече малигнени клетъчни клонове (21).

На таблица 1 за представени подтиповете ОМЛ според FAB класификацията.

Таблица 1. FAB класификация на ОМЛ (Адаптирана по Ladines-Castro et al, 2016)

(20)

Означение	Подтип ОМЛ според FAB
M0	<i>ОМЛ с минимална диференциация</i>
M1	<i>ОМЛ без матурация</i>
M2	<i>ОМЛ с матурация</i>
M3	<i>Остра промиелоцитна левкемия (ОПЛ)</i>
M3v	<i>ОПЛ, микрогрануларен вариант</i>
M4	<i>Остра миеломоноцитна левкемия (ОММЛ)</i>
M4Eo	<i>ОММЛ с абнормни еозинофили</i>
M5a	<i>Остра монобластна левкемия</i>
M5b	<i>Остра моноцитна левкемия</i>
M6	<i>Остра еритролевкемия</i>
M7	<i>Остра мегакариобластна левкемия</i>

M0 се среща в 5-7% от случаите и се характеризира със значителна лекарствена резистентност. Често пациентите са с комплексен кариотип, а при някои се среща тризомия 13 (21).

При **M1** клетките са еднородни, като не се наблюдават представители отвъд миелобластите в миелоидния ред. Характерни за някои клетки от последния, могат да се срещнат пръчици на Ауег – азурофилни грануларни цитоплазмени включвания. Няма възрастова или полова предилекция, нито известни клинични съотнасяния за този подтип (20,21).

M2 е характерен за около 30% от пациентите с ОМЛ. В 10% от клетките се наблюдават признаци на матурация и се разпознават промиелоцити, миелоцити и неутрофили. В една трета от случаите на M2-ОМЛ се наблюдава цитогенетичната аберация t(8;21) (20), особено в комбинация с пръчици на Auer. Характерни за M2 ОМЛ са младата средна възраст на пациентите – около 30 години, високият терапевтичен отговор и ниската степен на релапс (21).

M3, срещан в около 10% от случаите, е характерен за всички възрасти. Морфологично се разпознава по хипергрануларните промиелоцити, като отново често се срещат пръчици на Auer. Тази форма на ОМЛ се асоциира с риск от развитие на синдром на дисеминирана интравазална коагулация (DIC синдром), който може да бъде застрашаващо живота състояние, особено в случаи на вътречерепни кръвоизливи. Характерна транслокация за M3 е t(15;17). Пациентите са с много добър терапевтичен отговор на антрациклинови препарати (21).

M3v се среща в 15-20% от случаите на M3 и се характеризира с по-лоша прогноза от последната (20).

M4 е с честота около 20% и представлява комбинация от гранулоцитен и моноцитен елемент с различни дялове и степени на диференциация. Клинично при част от пациентите се наблюдава гингивална хиперплазия (20).

M4Ео е характерна за 5% от новодиагностицираните пациенти с ОМЛ, като те обикновено са млади (35-40 г). Абнормните еозинофили представляват 5-10% от клетъчното съдържание в КМ и са сравнително лесни за разпознаване. M4Ео се отличава с добър терапевтичен отговор и особено добра прогноза (21).

M5 се среща в 15% от случаите като **M5a** или монобластната форма е по-често срещаният от двата подтипа. Последният често се асоциира с хромозомни аберации като t(9;11), t(6;11), t(8;16), както и с преустройства в 11q23 (20). M5 се характеризира с по-късна възраст на изява и твърде кратки периоди на пълна ремисия. На фона на изразената хиперлевкоцитоза са често срещани екстрамедуларните прояви – гингивална хиперплазия, засягане на централна нервна система, отделителна система, гастроинтестинален тракт, кожа и други (21).

M6 може да бъде комбинация от миело- и еритробласти, развила се на базата на Миелодиспластичен синдром (МДС) – 6% от случаите на ОМЛ, или да бъде изцяло еритроидна вследствие на значително нарушение в еритропоезата (20). Характеризира се с повишено съдържание на желязо и висока честота на ринг сидеробласти.

Обикновено са засегнати хора в напреднала възраст като повечето от тях проявяват резистентност към терапията. Цитогенетично се наблюдават клетки с комплексен кариотип или делеции в 5-та или 7-ма хромозома, както и маркерни хромозоми (21)

M7 е рядък подтип с честота 3-5% и сравнително лоша прогноза, асоцииращ се понякога с инверсии в 3-та хромозома (20,21).

Тази класификация е важна стъпка към разбирането на съвкупността от нозологични единици, които ОМЛ представлява, но далеч не е изчерпателна за практиката на медицинския специалист в наши дни. Това се дължи на непостоянната корелация между морфологични и цитохимични особености от една страна, и на молекулярни механизми и клинична вариабилност от друга (22).

2.1.1.2 Класификация на WHO

Разбирането и оценката на генетичните характеристики коригират недостатъка на класифицирането по FAB, описан по-горе, и допълват познанията ни относно етиологията, патогенезата, прогнозирането и терапевтичния отговор при това заболяване. Първата класификация, която внедрява генетична информация в охарактеризирането на различните подтипове ОМЛ е тази на WHO от 2001-ва година (23). Поради своята изчерпателност, тя се възприема като златен стандарт (20). Последната и понастоящем актуална ревизия е 5-ата, обявена през 2022-ра година, представена на таблица 2.

Таблица 2. Класификация на ОМЛ - WHO, 2022 (Адаптирана по Khoury et al, 2022) (24)

ОМЛ с определящи генетични аномалии:

- ОПЛ с *PML::RARA* фузия
- ОМЛ с *RUNX1::RUNX1T1* фузия
- ОМЛ с *CBFB::MYH11* фузия
- ОМЛ с *DEK::NUP214* фузия
- ОМЛ с *RBM15:MRTFA* фузия
- ОМЛ с *BCR::ABL1* фузия
- ОМЛ с *KMT2A* структурни изменения
- ОМЛ с *MECOM* структурни изменения
- ОМЛ с *NUP98* структурни изменения
- ОМЛ с *NPM1* мутация
- ОМЛ с *CEBPA* мутация
- Миелодисплазия-свързана ОМЛ

- ОМЛ с други дефинирани генетични промени

ОМЛ, определена според диференциацията

- ОМЛ с минимална диференциация
- ОМЛ без матурация
- ОМЛ с матурация
- Остра базофилна левкемия
- ОММЛ
- Остра моноцитна левкемия
- Чиста еритроидна левкемия
- Остра мегакариобластна левкемия

Както се вижда на таблицата, генетичните промени заемат значително място в класификацията на WHO и наличието на такива ги обособява в отделен подтип. Още една съществена разлика от изискванията на FAB класификацията, както и от предходни версии на класификацията, е липсата на минимален брой бласти в случаите с определящи генетични аномалии (изключая подтиповете с *BCR::ABL* фузия и *CEBPA* мутация). Тази характеристика демонстрира приоритизиране присъствието на драйверни мутации за сметка на величината на клона в момента на изследване. По този начин, наличието на характерни генетични събития при корелация с морфологичните находки е достатъчно за поставяне на диагноза ОМЛ независимо от броя на миелобластите. Въвежда се и подгрупата ОМЛ с други дефинирани генетични промени, в която се включват варианти с потенциал за обособяване в отделен подтип в следваща корекция на класификацията. Всички тези особености поддържат измененията на хромозомно или молекулярно ниво редом с клиничната и морфологичната характеристика в диагностичния процес и последващия алгоритъм на терапевтично поведение (24). Тръгвайки от по-ниска към по-висока резолюция, е редно да се започне с характерните генни фузии, асоциирани с конкретни цитогенетични промени. В исторически план те също са по-рано описаните предвид давността на цитогенетичния метод спрямо тази на молекулярно-генетичните (2).

2.1.1.2.1 ОПЛ с *PML::RARA* фузия

С честота около 10% при възрастни като най-често възниква *de novo* (25). Подтипът се асоциира с балансираната транслокация $t(15;17)(q24;q21)$. Единият ген, засегнат при това преустройство е Promyelocytic leukemia (*PML*) генът, разположен на дългото рамо на хромозома 15. *PML* кодира ядрен протеин, включен в множество регулаторни

механизми, включително такива, засягащи тумор-супресорна активност, апоптоза, епигенетична модификация и транскрипция на ХСК (26). Другият ангажиран ген се нарича Retinoic acid receptor alpha (*RARA*) и се намира на дългото рамо на хромозома 17. *RARA* кодира ядрен рецептор с обширна експресия, свързващ ретиноиди и специфични ДНК сегменти, и с влияние върху растежа и диференциацията на нормалните клетки от миелоидния ред (25,26). Образуваният *PML::RARA* фузионен ген на дериватната 15-та хромозома е с абнормна онкогенетична активност, като възпрепятства диференциацията на клетките в промиелоцитен етап и стимулира тяхната извънредна пролиферация. Детекцията му носи както диагностично и прогностично значение, така и служи за проследяване възникването на MRD и молекулярен релапс (26). Тази генетична характеристика обуславя добрия терапевтичен отговор на all-trans retinoic acid (ATRA) и arsenic trioxide (ATO) с постигане на пълна ремисия в над 90% от случаите. Двата медикамента се свързват в химерния протеин с *RARA* и *PML*, съответно, и инхибират неговата абнормна активност (25,26). Прието е, че с изключение на неблагоприятния комплексен кариотип, придружаващите цитогенетични аберации не променят прогнозата при пациенти с $t(15;17)(q24;q21)$ (27).

2.1.1.2.2 ОМЛ с *RUNX1::RUNX1T1* фузия

Съставлява около 4-8% от случаите на ОМЛ и се характеризира с по-млада възраст на пациентите и добра прогноза предвид задоволителната чувствителност спрямо химиотерапевтични средства. Изключение правят случаите на комбинация с мутации, влошаващи прогнозата (28). На хромозомно ниво фузията се дължи на транслокация $t(8;21)(q22;q22)$, и включва два гена – *RUNX1* (runt-related transcription factor 1), разположен на дългото рамо на хромозома 21 и *RUNX1T1*, разположен на дългото рамо на хромозома 8. Първият кодира α субединицата на т.нар core-binding factor, който представлява свързващ се с ДНК транскрипционен фактор, есенциален за диференциацията на миелоидните клетки (29). *RUNX1T1* от своя страна е ген с широка експресия, особено в сърдечна и мозъчна тъкан, където координира процесите на ангиогенеза. По отношение на клетките на кръвния ред най-силно участие взема в еритропоезата. Кодираният от него протеин ЕТО, служещ като транскрипционен корепресор, е ангажиран в механизми за потискане активността на други гени (28). Фузионният ген, разположен върху дериватната 8-ма хромозома, води до формирането на химерен протеин с абнормна активност. Повишава се експресията на *RUNX1T1*, което от своя страна повлиява нормалната функция на *CBFa* и свързаните с него гени. В резултат на фузията се възпрепятстват нормалните процеси на матурация и

диференциация на ХСК, както и експресията на други гени със съществена роля ДНК репарацията и програмираната клетъчна смърт. Повлиява се активността на транскрипционни фактори като *CEBPA*, *GATA-1*, *PU.1*, както и на тумор-супресорни гени като *NF1* (Neurofibromin 1) и *RUNX3*. Известно е също взаимодействието на химерния протеин с микрорибонуклеинови киселини (микроРНК), както и с епигенетични механизми като хистоновите деацетилази и деметилази (29). По отношение на давността на тази мутация в еволюцията на клоналния процес засега е прието, че тя възниква рано и е инициращо, дори прелевкемично събитие, което обаче не е достатъчно за разгръщането на пълния левкемичен процес (30,31). Отчитането на този генен продукт във венозна кръв или в материал от КМ е маркер за наличие на MRD (29). Хромозомното преустройство може да се идентифицира чрез хромозомен анализ, FISH или PCR. Освен описаната транслокация често се срещат придружаващи мутации. От цитогенетичните могат да се срещнат хромозомни аберации като тризомия по 8-ма хромозома, делеция в дългото рамо на хромозома 9, монозомия по полово хромозома. На молекулярно-генетично ниво често се отчитат ко-мутации в гени като *KIT*, *FLT3-ITD*, *RAS*, *ASXL1/2* и др. Влиянието на тези асоциирани генетични събития не е изцяло изяснено, но за някои като *KIT* мутациите е известно, че влошават изначално добрата прогноза, докато други като *RAS* не я повлияват (28). Както бе изтъкнато по-горе, ОМЛ с t(8;21)(q22;q22.1) често се асоциира с M2 от FAB класификацията (21,28,29) .

2.1.1.2.3 ОМЛ с *CBFB::MYH11* фузия

Среща се в 5-8% от случаите и се характеризира с добра прогноза поради добрия отговор на високи дози Cytarabine (32). Както перичентричната инверсия inv(16)(p13.1q22) така и реципрочната транслокация t(16;16)(p13.1;q22), водят до формиране на фузионен ген между *CBFB* (core binding factor beta subunit) гена, намиращ се на късото рамо на 16-та хромозома, и *MYH11* (myosin heavy chain 11), разположен върху дългото рамо на същата. *CBFB* е част от фамилия транскрипционни фактори, регулиращи гени с влияние върху хематопоезата (напр. *RUNX1*) и остеогенезата. *MYH11* кодира основен за гладката мускулатура контрактилен протеин (33). Новият химерен протеин е с функция, свързана със абнормно стимулиране на клетъчното самообновяване за сметка на потисната диференциация. Подобно на предходния описан подтип, и тук придружаващи мутации, свързани с лоша прогноза (*KIT*, *FLT3*) повлияват негативно състоянието на пациентите. За разлика от тях, тризомията по 22-ра хромозома се асоциира с по-добра прогноза. Този подтип отговаря на M4Eo от FAB класификацията (34).

2.1.1.2.4 ОМЛ с *DEK::NUP214* фузия

Възниква най-често *de novo* и е с честота 0,7-1,8%. Среща както при деца, така и при възрастни, като последните са на средна възраст 35 години без полова предилекция. При тях подтипът се характеризира с по-леко изразена левкоцитоза в сравнение с останалите подтипове, а в клиничен аспект - с повишен риск от развитие на DIC синдром и инфекции. Морфологично се асоциира с уни- или биклонална дисплазия, базофилия и наличие на ринг сидеробласти (35). Дължи се на транслокация с формиране на фузионен ген между *DEK*, разположен в цитолента 6p22.3, и *NUP214* (Nucleoporin 214kDa) – в цитолента 9q34.1. *DEK* е протоонкоген, кодиращ протеин с множество ДНК-свързващи домени - транскрипционен активатор или репресор според лигандите си. Той има роля в запазване интегритета на хетерохроматина, както и в регулацията на стволовите и прогениторните клетки. Неслучайно, неговата абнормна активност е асоциирана с множество неопластични процеси и има особено отношение като активатор на миелоидната генна експресия. *NUP214* кодира протеин с локализация в ядрената мембрана, участващ в ядрено-цитоплазмения транспорт (36). Фузионният *DEK-NUP214* ген, разположен върху дериватната 6-та хромозома, се транслира в нуклеарен протеин, повишаващ протеиновата синтеза в клетките от миелоидния ред без да блокира тяхната диференциация. Транслокацията най-често е самостоятелно хромозомно преустройство, но в 20% от случаите се откриват и тризомия по 8-ма или по 13-та хромозома (37). На молекулярно ниво се отчита и висока степен на мутации в *FLT3* гена, най-вече *FLT3-ITD*, които влошават тежестта на клиниката и прогнозата на заболяването. Наличието на тази транслокация се асоциира с неблагоприятна прогноза по отношение на постигната ремисия (под 50%) след химиотерапия, и на средна преживяемост – обикновено 1 година след диагностициране. Що се отнася до FAB класификацията, ОМЛ с t(6;9)(p23;q34.1) стои на междинна позиция между M2, M3 и M4 подтиповете (35).

2.1.1.2.5 ОМЛ с *RBM15::MRTFA* фузия

Включва по-малко от 1% от всички случаи на ОМЛ и се среща основно при деца. Обикновено възниква през първите 6 месеца от живота, включително се съобщава за вродени форми. Засегнатите деца най-често са без синдром на Даун като се отчита значителна полова предилекция за сметка на женския пол. Най-често става дума за *de novo* възникнал процес, клинично изявяващ се с маркирана хепатоспленомегалия, анемия, тромбоцитопения и известно завишаване на клетките от белия кръвен ред. Поради специфичната възраст на изява може да наподобява други характерни за нея

неопластични състояния като хепатобластома (38,39). Морфологично се отличава с наличие на различни по размер мегакариобласти и недиференцирани клетки както в периферната кръв така и в КМ. Наблюдават се още микромегакариоцити и нормо- до хиперцелуларен КМ със значителна фиброза като последната би могла да затрудни аспирирането на биопсичен материал. Микроскопски видимата транслокация между 1-ва и 22-ра хромозома води до фузия между два гена. *RBM15* се намира в позиция 1p13.3 и кодира РНК-разпознаващи мотиви. *MRTFA*, разположен в цитолента 22q13.1 носи информация за транскрипционен фактор, повлияващ множество процеси - на клетъчен растеж, пролиферация и диференциация и др. Фузионният *RBM15::MRTFA* ген на дериватната 22-ра хромозома кодира химерен протеин, повлияващ хроматиновата организация, диференциация, повлияна от *HOX*-гените (homeobox genes), както и различни сигнални пътища. Образуването и активността му се приемат за инициращо събитие в дадения левкемичен процес (38,39). По отношение на кариотипа, най-често се касае за изолирана хромозомна аберация, но могат да се срещнат и случаи с комплексен кариотип, полиплоидия или други придружаващи аберации, особено при деца над 6-месечна възраст (40). Повечето източници отличават този подтип като такъв със сравнително по-лоша прогноза спрямо останалите педиатрични форми, включително ОМЛ при пациенти със синдром на Даун. (38). Като паралел към FAB класификацията, подтипът изявява фенотип на остра мегакариобластна левкемия и отговаря на М7 (39,40).

2.1.1.2.6 ОМЛ с *BCR::ABL1* фузия

Добре познатата филиделфийска хромозома се среща първоначално и предимно при пациенти с ХМЛ. Характерна е също при съответно 5% и 20% от децата и възрастните с ОЛЛ. Подтипът е с честота под 1% при пациенти с ОМЛ и е нововъведение в последната корекция на класификацията на WHO след провизорно присъствие във версията от 2016 (41). Той е също от двете изключения, изискващи присъствие на повече от 20% бласти при поставяне на диагноза с цел отдиференциране от ХМЛ (24). Последното може да се окаже особено трудно в рутинната практика. Някои литературни източници посочват други генетични маркери като делеции в *IDH*, *IKZF1* и *CDKN2A* като метод за изясняване тъй като последните не са характерни за бластна криза при ХМЛ, а се срещат при ОМЛ с коментиранията фузия. Като нов и по-рядък подтип, познанията за хода и прогнозата на заболяването са все още оскъдни. Доминира мнението за високо-рисковия ѝ характер, който обаче най-вероятно зависи и от мутациите, допринасящи за левкемичния процес. Това определя важноста на

характеризирането на генетичния фон за по-точно определяне на риска и прогнозата при тези пациенти (42). По отношение на терапията, третирането с конвенционални тирозинкиназни инхибитори обикновено е с лоша прогноза, но се регистрират по-добри резултати с нови таргетни медикаменти от тази група. Тук влияние оказва присъствието на допълнителни хромозомни аномалии, както и туморният товар (41)

2.1.1.2.7 ОМЛ с *KMT2A* структурни изменения

Подтипът е с честота едва 1-2% процента при възрастни, но достига 15-20% от случаите ОМЛ сред педиатричната популация (43,44). Преустройството може да възникне както *de novo*, така и вследствие на химиотерапевтични медикаменти, инхибитори на топоизомераза II. Клинично могат да се наблюдават органомегалия, засягане на ЦНС, DIC синдром и тъканна инфилтрация. Най-често се наблюдава транслокация между два гена – *MLL3* (Super Elongation Complex Subunit), намиращ се на късото рамо на хромозома 9, и *KMT2A* (Lysine Methyltransferase 2A) – на дългото рамо на 11-та хромозома (43). Първият кодира ядрен протеин с функция на транскрипционен активатор. *KMT2A* носи информация за протеин също с нуклеарна локализация, ангажиран с транскрипционна регулация и по-конкретно ремоделиране на хроматина посредством няколко свързващи места по повърхността си. Той е от огромно значение по време на ранното развитие, а също и за хематопоезата. Хромозомното преустройство най-често води до формиране на фузионен ген *KMT2A::MLL3* на дериватната 11-та хромозома с онкогенетична активност и генен продукт, възпрепятстващ нормалната матурация. Традиционно отговаря на подтипове М5а и М4 от FAB класификацията. Транслокацията е самостоятелна, или в около 20% от случаите - в комбинация с тризомия на хромозома 8 (45). Прогнозата при възрастни се оценява като неблагоприятна, независимо от конкретния подвид на преустройството (46). При деца се разглежда основно като неблагоприятна, но варира според фузионния партньор на *KMT2A* (47).

2.1.1.2.8 ОМЛ с *MESOM* структурни изменения

Представява още една рядко срещана форма с честота 1-2%, като пациентите са на средна възраст 50 години. Половата предилекция е пренебрежима, но се отчитат някои расови различия по отношение на клинични и лабораторни характеристики (48,49). Заболяването възниква *de novo* или от предхождащ миелодиспластичен процес. Морфологично се наблюдават костно-мозъчна хиперплазия, мултилинеарна дисплазия и дисмегакариопоеза. Клиниката се отличава с анемия, спленомегалия и нормално или

повишено ниво на тромбоцити във венозна кръв. Диагнозата изисква присъствие на 20 или повече процента бласти в КМ или във венозна кръв и наличие на едно двете патогномонични хромозомни преустройства - транслокация $t(3;3)(q21.3;q26.2)$ или инверсия $inv(3)(q21.3q26.2)$. Последните водят до засягане функцията на два гена - *GATA2* в цитолента 3q21.1, и *MESOM* - в 3q26.2. *MESOM* е протоонкоген, кодиращ ядрен протеин, регулатор на транскрипцията, клетъчния цикъл и апоптозата. *GATA2* кодира транскрипционен фактор, участващ в процесите на хемопоеза и пролиферация на ендокринните клетки. Хромозомните преустройства водят до трансформация на *MESOM* в онкоген поради свръхекспресия, успоредно с хаплоинсуфициенция по отношение на *GATA2*, водещо до развитие на левкемичен процес. Отличава се с агресивен ход и особено неблагоприятна прогноза поради липса на отговор спрямо конвенционалните химиотерапевтични средства, както и поради ограничената преживяемост (48). Наличието на монозомия по 7-ма хромозома при този подтип допълнително влошава прогнозата. Възможни придружаващи цитогенетични находки са още комплексният кариотип и делецията в дългото рамо на 5-та хромозома. В 28% от случаите се отчита асоциация с мутации в *NRAS* протоонкогена, а по-рядко – *FLT3-ITD* и *NPM1* мутации. По отношение на FAB класификацията, ОМЛ с $inv(3)(q21.3q26.2)$ или $t(3;3)(q21.3;q26.2)$; *GATA2*, *MESOM* може да отговаря всеки подтип с изключение на М3 (50).

2.1.1.2.9 ОМЛ с *NUP98* структурни изменения

Нуклеопорин 98 (*NUP98*), разположен в цитолента 11p15 в норма кодира протеин, част от ядрен поров комплекс. Структурните изменения, които включват гена водят до фузии, като са описани над 30 възможни парньора с функции като епигенетичен контрол и транскрипционна регулация. Левкемогенният процес в тези случаи се задвижва именно от промени в хроматиновата структура и генната експресия, последвани от пролиферативни промени след мутации в други гени (51,52). Наблюдава се при педиатрични пациенти и много рядко при възрастни, и се характеризира с лоша прогноза по отношение на обща преживяемост. Маркерът може да се използва и за предикция за отговор на химиотерапия, тъй като се открива асоциация с терапевтична резистентност. Може да се наблюдават ко-мутации в *FLT3*, *WT1*, *CEBPA* и др. (52)

Всички описани дотук подтипове на класификация на WHO, обновена през от 2022-ра година, се асоциират с абнормен кариотип, включващ една или повече характерни хромозомни аберации. В поне 50% от случаите на ОМЛ обаче се открива нормален кариотип (НК). При последния етиологията е свързана с далеч по-детайлни промени,

каквито са мутациите на ниво ген до единичен нуклеотид. Освен обособените към момента подтипове според WHO с конкретни генни промени, ще бъдат разгледани също някои важни изменения на ниво ген с известно участие в левкемогенния процес, макар и без отредена собствена позиция в последната ревизия.

2.1.1.2.10 ОМЛ с *NPM1* мутация

Най-честата известна генна мутация при ОМЛ е тази в *NPM1* (Nucleophosmin 1) гена, откривана в около 30% от случаите на ОМЛ като цяло и в 45-64% от пациентите с НК. Среща се по-често при жени като средната възраст на възникване на този подтип е около 50 години. 85% от пациентите са с НК, а при останалите се наблюдават основно вторично възникнали хромозомни аберации. Клинично този подтип се характеризира с високи стойности на клетки от белия кръвен ред, на бласти в КМ и с екстремедуларни прояви (53). Генът се намира в цитолента 5q35.1, съдържа 12 екзона и кодира фосфопротеин с обширна експресия, придвижващ се между ядрото и цитоплазмата (54). Нормалният протеин има основно нуклеоларна локализация и 4 функции – рибозомна синтеза, поддържане на геномната стабилност, р53-асоцииран отговор при увреда и модулация на растеж-потискащи сигнали чрез взаимодействие с Arf (Alternate reading frame protein). Мутациите биват различни, но резултатът в потенциране на активността на *NPM1* и промяна на неговата локализация в основно цитоплазмена. Най-често се доказва инсерция от четири базови двойки (base pairs – bp) в екзон 12. Интересен е и фактът, че мутациите са винаги хетерозиготни и обикновено в клетъчното ядро продължават да присъстват див тип *NPM1* протеини (53). Поради убиквитерното представяне на белтъка мутациите водят до плейотропен ефект, на места свързан със загуба, а на други - с придобиване на функция (loss-of-function and gain-of-function effects) (55). Индуцираният левкемичен процес, изследван в knock-out мишки, демонстрира съвкупност от засегнати по различен начин клетъчни процеси. Загубата на функция води до хаплоинсуфициенция по отношение на клетъчната диференциация с блок в еволюцията на мегакариоцитите и тромбоцитопения. От друга страна, под влияние на променените свойства на мутантния протеин, се променят и свойствата на взаимодействащите с него *ARF* и *TP53* тумор-супресорни гени. Оттук се нарушава нормално настъпващия арест в клетъчния цикъл при възникнали грешки. По механизма на gain-of-function пък се нарушават протеолитичните качества на каспаза-6 и каспаза-8, съответно механизмите на апоптоза. Съобщава се още за повишаване активността на с-трус протоонкогена с преминаването му в онкоген, което в норма би трябвало да доведе до тумор-супресорен отговор, но не и при налична *NPM1* мутация поради

засягане на функциите на *ARF* и *TP53* (53). Въпреки всички описани последствия тази мутация не е самодостатъчна за развиване на същински левкемичен процес – предполага се участие на допълнителни ко-инициращи генетични събития. Проучени са често срещаните взаимодействия с мутации в гени като *FLT3* и *DNMT3A*, които са в различни еволюционно-йерархични взаимоотношения с *NPM1* мутациите. *FLT3* например най-често мутира в клетъчна субпопулация на вече съществуващ *NPM1* мутантен клон. При ко-присъствието на *DNMT3A* мутации, обратно, се приема че именно последните са по-ранно, дори прелевкемично настъпващите, налични месеци до години преди развиването на клинично различим левкемичен процес. Известно е също подчертано рядкото комбиниране с някои от вече обсъдените по-горе мутации – *RUNX1*, *PML-RARA*, *TP53* (Tumor Protein 53), *MLL*, *MYH11-CBFB*, биалелни *CEBPA* и др. По отношение на 15% от пациентите с този подтип, при които има и придружаващи хромозомни аномалии се оказва, че те са вторични както по време на възникване така и по значение, характеризират се с нестабилност в еволюцията на левкемичния процес и не повлияват прогнозата (55). *NPM1* мутациите се наблюдават изключително в клетките от миелоидния, но не и от лимфоидния ред, като възможните обяснения за това включват потенциален токсичен ефект спрямо лимфоидния растеж, възникване в миелоидна прогениторна клетка и др. Още повече, тези мутации се смятат за характерни единствено за нарушена моноцитна диференциация в аспекта на ОМЛ. Най-често *NPM1* мутациите са налични и по време на релапс и изчезват при ремисия, което позволява използването им за мониторинг на MRD и възникване на релапс. Загубата им по време на последния се свързва с вторичен левкемичен процес или на релапс от по-малък клетъчен клон. Съответства най-често на М4 и М5 и по-рядко на М3 от FAB класификацията. Асоциира се с добра прогноза в отсъствие на *FLT3-ITD* и *DNMT3A* мутации по отношение на отговор спрямо химиотерапевтични средства, постигане на пълна ремисия и обща преживяемост. Поради това пациентите с този подтип обикновено се подлагат на индукционна терапия вместо предпочитаната в други случаи алогенна ТХСК. Персистирането на *NPM1* мутациите през втория цикъл на химиотерапия обаче се обвързва с повишен риск от релапс и понижена обща преживяемост (53,55). При пациенти с рефрактерна ОМЛ или релапс *NPM1* мутациите обаче не влияят на обща преживяемост или преживяемост в отсъствие на релапс (56). Мутациите се доказват чрез молекулярно-генетични методи като Real Time PCR, MLPA, секвениране по Sanger, NGS (53,55).

2.1.1.2.11 ОМЛ с *CEBPA* мутация

Самостоятелен подтип ОМЛ, характеризиращ се с генна мутация, е този с мутация в *CEBPA* (ССААТ/enhancer binding protein α) гена. Среща се в 2-15% от случаите на *de novo* ОМЛ като честотата при индивиди от азиатски произход е по-висока спрямо тези с европейски (57,58). Генът включва само екзони и е разположен в цитолента 19q13.1 (59). *CEBPA* носи информация за транскрипционен фактор, свързан с функции като тъкан-специфична експресия и пролиферационен арест. По отношение на хематопоезата в частност, влиянието му е концентрирано върху миеломоноцитната пролиферация и диференциация. Описани са множество различни мутации, които се обособяват в два основни типа – N-терминални и C-терминални. Първите нарушават рамката на четене (frameshift mutations), а оттам и синтеза на дивия тип протеин. За негова сметка се синтезира нефункционална скъсена изоформа, оказваща доминантно-негативен ефект върху продукта на незасегнатия от мутация втори алел. C-терминалните мутации биват делеции и инсерции, които запазват рамката на четене (in-frame mutations), но засягат свързването с ДНК или необходимите конформационни промени. *CEBPA* мутациите могат да бъдат моно-, биалелни, или хомозиготни, което определя фенотипната изява и прогнозата. Докато при моноалелните има известно количество див тип белтък и съответно експресия, то при другите две форми те липсват. Добрата прогноза обаче се свързва единствено с пациентите с доказана биалелна мутация в отсъствие на *FLT3* мутация и на цитогенетични аберации. Известно е, че този подтип обикновено не се комбинира с често срещаните и описани горе цитогенетични аберации, но може да се наблюдава в различни комбинация с мутации в други протеин-кодиращи гени (57). Описани са множество такива, като някои от тях повлияват прогнозата, а други не оказват такова влияние. Често се срещат например ко-възникващи мутации в епигенетични регулатори като ДНК-деметиращите *TET2* (ten-eleven translocation methylcytosine dioxygenase 2) гени – 40% от случаите с биалелна *CEBPA* мутация имат и *TET2* мутация, което се отразява негативно на общата преживяемост и на преживяемостта с липса на събития (event-free survival; EFS) (60). В същото време тумор-супресорният *WT1* ген е с мутация в 30% от случаите с биалелна *CEBPA* мутация, но това не променя прогнозата на пациентите. От транскрипционните фактори най-често срещана е ко-мутацията в *GATA2* – 15-35% от случаите като това подобрява продължителността на общата преживяемост и на EFS. По отношение на *FLT3* гена по-често срещана е ко-мутацията *FLT3-ITD* - 15%, с негативен ефект върху прогнозата (57). В диагностичен план се съобщават трудности във връзка с насищането

на GC-последователности в гена, което значително затруднява процесите на PCR и секвениране по Sanger. За разлика от тези методи, NGS би могъл да превъзмogne тези особености, но засега не се прилага достатъчно широко (58,61).

2.1.1.2.12 Миелодисплазия-свързана ОМЛ

Представява особено важен елемент от класификацията на WHO от 2022, и съответства на 25-48% от случаите (62,63). В този подтип се включват всички случаи на ОМЛ, развити след МДС или МДС/Миелопролиферативни неоплазми (МПН), включително Хронична миеломоноцитна левкемия, ОМЛ с мултилинейна дисплазия или *de novo* ОМЛ с МДС-свързани цитогенетични аберации (63). Редно да се изяснят и използваните понятия – ОМЛ с мултилинейната дисплазия се дефинира като наличие над 20% бласти в КМ или венозна кръв, дисплазия в над 50% от клетките и на повече от две хематопоеични клетъчни линии. Също така, за категоризирането на този подтип се изключва наличие на мутации в *NPM1*, *CEBPA*, както и на гореописаните генетични мутации при ОМЛ с определящи генетични аномалии (Таблица 2) (24). Характерни цитогенетични промени са случаите с комплексен кариотип, т.е наличие на три или повече несвързани цитогенетични аберации, невключващи *CBFB* и *PML-RARA* преустройства, както и други, показани на таблица 3.

Таблица 3. Генетични критерии за Миелодисплазия-свързана ОМЛ според WHO, 2022 (Адаптирана по Khoury et al, 2022) (24)

<p>Определящи цитогенетични аберации</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Комплексен кариотип • 5q делеция или загуба поради небалансирана транслокация • Монозомия 7, 7q делеция или загуба поради небалансирана транслокация • 11q делеция • 12p делеция или загуба поради небалансирана транслокация • Монозомия 13 или 13q делеция • 17p делеция или загуба поради небалансирана транслокация • Изохромозома 17q • idic(X)(q13)
<p>Определящи соматични мутации</p>	<ul style="list-style-type: none"> • <i>ASXL1</i> • <i>BCOR</i>

	<ul style="list-style-type: none"> • <i>EZH2</i> • <i>SF3B1</i> • <i>SRSF2</i> • <i>STAG2</i> • <i>U2AF1</i> • <i>ZRSR2</i>
--	---

На молекулярно ниво в честа асоциация с този подтип са мутации в гените в *ASXL1* (21-35%), *TP53* (22%), *IDH1* и 2 (25%), *RUNX1* (15-17%), *TET2* (15%), *DNMT3A* (8-9%), *FLT3* (2-7%), включително епигенетични регулатори и сплайсинг фактори (64,65). Това неизменно се отразява и на патогенезата на прогресирация в ОМЛ миелодиспластичен процес. Най-поддържана засега е хипотезата за двата удара на Knudson, според която за генезата на даден неопластичен процес в придобита, не-наследствена форма са необходими поне две генетични събития. Последните могат да засягат процесите на диференциация, апоптоза или пролиферация, като измененията могат да бъдат в някои от описаните по-горе гени. Все пак е трудно да се посочат мутации, които да са характерни изключително за този подтип (66). Участие най-вероятно имат и епигенетични механизми, най-вече свързани с хиперметилация на CpG участъци, както и задължителната за всеки неопластичен процес усилена ангиогенеза (64). Според друга хипотеза процесът на трансформация на МДС в ОМЛ не е последователен, а протича успоредно в КМ с две клетъчни линии – една преминаваща в МДС и една прелевкемична, произхождащи от една и съща прогениторна клетка. В такъв случай броят, видът и времето на настъпилите мутации в еволюцията на процеса биха определили съдбата на даден клетъчен клон (67). В демографско отношение пациентите обикновено са в напреднала възраст – средно 73 години, което обикновено се асоциира с повече коморбидни състояния (62). За тях е характерна още неблагоприятна прогноза по отношение на терапевтичен отговор, обща преживяемост, и степен на постигане на ремисия (62,63). Този профил е свързан от една страна с възрастта и придружаващите заболявания, а от друга – с предходно прилаганата цитостатична терапия във връзка с подлежащия МДС (62).

ASXL1 (Additional sex comb-like 1) е ген, участващ в развитието на 5-17% случаите на ОМЛ и често асоцииран с ОМЛ с миелодисплазия-свързани промени е, разположен в цитолента 20q11 (68). Мутациите в него първоначално от откриват и асоциират с МДС, но в последствие става ясно, че играят роля и в много други пре-малигнени и малигнени процеси, включително в ОМЛ (69). Генът кодира ядрен протеин с

епигенетична регулаторна функция – лиганд-зависим ко-активатор на рецептора за ретиноева киселина, потенциално свързващ се с хистонови модификатори (70). Обикновено мутациите са frameshift или nonsense и водят до скъсяване на протеина. Те упражняват ефекта си по механизма на loss-of-function, gain-of-function, хаплоинсуфициенция или доминантно-негативно спрямо дивия тип алел (65,69). Това води до абнормна генна експресия и допринася за развитието на неопластичния процес – ранни, но не и самодостатъчни събития (69). Смята се обаче, че те ускоряват трансформацията на МДС и Хронична миеломоноцитна левкемия в ОМЛ (65). Повечето проучвания стигат до извода, че мутации в гена по-често се срещат сред пациенти с НК. Установяват се обаче ко-мутации в *TET2* и *DNMT3A*, които не променят значително прогнозата в тези случаи (70). Също се отчитат ко-мутации в *FLT3* и *RUNX1*, но не и в *NPM1* (65). По отношение на FAB класификацията мутациите в *ASXL1* често се асоциират с М5 (70). Те представляват негативен прогностичен маркер по отношение на обща преживяемост особено при НК и при пациенти над 60-годишна възраст (69,70). Освен *ASXL1*-мутациите по отношение на ОМЛ с миелодисплазия свързани промени има единствен друг ген и по-конкретно мутации в него, представляващи прогностичен маркер - тези в тумор-супресорния TP53 (65)

BCL6 co-repressor (*BCOR*), намиращ се в цитолента Xp11.4 представлява транскрипционен репресор. Като част от т.нар polycomb repressor complex 1, *BCOR* взема участие в нормалните процеси на хематопоеза (71,72). Асоциира се с лоша прогноза по отношение на обща преживяемост и преживяемост в отсъствие на релапс, особено що се отнася до случаите с нормален кариотип (71,73). Наблюдаваната терапевтична резистентност се обяснява също с нарушаването на епигенетичния контрол, упражняван в норма от протеиновия комплекс, и последващата извънредна транскрипционна активност (72). Тъй като ко-мутации в *NPM1* и *FLT3-ITD* се наблюдават изключително рядко, маркерът има приложение в прогнозирането на негативните за тези две мутации случаи (71).

TET2*, *EZH2 (Enhancer of zeste homolog 2) и ***IDH1&2*** (Isocytate dehydrogenase 1 & 2) са 4 допълнителни гена, свързани с епигенетична регулация от една страна, и с ОМЛ от друга. *TET2*, намиращ се в цитолента 4q24 (74), кодира протеин с генно-регулаторна тумор-супресорна функция. Последната се осъществява посредством ДНК деметилиране. Мутации, водещи до загуба на последната често се придобиват в хода на еволюция на МДС в ОМЛ, както и при миелопролиферативни неоплазми (75). Генният продукт на *EZH2* (7q36) (76) е епигенетичен фактор с функция на тумор-супресор или

на онкоген в различните видове неопластични процеси. При ОМЛ обикновено се касае за мутации, водещи до хиперметилация и загуба на функция, което обуславя и неблагоприятна прогноза по отношение на обща преживяемост и EFS (77). Макар и *EZH2* да не е самостоятелен прогностичен маркер, това важи особено при ко-мутации в двата гена и в *RUNX1* (78). Нарушенията в *TET2* и *EZH2* водят до засягане на хистоновата модификация и до хромозомна нестабилност. Последната от своя страна предразполага към грешки при репликация посредством влияние върху протеини като *MAD2* и *CDC20*, контролиращи ключови етапи в митотичното делене, и анеуплоидии (75). Също така, мутациите в *EZH2* повишават значително химиотерапевтичната резистентност при ОМЛ (78).

IDH1 и *IDH2* са разположени съответно в цитоленти 2q34 и 15q26.1 (79). Кодираните от тях ензими вземат участие в множество метаболитни процеси, както и в такива на епигенетична регулация. Мутациите в тези два гена са взаимно изключващи се и представляват ранни генетични събития в около 20% от случаите на ОМЛ (80). Тази честота варира в различните възрастови групи – 0-4% за децата и 6-19% за възрастните пациенти (81). Мутациите често се комбинират с НК. Нарушенията водят до формиране на онкометаболита 2-хидроксиглутарат и последващо хиперметиране на ДНК. Също така се повлияват процесите на генна експресия, клетъчна пролиферация и диференциация. Наличието на тези мутации се асоциира с понижена обща преживяемост според някои автори (80), но тази прогноза, както и терапевтичният отговор, значително се подобряват при млади пациенти с наличие на ко-мутации в *NPM1* (81,82).

Четири други гена, асоциирани по-често с този подтип, са сплайсинг факторите *SF3B1*, *SF3B2*, *U2AF1* и *ZRSR2*. Тяхното участие в норма е рано през формирането на сплайсеозомите (83). Мутациите в тези гени са свързани с нарушена експресия на изоформите на други генни продукти, ангажирани в хематопоезата (84). Приемат се като ранни събития в левкемогенния процес с широко повлияване на транскриптома и с промени в хематопоезата (83). Приети за взаимноизключващи се, при ОМЛ се асоциират се с лоша прогноза по отношение на обща преживяемост, преживяемост в отсъствие на релапс и терапевтичен отговор (83,84)

STAG2 мутациите се характеризират със засягане на кохезиновия комплекс, като функционално това включва процесите на генна регулация и пространствена организация на ДНК (85). В патогенезата са заложили епигенетични механизми като взаимодействията промотор – енхансер и хистонови модификации, водещи до промяна

в онкогенната експресия. Тези характеристики носят определен потенциал за лечение с таргетен подход (85,86). Предполага се и повлияване на процесите на растеж и матурация на ХСК (87). Наблюдават се ко-мутации в *NPM1*, *FLT3*, *CEBPA* и др (85). Описва се и по-честа асоциация при възрастни пациенти с разгледаната вече *RUNX1-RUNX1T1* фузия, но все пак повече от половината пациенти са с НК (85,87). *STAG2* мутации се срещат и маркират прогресия при пациенти с герминативни *GATA2* мутации, предразполагащи към миелоидни неоплазии (88). По отношение на левкемичния процес тези събития се отнасят към ранни, дори прелевкемични такива. Клиничното значение им значение силно зависи от наличните ко-мутации и от кариотипа, но се отчита значително по-ниска 5-годишна обща преживяемост спрямо пациентите с див тип *STAG2* (85,87)

2.1.1.2.13 ОМЛ с други дефинирани генетични промени

Отделен по този начин, този подтип дава възможност за обогатяване с нови генетични фактори на базата на информация от мащабни молекулярно-генетични проучвания. Към момента включва случаи на ОМЛ с по-редки генни фузии като *RUNX1T3::GLIS2*, *KAT6A::CREBBP*, *FUS::ERG*, *MNX1::ETV6* и *NPM1::MLF1* (24).

2.1.1.2.14 Допълнителни гени в ролята на ОМЛ, без обособена позиция в класификацията

2.1.1.2.14.1 *FLT3*

Редно да се изясни значението на мутациите в *FLT3* (FMS-like tyrosine kinase 3) в етиологично отношение. Въпреки че тези мутации все още не се обособяват в отделен подтип в класификацията на WHO, те се откриват в около 30% от всички новодиагностицирани пациенти с ОМЛ, включително при деца (89). *FLT3* генът, намиращ се в цитолента 13q12.2 (90), се характеризира с широка експресия в хематопоеичните прогениторни клетки и в бластите (89). Генът кодира тип III тирозин-киназен рецептор, който при свързване с лиганд се активира и стимулира клетъчната пролиферация за сметка на процесите на диференциация и апоптоза. Съществуват два добре познати вида мутации - *FLT3-ITD* (internal tandem duplicates) и *FLT3-TDK* (tyrosine kinase domain). В основата си те имат сходен ефект – лиганд-независима активация на рецепторите (91). *FLT3-ITD* се откриват при 25% от новодиагностицираните пациенти с ОМЛ. Представяват различни по размер (3 до 1000 нуклеотида) in-frame дупликации в регион, отговарящ за инхибирането на сигнал в отсъствие на лиганд. *FLT3-ITD* се асоциират с интермедиерна прогноза по отношение

на възникване на релапс и обща преживяемост. Това важи както в самостоятелен вид, така и в комбинация с NPM1 мутация (3). *FLT3-ITD* маркерът има потенциал и за оценка на терапевтичния отговор (92). *FLT3-TDK* са характерни за 5% от новодиагностицираните с ОМЛ пациенти и представляват точкови мутации в ключов за рецепторната конформационна стабилност участък. Тяхното прогностично значение засега е по-неясно и се определя от асоциираните варианти на хромозомно или генно ниво (89). Мутациите се доказват чрез PCR или NGS технологии. Случаите с доказани *FLT3* мутации подлежат на прицелна терапия с малки молекулни *FLT3*-инхибитори, представени от множество препарати в две поколения. Прилагат се също хипометилиращи агенти, мултикиназни инхибитори, биологични агенти и др (89,91,93).

2.1.1.2.14.2 RUNX1

Извън рамките на разгледаната ОМЛ с транслокация между 8-ма и 21-ва хромозома, могат да възникнат мутации и в самия *RUNX1* ген. По-горе същността и функцията на последния бе описана подробно, но е важно да се отбележи, че мутации в гена са често срещани в множество неопластични процеси, засягащи миелоидния и лимфоидния ред. Тези мутации се наблюдават както като соматични, така и като герминативни, унаследяеми събития. Мутации в гена се описват като част от генезата на автозомно-доминантното заболяване FPD/AML (Familial platelet disorder with predisposition to AML), а също и на МДС, ХМЛ и Т-клетъчна остра лимфобластна левкемия (94). В контекста на ОМЛ, *RUNX1* нарушения се срещат в 5.6 – 17.9% от случаите като цяло, с по-ниска честота при деца – 3%, и особено висока при вторична ОМЛ след МДС – 27.7% (95). Сред формите с НК се срещат в 16% от случаите (94). Отчитат се още епидемиологични особености като напреднала възраст и мъжки пол, характерни за този подтип. Мутациите са точкови, най-често моноалелни, някои от които оказват доминантно-негативен ефект. В общия случай се стига до загуба на функция (loss-of-function effect). Основно се засягат два региона – *RHD* (runt homology domain) и *TAD* (c-terminal transactivation domain). Първите засягат ДНК-свързващата повърхност, а вторите водят до синтеза на протеин с липсващ съответен участък. Описаните мутации засягат ключови за хематопоетичните клетки процеси като клетъчен цикъл, ДНК репарация, геномна стабилност, P53-медирана апоптоза, диференциация и матурация. Също така се асоциират с различни сигнални пътища, играещи роля в онкогенезата, както и повишена резистентност към стрес (94,95). Мутацията често е в съчетание с други промени като тризомия 8 или 13, мутации в *FLT3*, *NRAS*, *TET2*, *DNMT3A* гените.

Асоциира се с лоша прогноза във връзка с химиотерапевтична резистентност, ниска обща преживяемост, EFS и обща преживяемост в отсъствие на релапс. Описва се обаче подобрен *in vivo* отговор към комбинирана терапия с venetoclax (анти BCL2 активност) и omacetaxine (транслационен инхибитор) (96). Особено неблагоприятно е наличието ѝ в комбинация с *ASXL1* или *SRSF2* мутации, характерни поначало за МДС. *RUNX1* се използва като прогностичен маркер по отношение на EFS и обща преживяемост. По отношение на FAB класификацията най-често се асоциира с M0, но също и с M1, M2, M4 и M5 (95).

2.1.1.2.14.3 DNMT3A

Важен елемент от генезата на ОМЛ, споменаван неколкократно досега, са вариантите в *DNMT3A* (DNA methyltransferase 3 alpha) гена, намиращ се в цитолента 2p23 (97). Те не са обособени като отделен подтип в класификацията на WHO, но се откриват в 20% от случаите. Тази честота нараства до 30-35% при ОМЛ с НК (98). Генът кодира метилтрансферазен ензим, участващ в епигенетичната регулация на генната експресия чрез метилиране на CpG динуклеотидни участъци. Пациентите обикновено са хетерозиготи по мутация в гена като най-честа е missense мутацията R882H. В следствие на тази промяна се постига доминантно-негативен ефект – инхибиция на метилтрансферазната активност на генния продукт на дивия тип алел с близо 80% чрез повлияване на способността за конформационни промени на белтъка. Това води до неадекватно понижено или повишено метилиране на определени CpG участъци в генома на левкемичните клетки (99,100). Предполага се и повлияване на тумор-супресорни гени, например *CDKN2B*. Последният кодира инхибитор на циклин-зависими кинази и играе роля в клетъчния арест, както и в диференциацията на клетките от миелоидния ред (98). *DNMT3A* мутациите са с негативно прогностично значение по отношение на отговор на стандартна индукция с химиотерапевтични средства, обща преживяемост, постигане на пълна ремисия и преживяемост в отсъствие на заболяване. Това се наблюдава с още по-изразена тенденция при НК и ко-мутации в *NPM1* и *FLT3-ITD*, включително при пациенти след алогенна трансплантация на ХСК (99,101,102). Мутациите се откриват чрез молекулярно-генетични методи като секвениране по Sanger, RT-PCR, NGS и др (98,99).

2.1.1.2.14.4 BAALC

BAALC (brain and acute leukemia, cytoplasmic) е ген, разположен на дългото рамо на хромозома 8 (8q22.3), експресиран в норма в тъканите на ЦНС, в костния мозък, в

невроектодермални тъкани и др (103,104). Предполага се, че кодираните от него транскрипти участват в процесите на пролиферация, диференциация, клетъчна смърт и цитоскелетна функция и интегритет. Една от най-съществените мутации в гена, наречена T-алел, създава свързващо място за транскрипционния фактор *RUNX1*, което води до свръхекспресия на *BAALC*. Тази свръхекспресия се отчита в 28% от пациентите с ОМЛ, като се забелязва значително по-силна асоциация с M0, M1 и M2 от FAB класификацията в сравнение с по-добре диференцираните подтипове (104,105). По отношение на цитогенетичните находки най-често *BAALC* свръхекспресия се среща при пациенти без хромозомни аберации. На молекулярно-генетично ниво се открива асоциация с *NPM1* и вероятна такава с *FLT3-ITD* мутациите. Свръхекспресията на гена възпрепятства диференциацията на клетките от миелоидния ред и потиска процесите на апоптоза за сметка на усилената диференциация на неопластичните клетки. Мутациите в *BALLC* не са самодостатъчни и обикновено се комбинират с такива в известни онкогени, което да тласне развитието на левкемичния процес (105). Асоциират се с неблагоприятен риск при пациенти с НК, както и при тези с налични хромозомни аберации, независимо от техния собствен прогностичен смисъл. Това се свързва с значителната резистентност на химиотерапевтични средства, високата честота на релапси и кратките EFS и обща преживяемост. Тези характеристики обуславят *BAALC* свръхекспресията като независим предиктивен маркер по отношение на първична резистентност и обща преживяемост (104,105).

2.1.1.2.14.5 *WT1*

Освен инициалното му значение за предиспозиция към добре познатия тумор на Вилмс и други състояния с бъбречно засягане, *WT1* всъщност има роля и в други форми на неоплазия. Разположеният на късото рамо на 11 хромозома ген играе роля в развитието на отделителната система, гонадите, а също така в екстрамедуларната хематопоеза (106). *WT1* се характеризира с множество изоформи и интеракции с други гени, сред които *TP53*, *TET2* и *TET3*. Отчита се повишена експресия при остри левкемии, включително при повечето случаи на ОМЛ. *WT1* се характеризира с мутации с 6-15% от новодиагностицираните пациенти с ОМЛ и е честа асоциация с мутации в *FLT3 (-ITD)* и *CEBPA*. Мутациите най-често засягат 1, 7 и 9 екзон и са тип loss-of-function. Конкретната роля в левкемогенния процес все още не е напълно изяснена, но се предполага медиране посредством хиперметилация, а също спомагане на ефекта на други възникнали събития, например гореописаната *RUNX1-RUNX1T1* фузия. Тази свръхекспресия е лош прогностичен маркер, като се асоциира с терапевтична

резистентност, повишен риск за възникване на релапс и ниска обща преживяемост, включително в педиатричната група пациенти (107,108).

2.1.1.2.14.6 RAS гени

Rat sarcoma gene (*RAS*) представлява генна суперфамилия протоонкогени, като при човека основни представители са *HRAS*, *KRAS* и *NRAS*. Кодираният от тях G-протеин подава сигнали за растеж и пролиферация към клетъчното ядро. В норма тези сигнали се генерират периодично само при наличието на лиганд (109). Под формата на онкогени те участват в поне 30% от генезата на различни типове ракови заболявания. По отношение на ОМЛ се отчита присъствие най-вече на *KRAS* и *NRAS* мутации, водещи до свръхекспресия в съответно 4-5% и 11-16% от случаите (110,111). Тези мутации нарушават хематопоезата чрез свръхпролиферация за сметка на процесите на диференциация, като често се придобиват и при трансформация на МДС в ОМЛ (111). Молекулярно-генетично това обикновено са точкови мутации в 1 и 2 екзон на двата гена – субституции и инсерции, като последните водят до промяна в рамката на четене (112). Чести ко-мутации се наблюдават в *FLT3-TKD*, *TET2*, *ASXL1*, *CABPA*, *WT1*, *RUNX1* и др. Асоциират се с понижена обща преживяемост и преживяемост в отсъствие на събития при пациенти, получаващи индукционна терапия (110,111). *KRAS* мутациите в частност се асоциират с по-възрастни пациенти и високи стойности на левкоцити. Приемат се за неблагоприятен прогностичен маркер при пациенти с НК (109). Мутациите се откриват чрез PCR, NGS, секвениране по Sanger и др. (109–112).

2.1.1.2.14.7 TP53

TP53 е тумор-супресорен ген в повсеместна клетъчна експресия. Участва в процесите на регулация на клетъчния цикъл, контрол върху пролиферацията и ДНК репаративните механизми в отговор на клетъчна увреда, стареене и апоптоза. В 5-15% от случаите се наблюдава загубата на функция на гена на соматично с ранно превръщане на прогениторните хематопоеични клетки в пре-левкемични. Особено често се асоциира с миелодисплазия-свързана и терапия-свързана ОМЛ (113,114). Мутациите могат да бъдат и герминативни – Li-Fraumeni наследственият раков синдром се изявява в множество млади индивиди в една фамилия с различни неоплазии, включително и ОМЛ. Що се отнася до последната, *TP53* мутациите са сред най-неблагоприятните, като се асоциират и терапевтична резистентност и понижена обща преживяемост, както след конвенционална химиотерапия, така и след аlogenна ТХСК. Отчита се и зависимост на величината на това прогностично значение от мутационния

товар. Молекулярно-генетично се наблюдават най-често миссенс замени, но също инсерции, делеции и фреймшифт мутации (113,114). Обещаващи, макар и некатегорични, са стратегиите за лечение с алтернативни препарати като хипометилиращи агенти и venetoclax, имунотерапевтици и малки молекулни инхибитори и др. (114).

2.1.1.2.14.8 *PHF6*

Plant Homeodomain Finger 6 (*PHF6*) упражнява епигенетична транскрипционна регулация и принадлежи към групата на тумор-супресорните гени. Представлява изключително консервативен ген в обширна експресия, застъпена най-вече в мозъчната тъкан и хематопоетичните клетки. Поначало се асоциира с 20% от случаите на Т-ОЛЛ при възрастни и деца (115). Мутациите в него в контекста на ОМЛ са рядко срещани късни събития – едва в 3% от случаите, които предвещават прогресия (116,117). Наблюдават се много по-често при мъже, отколкото при жени, което се обяснява с X-свързаното разположение на гена (115). Чести ко-мутации се срещат в гени като *RUNX1*, *U2AF1*, *EZH2*, *ZRSR2* и *ASXL1*, а тези в *SF3B1* са приети за взаимно изключващи се. Както при възрастни, така и при деца се наблюдава по-често в FAB типове без или с ниска степен на матурация. Също така се съобщава на пръв поглед неочаквано повишена експресия на гена при пациенти с ОМЛ, която обаче се обяснява с нарушаване на фините механизми на взаимодействие и транскрипционен контрол (117,118). Именно последният обяснява обичайната резистентност на конвенционалния химиотерапевтик цитарабин, и създава предпоставка за нов таргет за лечение на пациенти с мутация в *PHF6* (118).

2.1.1.2.14.9 *KIT*

C-KIT кодира тирозин-киназен рецептор, който при gain-of-function мутации води до свръхекспресия и матурационен арест. Участва в генезата на различни висове неоплазии, включително ОМЛ. Особено често се среща при т.нар core-binding factor подтипове, описани по-горе – 20-45% от пациентите с тези форми (119). Мутациите, най-често възникващи в екзон 17, се асоциират с неблагоприятна прогноза поради кратка обща преживяемост и преживяемост в отсъствие на релапс. Това значение е по-често описвано за пациентите с *RUNX1-RUNX1T1*, отколкото с *CBFB* преустройства, но важи както за възрастни, така и за педиатрични пациенти (119,120). Някои автори асоциират неблагоприятния смисъл само с някои конкретни – *D816* и *D820* в екзон 17, а не с всички наблюдавани мутации в гена (121). В терапевтично отношение подходите

включват малки молекулни тирозин-киназни инхибитори самостоятелно или в комбинация с конвенционални химиотерапевтици. Проучва се също ползата от приложението на шаперонни инхибитори като heat shock protein 90 инхибитора, но засега нежеланите реакции доминират ефекта му (122,123).

2.1.1.3 Международна консенсусна класификация - ICC

През 2022 година е публикувано и последното издание на Международната консенсусна класификация (International Consensus Classification, ICC) (124). Поради сходството с описаната по-горе на WHO по отношение на ОМЛ, ще маркираме основните различия спрямо нея:

- Изискване за минимален процент бласти – над 10% или над 20% за различните подтипове, на фона на липсата на такова (с малки изключения) по WHO.
- Присъствие на подтип с *TP53* соматични мутации и на друг с *RUNX1* соматични мутации (като част от групата на ОМЛ с миелодисплазия-свързани промени), в ICC, но не и в WHO.
- Добавяне на други, макар и рядко срещани преустройства в гените *RARA*, *KMT2A* и *MECOM* освен класическите, включени в WHO.
- Ограничаване на подтипа с *CEBPA* мутации в ICC до биалелни, запазващи рамката на четене и засягащи определен домейн.
- Наличие на по-голям брой дефиниращи цитогенетични промени в ICC с включване и тризомия 8 и делеция в дългото рамо на хромозома 20 (125).

Интерес представлява също „смекчаването“ на границите между МДС и ОМЛ и в двете класификации, включително наличието на т.нар МДС/ОМЛ форма в ICC. Този поглед върху двете състояния облекчава разбирането за възможна преходност от МДС в ОМЛ и хода на работа в тези случаи.

2.1.1.4 ОМЛ сред педиатричната популация – различия и особености

Въпреки че се среща основно при възрастни, ОМЛ възниква и в детска възраст. Предвид факта, че последните представляват отделен и специфичен контингент, е редно заболяването да се разгледа и характеризира отделно в този контекст. На първо място, децата с ОМЛ се характеризират с по-благоприятна прогноза поради по-рядко възникващите неблагоприятни мутации. За съжаление, релапс се среща в половината

от случаите, и това продължава да представлява предизвикателство за педиатриче-онкохематолози. Що се отнася до генетичните основи, най-честите хромозомни промени тук са $t(8;21)$ и $inv(16)$, характерни за 20–25% от случаите. Криптичните хромозомни транслокации тук също често допринасят за развитието на неопластичния процес (126). От групата на молекулярно-генетичните изменения, най-често се откриват мутации в *HRAS* и *KRAS* от *RAS* генната фамилия - 40% от случаите. Освен че имат прогностично значение в определени подтипове, тези гени са също и подходящи обекти за потенциална таргетна терапия. *FLT3* мутации се срещат в около 25% с по-голяма честота на *FLT3-ITD* в сравнение с контингента възрастни пациенти. Прогностичното значение тук зависи от AR. *KMT2A* мутации са по-чести при деца като прогностичното значение се определя от присъстващия фузионен ген, формиран при ангажирането на генния локус. *KIT* и *WT1* също често са засегнати, докато *NPM1* мутациите са значително по-редки за тази популация. Всички тези различия определят необходимостта от модифициран подход, разграничен от този при възрастни, както и вниманието, което се изисква при диагностициране на дете с ОМЛ. Сред понастоящем използваните класификации и препоръки са тези на WHO, ELN, както и Therapeutically Applicable Research to Generate Effective Treatments (TARGET) (126,127).

2.1.2. Стратификация спрямо риск според ELN

Всичко, описано дотук, демонстрира колко хетерогенна, комплицирана и индивидуална е природата на всеки един случай на ОМЛ, а оттам и подходът към тези пациенти. От особено значение тук е създаването на алгоритми за работа в изясняването на всеки конкретен случай с цел улесняване на диагностико-терапевтичния процес. Редом с клиничко-морфологичните, лабораторните и статистическите методи за оценка, едно от средствата, които рутинно се използват в практиката, е т.нар. ELN стратификация спрямо риск. Приета за златен стандарт, тя се ангажира с предикция на риск – благоприятен, интермедиерен, или неблагоприятен, т.е. един „генетичен триаж“, според генетичните находки – цитогенетични или моногенни, в даден случай на ОМЛ. Общата преживяемост за период от 5 години, с която се обвързват тези категории, е съответно 60%, 40% и 20%. Стратификацията е разработена от международен експертен панел през 2010-та година като сега се използва поправката ѝ от 2022-ра, показана в таблица 4 (3).

Таблица 4. ELN стратификация спрямо риск, 2022 (адаптирана по Dohner et al, 2022) (3)

Рискова категория	Генетична характеристика
<i>Благоприятна</i>	<ul style="list-style-type: none"> ● t(8;21)(q22;q22.1);<i>RUNX1-RUNX1T1</i> ● inv(16;16)(p13;q22) или t(16;16)(p13;q22);<i>CBFB-MYH11</i> ● мутация в <i>NPM1</i> без <i>FLT3-ITD</i> ● in-frame мутация в <i>CEBPA</i>, засягаща базовия левцинов цип-регион (bZIP)
<i>Интермедиерна</i>	<ul style="list-style-type: none"> ● мутация в <i>NPM1</i> с <i>FLT3-ITD</i> ● див тип <i>NPM1</i> и <i>FLT3-ITD</i> (в отсъствие на лезии, свързани с неблагоприятен риск) ● t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>MLLT3-KMT2A</i> ● Цитогенетични аберации, неклаифицирани като благоприятни или неблагоприятни
<i>Неблагоприятна</i>	<ul style="list-style-type: none"> ● t(6;9)(p23;q34.1);<i>DEK-NUP214</i> ● t(v;11q23.3); промени в <i>KMT2A</i> ● t(9;22)(q34.1;q11.2); <i>BCR::ABL1</i> ● t(8;16)(p11.2;p13.3)/<i>KAT6A::CREBBP</i> ● inv(3)(q21.3;q26.2) или t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA, MECOM(EV11)</i> ● t(3q26.2;v)/<i>MECOM(EV11)</i>-структурно изменение ● -5 или del(5q); -7; -17/abn(17p) ● комплексен или монозомален кариотип ● мутация в <i>ASXL1, BCOR, EZH2, RUNX1, SF3B1, SRSF2, STAG2, U2AF1</i>, и/или <i>ZRSR2</i> ● мутация в <i>TP53</i>

Така изброени, тези генетични характеристики изискват допълнителни разяснения:

- Прогностичното значение на маркерите би могло да се промени при въвеждане на нови видове терапия;
- Алелното съотношение между дивия тип и мутантния алел вече не е включено в стратификацията при *FLT3* мутации, както беше в поправката от 2017 г.
- Единствено този подвид *CEBPA* мутация е благоприятен, независимо дали е в моно- или биалелно състояние;

- Наличието на t(9;11)(p21.3;q23.3) надделява спрямо по-рядко срещани аберации, причислени към свързаните с неблагоприятен риск;
- Комплексен кариотип се дефинира като наличие на три или повече несвързани хромозомни аберации в отсъствие на често срещана такава по класификацията на WHO като t(8;21), inv(16;16) или t(16;16), t(9;11), t(6;9), t(v;11q23.3), t(9;22), inv(3) или t(3;3);
- Монозомален кариотип се дефинира като единична монозомия (с изключение на такава по полова хромозома) в асоциация с поне 1 допълнителна монозомия или структурна хромозомна аберация (с изключение на такива, засягащи CBF ген);
- С изключение на TP53, изброените моногенни мутации в „неблагоприятната“ категория губят това свое значение при комбинация с подтип от „благоприятната“;
- Мутацията в TP53 трябва да е с товар поне 10% независимо от това дали е моно- или биалелна (3).

Повечето от включените в стратификацията генетични маркери фигурират и в класификацията на WHO, но има няколко, свързани с неблагоприятен риск, които не са включени в последната и е редно да се коментират.

Монозомия по цялата 5-та хромозома или делеция на дългото ѝ рамо – del(5q), се срещат в 10% от случаите на ОМЛ. Най-често засегнатият регион е 5q31-q32 с големина 1,5 МВ и включване на около 40 гена (128). Други проучвания сочат значително по-големи региони с размер около 32-38 МВ – 5q23.2-q33.2 при пациенти с изолирана делеция, и 8-20 МВ – 5q31-q33.2 (над 100 гена) при комбинация с -7/del(7q) или комплексен кариотип. Това в голяма степен зависи от използвания метод и начина на групиране на изследваните пациенти, но се обуславя и от хетерогенността на самата делеция (129,130). По отношение на патогенетичния молекулярен механизъм обаче се постига консенсус - хаплоинсуфициенция или ефект на генната доза на тумор-супресорни гени, кодирани в делетирания регион (128–130). Хаплоинсуфициенцията на рибозомален протеин RPS14 например, който поначало в свързан с негативна регулация на тумор-супресора TP53, води до т.нар. „рибозомален стрес“, неколккратно повишена апоптоза и клетъчен G0/G1 арест. Макар величината му все още да не е изяснена, това е едно известно събитие, ангажирано в развитието на МДС/ОМЛ (131). Предполага се значение не само на делетираните, но и на запазените гени за нарушаване контролираните процеси на пролиферация и диференциация (129). Монозомията или делецията могат да се наблюдават като изолирано състояние или в комбинация с други цитогенетични аберации като монозомия 7 (40% от случаите) (130), тризомия 8,

монозомия 20 и др. Асоциира се с бърза прогресия и кратка преживяемост, особено ако се включва в комплексен кариотип (128).

Монозомия 7 (-7) е най-честата монозомия по автозома при ОМЛ, особено в контингента високорискови пациенти (132). На молекулярно-генетично ниво тук от една страна се наблюдава хаплоинсуфициенция на гени, лежащи върху липсващата цяла 7-ма хромозома, например гореописаните *KMT2C* и *EZH1*, а също на *PMS2*, ангажиран с поправка на грешки в ДНК, *TMEM248* (Transmembrane protein 248), *IKZF1* (IKAROS Family Zinc Finger 1), *CUX1* (Cut Like Homeobox 1) и др. От друга страна обаче се отчитат и мутации в гени, разположени извън 7-ма хромозома, с участие в патогенезата на левкемичния процес, сред които най-често *RUNX1*, *ASXL1*, *NRAS*, *TET2*, *SRSF2*, *DNMT3A*, *SETBP1*, *NOTCH1* и др. Включително може да става дума за повишена експресия на гени като *PTPRM* (Tyrosine phosphatase Receptor Type M gene), оказващ контрол върху клетъчния растеж, диференциация и неопластична трансформация, и *MECOM*, описан по-горе като свързан с аберации по 3-та хромозома. Като цяло ОМЛ с -7 е хетерогенна с включване на множество механизми и клетъчни процеси. Има известни различия по отношение на честотата на засягане на тези механизми при пациенти под и над 60-годишна възраст. Така например при млади пациенти по-често се наблюдава засягане на модификатори на хроматина, а при възрастни - на гени, свързани с метилация или със сплайсеозоми (133). Може да се наблюдава като част от т.нар монозомален кариотип - наличие на поне две клонални (налични в поне три метафази) монозомии по автозома, или комбинация от монозомия по автозома със структурна аберация (134). Честа е асоциацията с монозомия 5 или *del(5q)*, *inv(3)* и с аберации по късото рамо на 17-та хромозома (*abn(17p)*) (135). Монозомалният кариотип зачестява значително с напредване на възрастта, като се среща в едва 4% от пациентите под 30-годишна възраст спрямо 20% сред тези над 60-годишна (134). Монозомия 7 може да се наблюдава и като самостоятелна цитогенетична находка или в контекста на комплексен кариотип. Асоциира се с неблагоприятна прогноза, включваща незадоволителен отговор на стандартно химиотерапевтично лечение, кратка ремисия и ниска обща преживяемост (133,136) като според някои автори тази прогноза е по-неблагоприятна когато става дума за изолирана монозомия 7 в отсъствие на комплексен кариотип (133).

Цитогенетичните аберации, включващи 17-та хромозома или в частност нейното късо рамо (*-17/abn(17p)*), биват няколко основни вида: монозомия 17 (*-17*), делеция на късото рамо - *del(17)(p13)*, небалансирани транслокации, свързани със загуба на късото рамо на хромозомата, дицентрична хромозома 17 със счупване в 17p13, допълнителен материал - *add(17p)*, и изохромозома - *i(17q)* (137). Във всеки случай става дума за

засягане на едното копие на ключовия тумор-супресор TP53, изразяващо се в loss-of-function мутация или делеция. Такива се откриват у 10-15% от пациентите с ОМЛ, особено в асоциация с напреднала възраст, комплексен или монозомален кариотип, и вторична ОМЛ (138). Описаните цитогенетични аберации, касаещи хромозома 17, се характеризират с неблагоприятна прогноза по отношение на терапевтичен отговор особено към цитотоксични агенти, EFS и обща преживяемост след алогенна трансплантация на ХСК както като самостоятелна находка, така и в контекста на комплексен кариотип (17,137,138). Това обуславя значението им като независим негативен прогностичен маркер за възникване на релапс, преживяемост в отсъствие на болест и обща преживяемост (137,139). Наблюдава се обаче дисоциация между мнозинството изброени аберации и изохромозома по дългото рамо на 17-та хромозома, а именно че последната се отразява сравнително по-благоприятно на прогнозата. Това подсказва, че вероятно мутациите в TP53 могат да бъдат тип gain-of-function, което да е по-негативно отразяващо се събитие от биалелната загуба при i(17q) (137).

Изброените в таблицата генетични находки потвърждават значението на хромозомните преустройства и генните мутации, които присъстват и в класификацията на WHO от 2022, вече описани по-горе в текста. Прави впечатление наличието на най-много изброени характерни генетични промени в третата графа на таблицата, т.е към неблагоприятния риск. Тази тенденция е запазена в последните две поправки. Според някои автори, така организираната стратификация може да се окаже недостатъчна, особено що се отнася до по-възрастните пациенти над 55-годишна възраст, които всъщност представляват по-голяма част от контингента засегнати (140). Това предполага необходимостта от обогатяване с повече генетични и цитогенетични маркери извън рамките на така обновената стратификация и те най-вероятно ще бъдат инкорпорирани в нейната следваща версия.

Прави впечатление също активната препоръка за неколнократно биобанкиране – изолиране на ДНК от костен мозък или венозна кръв при поставяне на диагноза, постигане на ремисия или отчитане на релапс. От медико-етична гледна точка това е възможно с вземане на т.нар „разширено съгласие“, което да улесни осъществяването на тези процедури в рутинната практика. Препоръчва се също изолиране на ДНК от материал от втора тъкан за при необходимост от отдиференциране на соматични от герминативни мутации (3). Всички тези препоръки са свързани с осъзнато нарастващото значение на индивидуалните генетични характеристики на всеки един случай, влияещо върху диагностика, прогнозиране и подбор на терапия, и а понякога и върху здравните рискове и решения на кръвните родственици на пациента.

2.2 Най-често използвани молекулярно-генетични маркери и методи

2.2.1. Основни положения

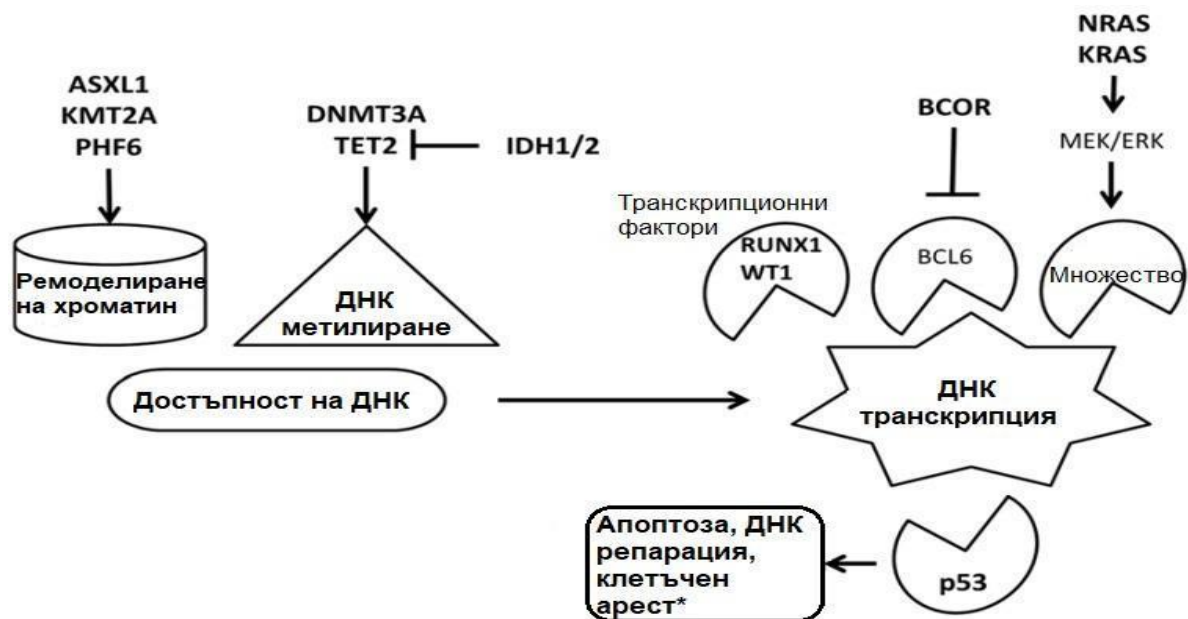
В ерата на молекулярната медицина ключово място заемат т.нар биомаркери, които според дефиницията на WHO представляват субстанция, структура или процес, които биха могли да се измерят с цел да се предвиди изхода от дадено заболяване(141,142). В по-широк смисъл те служат не само за предвиждане на изхода на последното, а за разнородна оценка като се описват три основни вида:

- диагностични - оценяват наличието на конкретно заболяване;
- прогностични - оценяват хода на заболяването, отговора на терапия сред пациенти със сходни характеристики, или изхода от заболяването след стандартна терапия;
- предиктивни - оценяват ползата от определен вид лечение или от два или повече различни типа лечение с оглед на чувствителност и резистентност на пациентите към тях (142).

Така те подпомагат дейността по даден случай от самото начало, като участват в поставянето на точна диагноза, подбора на подходяща терапия, предикция на настъпването на ремисия, терапевтична резистентност и релапс, обща преживяемост и пр. Ето защо откриването и използването на все повече нови биомаркери за различни заболявания е обект на интензивен научен труд през последните години. Що се отнася до молекулярните маркери, те представляват участъци от ДНК, характерни за конкретни промени в генни секвенции, нива на генна експресия или протеинови качества (142).

На практика обсъжданите по-горе генетични събития, отразяващи се в нарушение на различни звена на клетъчните процеси, или липсата им с отчитане на див тип, представляват молекулярно-генетични маркери. Това наличие или отсъствие допринася за разбиране, уточняване, предвиждане, овладяване и мониториране на неопластичния процес. Прилагането на маркери с тази цел, както и за подобряване на подхода към даден пациент е в същината на т.нар персонализирана медицина (143). Рутинно използваните класификации като тези на WHO и ELN например инкорпорират някои маркери, вследствие на тяхното дългогодишно картиране, проучване и в последствие утвърждаване като значими за разбиране на силно хетерогенната ОМЛ. На фигура 1 са показани някои от коментираните гени, групирани според изпълняваните от тях и техните продукти функции.

Фигура 1. Гени, участващи в левкемичния процес при ОМЛ и техните ефекти върху транскрипцията на ДНК (Адаптирана по Yohe, 2015) (144)



***чрез транскрипционни и нетранскрипционни ефекти**

Както се вижда на фигурата, приносът на тези гени и мутациите, настъпващи в тях вече са сравнително опознати. Мнозинството демонстрирани маркери са вече включени в настоящите, много по-изчерпателни алгоритми на клинично-диагностична дейност (3). Силно хетерогенния характер на заболяването и потенциалът за недоразкрити механизми все пак предполагат нужда от по-задълбочено проучване на ползата от рутинизираното изследване на тези и други маркери при пациенти с ОМЛ (144).

2.2.2. Методи за изследване на молекулярно-генетични маркери

Цитогенетичната оценка на генетичния фон при даден случай на ОМЛ преди лечение има безспорен принос в избирането на най-удачен подход и прогнозиране на изхода на даден клиничен случай (144). В този смисъл генетични прогностични маркери са всички включени в класификацията на WHO и стратификацията на ELN хромозомни аберации, а оттам и съществен метод за оценка е именно цитогенетичният.

За изследване на молекулярно-генетичните маркери обаче методите на избор следва да притежават много по-добра разрешителна способност. Основен принос по отношение на откриването и напредъка в разбирането на молекулярно-генетични маркери са геномните методи като SNP (single nucleotide polymorphism) -microarray и NGS (145–148). За момента ELN препоръчва към рутинния цитогенетичен анализ да се

извършва скрининг на 16 задължителни и още 20 препоръчителни молекулярно-генетични маркера при новодиагностицирани с ОМЛ пациенти, сред които *FLT3*, *NPM1*, *CEBPA*, *RUNX1*, *TP53*, *ASXL1* и др. Включен е също скрининг за следните генни фузии *PML::RARA*, *CBFB::MYH11*, *RUNX1::RUNX1T1*, *KMT2A* и *BCR::ABL1* (3). NCCN (National Comprehensive Cancer Network) от своя страна се припокрива в препоръката си с посочените от ELN гени и добавя *IDH1*, *IDH2* и *c-KIT*. Съществена разлика между двете системи е обаче включването на пациенти с *CBF* мутация, по презумпция причислени към групата с благоприятен риск според ELN, мутация към групата на интермедиерния риск когато е в съчетание с *c-KIT* според NCCN (17). На таблица 5 са представени някои от най-често използваните в клинично-диагностичния процес молекулярно-генетични маркери на фона на прогностично значимата за тях цитогенетична конфигурация.

Таблица 5. Значими молекулярно-генетични маркери с прогностично значение в комбинация с конкретен кариотип (Адаптирано по Weinberg et al, 2017) (145)

Молекулярно-генетичен маркер	Придружаващ кариотип	Прогностично значение
Мутация в <i>KIT</i>	t(8;21)(q22;q22.1)	Неблагоприятно
<i>FLT3-ITD</i> *	Нормален	Неблагоприятно
Биалелна мутация в <i>CEBPA</i>	Нормален	Благоприятно
Единична мутация в <i>CEBPA</i> **	Нормален	Неблагоприятно в сравнение с биалелните мутации в гена
Мутация в <i>NPM1</i> без <i>FLT3-ITD</i>	Нормален	Благоприятно
Мутация в <i>RUNX1</i>	Нормален	Неблагоприятно
Мутация в <i>WT1</i>	Нормален	Неблагоприятно
Мутация в <i>TET2</i>	Нормален	Неблагоприятно
Мутация в <i>ASXL1</i>	Нормален	Неблагоприятно
Мутация в <i>DMNT3A</i>	Нормален	Неблагоприятно
Мутация или делеция на <i>TP53</i>	Комплексен	Неблагоприятно

*Както се видя в предходната таблица, този маркер вече се отнася към групата на интермедиерния риск.

**Последната ELN стратификация внесе известни промени по отношение на СЕВРА мутациите и генотипните им варианти (виж Таблица 4).

Така представени, маркерите изискват от една страна предварително изяснен кариотип, а от друга - подходящ молекулярно-генетичен метод, който да е успее да регистрира конкретния вид мутация според нейния тип и размер. Известно е също обичайното съчетание между 2 и повече мутации при един и същи пациент, което предполага целенасочено търсене на повече мутации дори и след открита единична значима такава (145). Това би могло да означава комбинация от няколко молекулярно генетични метода предвид наличието на известни ограничения при всеки от тях. Последните са представени на таблица 6 (148).

Таблица 6. Характеристики на молекулярно-генетични методи, използвани в съвременния клинично-диагностичен подход при някои онкохематологични заболявания (Адаптирано по Berry et al, 2019)(148)

Анализ	Резолуция	Целогеномен анализ	Загуба на хетерозиготност	Делящи се клетки	Чувствителност	Балансирани промени
КЦА	5-10mb*	Да	Не	Да	10%	Да
FISH	100-300kb**	Не	Не	Не	5-10%	Да
SNP-microarray	3-10kb	Да	Да	Не	5-20%	Не
Панели за секвениране на фузионни гени	<1kb	Не	Не	Не	<5-20%	Да
NGS/MP-S*	<1kb	Да	Не	Не	5-10%	Да****

*mb - мегабази, 1 000 000 милион нуклеотида

**kb - килобази, 1 000 нуклеотида

***MPS - Massive parallel sequencing

****Отнася се за изготвени за целта панели и техники

2.2.2.1. SNP-microarray

SNP-microarray е микрочипов геномен метод, вариант на Хромозомния микрочипов анализ (Chromosomal microarray analysis; CMA), използващ сонди за т.нар полиморфизми по единични нуклеотиди като белег за настъпили промени из целия геном. Той превъзхожда по-конвенционалния CMA като позволява отчитане не само на чисто небалансирани количествени промени като микроделеции и амплификации, но и такива като загуба на хетерозиготност и пloidии, които последният би пропуснал (147,148). Включително SNP-microarray дава възможност за откриване на интерстициални делеции, характерни за около 25% от често срещаните и обсъдени по-горе в обзора фузионни гени, въпреки че фузиите сами по себе си са балансирани промени и при липса на делеции не биха били отчетени. Загубата на хетерозиготност, при която делецията на нормален алел се “спасява” с дупликация на мутантния, както и количествените отклонения като хиподиплоидия, хипердиплоидия и т.н са също силно застъпени в патогенезата на левкемичния процес и тяхното разпознаване е ключово за избиране на най-адекватен подход. Друго съществено предимство пред КЦА е информативността по отношение на неясни находки като маркерните и ринг хромозомите, често с неуточен при КЦА произход. Недостатъците на метода включват невъзможността за отчитане на балансирани промени, както и вероятния пропуск на клонове, представляващи по-малко от 10% от клетките, което напълно изключва мониторирането на MRD като приложение на SNP-microarray. Освен това, разрешителната способност от 5-10kb (килобази) възпрепятства отчитането на промени с по-малки размери. Такива са мутациите в ключови за ОМЛ гени като *FLT3*, *NPM1*, *C-KIT*, *RUNX1*, *CEBPA*, *IDH1*, *IDH2*, *JAK2* и често в *TP53*, засягащи една или няколко базови двойки (base pairs; bp). Това прави SNP-microarray неподходящ за приложение като единствен молекулярно-генетичен метод, и предполага нуждата от допълване с друг такъв (148).

2.2.2.2. NGS

Терминът NGS представлява “шапка”, обединяваща сходни по цел, но различаващи се по механизъм и възможности методи. Последните имат способността успоредно да разчитат последователността на множество участъци с различна дължина от

нуклеинови киселини с точност до един нуклеотид при това за сравнително малко време - няколко часа до няколко дни. Различията между конкретните NGS методи са свързани с обекта на секвениране и неговата големина, например:

- цялостно геномно секвениране - разчитане на цялата съвкупност от кодиращи и некодиращи последователности;
- цялостно екзомно секвениране - ангажирано само със съвкупността от кодиращи последователности, наречена екзом;
- таргетно секвениране - насочено към предварително зададени конкретни участъци, например панел от гени, асоциирани с дадено заболяване;
- дълбоко секвениране - успява от регистрира клонове в размер под 1% от изследваната проба, което е огромен по рода си напредък в сравнение с останалите разновидности на NGS и с останалите молекулярно-генетични методи като цяло (17).

Значително се понижи и цената на изследванията от тази група - от 50-10 млн. долара в началото на века до под 1000 долара на геном днес (149). Именно благодарение на NGS се разкриха някои аспекти на зараждането на левкемичния процес, което обогати разбирането и възможностите за персонализиран дефинитивен подход (145,150). Такава е клоналната хематопоеза с неопределен потенциал (clonal hematopoiesis of indeterminate potential, CHIP), представляваща наличие на инициращи мутации с алелна честота 10-20% в гени като *TET2*, *DNMT3A*, *ASXL1*, *GNAS*, *PPM1D*, *SF3B1* (Splicing factor 3b, subunit 1), наблюдавана при здрави хора в напреднала възраст. Изглежда тези ранни генетични събития сами по себе си са недостатъчни за същинското развитие на неопластичния процес въпреки доказания си принос в него. Индивидите с CHIP обаче са изложени на завишен риск от развиване неоплазии с миелоиден произход - около 1% годишно, както и двукратно завишен такъв по отношение на коронарна сърдечна болест (150). Друг пример е клоналната хематопоеза със значителен онкогенен потенциал (clonal hematopoiesis with substantial oncogenic potential, CHOP), свързана с характерни за заболяването или драйверни мутации с висока алелна честота в гени като *FLT3*, *KRAS*, *HRAS*, *BCR-ABL*, *JAK2*, *RUNX1*. CHOP се доближава още повече до ОМЛ, като не изпълнява изискванията за разгърнатото заболяване, но обикновено са необходими още едва няколко генетични събития до пълна трансформация в ОМЛ (17,151).

В последните години се проучва и ползата от прилагането на NGS не само с диагностична, но и с предиктивна и прогностична цел. Въпреки необходимостта от валидиране на резултатите от тези проучвания се предполага приносът на метода при

оценка на потенциалния терапевтичен отговор, подбора на таргетна терапия и на рисковете за възникване на релапс при алогенна трансплантация на ХСК.

Що се отнася до мониториране на MRD при пациентите се отчитат някои потенциални предимства на NGS пред сега използваните методи - Real-time PCR (quantitative, qPCR) и проточна цитометрия, например броя гени, които биха могли да се включат в секвенирането с цел придобиване на по-цялостна оценка на променливия генетичен фон (17,145). Не са напълно изяснени обаче най-подходящите време и кратност на провеждане на изследването, както и конкретния набор гени, които да се включат. Освен това съществуват предизвикателства предвид възможността за пропускане на по-малки клонове при повечето NGS методи, които не извършват дълбоко секвениране. Също така трябва да се имат предвид и наличните за момента непренебрежими артефакти, различностепенен шум при етапите изготвяне на библиотеки и същинско секвениране, както и до 1% вероятност за грешка (18,145).

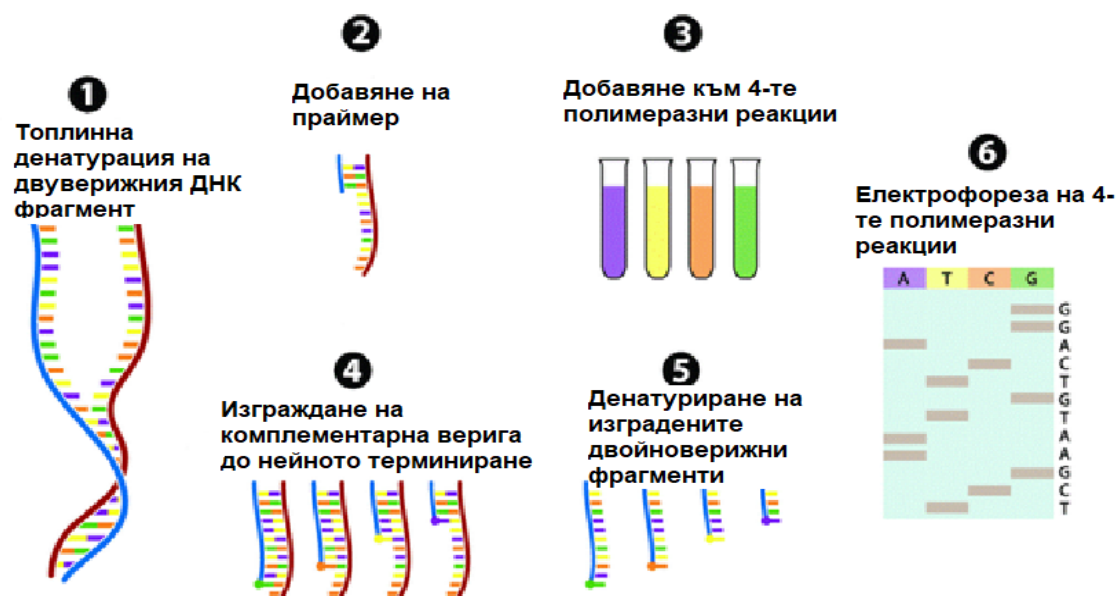
Засега препоръките подкрепят, но не задължават да се използва конкретно NGS като молекулярно-генетичен метод за стратификация в допълнение към КЦА [87]. На пазара са налични няколко панела за изследване на гени, асоциирани с миелоидни неоплазии, които са различни по обем - най-многобройни са Qiagen Human Myeloid Neoplasms Panel и Illumina AmpliSeq Myeloid Panel (17). Това все повече доближава NGS до успешно инкорпориране в рутинния клиничен подход към пациентите. Освен гореспоменатите недостатъци обаче трябва да се имат предвид все още са сравнително скъпата цена, както и особеностите на някои гени като наситения на гуанин-цитозинови сегменти *CEBPA* и *FLT3-ITD* мутациите с различна дължина на ампликоните, обуславящи затрудненото им секвениране. Както се вижда на Таблица 6, от друга страна, неидентифицирана с NGS остава загубата на хетерозиготност, която е важен и застъпен в патогенезата на ОМЛ механизъм (148). Също така детекцията на значимите генни фузии с по-стария метод qPCR всъщност става доста по-бързо отколкото е засега с NGS поради технологичното време на последния (18). В допълнение, все още е общоприета и необходимостта от потвърждаване на резултатите чрез секвениране по Sanger въпреки зараждащото се мнение за липса на такава в най-скорошни трудове (152). Всичко това обуславя необходимостта от допълнително проучване, изясняване и прецизиране на възможностите, ограниченията и приложението на метода в рутинната практика.

2.2.2.3. Секвениране по Sanger

Секвенирането по Sanger позволява изясняването на точната нуклеотидна последователност в даден фрагмент нуклеинова киселина. Датиращ от 70-те години на миналия век, той представлява златен стандарт и до днес. Методът включва няколко етапа (Фигура 2):

- денатурация на двойноверижен фрагмент ДНК;
- свързване на едноверижния ДНК фрагмент с кратка комплементарна нуклеотидна последователност, наречена праймер;
- разпределяне на еквимоларно количество едноверижни ДНК фрагменти с различна дължина в четири успоредни отделни реакции с еквимоларни количества ДНК полимераза, нуклеотиди, радиоактивно маркирани дидеоксинуклеотиди, като във всяка реакция се използва единствен вид дидеоксинуклеотид. Последният терминарен изграждащата се ДНК верига на случаен етап от нейното удължаване и същевременно означава конкретния нуклеотид, с който завършва фрагментът с определена дължина;
- повторно денатуриране с цел получаване на едноверижни фрагменти;
- електрофореза в полиакриламиден гел с цел разпределяне на фрагментите с точност един нуклеотид, завършващи с даден нуклеотид по дължина и по този начин детерминирането на секвенцията на ДНК фрагмента (16,153).

Фигура 2. Етапи на секвенирането по Sanger (Адаптирана по Gauthier, 2007) (153)



Разработката отнема години до окончателната си версия през 1977 г., когато в техниката се включват ключовите маркирани с радиоактивни елементи

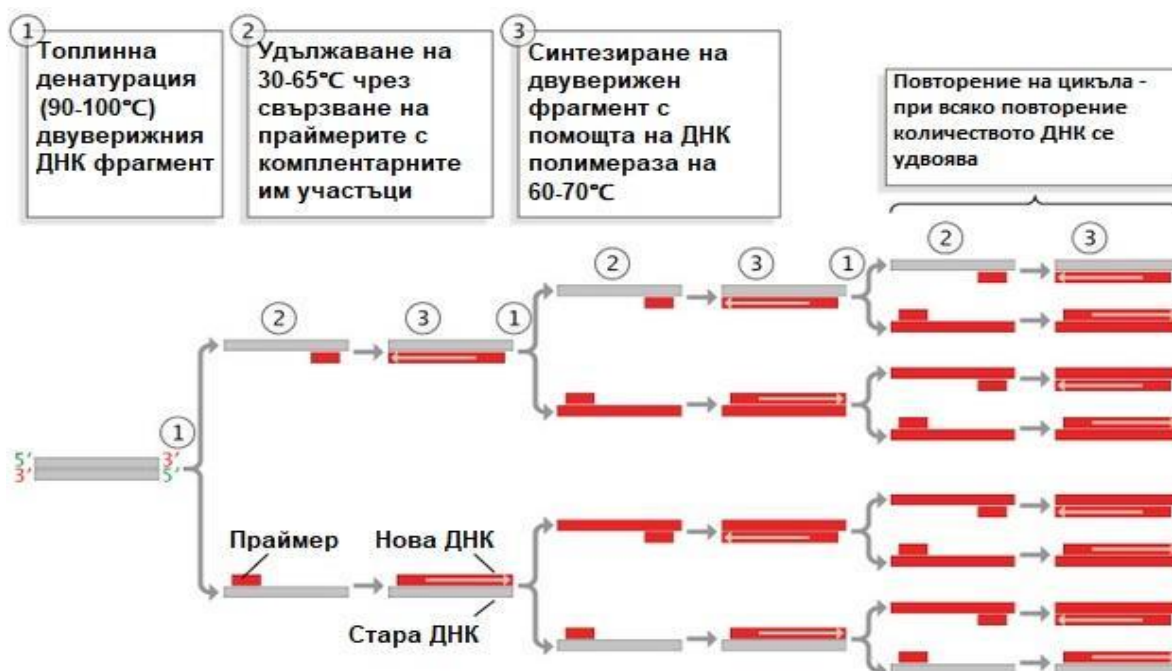
дидеоксинуклеотиди. През годините секвенирането по Sanger се усъвършенства чрез замяна на радиоактивното маркиране с флуоресцентно такова, внедряване на капилярната електрофореза, както чрез и автоматизиране на процеса с възможност за секвениране на множество фрагменти едновременно (16).

Сред недостатъците на метода (Таблица 6) е на първо място сравнително малкият размер на фрагмента - до 1 kb, което предполага и че това далеч не е целогеномен анализ. Друг недостатък е липсата на отчитане на загуба на хетерозиготност, която засега остава сред възможностите основно на SNP-microarray (148). Точността и яснотата на секвенирането по Sanger спрямо останалите налични му осигуряват позицията на златен стандарт и потвърдителен метод през десетилетията след неговото създаване. Въпреки това в наши дни се наблюдава тенденция за неговото отместване за сметка на по-потентни съвременни методи като NGS, SNP array, PCR техники и др (17,145).

2.2.2.4. PCR

PCR представлява молекулярно-генетичен метод, състоящ се от няколко последователни етапа, повтарящи се многократно на фона на периодични предварително зададени температурни промени (Фигура 3). Това дава възможност за амплифициране на фрагмент НК до получаване на милиарди копия за съвсем кратък период от време.

Фигура 3. Основни етапи на PCR (Адаптирана по Pray, 2008) (154)



Микроорганизмовият произход (*Thermus aquaticus*) на използвания ензим ДНК полимераза обуславя неговата термостабилност и позволява осъществяването на процеса на нетипично високи за човешката физиология температури. Правилото за комплементарност, от своя страна, осигурява достатъчно високата специфичност на метода. Не на последно място, автоматизацията на процеса чрез т.нар термоциклери улеснява и съкращава значително времето за неговото изпълнение (154).

В наши дни приложението на метода далеч не се ограничава с размножаване на конкретен ДНК фрагмент. Понастоящем PCR и негови разновидности са предпочитани и конкурентоспособни методи за скрининг и детекция на дадена таргетна последователност, била тя нормална или с известна мутация. В контекста на ОМЛ успешно се скринират мутации в ключови гени като *NPM1*, *FLT3*, *DNMT3A*, *IDH2*, *IDH2* и др (155–157). Особен напредък представлява т.нар Real-time PCR (Quantitative PCR, qPCR), който благодарение на флуоресцентни маркери и сензори за тях позволява количествена оценка на продуктите на реакцията, наречени още ампликони, в реално време (154). Качествата на тази разновидност, включително неговата чувствителност, специфичност и лесна интерпретация го правят особено подходящ за проследяване на нискостепенните промени при MRD (8,145). Друго важно предимство на qPCR в частност е възможността за отчитане на загуба на хетерозиготност, чието значение в генезата неопластичните процеси бе описано по-горе (158).

Съвсем естествено PCR не е съвършена технология и има своите ограничения. Така например методът не обхваща целия геном, а работи с таргетни участъци. Освен това нормалната или мутационно изменената последователност на тези участъци трябва да е предварително известна, за да се използват комплементарни праймери. Възможно е също така неспецифично свързване на последните, което обуславя потенциал за фалшиво-положителни резултати, или грешки от страна на ДНК полимеразата (159). Тези особености го правят подходящ за скрининг с условието за използване на потвърдителен метод. Въпреки това, PCR технологиите се развиват непрестанно, което прави справянето с повечето изброени недостатъци въпрос на време (158).

2.2.2.5. MLPA

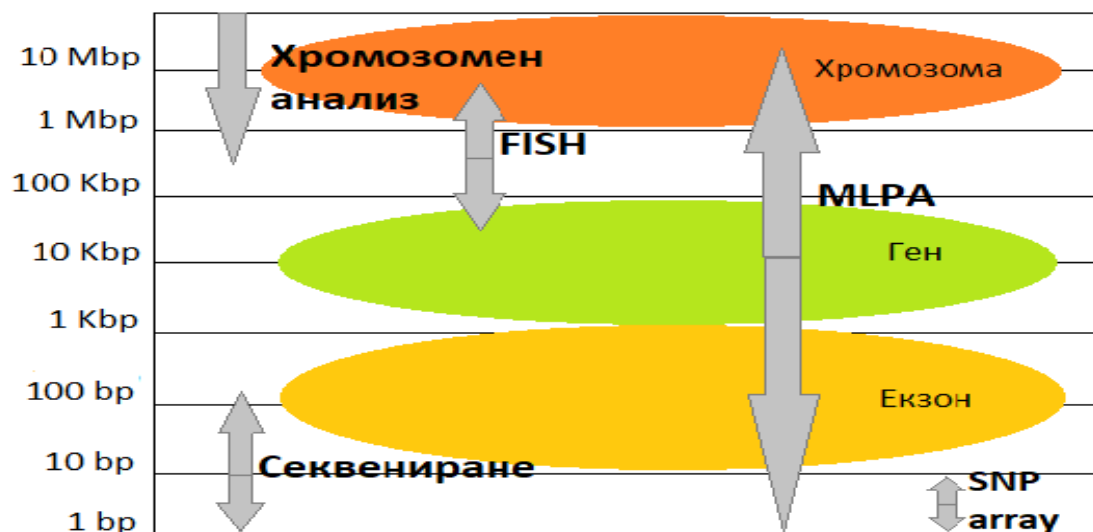
MLPA се основава на гореописания PCR метод, като самата амплификация, увенчаваща неговия успех, зависи от лигирането между два комплементарни на

едноверижната матрица праймера. Това позволява мултиплексно извършване на реакцията за също толкова кратко време, запазвайки нейното лесно изпълнение и висока специфичност. По същество този полуколичествен метод се състои от четири взаимосвързани етапа:

- денатурация и хибридизация между едноверижната матрица и двата праймера;
- лигиране на праймерите със силно чувствителна по отношение на пълна комплементарност лигаза;
- PCR на новополучения след лигирането фрагмент;
- разделяне на фрагментите чрез капилярна електрофореза и фрагментен анализ.

Разширените възможности тук разкриват огромен спектър на доловими мутации, включващ дори най-детайлните такива (Фигура 4). Така например вариация в брой повтори, малки делеции, точкови мутации, дори епигенетични промени като метилационен статус са вече рутинна част от тези възможности.

Фигура 4. Аналитичен спектър на някои генетични методи (Адаптирана по Hötig-Hölzel & Savola, 2012) (160)



Друго важно качество са големият брой сонди, които могат да се използват в единична реакция - засега около 60. Това води до повишаване на информативността на метода в сравнение с конвенционалния PCR. Последното е от особено значение за изследването на пациенти с неопластични процеси, тъй като при тях се подозират комбинации от различни мутации в различни локуси. Използваната техника е стандартна - термоциклер, капилярна електрофореза и аналитичен софтуер, наречен Coffalyser и създаден също от MRC Holland. Установена е и значителна редуция е цената на молекулярно-генетичния анализ на фона на други възможни такива (160).

Това прави MLPA все по-често използван метод в диагностиката на генетични заболявания, включително на неоплазии, засягащи клетките на кръвния ред (11–15).

Редно е да се отбележи зависимостта на чувствителността на метода от големината на клетъчния клон. Последният трябва да бъде с дял не по-малък от 20%, за да бъде отчетена хетерозиготна делеция в него, и 40% за дупликация. В това отношение MLPA отстъпва на другите коментирани методи, обобщени в Таблица 6. Що се отнася до хетерозиготните точкови мутации и до метилационния статус обаче чувствителността е съпоставима - съответно 5-10% и 30%. Друга важна особеност е, че аналогично на PCR точковите мутации следва да са известни, за да се създадат и използват подходящи праймери. Не на последно място, MLPA не е цялостен геномен метод, а е проектиран да отчита конкретни молекулярно-генетични таргети - съвсем удачно за целите на диагностиката на неопластични заболявания, но не толкова за други видове патология (160).

2.3 Обобщение

Съвременните наука и технология позволяват използването на широк спектър от молекулярно-генетични методи според нуждите и възможностите на конкретното клинично-диагностично звено. От значение са както броят и тежестта на пациентите и съответно на пробите, така и материално-финансови въпроси, касаещи оборудване, персонал и финансиране. Неделима част, разбира се, са и редовно обновяваните експертни препоръки. Не на последно място, квалификацията на лабораторния персонал е от огромно значение за адекватното и навременно изпълнение на необходимите изследвания, както и за подбора, адаптирането и приложението на нови такива. Всички тези фактори играят роля в избора на подходящи методи за изследване на пациенти с конкретно заболяване.

По отношение на ОМЛ в частност, общоприетите международни препоръки включват задължително провеждане на хромозомен анализ върху материал от костно-мозъчна биопсия с цел стратификация спрямо риск. Той би могъл да бъде частично заменен от FISH с цел скрининг за генни фузии при липса на метафази. Препоръчва се също молекулярно-генетичен метод за набор от гени (3,161). Необходимостта от последния е подчертана и от нуждата от прецизна и бърза информация за генетичната основа на неопластичния процес (161). Предвид изложените характеристики и сравнения по-горе, ние сметнахме за най-удачно фокусирането върху молекулярно-

генетичните методи за сметка на таргетния по характер FISH (Таблица 6, Фигура 4, (4,160)). По този начин се осигурява, от една страна, достъпна и надеждна целогеномна преценка и стратификация чрез КЦА, и от друга - бърза, лесна за изпълнение и детайлна характеристика чрез молекулярно-генетичен метод. Именно така би се добила цялостна и точна представа за подлежащия генетичен механизъм, което да осигури максимално персонализиран подход с най-добър шанс за благоприятен изход от заболяването.

3. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ НА ИЗСЛЕДВАНЕТО

3.1 Цел на изследването

Да се оцени приложимостта на метода MLPA за отчитане на характерни за ОМЛ молекулярно-генетични маркери в рутинната клинично-диагностична дейност за оценка на пациенти с новодиагностицирана ОМЛ.

3.2 Задачи на изследването

За да реализираме поставената в дисертационния труд цел, сме обособили следните пет задачи:

1. Да се въведе молекулярно-генетичен метод за идентификация на значими молекулярно-генетични маркери, свързани с ОМЛ.
2. Да се селектират пациенти с новодиагностицирана ОМЛ, отговарящи на критериите за включване в проспективното проучване.
3. Да се проведе молекулярно-генетичен анализ на ДНК, изолирана от левкоцити от венозна кръв от пациенти с новодиагностицирана ОМЛ преди лечение, и от контролна група от здрави индивиди.
4. Да се съпоставят данните с тези от успоредно проведен КЦА, и да се обобщят и анализират резултатите от проведеното молекулярно-генетично изследване.
5. Да се обобщи ролята на използвания молекулярно-генетичен метод в инициалния генетичен скрининг и да се изведат насоки за подобряване на генетичната оценка на контингента новодиагностицирани пациенти с ОМЛ.

На тази основа дефинирахме следната **работна хипотеза**: MLPA е подходящ метод за изследване на молекулярно-генетични маркери и би било удачно да бъде внедрен в рутинната оценка на генетичната основа при пациенти с новодиагностицирана ОМЛ, успоредно с цитогенетичния анализ.

4. ПАЦИЕНТИ И МЕТОДИ

4.1 База на провеждане на проучването

Нашето проучване е с проспективен характер и обхваща периода февруари 2022 - май 2023 г. Проведено е на територията на Лаборатория по Медицинска генетика към УМБАЛ “Света Марина” ЕАД, Варна.

4.1.1 Пациенти

В изследването подходящи за включване са пациенти, отговарящи на всички от следните критерии:

- Новодиагностицирани и нелекувани пациенти с ОМЛ, отговарящи на съответните на заболяването клинично-морфологични критерии (по актуалната за времето класификация на WHO);
- Пациенти, при които не се подозира подтип FAB-M3/ОПЛ;
- Възраст ≥ 18 г.;
- След дадено писмено информирано съгласие за участие в изследването;

Съответно критериите за изключване са следните, като един би бил достатъчен за изключване на участника от изследването:

- Пациенти с ОМЛ, диагностицирани преди време, с конкретизиран терапевтичен план или преминали ТХСК, или такива, неотговарящи на съответните на заболяването клинично-морфологични критерии;
- Пациенти, при които се подозира подтип FAB-M3/ОПЛ;
- Възраст под 18 г.;
- Отказ за подписване на информирано съгласие за участие в изследването;

Както и според други автори (64,162,163), и ние преценихме за удачно изключването на пациенти, при които се подозира наличие на FAB-M3 или съответстващата в голяма степен на този подтип ОПЛ (20,25–27). Това се дължи на факта, че FAB-M3/ОПЛ, с дял около 10% от случаите на ОМЛ, се асоциира с конкретен вид генна фузия, която лесно може да се визуализира дори цитогенетично. Също така, тук е налична терапия, към която обикновено пациентите развиват благоприятен и навременен отговор. В допълнение, използваният от нас таргетен панел поначало не включва характерната за FAB-M3 генетична мутация. Затова решихме да се фокусираме върху останалите 90% новодиагностицирани пациенти. При последните, поради различната от FAB-M3/ОПЛ

клиника, етиология и патогенеза, би било трудно да се говори за толкова добра прогноза без предварително изясняване на конкретната констелация от генетични промени чрез молекулярно-генетичен анализ като избрания от нас MLPA.

По отношение на критерия за възраст, преценихме да включим единствено пациенти над 18-годишна възраст, поради две основни причини:

Първо, има значителна разлика по отношение на често срещаните мутации при случаи на деца и на възрастни с ОМЛ. Честите в детска възраст мутации като например $t(1;22)(p13.3;q13.3);RBM15::MKL1$ са изключително редки при възрастни (38–40). Обратно, мутации в гени като *IDH1* и *IDH2*, се срещат с честота 6-19% при възрастни на фона на 0-4% от случаите при деца (81). Едновременната работа с тези два качествено различаващи се контингента би затруднила значително интерпретацията на резултатите. Това е валидно поне във този начален етап на оценка на ефективността на метода. При негово утвърждаване като подходящ за рутинната практика метод, той би могъл да се използва и при новодиагностицирани пациенти в детска възраст.

Второ, от етична гледна точка децата спадат към т. нар. застрашена популация, разгледано изрично в Декларацията от Хелзинки (164). В тази връзка сметнахме, че на този етап не е необходимо включването на представители на такъв уязвим контингент.

Набирането на подходящи участници в тази група се реализира с помощта на лекуващия лекар, като те бяха селектирани от контингента лежачо болни пациенти в Клиниката по клинична по хематология на УМБАЛ “Света Марина”, Варна.

MLPA е метод, изискващ наличието на ДНК проби с източник аналогичен биологичен материал от клинично здрави лица при всяко извършване на анализа, които служат като здрави контролни индивиди. Използването на последните е важно за осигуряване на максимални чувствителност и специфичност (165). В изследването са включени и доброволци, които отговарят на всички от следните критерии:

- Отсъствие на клинично-морфологични данни за ОМЛ, както и на данни за остри или хронични заболявания;
- Възраст над 18 години;
- С аналогично разпределение по пол и възраст на групата пациенти;
- След дадено писмено информирано съгласие за участие в изследването;

Съответно критериите за изключване са следните, като един би бил достатъчен за изключване на участника от изследването:

- Присъствие на клинично-морфологични данни за ОМЛ, и/или данни за остри или хронични заболявания;
- Възраст под 18 години;
- Липса на аналогично разпределение по пол и възраст по отношение на групата пациенти;
- Отказ за подписване на информирано съгласие за участие в изследването;

По отношение на критерия за възраст при доброволците, внесохме изискване те да са на възраст над 18 г., като се подбират спрямо възрастта на пациенти. Въпреки възраст-асоциирания потенциал за развиване на клинично неразличима СНР и свързаните с последната рискове за възникване на миелоидна неоплазия, сметнахме за най-редно да съпоставим двете групи максимално. На практика наличието на СНР не би могло да се отчете от избрания метод поради технически ограничения на неговата чувствителност (150,166). По този начин, потенциално наличие на СНР у здравите контроли не би могло да компрометира интерпретацията на проведеня анализ и последващите изводи. Изискването за съпоставима възраст всъщност присъства и в инструкциите на производителя, тъй като тези контролни проби служат за създаване на адекватни и реалистични параметри на нормата по отношение на изследваните генетични маркери.

На всички участници бяха подробно обяснени същността и целите на изследването, както и очакваните ползи и рискове от него чрез създадена за целта писмена форма на „Информация за участниците“ (Приложение 1), свързана с практическия подход за изследване на пациентите и доброволците, участващи в проучването. Всички участници са подписали информирано съгласие за участие в изследването (Приложение 2).

Като здрави контролни индивиди поканихме да се включат в проучването жени и мъже (на случаен принцип), отговарящи на описаните критерии, предимно служители на Медицински университет – Варна и УМБАЛ „Света Марина“ ЕАД Варна, подписали информирано съгласие.

Всякаква лична информация за участниците се съхранява на служебен компютър на главния изследовател в кабинет 212 на УМБАЛ „Света Марина“ Варна с достъп, защитен с парола и не се споделя с други лица. Информация на хартиен носител до въвеждането ѝ в служебния компютър се съхранява в шкаф, заключен с ключ в кабинет 212 на УМБАЛ „Света Марина“ Варна, достъп до който има само главният изследовател. Информация се съхранява за период от 5 години от началото на проучването.

Изследването е проведено по проект №21008: „Молекулярно-генетичен анализ на новодиагностицирани пациенти с остра миелогенна левкемия“, финансиран от Фонд „Наука“ (конкурсна сесия 2021) към Медицински университет Варна.

Проучването бе одобрено от Комисията по етика на научните изследвания към Медицински университет Варна с протокол №111 от Заседание на 20.01.2022 г.

4.1.2 Биологичен материал

За целите на молекулярно-генетичния анализ бе изолирана ДНК от левкоцити от венозна кръв. За всеки участник в изследването е използвана затворена система при спазване на стандартните процедури за стерилност.

Материалът бе взет чрез еднократно вземане на периферна венозна кръв в количество 6-10 мл, като за групата новодиагностицирани пациенти то бе успоредно с рутинното пробовземане по време на болничния престой за пациентите.

За изолирането на ДНК са използвани затворени системи с антикоагулант EDTA (виолетова капачка). Изолирането на ДНК е извършвано в срок до 24 часа след вземане на пробата, като получената ДНК е в TE буфер и е съхранявана в разтворено състояние при температура -20 °C до анализирането на пробите.

Биологичният материал на двете групи участници ще бъде съхраняван в рамките на 5 години и след това ще бъде предаден и унищожен в специализираното звено за унищожение на биологични отпадъци на УМБАЛ „Света Марина“ ЕАД Варна.

4.2 Методи

4.2.1 Клинични методи

Всички пациенти са селектирани от своя лекуващ лекар в Клиниката по клинична хематология, УМБАЛ „Света Марина“ ЕАД Варна, и насочени за консултация с основния изследовател от Лаборатория по медицинска генетика, УМБАЛ „Света Марина“ ЕАД Варна. По време на консултацията биват подробно обяснени същността, целите, очакваните ползи и рискове на изследването, и се подписва информирано съгласие за участие в изследването. Разгледана бе и наличната медицинска документация от проведени лабораторни, образни и други изследвания от настоящата и предишни хоспитализации.

4.2.2 Генетични лабораторни методи

4.2.2.1 Изолиране на ДНК от венозна кръв (преданалитична процедура)

Изолирахме геномна ДНК чрез добре познатия солеви метод (изсолване). Изолираната нуклеарна ДНК трябва да бъде с достатъчна концентрация - 10-50 ng/ μ l, в количество 50-250 ng и обем 5 μ l, като за оптимално количество се приемат 50-100 ng. По отношение на чистотата, MLPA има по-високи изисквания в сравнение с конвенционалния PCR метод. За да отговаря на тези изисквания, получената ДНК трябва да е максимално лишена от примеси на соли - NaCl, KCl, а също от примеси на хепарин, РНК и белтъци. По тази причина предпочитани са затворените системи за колекция на кръв с антикоагулант EDTA, фабрично налични на пазара с виолетова капачка.

Изпълнение на метода:

- 1) Получаване на клетъчно-ядрен лизат чрез поетапно добавяне към пробата на еритроцит-лизиращ буфер (хипотоничен разтвор) и нуклеолизиращ буфер.
- 2) Освобождаване на ДНК от белтъци чрез детергента настриев додецил сулфат и последващото им разграждане от протеиназа К. РНК-аза премахва примесите рибонуклеинови киселини.
- 3) Пречистване на получената ДНК чрез преципитиране на белтъците с 6 М разтвор на NaCl (изсолване).
- 4) Преципитация на ДНК с абсолютен алкохол и последващо ресуспендиране в TE буфер (подготовка за съхранение).
- 5) Измерване на ДНК концентрацията чрез абсорбционен спектрофотометър NanoDrop™ 2000c (ThermoFisher Scientific, USA), и изчисляване на чистотата от съотношението A260/A280. За оптимална чистота се приемат стойности между 1,6 и 1,9 (съотношението под 1,6 показва наличие на РНК, а над 1,9 – на белтъци).
- 6) Съхранение на получената ДНК в разтворено състояние в TE буфер при температура -20 °C до анализиране на пробите.

4.2.2.2 MLPA

Проведохме MLPA на изолираната геномна ДНК с кит SALSA MLPA probemix X060-X2 MDS-AML (MRC Holland, Netherlands), таргетиращ характерни за ОМЛ/МДС хромозомни региони и съответните на тях гени, както и 11 референтни сонди за региони,

характерно стабилни при МДС и ОМЛ (Таблица 7) – общо 59 сонди за анализ и качествен контрол, според описания от производителя протокол.

Таблица 7. Сонди, включени в използвания кит *SALSA MLPA probemix X060-X2 MDS-AML*

Гени със соматични варианти	Аберации в брой повтори със съответни гени и екзони	Референтни сонди със съответни гени
<i>DNMT3A</i> (<i>R882H</i>)	4(q24) - <i>TET2-4, -11</i>	1(q23.3) - <i>PPOX</i>
<i>SF3B1</i> (<i>K700E</i>)	5(q31.2) - <i>CTNNA1-3, -6</i> 5(q35.1) - <i>NPM1-2, -5</i>	1(q41) - <i>USH2A</i>
<i>IDH1</i> (<i>R132H</i> и <i>R132C</i>)	6(p22.3) - <i>JARID2-8, -19</i>	2(p21) - <i>SLC3A1</i>
<i>NPM1</i> (<i>865insTCTG</i>)	7(p12.2) - <i>IKZF1-4, -6</i>	3(p12.3) - <i>GBE1</i>
<i>FLT3-TKD</i> (<i>D835Y</i>)	7(q22.1) - <i>CUX1-6, -23</i> 7(q22.2) - <i>KMT2E(MLL5)-4, -11</i> 7(q36.1) - <i>EZH2-4, -14</i>	3(q25.31) - <i>KCNAB1</i>
<i>IDH2</i> (<i>R140Q</i>)	11(q22.3) - <i>ATM-13, -22, -63</i> 11(q23.3) - <i>KMT2A(MLL)-3, -4, -5, -36</i>	6(q12) - <i>EYS</i>
<i>ASXL1</i> (<i>G646fs*12</i>)	12(p13.2) - <i>ETV6-1, -8</i> 12(p12.3) - <i>AEBP2-3, -9b</i>	9(q21.13) - <i>PCSK5</i>
	17(p13.1) - <i>TP53-8, -7</i>	13(q14.3) - <i>RNASEH2B</i>
	17q(11.2) - <i>NF1-34, -53, SUZ12-10, -15</i>	14q11.2 - <i>RPGRIP1</i>
	20(q11.21) - <i>ASXL1-1, -8</i>	15(q15.3) - <i>SPG11</i>
	21(q22.12) - <i>RUNX1-6, -2</i> 21(q22.3) - <i>U2AF1-1, -7</i>	16(p13.2) - <i>ABAT</i>

Капилярната електрофореза бе извършена с генетичен анализатор GeXP Beckman Coulter (Sciex, USA) със стандарт за размер 600 нуклеотида. Данните бяха експортирани и анализирани със специализиран софтуер Coffalyser версия 220513.1739 (MRC Holland, Netherlands). За качествен контрол са включени негативни контроли (в отсъствие на ДНК), както и пробите на здравите контролни индивиди. Като позитивна контрола и за повишаване качеството на анализа на данните от фрагментния анализ на осемте моногенни соматични варианта, в тестовия набор е включена т. нар. SD041 binning DNA – синтетична ДНК с едновременно присъстващи гореописаните осем варианта.

Вариантите, открити от MLPA в *FLT3-TDK (D835Y)* гена бяха своевременно сравнени с данните от рутинен успоредно проведен молекулярно-генетичен анализ от Лаборатория по клинична имунология, УМБАЛ „Света Марина“ ЕАД Варна, където е използван метод полимеразна верижна реакция – полиморфизъм на рестрикционните фрагменти (PCR-RFLP, restriction fragment length polymorphism), използващ рестриктазни ензими, разпознаващи и срязващи определени места в дивия тип ген, но не и в мутантните алели (167).

4.2.2.3 КЦА

Сравнихме данните от MLPA с успоредно проведен КЦА (в случаите, в които такъв бе проведен) като рутинна част от диагностичния процес. Цитогенетичния анализ бе проведен стандартно на материал от костно-мозъчна аспирация след краткотрайна 24- или 48-часова култивация по установен протокол в съгласие с Медицински стандарт „Медицинска генетика“. Оцветяването е диференциално чрез GTG бендинг на минимум 15, по възможност 20 метафазни пластинки с максималната възможна резолюция (варираща от 100 до 300 бенда) предвид източника на пластинките. Резултатите бяха интерпретирани и описани според актуалната международна номенклатура (ISCN 2020, International System for Human Cytogenomic Nomenclature 2020). Възможностите и ограниченията на метода бяха подробно разгледани по-горе.

4.2.3 Методи за медико-статистическа обработка на данните

За статистически анализ използвахме следните методи:

- Графичен анализ
- Обработка на количествени показатели
- Непараметрични анализи - *Mann-Whitney test*, *Kruskal-Wallis test*, както и *chi-square test*, *Fisher's exact test*.
- Оценка на преживяемостта чрез *Kaplan-Meier test*

Софтуери за работа - GraphPad Prism v. 9.5.1 (GraphPad Software, USA) и Microsoft Excel 2016 (Microsoft, USA). Приехме двустранна p стойност $<0,05$ като статистически значима разлика. Всички числа с изключение на p стойностите са закръглени до един знак след десетичната запетая.

5. РЕЗУЛТАТИ

5.1 Дескриптивно – епидемиологична характеристика на пациентите и контролните индивиди, включени в проучването

5.1.1 Възрастово-полова характеристика

Включихме общо 61 пациенти с разпределение по пол – 29 (47,5%) жени и 32 (52,5%) мъже в отношение (М:Ж=1,1:1). Възрастта на обхванатите от проучването пациенти е от 20 до 89 години (медиана на възрастта 62 години) без сигнификантни различия за двата пола – жените бяха на възраст от 20 до 89 години с медиана на възрастта 61, а мъжете – 29 до 83 с медиана 65 години ($p=0,3867$, *Mann-Whitney test*).

Процентното разпределение по възраст на анализирания контингент пациенти показва преобладаване на тези над 60 години - 59% ($n=36$) ($p=0,0466$, *Chi-square test*), а най-силно представената възрастова група бе тази на 61-75 години – 39,3% ($n=24$) (Фигура 5).

Що се отнася до здравите контролни индивиди, включихме общо 21 – 10 жени на възраст 20-79, медиана 64,5 години, и 11 мъже на възраст 37-73, медиана 62 години, без значима разлика с разпределението и медианата на възрастта на пациентите ($p=0,8557$, *Kruskal-Wallis test*) (Фигура 5).

Фигура 5. Възрастово разпределение на пациенти и контроли по групи



5.1.2 Разпределение по тип ОМЛ

Според първоначалната диагноза, изследваният контингент пациенти бе условно разпределен в 4 основни групи лица:

- Група I – новодиагностицирани пациенти без други предходни хематологични (вкл. малигнени) заболявания (*de novo* ОМЛ) – 48 (78,7%)
- Група II – пациенти с предходно установен МДС – 7 (11,5%)
- Група III – пациенти с предходно установена *BCR::ABL1* (-) МПН – 4 (6,6%)
- Група IV – пациенти с предходно установена ХМЛ – 2 (3,3%)

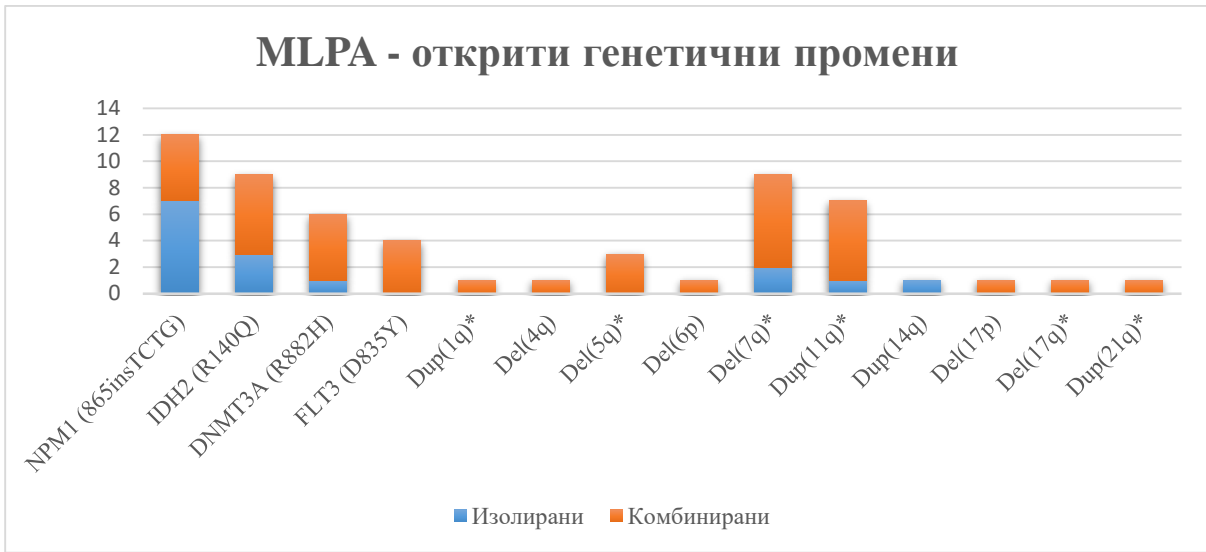
Както се вижда от разпределението, доминираха пациенти без установено подлежащо друго хематологично заболяване.

5.2 Представяне и анализ на резултатите от проведени генетични изследвания

5.2.1 Резултати от MLPA

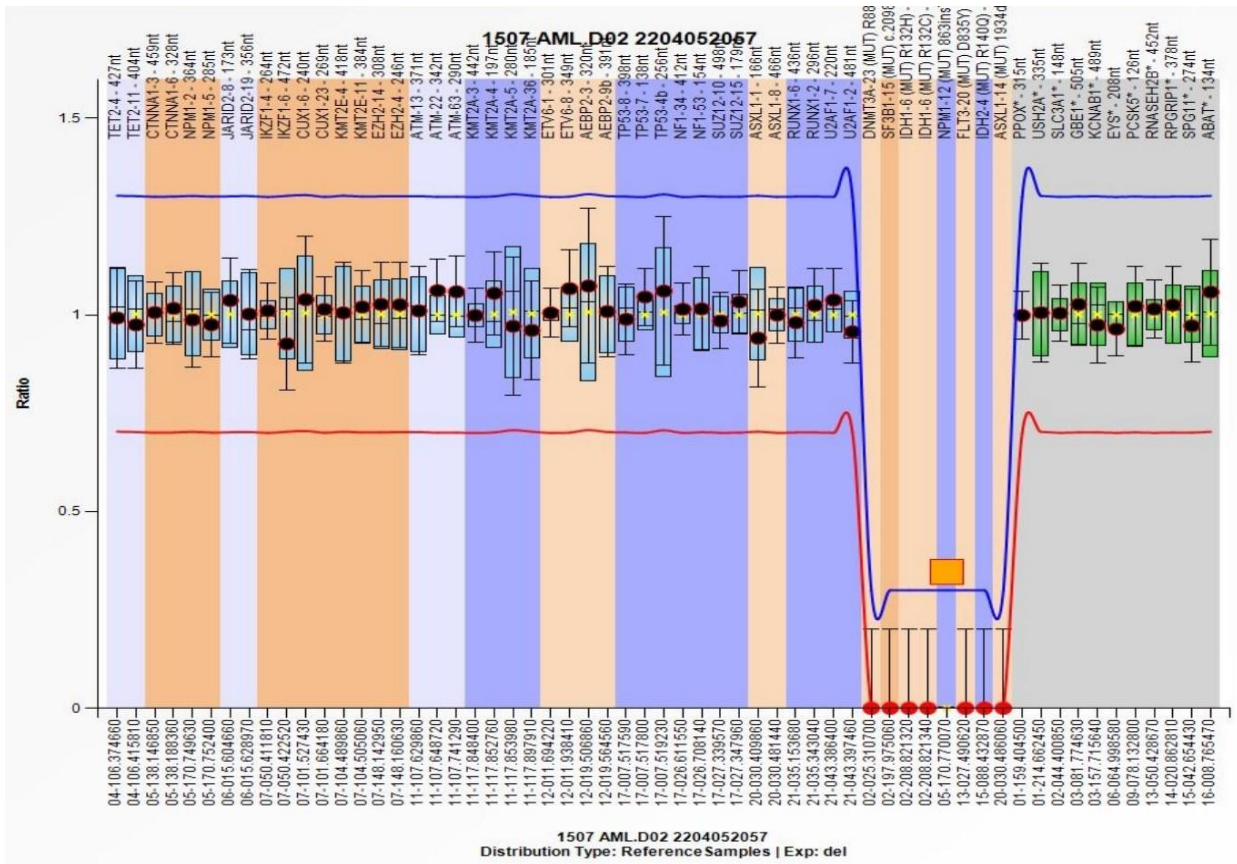
За периода на проучването са изследвани общо 61 пациенти, като при 34 (55,7%) се откриват генетични промени, а при останалите 27 (44,3%) такива не се установяват. От 34-мата с открита патология, при 22-ма (64,7%) бяха открити общо 31 моногенни соматични варианта – в изолирана форма у 11 и в комбинация с друга генетична находка при другите 11 пациенти (Фигура 6). Водещ по честота бе *NPM1 (865insTCTG)* вариантът (Фигура 7) – 35,3% от всички пациенти с патология и 19,7% от всички изследвани пациенти (n=12).

Фигура 6. Генетични промени, открити чрез MLPA



*за простота на изгледа са маркирани общо всички сонди в конкретното хромозомно рамо, а честотата е дадена за брой пациенти. Подробно са разгледани комбинациите в Таблица 10.

Фигура 7. Пациент с NPM1 (865insTCTG) вариант (означен с оранжев правоъгълник), открит чрез MLPA (Coffalyser™ tool, MRC Holland, Netherlands)



Както се вижда на Фигура 6, *NPM1* вариантът се среща по-често в изолирано състояние – при 7 пациенти, докато при останалите 5 е в комбинация, но само с други моногенни варианти от проведения молекулярно-генетичен анализ (Таблица 9).

Таблица 9. Пациенти с наличен *NPM1* вариант в комбинация с други моногенни варианти

Пациент	Първи вариант*	Втори вариант*	Трети вариант*
1.	<i>NPM1</i> (865insTCTG)	<i>IDH2</i> (R140Q)	<i>FLT3-TDK</i> (D835Y)
2.	<i>NPM1</i> (865insTCTG)	<i>IDH2</i> (R140Q)	<i>DNMT3A</i> (R882H)
3.	<i>NPM1</i> (865insTCTG)	<i>IDH2</i> (R140Q)	-
4.	<i>NPM1</i> (865insTCTG)	<i>FLT3-TDK</i> (D835Y)	<i>DNMT3A</i> (R882H)
5.	<i>NPM1</i> (865insTCTG)	<i>DNMT3A</i> (R882H)	-

*поредността на вариантите е условна и не отразява еволюционната давност на различните клонално настъпили моногенни събития

Моногенният вариант в *IDH2* бе в изолирана форма при трима пациенти. При други трима, както се вижда по-горе (Таблица 9), той е в комбинация с други варианти в *NPM1*, *FLT3* и *DNMT3A* гените. При останалите трима, комбинацията бе със структурни хромозомни варианти – двама пациенти с делеция 5q и един с дупликация 11q.

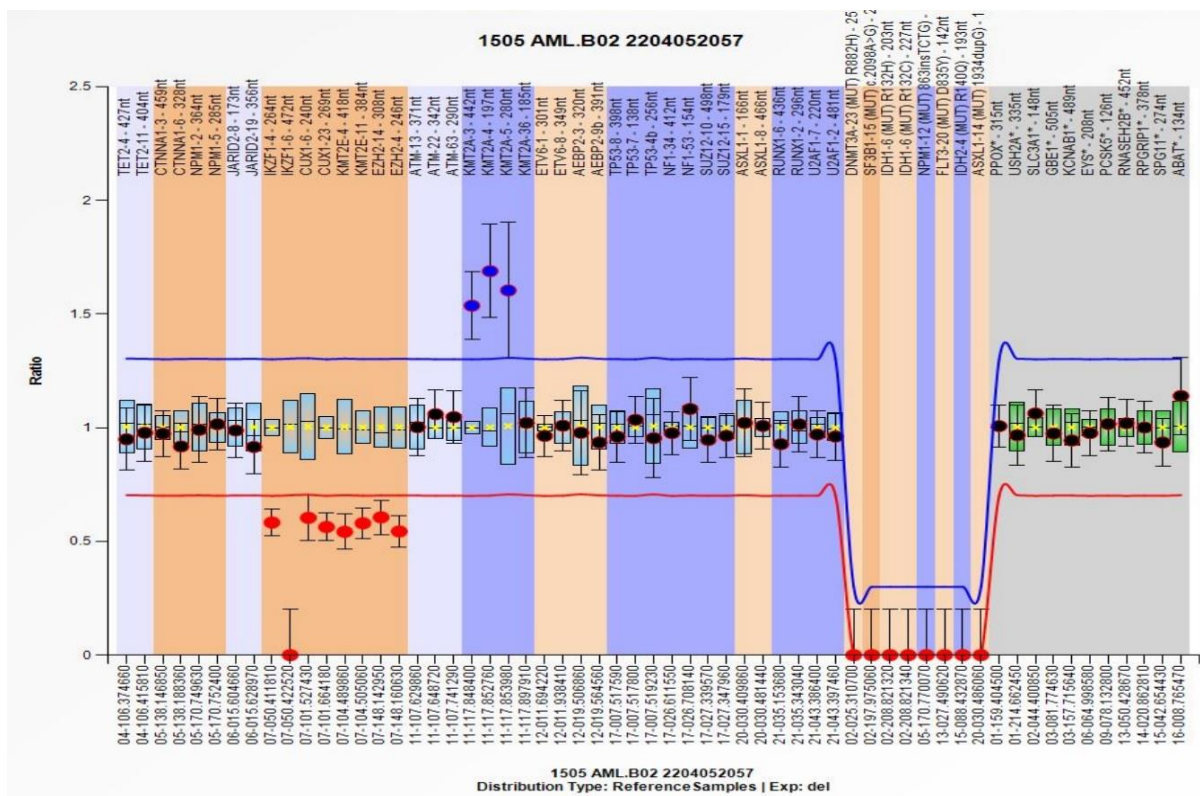
DNMT3A бе в изолирана форма само при 1 пациент, докато в останалите бе в комбинация с друг моногенен (n=3), с моногенен и структурен хромозомен вариант – *FLT3* и дупликация 11q (n=1), или само със структурен хромозомен вариант (n=1) – делеция 7q.

FLT3-TKD вариантът бе установен единствено в комбинирана форма – 2 пациенти с един или повече други моногенни варианти в *NPM1*, *DNMT3A*, *IDH2* (Таблица 9), и други 2 с моногенни мутации и структурни хромозомни варианти – *DNMT3A* и дупликация 11q (n=1) и дупликация 11q (n=1). Откритите *FLT3-TKD* варианти бяха

потвърдени от идентични резултати от рутинно проведения RFLP-PCR при 3-ма от 4-мата пациенти, докато 4-тият не е изследван чрез този метод.

По отношение на хромозомните промени, при 18 (52,9%) от същите 34-ма пациенти (29,5% от всички в проучването) се откриха промени в броя повтори в хромозоми 1, 4, 5, 6, 7, 11, 14, 17 и 21 (Фигура 8). Като разпределение по честота, най-чести бяха МДС-асоциираната **делеция в 7-ма хромозома** (Фигура 8) – у 50% от пациентите с открита структурна хромозомна патология (n=9), както и **дупликация в дълго рамо на 11-та хромозома** – 38,9% (n=7) (Фигура 6, Таблица 10).

Фигура 8. Пациент с делеция в 7-ма хромозома – дълго и късо рамо (в червено) и дупликация в дълго рамо на 11-та хромозома (в лилаво) (Coffalyser™ tool, MRC Holland, Netherlands)



От всички описани структурни хромозомни находки, 4 бяха в изолирано състояние, а 14 - в комбинация с други генетични промени, както моногенни варианти, така и други структурни хромозомни изменения (Таблица 10).

Таблица 10. Резултати от проведения MLPA – открити структурни хромозомни аберации (с отговарящите на региона гени и техни екзони); маркирани са и моногенните варианти, открити в комбинация при няколко пациенти

Пациент	MLPA резултат
1.	del(4)(q24) – <i>TET2-4</i> , -11; del(5)(q31.2) - <i>CTNNA1-3</i> , -6 del(6)(p22.3) – <i>JARID2-8</i> , -19; del(17)(p13.1) – <i>TP53-8</i> , -4b; del(17)(q11.2) – <i>NF1-34</i> , <i>SUZ12-10</i> ; dup(21)(q22.12) – <i>RUNX1-2</i> ; dup(21)(q22.3) – <i>U2AF1-7</i>
2.	del(5)(q31.2) – <i>CTNNA1-3</i> , -6; del(5)(q35.1) – <i>NPM1-2</i> , -5
3.	del(7)(p12.2) – <i>IKZF1-4</i> , -6; del(7)(q22.1) – <i>CUX1-6</i> del(7)(p22.2) – <i>KMT2E-4</i> , -11; del(7)(q36.1) – <i>EZH2-4</i> , -14
4.	del(7)(p12.2) – <i>IKZF1-4</i> , -6; del(7)(q22.1) – <i>CUX1-6</i> del(7)(q22.2) – <i>KMT2E-4</i> , -11; del(7)(q36.1) – <i>EZH2-4</i> , -14 dup(11)(q23.3) – <i>KMT2A-3</i> , -4, -5
5.	del(7)(p12.2) – <i>IKZF1-4</i> , -6; del(7)(q36.1) – <i>EZH2-4</i> , -14
6.	<i>DNMT3A (R882H)</i> ; del(7)(q22.1) – <i>CUX1-23</i> del(7)(q22.2) – <i>KMT2E-4</i> , -11; del(7)(q36.1) – <i>EZH2-4</i> , -14
7.	del(7)(q22.1) – <i>CUX1-6</i> ; del(7)(q22.2) – <i>KMT2E-4</i> , -11 del(7)(q36.1) – <i>EZH2-4</i> , -14; dup(11)(q22.3) – <i>ATM-13</i> , -22, -63 dup(11)(q23.3) – <i>KMT2A-3</i> , -4, -5, -36
8.	del(7)(q22.1) - <i>KMT2E</i> ; <i>CUX1-6</i> ; del(7)(q36.1) – <i>EZH2-4</i> , -14
9.	dup(1)(q23.3) – <i>PPOX</i> ; dup(1)(q24) – <i>USH2A</i> ; del(7)(q22.1) – <i>CUX1-6</i> , -23; del(7)(q22.2) – <i>KMT2E-4</i> , -11 del(7)(q36.1) – <i>EZH2-4</i> , -14
10.	<i>DNMT3A (R882H)</i> ; <i>FLT3-TDK (D835Y)</i> ; dup(11)(q22.3) – <i>ATM-13</i> , <i>ATM-22</i> , <i>ATM-63</i> ; dup(11)(q23.3) – <i>KMT2A-3</i> , <i>KMT2A-4</i> , <i>KMT2A-5</i> , <i>KMT2A-36</i>
11. и 12.	<i>IDH2 (R140Q)</i> ; dup(11)(q23.3) – <i>KMT2A-3</i> , -4, -5
13.	<i>FLT3-TKD (D835Y)</i> ; dup(11)(q23.3) – <i>KMT2A-3</i> , -4, -5
14.	<i>IDH2 (R140Q)</i> ; del(5)(q31.2) - <i>CTNNA1-3</i> , -6
15.	dup(14)(q11.2) - <i>RPGRIP1</i>
16.	del(7)(p12.2) – <i>IKZF1-4</i> , <i>IKZF1-6</i>
17.	del(7)(q36.1) – <i>EZH2-4</i> , -14
18.	dup(11)(q23.3) – <i>KMT2A-3</i> , -4, -5

5.2.2 Резултати от КЦА и съпоставка с MLPA

Анализът бе проведен за 53 (86,9%) от всички пациенти, като при останалите 8 (13,1%) такъв не е проведен поради следните причини:

- суха стернална пункция (n=2)
- отказ от провеждане на костно-мозъчна биопсия (и последващо лечение) (n=2)

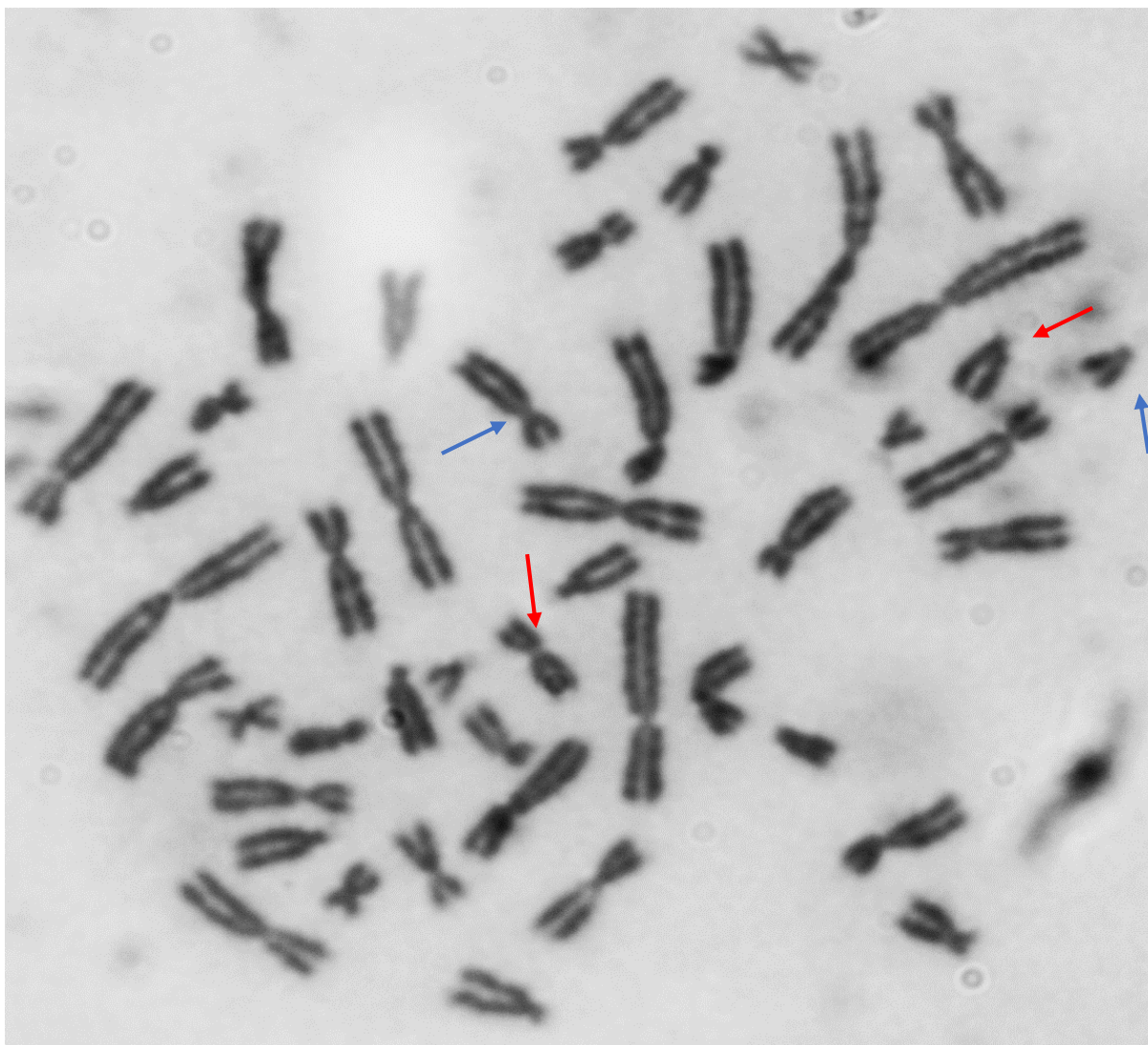
- силно увредено общо състояние, изискващо предварително овладяване преди провеждане на стернална пункция и скоро настъпил летален изход след прием в отделението (n=4)

От включените 53, КЦА бе проведен успешно при 38 (71,7%), докато при останалите 15 (28,3%) не са открити метафазни пластинки за анализ. При 21 (55,3%) от успешно проведените (или 39,6% от всички изследвани), КЦА установи патологичен резултат (Таблица 11). Водеща по честота находка бе **t(8:21)(q22;q22)** (Фигура 9) - при 6 (28,6%) от тези пациенти, а след нея бе комплексният кариотип - при други 4 (19%).

Таблица 11. Резултати от проведения КЦА – открита патология

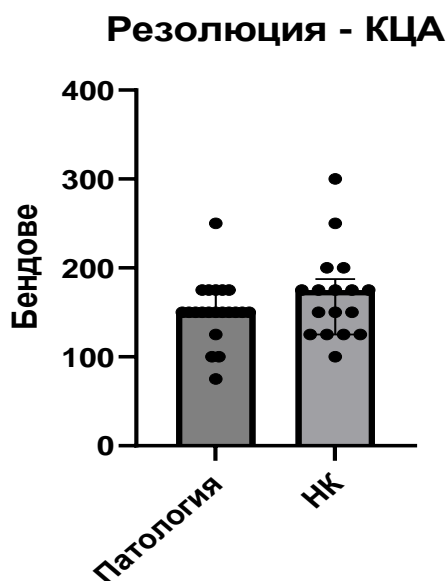
№	Резултат	Резолюция (бендове)
1	45,XY,-?D[7]/46,XY[8]	<100
2	46,XY,add(19)(q13.3?)[20]	150
3	43~46,XY,del(?5)(q?13q?33),+16,-17,-17,+mar{cp9}/46,XY[1]	100
4	46~48,XX,-7?[3],del(11)(q22),+11,del(12)(p?12),+16,+mar{cp14}	150-200
5	45,XX,-20[3]/46,XX[17]	150
6	45,XY,-7[20]	150
7	45,XY,-8(?)[3]/46,XY[17]	150
8	46,XX,add(14)(q32)[20]	150-200
9	46,XX,add(3)(q?29),del(4)(q?25),del(5)(q12(13);q33),del(11)(q23),del(?13)(q?34),-17,+21[20]	150
10	46,XX,del(16)(q21(22))[2]/46,XX[18]	150
11	46,XX,del(5)(q12(13)q?33)[10] / (46,XX,-C,+mar[2])	100
12	46,XX,inv(16)(p13q22)[6]/46,XX[6]	150
13	46,XX,t(2;21)(p11(12);q22)[15]	150
14	46,XY,t(7;15)(p?15;q?15)[20]	150-200
15	47,XY,+8[16]/46,XY[4]	150
16	46,XX,t(8;21)(q21;q22)[20]	150
17	46,XY,t(8;21)(q21(22);q21(22))	100-150
18	46,XY,t(8;21)(q21;q22)[20]	150-200
19	45,X,t(8;21)(q21(q22);q22)[20]	150-200
20	46,XX,t(8;21)(q21;q22)[20]	150
21	47,XY,t(8;21)(q22;q22),+8[20]	200-300

Фигура 9. Кариотип с $t(8;21)(q22;q22)$ (двете дериватни хромозоми са маркирани с червени стрелки, а двете нормални – със сини), GTG бендинг, 150-200 бенда.



Прави впечатление, че водещата резолюция и същевременно медиана при пациентите с открита хромозомна аберация, е 150 бенда – 11 (52,4%). Сравнихме я с тази при пациентите с НК като не открихме статистически значима разлика въпреки малко по-високата медиана при втората група ($p=0,2906$, *Mann-Whitney test*) (Фигура 10).

Фигура 10. Графично изображение на разпределението на резолюция с изброени медиани на двете групи резултати (GraphPad Prism)



Ако се фокусираме върху комбинациите от резултатите на двата метода като цяло, може да се направи следният разбор:

➤ *Пациенти с NPM1 вариант от MLPA*

Цитогенетичният анализ при тези 12 пациенти демонстрира НК при 7 от тях, както и 3 патологични резултата съответно с тризомия 8, монозомия 20 и делеция на недефинирана хромозома от група D. Другите двама пациенти бяха съответно с неуспешен анализ и без проведен такъв.

➤ *Пациенти с IDH2 вариант от MLPA*

При тези пациенти нямаше комбинация в открита от двата метода патология – 4-ма бяха с НК, 3-ма с неуспешно проведен КЦА и 2-ма без проведен такъв.

➤ *Пациенти с DNMT3A вариант от MLPA*

Тук 4-ма бяха с НК, 1 с монозомия по 20-та хромозома, и 1 с неуспешен КЦА.

➤ *Пациенти с FLT3 вариант MLPA*

Разпределението при тези пациенти бе – 2-ма с НК, 1 с монозомия 20 (съобща се за един и същ пациент с три моногенни варианта - в *NPM*, *DNMT3A* и *FLT3* и монозомия 20), и един с неуспешен КЦА.

➤ *Пациенти със структурни хромозомни нарушения от MLPA*

От общо 18 пациенти с открита структурна хромозомна аберация от този метод, 6-ма (30%) са с неуспешен, а 4-ма (22,2%) нямат проведен КЦА. Други 4-ма (22,2%) са с НК

и при още 4-ма (22,2% или едва 7,5% от всички с проведен КЦА) се открива патологичен резултат и тук са случаите на конкордантност между двата метода. Това припокриване включи структурни и/или бройни хромозомни аберации по хромозоми 4, 5, 6, 11, 14, 17 и 21, които взаимно се отразяват между двата метода (Таблица 12). Монозомии и тризомии, открити чрез КЦА, се регистрираха от MLPA съответно като дупликации и делеции, засягащи няколко сонди на една хромозома.

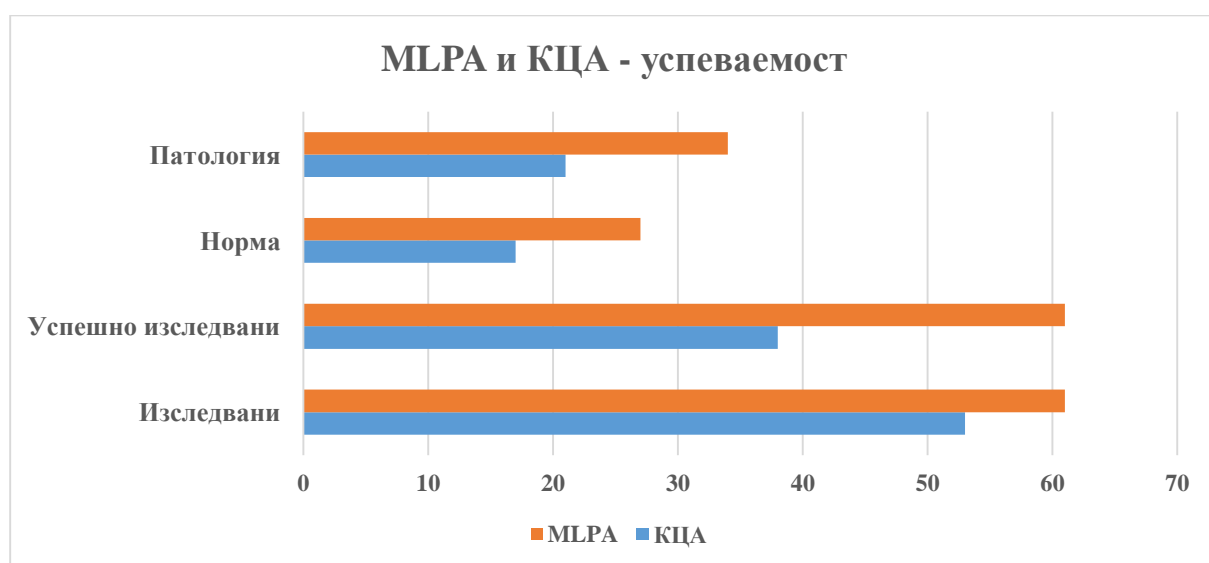
Таблица 12. Конкордантност между находките от MLPA и КЦА

	КЦА находка	MLPA находка
1	Монозомия 7, тризомия 11	del(7q), dup(11q)
2	del(4q), del(5), монозомия 17, тризомия 21	del(4q), del(5q), del(17p), del(17q), dup(21q)
3	Add(14q)	dup(14q) – референтна сонда
4	Монозомия 7	del(7q), dup(11q)

Прави впечатление, че при последния пациент дупликацията по 11-та хромозома, открита чрез MLPA, не е отчетена от КЦА – в този случай не става дума за бройно нарушение, а за структурно такова.

Сравнението на двата метода по отношение на цялостната им успеваемост и информативност е графично представено на Фигура 11.

Фигура 11. Сравнение между MLPA и КЦА по отношение на успеваемост и находки



От проведеното сравнение правят впечатление няколко особености:

- 1) Бе отчетена значителна разлика между успешно изследваните по двата метода – 61 срещу 38 съответно за MLPA и КЦА ($p < 0,00001$, *Chi-square test*). Тази разлика от 23 пациенти - 37,7% от всички пациенти в проучването, е сбор от пациентите без ($n=8$) и пациентите с неуспешен цитогенетичен анализ ($n=15$)
- 2) Същевременно, видимата разлика от около 16% за открита патология – 55,7% за MLPA и 39,6% за КЦА, не показва статистическа значимост ($p=0,08544$, *Chi-square test*). Прави впечатление, че сравняването по открита хромозомна патология, успеваемостта е по-висока при КЦА, тъй като MLPA открива такъв тип патология само у 29,5% от всички изследвани.

Сумарно от двата метода, успеваемостта на тяхната комбинация дава информация за 48 (78,7%) пациенти. Що се отнася до останалите 13 (21,3%) - 5 (8,2%) са без открита патология и от двата метода, а други 8 (13,1%) – без находки от MLPA и с неуспешен или непроведен КЦА.

Изолирайки информацията за моногенни изменения, тъй като те поначало не са в обхвата на КЦА, при 35 (57,4%) се открива структурна или бройна хромозомна патология от комбинацията на КЦА и MLPA - със 17,8% повече от самостоятелното използване на хромозомен анализ. В 18% ($n=11$) от всички изследвани, MLPA дава информация за находки, пропуснати от КЦА.

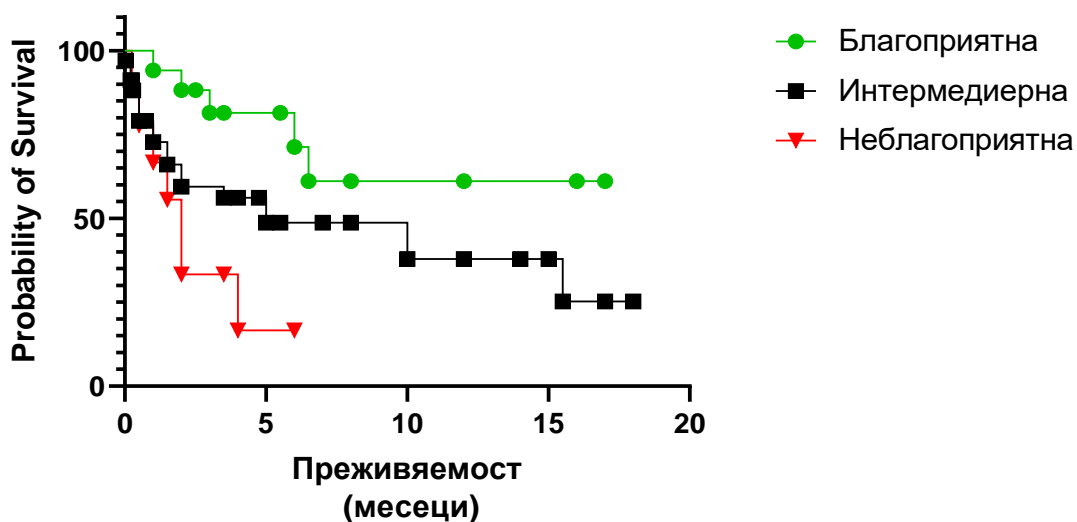
Стратификация спрямо риск по ELN 2022

Що се отнася до изведената от тези резултати стратификация спрямо риск, 18 (29,5%) принадлежаха на благоприятната, 34 (55,7%) – на интермедиерната и 9 (14,8%) – на неблагоприятната рискова група. Редно е да се отбележи, че индивидуалната роля на MLPA метода бе такава, че допринесе за стратифицирането на 26 (42,6%) от пациентите в проучването. За 14 (22,9%) пациенти класифицирането се базираше изцяло информацията от метода (Фигура 6) поради липсващ или неуспешен КЦА. За останалите 12 (19,7%), информацията от КЦА (основно НК) бе надградена и доведе до промяна в първоначалната стратификация. Така например, при 11 (18%) пациенти се касаеше за установен *NPM1* соматичен вариант и класифициране в благоприятна група на фона на НК ($n=7$) или аберация, принадлежаща към интермедиерната група ($n=3$), или не бе

проведен (n=1) КЦА. Въпреки наличието на пациенти с комутации в *NPM1* и *FLT3-TKD* (n=2), не сме класифицирали тези случаи като такива с интермедиеренен риск поради липсата на конкретния *FLT3* вариант в ELN 2022 (3). По тази причина те бяха причислени към благоприятната група. За други 4 (6,6%) рискът бе такъв, че те бяха класифицирани в неблагоприятната рискова група поради установени от MLPA съответно делеция в 5 хромозома (n=2) и делеция на сонди по късо и дълго рамо на 7 хромозома, предполагащо монозомия (n=2). Класифицирахме също един пациент със соматични варианти в *NPM1* и *FLT3* в интермедиерната рискова група, като влиянието на MLPA бе частично - успоредно се получи информация за наличен *FLT-ITD* вариант извън рамките на нашето проучване.

На базата на тези данни проведохме анализ на средната преживяемост чрез *Kaplan-Meier test* с нулева хипотеза, че преживяемостта на трите групи, представени от нашите участници в проучването, е идентична. Получихме следните резултати – медиана на преживяемостта за благоприятната рискова група - недефинирана (т.е. >50% преживяват проучения период, но неизвестно с колко точно). Уточнихме тази преживяемост по метода на *Machin* (168) и получихме 11,8 месеца преживяемост за 61,1% от рисковата група. За интермедиерната и неблагоприятната групи тя бе съответно 5 и 2 месеца със статистически значима разлика между трите ($p=0,0190$, *Log-rank (Mantel-Cox test)*, $p=0,0054$, *Log-rank test for trend*). Този резултат отхвърли гореспоменатата нулева хипотеза (Фигура 12):

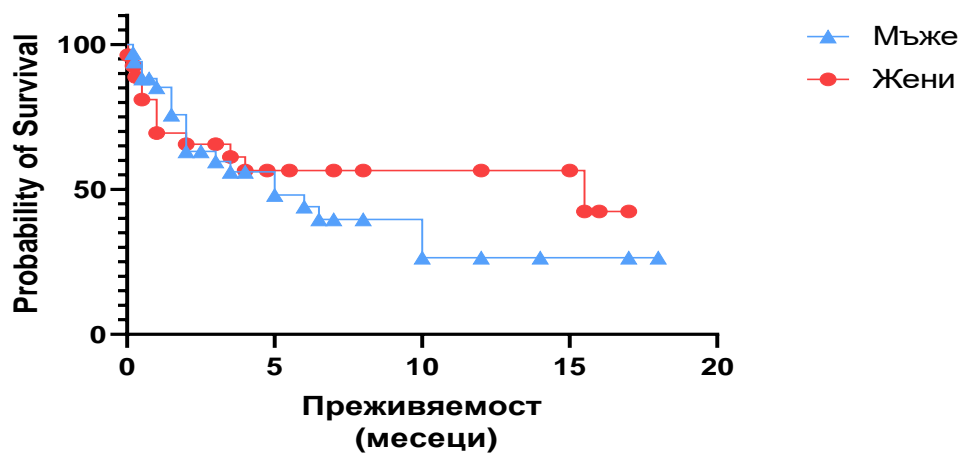
Фигура 12. Средна преживяемост на пациентите, разпределени в рискови групи по ELN 2022 (*Kaplan-Meier test*, *GraphPad Prism*)



Анализ на средната преживяемост спрямо пол и възраст

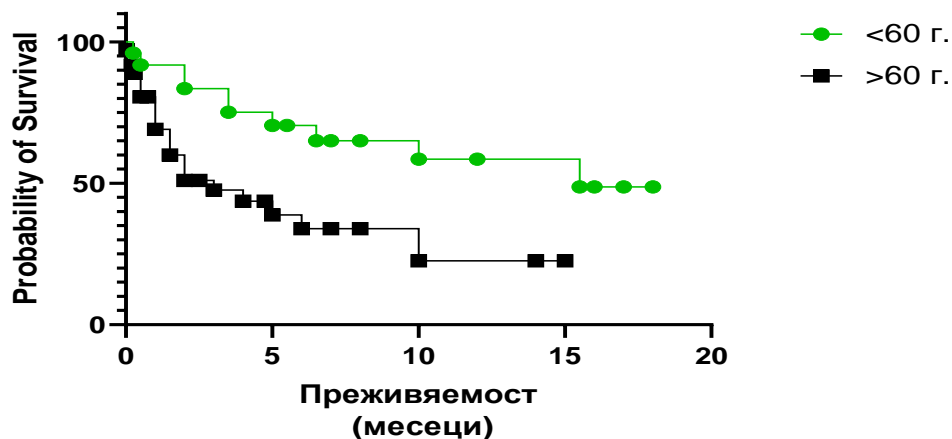
Проведохме също *Kaplan-Meier* анализ на преживяемостта според наличните демографски данни за включените в проучването пациенти. При мъже и жени се демонстрира средна преживяемост 15,5 месеца за жени и трикратно по-ниска за мъже – 5 месеца, въпреки че p не доби статистически значима стойност ($p=0,4046$, *Log-rank (Mantel-Cox) test*, $p=0,8603$, *Gehan-Breslow-Wilcoxon test*) (Фигура 13):

Фигура 13. Средна преживяемост за двата пола (*Kaplan-Meier test*, *GraphPad Prism*)



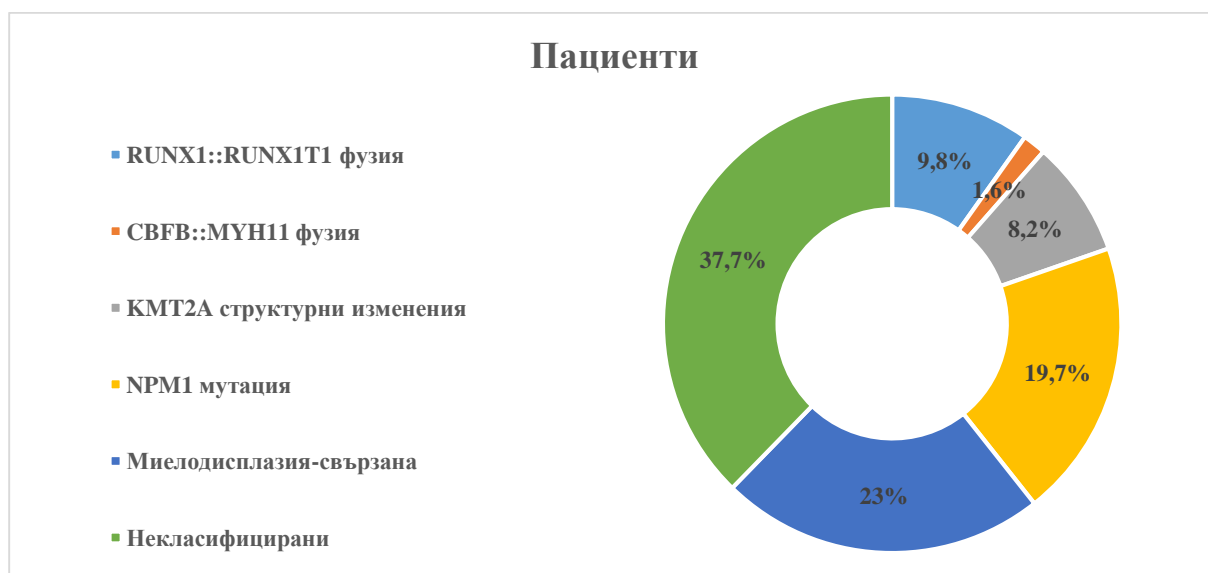
Сравнихме също преживяемостта при пациенти под и над 60-годишна възраст, за да проверим наблюдава ли се при нас очакваната разлика. Резултатът бе красноречив със статистически значима разлика в средната преживяемост -15,5 месеца за пациентите под 60 г и 3 за тези над 60 г ($p=0,0074$, *Log-rank (Mantel-Cox) test*, $p=0,082$, *Gehan-Breslow-Wilcoxon test*) (Фигура 14).

Фигура 14. Средна преживяемост за пациентите под и над 60-годишна възраст (*Kaplan-Meier test*, *GraphPad Prism*)



Основавайки се на придобитата от проучването информация, разпределихме пациентите на следните групи (Фигура 15):

Фигура 15. Разпределение на включените в проучването пациенти по WHO 2022



Както се вижда от таблицата, от класифицираните пациенти **водеща бе групата на МДС-свързаните промени** – 23% (n=14). На практика най-много са некласифицираните пациенти – 37,7% (n=23) поради липса на открита генетична промяна в 21,3% (n=13) от двата метода или поради невъзможност наличната генетична промяна да се класифицира – при останалите 16,4% (n=10).

6. ОБСЪЖДАНЕ

6.1 Обсъждане на резултати от дескриптивно – епидемиологична характеристика на участниците в проучването

Възрастово-полова характеристика и изследвана средна преживяемост спрямо тези фактори

По отношение на възрастовото разпределение, нашите резултати показаха голямо сходство с докладваните в литературата – като средна възраст на поставяне на диагнозата Vakit и съавтори посочват 65 години (1). Ние докладвахме медиана вместо средна стойност поради очакваната липса на Гаусово разпределение, като за възрастта на новодиагностицираните пациенти тя бе 62 години. Тази стойност силно се доближава до докладваната от Герчева и съавтори в проучване, обхващащо терапевтичните резултати при пациенти с ОМЛ >18 г. за 10-годишен период – 63 години (169). Нашите данни демонстрират по-често установяване на ОМЛ при по-възрастни пациенти – 59% (n=36) бяха над 60- и 75,4% (n=46) - над 45-годишна възраст. Сходни са данните на Герчева и съавтори с 55% пациенти над 60-годишна възраст (169). Напредналата възраст на новодиагностицираните с ОМЛ пациенти е добре позната предпоставка за по-нисък процент на постигане на ремисия, по-висока ранна смъртност и по-кратка обща преживяемост (170), установени и от местни проучвания на Герчева и съавтори и на Шемелекова и съавтори (169,171). Преживяемостта на нашите пациенти под и над 60-годишна възраст също демонстрира влошаване на прогнозата за по-възрастните пациенти с петкратно по-ниска преживяемост при вторите (Фигура 14). Разбира се, тази смъртност се влияе и от други фактори като вид терапия, придружаващи заболявания (периодът ни на проучване съвпада с новозатихналата пандемия от COVID-19 освен очакваните сърдечно-съдови, ендокринни и др. хронични заболявания), ELN рискова група и др.

Много по-млад е контингентът пациенти в дългогодишно проучване от Индия на Srivastava и съавтори (172), включващо 1860 пациенти над 18-годишна възраст. Медианата на възрастта в това проучване – 42 години, е с 20 години по-ниска от тази на нашите пациенти. Едва 13% са на възраст над 60 години, докато при нас това са повече от половината пациенти с водеща възрастова група 61-75 години (Фигура 5). Тези значителни различия са интересни, тъй като по-горе се описа сходство с други български проучвания и е възможно да става дума за различна възраст на изява на заболяването при

различните етнически групи. Все пак трябва да се има предвид съществения превес на броя пациенти в труда на Герчева и съавтори и възможността за уеднаквяване на тази характеристика при по-голям обем и на нашите местни извадки.

Ние не отчетохме голяма разлика в засягането на двата пола – М:Ж=1,1:1. По литературни данни се очаква по-голяма, макар и варираща разлика - докладваното от Vakitи и съавтори съотношение е значително по-красноречиво - 5:3 или 1,67:1 (1), а това на Stabellini и съавтори от САЩ, обхващащо 12-годишен период – 1,34:1 (173). В проучването на Шемелекова и съавтори, сравняващо резултатите от лечението на пациенти над и под 60-годишна възраст, съотношението общо е 1,63:1 (171). Мъжкият пол се асоциира с по-висока честота на засягане и по-висока смъртност (173). Възможно е разликата при нас да се дължи на малката извадка пациенти и би било удачно да се проследи съотношението при бъдещо изследване на по-голям брой пациенти. Възможно, макар и по-малко вероятно, е също разликата да се дължи на възрастовото ограничение, наложено в нашето проучване. Проведеният от нас анализ за средна преживяемост (Фигура 13) отчете трикратна разлика между двата пола (М:Ж = 5:15,5 месеца). За сравнение, проучването на Stabellini и съавтори отчита сходна за двата преживяемост - 10,8 и 10,1 месеца съответно за мъже и жени. Прави впечатление, че те съобщават още едно съотношение с двукратна разлика в полза на жените - 36,7 спрямо 70,9 месеца, при вземане предвид история за предходна хоспитализация (173). От тези данни може да се заключи, че както и при фактора възраст, полът не може да се разглежда индивидуално без съотнасяне към останалите фактори, определящи хода на заболяването.

Разпределение по видове показания

Известно е, че основен рисков фактор за развитие на ОМЛ е МДС, а също миелофиброза и апластична анемия (1). В нашето проучване 11 (18%) пациенти отговарят на тези категории. Общо 11,5% са с ОМЛ след МДС, което съвпада с процента вторична ОМЛ (11%) при пациенти над 60 години при проучването на Шемелекова и съавтори (171). Тези резултати биха могли да се приемат за съпоставими, имайки предвид доминирането на нашия контингент изследвани от такива над 60 г. (59%). При тези, както и при малкото пациенти с предходна ХМЛ (n=2), знанието за тези състояния и системното провеждане на контролни прегледи и клинично-лабораторни проучвания предполагат навременно поставяне на диагноза ОМЛ. Въпреки това, предходно хематологично заболяване представлява предпоставка за по-лоша прогноза в сравнение с *de novo* ОМЛ (174).

За мнозинството включени в проучването обаче това е първо хематологично заболяване. Тези 48 (78,7%) души са диагностицирани на база на проявени във времето оплаквания, тяхната тежест, както и потърсена лекарска помощ. Някои от тях са с изключителна кратка преживяемост (под 30 дни) и съответно ранна смъртност, включително приети по спешност и починали на фона на остра циркулаторна недостатъчност преди или по време на инициалната диагностична оценка и терапия. Извън обхвата на специалиста-хематолог, както и на целия екип, ангажиран в първоначалната оценка на пациент с ОМЛ, биха останали инициативата и скоростта на търсене на лекарска помощ и насочването от общопрактикуващи лекари или по-малки болнични заведения. Това обаче са фактори, определящи времето на поставяне на диагноза, а оттам и изхода на заболяването на тези пациенти. Въпреки, че този въпрос не е конкретен предмет на настоящата дисертация и би бил труден за контролиране, той адресира нуждата от масова информираност на обществото за ефективна профилактика на това заболяване, както и нуждата от подобряване на масовата здравна култура като цяло.

6.2 Обсъждане на резултатите от проведените генетични изследвания

6.2.1 MLPA

Първият аспект на резултатите от този метод, изискващ обсъждане, е неговата успеваемост. Ние отчетохме наличие на генетична промяна при 55,7% от изследваните (Фигури 8 и 13). Наличието на левкемогенен процес у тези пациенти е основание да приемем, че идеалната и целева успеваемост на кой да е метод, е 100%. Това означава, че MLPA проявява неуспех в откриването на генетичните промени у останалите 44,3%. От една страна, това се дължи на таргетния характер на метода – известни са включените сонди (Таблица 7) и че не би било възможно да се отчетат моногенни и хромозомни промени отвъд техния обхват. Следователно, тук се пропускат множество обособени по WHO 2022 форми като:

- ОМЛ с *RUNX1::RUNX1T1* фузия
- ОМЛ с *CBFB::MYH11* фузия
- ОМЛ с *DEK::NUP214* фузия
- ОМЛ с *RBM15::MRTFA* фузия
- ОМЛ с *BCR::ABL1* фузия
- ОМЛ с *MECOM* преустройства

- ОМЛ с *NUP98* преустройства
- ОМЛ с *CEBPA* мутация
- Част от МДС-свързаните форми (Таблица 3)
- ОМЛ с други дефинирани генетични промени

По литературни данни, общата честота на всички тези форми взети заедно (представена в разбивка в Раздел „Литературен обзор“) е от порядъка на 25-45% при възрастни, което може да обясни липсата на по-висока степен на успеваемост на използвания от нас молекулярно-генетичен метод. Фактор е също известното ограничение в чувствителността на метода по отношение на моногенни варианти, делеции и дупликации – съответно 5-10%, 20% и 40% (160). Възможно е използването на общоприетия първи избор за биологичен материал при миелоидни неоплазии – костен мозък (161), да повиши информативността на метода и това е една от бъдещите насоки за работа на това проучване.

Открихме едва няколко проучвания, използващи MLPA като метод първоначална оценка на пациенти с ОМЛ (175–179). Bănescu и съавтори и Tгіrop и съавтори и съавтори (175,177) включват 283 новодиагностицирани пациенти в Румъния над 18-годишна възраст с източник на генетичен материал - венозна кръв. Те използват общо 5 панела - P437 Familial MDS-AML (сонда за 3q, 5p, 19q, 21q и моногенни варианти в *GATA2* и *TERT*), P202 *IKZF1* [IKAROS], P414 MDS (сонди за хромозома 3, 5q, 7q, 8q, 11q, 12p, 17, 19, 20q, Y), P040 CLL (сонди за делеция/дупликация в *TP53*, *RB1/DLEU/MIR15A-16* и *ATM* и хромозома 12) и P070 (за субтеломерни преустройства, в случая – за откриване на анеуплоидии). Екипът включва още соматичните варианти *NPM1(863insTCTG)*, *FLT3-ITD*, *-TKD* и *DNMT3A(c.2644 C>G/A/T, c.2645G>A/C/T)*. Като цяло резултатите им са сходни с тези в нашето проучване - 31,8% от пациентите им имат поне една структурна хромозомна аберация, което е съпоставимо с нашата успеваемост от 29,5%. По отношение на моногенните варианти, те откриват *NPM1* вариант в 17%, също близко до нашите резултати – 19,7%; *FLT3-TKD* – 5,3%, при нас – 6,6%; *DNMT3A* – 12,4% на фона на 9,8% при нашите пациенти. Съпоставимостта на резултатите на двете проучвания сочи, че нашият подход вероятно е бил по-практичен, тъй като използваме само един MLPA панел, т.е той е по-благоприятно компилиран съгласно срещаната при пациентите с ОМЛ патология. Практичността в случая би се отразила както на количествата използван реактив и биологичен материал, така и стойността на молекулярно-

генетичната оценка и възможността за реимбурсирането ѝ в рамките на стандартните клинични пътеки и амбулаторни процедури.

В друго проучване в Полша, Marcinkowska-Swojak и съавтори (176) използват MLPA като разработват собствен панел и се фокусират върху детекция на три от най-честите при ОМЛ *NPM1* варианта – тип А, В и D (и трите в екзон 12 с почти идентични сонди) или структурни преустройства, включващи този ген, с общо 12 специфични сонди. Те изследват 83 възрастни пациенти, от които 67 с ОМЛ, а останалите с друго пролиферативно заболяване, като за биологичен материал посочват венозна кръв или костен мозък. Те установяват моногенен соматичен вариант при 15 пациенти (всички с диагноза ОМЛ), като при 14 от тях е именно тип А, тип D само при 1 пациент, и нито един структурен вариант, включващ гена. Тяхната успеваемост от 20,9% (14 от 67) за установяване на *NPM1* тип А е съпоставима с нашата.

В трето проучване - от Бразилия, Santos и съавтори (178) описват клиничен случай с 67-годишен пациент, като в диагностичния си алгоритъм те прилагат комбинация от КЦА, FISH, два панела на MRC Holland - P144-A2, P145-A2 и SNP-array. Използваните четири метода откриват едни и същи промени, макар и с различна аналитична перспектива и разделителна способност – допълнителен материал в хромозома 2 и монозомия 7 (FISH е използван само със сонда за 7-ма хромозома). Авторите предлагат интересна съпоставка на тези методи, която още веднъж потвърждава обсъдените по-горе възможности и ограничения на всеки от тях. Тъй като публикацията е с ограничен обем, те не коментират по-обстойно каква част от тези изследвания биха се използвали в рутинната им практика при новодиагностицирани пациенти. У нас обаче не би било оптимално използването на всички тези методи в инициалната оценка на пациенти с ОМЛ най-вече поради ограничените ресурси на Националното здравно осигуряване и клиничните пътеки, налични за тези пациенти.

Екипът от САЩ на Donahue и съавтори (179) провежда изследване на общо 110 проби (костен мозък или венозна кръв) като 56 от тях са на пациенти с МДС/ОМЛ, а останалите 54 – с хронична лимфоцитна левкемия. Те използват панел P145-MDS2, включващ 31 хромозомни локации (в хромозоми 5, 7, 8, 11, 12, 17, 20 и 21), без моногенни соматични варианти. Провеждат също FISH с МДС/миелоиден панел на Vysis (Abbot Molecular, USA) със сонди за *D7S486* (7q31)/*CEP7* (7p11.1–7q11.1), *EGR1* (5q31)/*D5S23*, *CEP8* (8p11.1–8q11.1)/*D20S108*(20q12), *ATM* (11q22.3), *TP53* (17p13.1), *D13S319* (13q14.3)/*D13S1020* (13q34) и *D12Z3* (*CEP12*; 12p11.1–12q11.1) с изброяване на поне 300 интерфазни ядра за всяка проба. Тяхната успеваемост е значително по-ниска – 8,9% за

MLPA и 10,7% за FISH с висока конкордантност между двата метода – 89% и 93% съответно за костен мозък и венозна кръв. Тази разлика с нашите данни вероятно се дължи от една страна на селектирането на пациенти – авторите не посочват демографски данни, като пробите са събрани като остатъчен материал след рутинно използваните в диагностичното звено методи. Влияние вероятно оказва и самата методика – избраният от тях панел включва по-малко на брой сонди и нито една за соматичен вариант, което със сигурност би намалило процента открита патология. Все пак, докладваната висока конкордантност от една страна между двата метода, и от друга – между двата вида биологичен материал, е обнадеждаваща за нашите перспективи за бъдеща работа.

Ако разгледаме откритата патология на фона на известната честота по литературни данни, виждаме че очакваната честота за *NPM1* вариантите е 30% (53) - от една страна е възможно да са пропуснати пациентите с други типове варианти в гена, а от друга е възможно да е недостатък на използването на венозна кръв като източник на биологичен материал. Не на последно място е обемът на нашето проучване, който не би могъл да се нарече достатъчен за представителна извадка. Все пак както отбелязахме по-горе, успеваемостта в нашето проучване е съпоставима с тази на други екипи. Balatzenko и съавтори използват метода reverse transcriptase-PCR - разновидност на PCR с използване на ензима обратна транскриптаза за амплификация и анализ на РНК, където 24,8% от пациентите са именно с *NPM1* тип А (863insTCTG) (180). Bănescu и съавтори и съавтори и Marcinkowska-Swojak и съавтори използват MLPA и отчитат сходен на нашия процент (175,176).

По отношение на открития от нас вариант *IDH2* (R140Q) при 14,6% от пациентите, докладваната от нас честота съвпада с тази по литературни данни – 10-15% (181). Abbas и съавтори (182) докладват за честота от 11% (n=97) на варианти в този ген в проучване проведено на 893 новодиагностицирани пациенти с ОМЛ в Нидерландия. Като източник на биологичен материал те използват костен мозък или венозна кръв, а методът им за молекулярно-генетичен анализ е reverse transcriptase-PCR, последван от директно секвениране. Най-честият вариант, докладван от тях, е R140Q – 8,3% (n=74) от всички изследвани. Прави впечатление също отчетената тях асоциация с други находки – при 41,2% от пациентите с *IDH2* вариант се открива и такъв в *NPM1* гена, у 12,4% - *FLT3-TKD*, а при 34% - хромозомна аберация. Нашето проучване също докладва такива асоциации - в по-ниска степен за *NPM1* и в сходна - за другите две категории, съответно 33,3%, 11,1% и 33,3%. Отново, многократната разлика в броя изследвани пациенти прави

резултатите на цитираното проучване много по-достоверни, и било добре да се сравнят отново находките при по-голям брой изследвани пациенти от наша страна. Освен изцяло за целите на подобрена диагностика, разпознаването на тези пациенти би могло да даде възможност за таргетна терапия, например с малкия молекулен инхибитор Enasidenib (183).

Що се отнася до пациентите от нашето проучване с открит *DNMT3A* вариант - 9,8%, направихме сравнение с работата на няколко екипа. Vănescu и съавтори (175) откриват такъв при 12,4% от своите пациенти. Тук трябва да се отбележи обаче, че те проверяват едновременно за общо 6 точкови варианта в гена (виж по-горе), докато използваният от нас кит има сонда за един от тях – R882H (с.2645G>A). Тъй като не е коментирана честотата на всеки от тези 6 варианта по отделно, можем да спекулираме, че тази на изследвания от нас вариант ще е в някаква степен по-ниска от общо посочената.

В проучване от Китай на Yuan и съавтори (99), включващо 870 новодиагностицирани пациенти над 14-годишна възраст, се изследват два точкови варианта в *DNMT3A* гена - R882H и R882C. Те използват друг молекулярно-генетичен метод – пиросеквениране, на ДНК от венозна кръв или костен мозък, и откриват R882H в 6,2% процента от всички изследвани. Прави впечатление, че както нашите, така и данните от тези две проучвания отчитат по-ниска от очакваната по литературни данни откриваемост от 20% независимо от обема или използвания метод (98). Възможно е това да се дължи на факта, че ние изследваме само един, макар и най-честия от вариантите в този ген на фона на съществуващи други такива със сходно прогностично значение.

Интересно е също наличието на съпътстващ *NPM1* и/или *FLT3* вариант при общо 66,7% от нашите пациенти с установен *DNMT3A* вариант, съответно 50% и 33,4% като при един от пациентите се наблюдават трите варианта едновременно. Подобна тенденция се установява и в проучването на Yuan и съавтори – близо 27% от пациентите има с *DNMT3A* вариант имат и такъв в *FLT3*, като се има предвид, че те проверяват за наличието на по-честия по литературни данни *FLT3-ITD*. За съжаление те не посочват конкретна честота на *NPM1* вариантите (99). Значението на тези комбинации не е напълно изяснено, но вероятно поначало добрата прогноза при наличен *NPM1* вариант се повлиява неблагоприятно, така както е известно за ко-мутацията в *FLT3-ITD*, която измества пациента от благоприятна в интермедиерна рискова група (3). Влиянието на

самия *DNMT3A* соматичен вариант върху изхода от заболяването вече бе коментирано в Раздел „Литературен обзор“.

Наблюдава се също едновременно присъствие на *DNMT3A* вариант и структурни и/или бройни хромозомни варианти при 50% от нашите пациенти (общо от двата метода) и при 33,3% конкретно от MLPA. Vănescu и съавтори (175) отчитат такива при 34,1% от пациентите с *DNMT3A* вариант от проведения MLPA с няколко различни кита, а екипът на Yuan и съавтори – при 20,6%, установени от КЦА (99). Не е изненадващо, че комбинацията на MLPA и КЦА за детекция на хромозомни аберации в нашето проучване, макар и съдейки по малък брой пациенти, обуславя по-високата успеваемост в сравнение с цитираните данни.

Вариантът *FLT3-TKD* е най-редкият в нашето проучване и е все още извън класификациите и рисковите стратификации, коментирани по-горе. Отчетената от нас честота от 6,6% отговаря на съобщената по литературни данни (89). Сходни са данните от мащабното проучване от Германия на Bacher и съавтори на 3082 пациенти на възраст над 17,5 години – 4,8% (184). Като източник на биологичен материал те използват костен мозък или венозна кръв, а като метод за детекция – т.нар. *melting curve analysis* – разновидност на PCR с отчитане разликата в точките на топене при наличие на разлики в секвенциите на PCR продуктите.

В ретроспективно проучване от Индия на Shankaralingappa и съавтори (185), *FLT3-ITD* и *FLT3-TKD* се изследват при 424 новодиагностицирани възрастни и деца. *FLT3-TKD* вариантът се установява при 5,9% от изследваните с помощта на PCR-базиран метод с източник на биологичен материал – венозна кръв. Разбира се, много по-висока е честотата на другия вариант в гена – 16,5%, което още веднъж потвърждава нуждата от изследване му при всеки един новодиагностициран пациент. Екипът анализира данни и от успоредно провеждан цитогенетичен анализ на материал костен мозък от същите пациенти – също както според нашите резултати, водещ е НК - при 63,9% от всички пациенти с някой от двата FLT3 варианта. Останалите са разпределени между СВFB-асоцииран кариотип (9,3%) високорисков кариотип съгласно ELN 2022 (2%), и други цитогенетични промени (24,7%).

Не на последно място трябва да се обсъди инициалното приложение на MLPA – детекция на конкретна структурна хромозомна патология. Както бе отбелязано в

предходния раздел (Фигура 6, Таблица 10), водеща по честота у нас бяха делеция в 7-ма хромозома – у 14,6% от всички изследвани, както и дупликация в дълго рамо на 11-та хромозома при 11,5% от пациентите. В проучването на Donahue и съавтори (179) цялостната успеваемост е много ниска и водещата им находка е дупликация в 8-ма хромозома при 4% от пациентите – вероятно става дума за сравнително честата тризомия 8, наблюдавана при този контингент пациенти. Нашият набор от сонди не съдържа такава, таргетираща хромозома 8, така че промените по нея биха останали изцяло неразпознати. Екипът докладва още за комбинация от 5q и 17p делеции при 1 пациент, каквато се отчита и при нас, но в комбинация с още няколко нарушения (Таблица 10). Те отчитат също делеция в 21q22.12 региона при 4% от изследваните, а при нас се отчита дупликация в региона при единствен пациент. Вижда се, че съпоставката е затруднена от различния процент успеваемост и различните сонди, използвани в двете проучвания. Интересно и вероятно по-удачно би било сравнението с труда на Bănescu и съавтори (175), но те не представят по-детайлни данни за откритата от тях структурна хромозомна патология от MLPA.

В проучване от Гърция, Konialis и съавтори (186) изследват 313 предимно костно-мозъчни проби, 56% от които на новодиагностицирани пациенти и 14% на пациенти с вероятна ОМЛ. Не се споменава възрастовото разпределение на пациентите, но от получените резултати се споменават случаи на находки при деца, така че вероятно няма възрастово ограничение. За провеждане на MLPA те създават панел P377, включващ общо 54 сонди за 2p (*MYCN*, *ALK*), 5q (*MIR145*, *EBF1*, *MIR146A*), 6q, 7p12 (*IKZF1*), 7q, 8q24 (*MYC*), 9p (*MTAP*, *CDKN2A*, *CDKN2B*, *PAX5*), 9p (*JAK2 V617F* точков вариант), 10q23 (*PTEN*), 11q23 (*ATM*), 12p (*ETV6*), 12q, 13q (*RBI*, *MIR15A*, *DLEU2*, *DLEU1*), 17p (*TP53*), 17q, хромозоми 18 и 19 и 21q22.1 (*RUNX1*). Екипът работи с ДНК, изолирана след краткотрайно култивиране на пациентските проби, а за качествен контрол използват 10 проби от здрави контролни индивиди. Те провеждат също КЦА и FISH – налични панели (Vysis, Abbott Molecular, USA) или подбрани и синтезирани според хромозомния регион (Empire Genomics LLC, USA, Bluegnome Ltd., UK). Те докладват успешна интерпретация на резултатите от MLPA в 98,4% от случаите, докато в останалите 1,6% голямото количество налични хромозомни аберации затруднява интерпретирането на получената информация. Най-честа находка при тях е делеция в 9p21.3 (*CDKN2A,-B*) при 2,2% от всички изследвани, докато в X060 панела такава сонда липсва. Редно е да се отбележи, че тази находка е открита при пациенти с подозрение за ОЛЛ. При други 1,9% се установява загуба или допълнителен генетичен материал в 22q22.1 – *RUNX1*, основно

при педиатрични пациенти с вероятна остра левкемия. Ние докладвахме дубликация при единствен пациент (1,6%). При 1,3% като пациентите са в същата възрастова и клинична група, Konialis и съавтори отчитат делеция в *ETV6*. При нас не бе открита такава находка въпреки наличието на подходяща сонда. По-нататъшна съпоставка не е възможна поради липса на описание на всички находки в проучването – авторите се ограничават до клинично значими на фона на НК или несвързани находки, определени така от тях. От всичко, описано за проучването на този екип, става ясно, че съпоставката е силно затруднена от разликите в дизайна на двете проучвания – контингент пациенти като възраст и инициална диагноза, време от поставяне на диагнозата. Тук едва половината пациенти са новодиагностицирани. Фактор е също и избрания панел – P377 е по-широк и би могъл да намери приложение при различни онкохематологични състояния, но същевременно находките за конкретна нозологична единица силно се ограничават. Описаното от авторите затруднение в интерпретацията на 1,6% не бе наблюдавано при нас. Възможно обяснение за това може да бъде по-големият брой здрави контролни индивиди в нашето проучване в съотношение 1:3 с пациентите, на фона на 1:31,3 за екипа на Konialis и съавтори. Възможно е обаче и да се дължи на по-големия обем на проучването на последните.

Поради ограниченото количество публикации, описващи проучвания, сходни на нашето по отношение на използван метод, решихме да съпоставим успеваемостта на използвания MLPA за структурни хромозомни преустройства с тази на алтернативни варианти. В скорошно проучване от САЩ, Levy и съавтори (187) изследват 100 възрастни пациенти с ОМЛ – 98 новодиагностицирани и 2-ма след релапс, с медиана на възрастта 58 години. Като източник на ДНК, екипът работи с венозна кръв или костен мозък при наличие на поне 20% бласти. Методът на избор е Optical Genome Mapping (OGM) (Bionano Genomics, USA) – молекулярно-генетичен целогеномен метод, визуализиращ голям диапазон от структурни генетични промени (разрешителна способност над 500 бази), включително балансирани, с висока чувствителност (5%). Всички от тях подлежат на КЦА, 19 - на FISH, 3-ма – на микрочипов анализ. Общо при 45% се открива находка от OGM, което надхвърля успеваемостта на използвания от нас молекулярно-генетичен метод по отношение на конкретния тип патология. Според представените от тях резултати, 11 от 16-те вида находки са транслокации и инверсии, които не са в аналитичния обхват на MLPA. Сред тях за гореописаните $t(8;21)$, $inv(16p)$, $t(6;9)$ и други, включени в актуалната класификация на WHO и в стратификацията спрямо риск на ELN. Що се отнася до съпоставимите с нашето проучване резултати, при

11% от изследваните се открива монозомия или делеция в хромозома 5 – по-висок процент от съобщения в нашите резултати. При 11% от изследваните от Levy и съавтори се отчита монозомия или делеция в хромозома 7, сходна с нашата честота от MLPA. При 8% се открива монозомия или делеция в хромозома 17, на фона на 1,6% при нас. Други 6% от цитираното проучване са с тризомия 8, за която в използвания от нас кит няма сонда, а в 3% се среща делеция в 20-та хромозома, неотчетена от MLPA. Редно е все пак да се отбележи, че имайки предвид всички използвани методи в проучването на Levy и съавтори, общо при 46% се открива патология с висока конкордантност между използваните от тях методи. За паралел, при нас общо при 57,4% се открива структурна или бройна хромозомна патология от комбинацията КЦА и MLPA. Тази разлика може да се дължи на различния обем на проучванията или на неизвестни за нас разлики в дизайна на проучването и в селекцията на пациентите. Конкордантността при нас е далеч по-ниска, най-вероятно заради таргетния характер на молекулярно-генетичния метод, но общият процент на успеваемост е по-висок. В 13% от случаите OGM дава информация за находки, пропуснати от КЦА, на фона на 18% при нашия опит с MLPA. Също така, в 27% от случаите, използваният в цитираното проучване метод уточнява точките на тези хромозомни промени, прецизирайки наличната информация и включените гени, което води и до изменения в първоначалната стратификация спрямо риск. Това уточняване касае най-вече откритите от екипа транслокации. OGM демонстрира висока конкордантност с КЦА и FISH, като се отчита потенциал за пропуск единствено при нискостепенни клонове под 5-10%. Това определя метода като неподходящ за изследване на пациенти с цел отчитане на MRD. При нас обаче конкордантността бе далеч по малка, както поради таргетния характер на MLPA, така и поради по-ниската чувствителност спрямо OGM и КЦА. От тези данни се вижда, че сравнението на OGM с MLPA безспорно сочи първия като по-висш метод в откриването на хромозомни изменения с различна резолюция. По-лесно би било сравнението с комбинацията от КЦА и MLPA, което предполага, че OGM би могъл успешно да я замени.

Резултатите от това проучване показват, че OGM е изключително потентна алтернатива за детекция на бройни и структурни хромозомни нарушения, включително балансирани и комплексни, с висока чувствителност и специфичност. Той превъзхожда както MLPA по чувствителност, така и КЦА в уточняването на някои криптични (до субмикроскопски), но ключови изменения като транслокации, малки делеции, инверсии, както и случаите на хромоплексия. Важна е също скоростта на анализа – няколко дни за лабораторни изпълнение и анализ на данните, както и липсата на нужда от култивация

на клетки, което е често предизвикателство при този вид проби. Имайки предвид тези предимства, както и автоматизацията на процеса, е твърде вероятно е методът да замени КЦА в бъдеще. Основното предизвикателство за целта е все още високата цена на анализа – около 500 щатски долара за проба (187). Включвайки допълнителен метод за детекция на моногенни промени, цената за пациент би се покачила вероятно двойно. OGM се извършва със специализирана техника, изискваща значителна начална инвестиция. Тази техника не е съвместима с друг метод, за разлика от практичните термоциклери и секвенатори при PCR или MLPA. Не на последно място, цялостният геномен характер на метода предполага изключителен обем на получените данни, което изисква комплексна биоинформатична обработка и интерпретация от специализиран персонал. Такъв не винаги фигурира като стандартна част от личния състав на болничните заведения. Това обаче е по-скоро временен проблем – съвременните генетични изследвания са тенденциозно все по-всеобхватни и работата с големи количества информация се очаква да стане рутинна.

Ако се върнем към нашите данни, от Таблица 10 прави впечатление, че в болшинството случаи има промяна по отношение на няколко сонди, маркиращи различни гени и/или различни техни екзони върху едно и също хромозомно рамо. От една страна, това корелира с размера на настъпилата аберация, макар че не може да се даде абсолютна информация поради таргетния характер на анализа. От друга страна, засягането на няколко съседни сонди повишава достоверността на резултата, тъй като се изключва възможността за случайно настъпили грешки при лигирането в реакцията. Все пак, макар и частична, тази информация би могла да се допълни с наличната от рутинно прилагания КЦА, както ще бъде коментирано по-долу.

6.2.2 КЦА

При този метод прави впечатление първоначалната редукция на пациенти, чиито резултати подлежат на обсъждане. От една страна, при 8 (13,1%) от тях, КЦА не е проведена по технически причини, описани в Раздел „Резултати“. Без успоредно провеждане на MLPA или друго генетично изследване, подходът при тях би бил по необходимост емпиричен поради липса на възможност за конкретизация на левкемогенния генетичен фон. Допълнителна редукция носи неуспешното култивиране на клетки с липса на метафазни пластинки, в нашия случай при 15 (24,6%) от всички пациенти в проучването. Това е много висок процент в сравнение с проучването от

Турция на Cırakoglu и съавтори (188), включващо 157 новодиагностицирани възрастни пациенти – 12,1%. При споменатото по-горе проучване на Yuan и съавтори (99) успешно се провежда КЦА при 90,7% от пациентите в проучването. Не е конкретизирана причината обаче да не се включат данните за останалите 9,3%. Дори да става дума за подобен неуспех, какъвто се отчита при нас и в проучването на Cırakoglu и съавтори, това отново би бил чувствително по-нисък от нашия процент. В проучването на Герчева и съавтори (169), повечето от пациентите (60%) не подлежат на КЦА. Коментирано е все пак, че за 85,7% от изследваните е възможна рисковата стратификация, т.е. неуспешният анализ при тях е наблюдаван при 14,3%. Цитираните различия в успешно култивиране на клетки са индикация за нужда от преразглеждане и опит за подобряване на използваните от нас протоколи на работа. Редно е да се отбележи, че нашата успеваемост на практика отговаря на установения по стандарт „Медицинска генетика“ на Министерство на здравеопазването допустим праг от 60% (189).

Успеваемостта по отношение на открита патология е друг аспект, който би могъл да варира по различни причини. Отчетеният от нас дял на НК (Фигура 11) е по-малък от половината успешно изследвани пациенти – 44,7%. Сходно е съотношението в проучването на Cırakoglu и съавтори – 42,8% (188). При Yuan и съавтори, 60,7% от пациентите са с НК. Възможно е тази разлика да се дължи на субективни фактори като критичност на анализацията, чувствителност на софтуера за кариотипиране, ако се използва такъв, или други, които не са дискутирани в статията на този екип. Интересна би била съпоставка с българските проучвания, цитирани по-горе, но Шемелекова и съавтори (171) изследват чрез КЦА малък контингент от пациентите си и данните не са включени, докато при Герчева и съавтори (169) находките не са конкретизирани, а само съотнесени към рисковата група.

Що се отнася до вида и честотата на находките от КЦА, водещи по честота при Cırakoglu и съавтори (188) са пациентите с монозомален кариотип (27,8%), следвани от тези с комплексен (25,3%). Това се различава от нашите резултати (Таблица 11), където водеща бе благоприятната $t(8;21)$ в 28,6% от пациентите с налична находка, следвана от комплексен кариотип при други 19%. В цитираното проучване, същата транслокация се среща при едва 8,7% от пациентите с патология, значително по-ниска от отчетената от нас честота. Възможно е тази разлика да се намали при увеличаване обема на нашето проучване, тъй като разликата в сравнените тук извадки е четирикратна.

Интересен е също паралелът със собствения ни опит за период от 11 години – 2010-2020 година, не включващ настоящото проучване (190). Ретроспективно бяха разгледани резултатите на 424 пациенти с ОМЛ, предимно възрастни (97,4%) – общо 723 проби за КЦА. Тъй като не става дума само за новодиагностицирани, а и за вече лекувани пациенти, някои от са изследвани повече от веднъж за периода. Успех е регистриран в 83,8% от случаите, което се доближава повече до цитираните по-горе сродни проучвания. Успеваемостта по отношение на отчетена патология обаче е по-ниска, отколкото според сегашните ни резултати – НК в отчетен в 60,9%, което е по-близко до коментирана от Yuan и съавтори (99). Релевантна разлика между тези две проучвания обаче е селекцията на пациенти – нашето ретроспективно проучване включва вече лекувани пациенти, което е добре позната и очаквана предпоставка за НК (191,192). Имайки това предвид, най-честата находка за този период е комплексния кариотип, срещан в 35% от случаите с открита патология, докато t(8;21) е характерна за едва 4,2%.

В друго българско проучване на Велизарова и съавтори (193) са изследвани 49 новодиагностицирани пациенти над 18-годишна възраст, от които 28 с ОМЛ, а останалите – с ОЛЛ. Те провеждат КЦА на материал от костен мозък, както и FISH със сонди за пет фузионни гена на Vysis (Abbot Molecular, USA) според находките от първия метод. Тъй като находките или липсата на такива не са разделени според диагнозата на пациентите, ще ги цитираме и сравним с нашите общо. Един от пациентите е без проведен КЦА, а при други 8 (16,7% от изследваните) той не неуспешен. От останалите 40, 15 (37,5%) са с НК – по-нисък от описаните по-горе проучвания на новодиагностицирани пациенти. Трябва да се отбележи обаче, че дизайнът на това проучване включва освен случаи на ОЛЛ и пациенти с ОПЛ, обичайно изключвани от цитираните досега проучвания, именно поради известната и очаквана находка там (25,26). Транслокация (15;17) или еквивалентната на нея генна фузия е установена при 2 (7,1%) от пациентите с ОМЛ от комбинацията КЦА и FISH. От 25 пациенти с открита патология, при 2 с ОМЛ се открива Филадельфийска хромозома, докато при нас не се откриват позитивни случаи. При други 2 авторите докладват t(8;21). Въпреки, че не се конкретизира диагнозата на последните, вероятно става дума за такива с ОМЛ, т.е честотата би била също 7,1%, по-ниска от нашата, която за всички изследвани би била 11,3%. Същото може да се предположи за 1 (3,6%) пациент с инверсия в хромозома 16, при нас също единствен такъв, както и по 2-ма пациенти с тризомия 8 за двете проучвания. Отчита се още комплексен кариотип при 3-ма пациенти, но той поначало е

характерен за различни онкохематологични заболявания и по-нататъшна интерпретация не е възможна.

В мащабното проучване на Srivastava и съавтори (172) са изследвани 1860 възрастни с ОМЛ. Екипът провежда КЦА на материал от костен мозък с допълнително прилагане на FISH при ниска информативност на резултата от първия метод. Те инициално изключват лекувани пациенти, както и такива с липса или недостатъчно метафазни пластинки. Тези критерии биват изпълнени от 96,3% (n=1791) – по-висока успеваемост от нашата и тази на другите цитирани проучвания. Водещ е също дялът на открити хромозомни аберации - НК е докладван в 36,1% от случаите, а патология – в цели 63,9%. И тук, както при предходното описано проучване, трябва да се уточни, че не са изключени пациенти с ОПЛ. Неслучайно най-честа находка е t(15;17) – 26,1% от патологичните резултати, което би могло да обясни и по-големия дял на патологични резултати в проучването. Чести също са комплексният кариотип – 17,5% и монозомалния кариотип – 13,8% (с частично припокриване между двете). Тези проценти са сходни с нашето, макар и далеч по-малко, проучване. Също както при проучването на Велизарова и съавтори (193), и тук t(8;21) се среща по-рядко отколкото при нашите пациенти. Инверсията в хромозома 16 се отчита в 2,6% от пациентите а хромозомна аберация, което е по-малко от нашата честота, о това вероятно е свързано с обема на двете извадки (единствен пациент при нас). Екипът описва също интересна асоциация на напредналата възраст с НК и комплексен кариотип. Въпреки споменатото по-горе различие във възрастта при двете проучвания е впечатляваща разликата в находките при заложените от тях възрастови групи. Поради малкия брой пациенти не сме провели такъв анализ, но би било информативно да се сравни при по-голяма група в бъдеще.

В цитираното по-горе проучване Levy и съавтори (187) демонстрират по-ниска успеваемост от докладваната в нашите резултати по отношение на КЦА – 42% с патологичен резултат и 58% с НК. Водещи са монозомия/делеция в хромозоми 5, 7 и 17 – по 23,8% от пробите с налична хромозомна аберация, следвани от inv(16) в 19%, надхвърлящи многократно докладваните от нас честоти за този метод. Възможно е да става дума за резолюционно ограничение, което да не позволява отчитането на някои структурни промени от нашия екип, в случая делеции и инверсии. Отново сравнително по-слабо е представянето на t(8;21) в данните от това проучване - 11,9%. Някои от тези находки се комбинират като при 11,9% става дума за комплексен или монозомален кариотип, срещани два пъти по-често сред нашите пациенти.

Още един важен аспект на надеждността на КЦА като източник на информация за генотипа на даден неопластичен процес е достигнатата разрешителна способност. Макар и да не се цитира в разгледаните от нас проучвания, тя е известен лимит както за самия метод, така и за работата с костно-мозъчни проби. Във всеки резултат от КЦА по стандарт (189,194,195) задължително се посочва резолюцията на анализираниите метафазни пластинки, както и ограниченията, които тя обуславя. Докладвайки постигнатата от нас резолюция (Таблица 11), без да отчитаме съществена разлика при НК и патология (Фигура 10), съзнаваме неизбежно пропуснатите находки. Неизменно това е предпоставка за неуспех в регистрирането на по-детайлни промени, които по дефиниция са в рамките на разрешителната способност на метода. Такива например са някои делеции и дупликации, инсерции, инверсии и др. Т.е НК може съвсем адекватно да се нарече „условно“ НК. Също така, част от резултатите са с липса на конкретика по отношение на засегнатата хромозома или неин регион – отбелязана е само хромозомна група или маркерна хромозома. В някои резултати има въпросителен знак поради несигурност в конкретната сублента. Това също се дължи на ниската резолюция, характерна за проби от костно-мозъчен материал и носи допълнително ограничение в информативността на метода.

В този смисъл MLPA превъзмогва или е независим от няколко често срещани проблема при провеждане на цитогенетичен анализ – необходимост от култивиране на клетки, липса на метафазни пластинки за анализ и техническите проблеми, свързани с източника на биологичен материал за него, включително отказ от провеждане на костно-мозъчна биопсия или временна невъзможност за провеждане на тази процедура. Работата с венозна кръв при наличие на достатъчно циркулиращи бласти се приема като достоверен източник на биологичен материал за провеждане на генетичен анализ (3,161).

Изключая очакваната дискордантност при моногенните соматични варианти, такава се наблюдава по резултатите от двата метода при пациенти (там, където КЦА е проведен успешно). От една страна, при 4-ма пациенти има открита структурна хромозомна аберация от MLPA – 2 с dup(11q), 1 с del(5q) и 1 с del(7q), без съответна находка от КЦА с резултат НК. Същевременно, при друг пациент дискордантността е частична – хромозомният анализ не отчита наличие на структурна, а само на бройна промяна (Таблица 12, пациент 4). Вероятно обяснение е резолюцията, в случая 100-200 бенда за тези 4 резултата, и обсъдените по-горе нейни ограничения. При други 17 пациенти се

открива патология от цитогенетичния анализ без аналогичен резултат от молекулярно-генетичния метод:

- Транслокации – 8;21 (n=6), 2;21 (n=1), 7;15 (n=1): освен при загуба на генетичен материал, която е разпознаваема с таргетираща региона сонда, или такава за конкретен фузионен ген, MLPA не е способен да отчете този тип промени.
- Монозомия 20 в 15% от анализираниите метафази (n=1): тук големината на клона вероятно не позволява детекция от MLPA, който при конкретния пациент открива 3 моногенни варианта, но не и хромозомна аберация. Възможно е също да има разлика в големината на този клон в областите в костен мозък и в венозна кръв.
- Тризомия / монозомия по хромозома 8 (n=2): липсата на сонда за тази хромозома обуславя пропускането на аберации по нея.
- Инверсия в хромозома 16 (n=1) – аналогично на транслокациите.
- Делеция в дългото рамо на 16 хромозома в 10% от анализираниите метафази (n=1) – тук липсата на конкордантност се дължи както на размера на клона, така и на липсата на сонда за делетирания регион.
- Монозомия на хромозома от група D в 46,7% от анализираниите метафази (n=1) – очаква се да липсва сонда за тази хромозома. Предвид информацията на налични референтни сонди за хромозомите от тази група обаче, може да се предположи, че клонът не е бил достатъчно добре представен в пробата венозна кръв за MLPA или че резолюцията (>100 бенда) и/или вероятни аберации тук са възпрепятствали правилното определяне на хромозомна група.
- Съставен кариотип с различни аберации (n=1) – по дефиниция съставният кариотип е изключително вариращ между отделните метафази, което обуславя слабо представяне на отделните клонове отвъд чувствителността на MLPA.
- Допълнителен материал по 19 хромозома (n=1) – липсват сонди за тази хромозома.
- Делеция в късо рамо на 5 хромозома (n=1) – липса на таргетираща сонда.

В обобщение на нашите данни от проведените генетични изследвания, обхващайки целия геном, КЦА запазва водещата си роля като метод за детекция на бройни и груби структурни хромозомни изменения. Чувствителността към нискостепенни клонове и балансирани преустройства допълнително стабилизира ролята му в инициалната оценка на пациенти с ОМЛ. Въпреки това информацията от него, особено при ниска резолюция, трябва да се приема критично, тъй като ограничената информативност може да „прикрие“ наличието или да промени възприятието за дадена аберация. Например,

допълнителен материал в дадена хромозома и липсващ в друга биха могли да се дължат на неразпознатата транслокация, но проведените два метода да не дават достатъчно информация. Също както и при маркерните хромозоми, произходът би могъл да се уточни с методи като Multicolor FISH, микрочипов анализ при небалансирани промени или OGM.

Резултатите от нашето проучване сочат, че комбинацията от КЦА и MLPA чувствително повишава (Фигура 11) количеството открити генетични маркери. При 27 (44,3%) пациенти са установени находки от MLPA - моногенни или структурни хромозомни, на фона на НК, липсващ или неуспешен КЦА. При други 4 (6,6%) са открити такива, допълващи или уточняващи резултата от хромозомния анализ. Контрастно е и нивото на детекция на патологични находки от двата метода – 36,9% и 55,7% съответно за КЦА и MLPA. Въпреки липсата на статистически значима разлика между тези две стойности, ефектът на допълнителния молекулярно-генетичен метод увеличава количеството информация за генетичната основа на заболяването при тези пациенти.

Общо 13 (21,3%) пациенти остават с неизяснена генетична характеристика на фона на приложената от нас аналитична комбинация. 5 (8,2%) пациенти са с нормален резултат и от двата метода, а други 8 (13,1%) – с нормален резултат от MLPA и липсващ или неуспешен КЦА. Това предполага нуждата от по-широкообхватен подход към диагностиката на пациентите с включване на повече генетични маркери – както моногенни, така и (бройни и структурни) хромозомни. Тази цел е насочена най-вече към молекулярно-генетичния метод или методи, но трябва да се има предвид и твърде високият процент провалени КЦА в сравнение с цитираните по-горе проучвания. Успеваемостта би могла да се повиши чрез избор на друг метод като PCR, NGS, SNP-array, FISH, OGM, или чрез добавяне на сонди или панел към настоящия MLPA подход. Това са всъщност практики, описвани и в други проучвания и международни препоръки като решение на проблема (3,162,175,196).

Разбира се, използваният от нас метод би могъл изцяло да се замени с такъв, базиран на новогенерационно секвениране. NGS обаче не е особено рентабилен метод в условията с нецентрализирана дейност с по-малък брой проби. Такъв е случаят както при нас, така и в други страни (197). Също така, подобно на OGM и други типове анализ,

продуциращи големи количества информация, интерпретацията на последната изисква сложна биоинформатична обработка.

Обсъждане на стратификацията спрямо риск по ELN 2022

Данните от стратификацията спрямо риск демонстрират значителен превес на пациентите в интермедиерната, като най-малко са пациентите в неблагоприятната рискова група. В проучването на Vănescu и съавтори (175) разпределението е със сходни съотношения трите групи. При Герчева и съавтори, Cırakoglu и съавтори, както и при Levy и съавтори (169,187,188) разпределението е с разменени позиции за благоприятна и неблагоприятна група, докато интермедиерната запазва челно място. Наличието на най-малко пациенти в неблагоприятната група при нас, макар и сравнимо с друго проучване, вероятно е вследствие на хиподиагностика на тези пациенти. От използваните от нас методи и техните възможности се вижда, че множество елементи от рисковата група са извън обхвата на тази комбинация. Такива например са соматични варианти в гените *BCOR*, *EZH2*, *SRSF2*, *STAG2*, *U2AF1*, *TP53* и *ZRSR2*. Възможностите на КЦА също са ограничени от ниската резолюция, както бе коментирано по-горе, и това би могло да повлияе детекцията на някои по-детайлни структурни изменения. Не помаловажен е разбира се големият дял на пациенти с липсващ или неуспешен КЦА – общо 37,7% от всички в проучването.

В скорошно проучване от САЩ на Lachowicz и съавтори (198) са включени 513 новодиагностицирани възрастни пациенти с ОМЛ, изключвайки случаите на релапс и ОПЛ. Информацията за налични генетични маркери при този контингент се базира на проведени КЦА, FISH, РНК секвениране, както и от цялостно екзомно и таргетно новогенерационно секвениране. Според ELN 2022 тяхното разпределение е 48% за неблагоприятна, 34% за интермедиерна и 29% за благоприятната рискова група, което се различава от нашето и цитираните по-горе проучвания. Прави впечатление, че те докладват налични соматични варианти в гените *SRSF2*, *SF3B1*, *U2AF1*, *ZRSR2*, *BCOR*, *EZH2* и *STAG2* в 33% от всички включени пациенти, което обяснява повишената честота на пациенти във високорисковата група. Тези гени всъщност не фигурират в нито едно от изброените по-горе 3 проучвания, а в нашето е включен единствено вариант в *SF3B1*. Резултатите от това проучване и различията с нашата стратификация демонстрират още веднъж предимството да се комбинират множество методи с различен обхват и разделителна способност на максимална детекция на генетични промени и коректно прогнозиране за пациентите. Съвсем буквално, разбира се, остава цената на такива

комбинации като проблем в рутинизирането на подобни практики в страни с развиваща се икономика.

В друго голямо проучване от Германия на Rausch и съавтори (199) са оценени 1138 възрастни пациенти с ОМЛ. Тяхното разпределение е с водеща по размер неблагоприятна рискова група, следвана от благоприятна и интермедиерна. Като източник на информация екипът използва КЦА и таргетно новогенерационно секвениране, селектирайки 68 чести соматични варианта, типични при миелоидни неоплазии. И тук превесът на групата с най-богата гама от включени соматични моногенни варианти говори за по-добра информативност и по-коректно стратифициране на пациентите.

Все пак, мнозинството на пациентите в интермедиерна рискова група в нашето и някои от цитираните проучвания не е изненадващо. То се дължи както на гореспоменатата хиподиагностика на някои маркери в другите групи, така и на включването на НК и всички непричислени към друга група хромозомни промени, които неизменно надвишават обособените благоприятни и неблагоприятни по брой (3). Тази тенденция подлежи на промяна с въвеждането на повече и по-детайлни генетични методи, изясняващи по-голяма част от генетичната характеристика на повече случаи с ОМЛ. Въпрос на време е и обогатяването на използваните рискови стратификации, което се наблюдава с всяка следваща корекция на ELN (3,200).

По отношение на приноса конкретно на MLPA, нашите данни демонстрират ползата от откриване на моногенни варианти и структурни хромозомни аберации, довели до класифициране на 42,7% от пациентите (Фигура 6, Таблица 10). Това уточняване на генетичната основа на левкемогенния процес дава възможност за персонализиране на подхода към пациентите и подбор на най-адекватни мерки за опосредстване на по-добра преживяемост за конкретния случай.

Що се отнася до отчетената от нас преживяемост на тези групи пациенти (Фигура 12), статистически значимата разлика в преживяемостта е очаквана. Би било по-информативно пациентите да се проследят за по-дълъг период, минимум от 5 години, с цел добиване на по-категорични данни за общата преживяемост и сравняване с други български и чуждестранни проучвания.

Обсъждане на разпределението спрямо получените резултати спрямо WHO 2022

Резултатите от нашето проучване позволиха ново класифициране на пациентите на база цитогенетични и молекулярно-генетични маркери от използваните два метода (Фигура 15). Измежду класифицираните, водещи по честота – 14 (23%), са тези с МДС-асоциирани промени, което може да се причисли към долната граница на честотата по литературни данни – 25-48% (62,63). От тях, 64,2% (n=9) са класифицирани в групата единствено от MLPA, 14,3% (n=2) - от КЦА, а при останалите 21,4% (n=3) има припокриване (Фигура 6, Таблици 10 и 11). Възможно е делът на тази група да се увеличи при включване на по-голям брой пациенти или при подобряване на генетичния обхват на използваните методи. От резултатите ни се вижда пропуск в отчитането на молекулярно-генетичните маркери на този подтип – единствено *ASXL1* и *SF3B1* фигурират в използвания от нас кит, докато *BCOR*, *EZH2*, *SRSF2*, *STAG2*, *U2AF1* и *ZRSR2* остават неизяснени. Същевременно, имаме основание за заключение, че и двата метода – MLPA и КЦА, са ограничени в отчитането на налични промени в групата на структурните хромозомни изменения (Таблица 3). Докато цитогенетичният анализ е ограничен от своята успеваемост и разрешителна способност, MLPA има недостатъци като таргетен характер и по-ниска чувствителност. Твърде вероятно е мнозинството пациенти, останали неклассифицирани – 23 (37,7%) да принадлежат поне частично към тази поначало голяма група.

Прави впечатление, че според класификацията на WHO 2022 групата на ОМЛ с МДС-асоциирани промени включва както пациентите с *de novo* МДС, така и тези с вторична ОМЛ след МДС. От нашите данни става ясно, че набавената от проведените анализи информация увеличава двойно броя на пациентите в групата, съдейки по инициално насочените с известен предшествващ МДС (n=7). Известно е, че МДС и ОМЛ са етиологично и патогенетично свързани и тяхното разграничаване към момента става все по-условно и несигурно (201).

Следващата по големина група – 12 (19,7%) е тази на ОМЛ с *NPM1* соматичен вариант, установен чрез MLPA. По-горе бе разгледана съпоставимостта на тази група като честота с други данни. Прогнозата на тези пациенти - поначало благоприятна, зависи от статуса на *FLT3* гена (53,55). При двама бе установен и *FLT3-TKD* вариант, което вероятно оказва негативно влияние върху изхода от заболяването, въпреки че към момента не фигурира в последната версия на ELN (3,89,91). При друг бе налична

информация за наличен *FLT3-ITD* извън рамките на проучването и този пациент бе класифициран в интермедиерната група.

Благоприятната *RUNX1::RUNX1T1* фузия отрежда трето място по големина – 9,8% (n=6), на тази група пациенти. Нейното установяване е изцяло благодарение на КЦА и най-честа находка от метода. Допускаме възможността за пропускане на други пациенти в тази група при цитираните 37,7% с липсващ кариотип.

KMT2A структурни изменения, характерни за 8,2% (n=5) от нашите пациенти са отчетени чрез специфичните сонди на използвания от нас MLPA X060 панел. Прави впечатление, че никой тях няма данни за хромозомни промени от КЦА – двама са с НК, един с неуспешен КЦА и 2 без проведен хромозомен анализ.

Групата с *CBFB::MYH11* фузия е представена от единствен пациент (1,6%), което говори за значителна хиподиагностика според докладваните в литературата и цитираните проучвания честоти (32,187). Подобрената детекция на инверсията и транслокацията, водещи до характерната генна фузия чрез КЦА или друг метод, би повишила броя пациенти както в класифицирането им, така и в адекватното им стратифициране по риск съгласно ELN 2022.

Както бе коментирано по-горе, наблюдава се ограничено до липсващо представяне на някои групи по WHO 2022. Това от една страна се дължи на малкия брой изследвани пациенти, както и на възрастовото ограничение, заложено в дизайна на проучването. Все пак, пропусъкът от страна на използваните от нас методи предполага нужда от още по-обхватна оценка на тези пациенти и това е една от насоките за бъдеща работа.

7. ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ПЕРСПЕКТИВИ ЗА БЪДЕЩА РАБОТА

Молекулярно-генетичните анализи имат неизменна позиция в инициалната оценка на пациенти с новодиагностицирана ОМЛ. Към момента препоръките включват задължително приложение на КЦА и един или повече молекулярно-генетични методи за пълноценно охарактеризиране на всеки един случай (3,161). Тези данни са силно необходими за диагностично, прогностично и предиктивно уточняване и прецизиране на подхода към пациентите с ОМЛ. Изборът на най-подходящ метод или комбинация от такива зависи от множество фактори – аналитичен обхват, сложност на изпълнение и технически изисквания, брой изследвани пациенти за единица време, кадрови състав, налично лабораторно оборудване и др.

На базата на сравнението на резултатите от MLPA и тези от проведен цитогенетичен анализ, и на сравнението с други подобни проучвания, можем да заключим, че MLPA може да бъде полезен и информативен метод за начален генетичен скрининг успоредно с цитогенетичния анализ. Чрез данните от молекулярно-генетичния анализ бяха разкрити генетични промени в повече от половината (55,7%) от пациентите. Същевременно, еднолично чрез MLPA бяха класифицирани и стратифицирани малко под половината (42,6%) от тях. Комбинацията от двата метода – цитогенетичен и молекулярно-генетичен, даде информация за мнозинството (78,7%) от нашите пациенти, и предостави възможност за индивидуализиране на тяхното лечение. Използван като скриниращ метод, MLPA дава допълнителна информация за по-детайлни генетични промени, превъзможвайки добре познатите ограничения на КЦА. В сравнение с приложението на няколко други MLPA кита или метода едновременно в други проучвания (175,176,179,180,182), изборият от нас X060 кит представи не по-малко находки от моногенен и хромозомен произход, което го направи ценна част от оценката на този контингент пациенти. Според нас ползата от MLPA би била особено осезаема в страни с ограничено покритие на молекулярно-генетични анализи от националното здравно осигуряване. Тъй като България е добър пример за подобно лимитирано финансиране, смятаме метода за перспективен поне до промяна и подобряване на обема на клиничните пътеки и процедури, налични за грижата за тези пациенти.

На базата на проведеното от нас проучване и неговите резултати и с цел подобряване на генетичната оценка на контингента новодиагностицирани пациенти с ОМЛ, могат да бъдат изведени следните насоки:

- Въвеждане на рутинен молекулярно-генетичен метод (или комбинация от такива) за инициална генетична оценка на коментирания контингент пациенти в допълнение към КЦА.
- Подбор на молекулярно-генетични маркери на интерес – както за възрастни, така и за педиатрични пациенти, в съображение с настоящите международни препоръки и възможности за таргетна терапия, както и редовното им актуализиране предвид бързопрогресиращите научни данни в областта.
- По възможност използване на костно-мозъчен материал като източник на ДНК за гарантиране на най-точна оценка на неопластичния генотип.
- Добро познаване на характеристиките, ограниченията и вариантите за подобряване на информативността на всеки от използваните методи.

Все пак, нуждата от по-голям обем на проучването в бъдеще е осезаема, за да се направят трайни заключения за неговата роля за рутинна употреба. Значителният процент резултати без дефинирана генетична находка от MLPA – 44,3%, е индикация за необходимост от оценка на повече генетични маркери в съответствие с настоящите препоръки. Особено значима е нуждата за пациентите с НК, без или с неуспешен цитогенетичен анализ, тъй като наличието на такива е трайна тенденция и от по-продължителни наши и чужди проучвания.

По отношение на перспективите ни за бъдеща работа, една от тях е свързана с фактора време. Тъй като нашето проучване бе сравнително кратко, би било удачно да се продължи оценката на MLPA с по-дълго проследяване на настоящия контингент и включване на повече пациенти. Удължаването на периода на проследяване би осигурило изчисляването на 5-годишна преживяемост. Също така, екипът ни ще може да оформи по-дефинитивно заключение за ползите от метод, даващ по-детайлна информация с по-кратко време за издаване на резултат в сравнение с КЦА. Паралелът с друг молекулярно-генетичен метод като NGS би дал полезна информация за ефективността на предложената от нас алтернатива, макар това да зависи основно от допълнителни финансови ресурси. Също така, успоредно изследване на различни източници на неопластично изменена генетична информация – венозна кръв и костен мозък, би осигурило възможност за съпоставка между качество и находки.

Що се отнася до контингента изследвани пациенти, смятаме за перспективно включването на деца, вземайки предвид описаните различия и особености на тази група. Удачно би било и включването на пациенти с МДС на фона на последните изменения в

класификациите на WHO, ICC и ELN и промяната в разбиранията за връзката с ОМЛ (3,24,124).

Не на последно място, най-перспективна в съвременната наука безспорно е колективната дейност. Особено информативни и ценени са данните от консорциуми, ангажирани с проучването на дадена група заболявания или на конкретно такова. Смятаме за изключително полезно обединяването на данните за България и бъдещо включване в консорциум за проучване и изясняване на генетичната етиология при пациенти с ОМЛ. Засега тези консорциуми твърде слабо репрезентират пациентите от източна Европа и интересът към работа и включване на тези страни е добре известен.

8. ИЗВОДИ

1. Сред селектираните пациенти с новодиагностицирана ОМЛ се отчете явен превес (над три четвърти – 78,7%) на тези без други предходни хематологични (вкл. малигнени) заболявания.
2. MLPA позволи откриване на моногенни и хромозомни изменение при повече от половината (55,7%) от пациентите, което допринесе за тяхното успешно класифициране и стратифициране на повечето от тях спрямо риск съгласно актуалните международни класификации.
3. Чрез използвания нов за нас метод се диагностицираха нови за практиката ни моногенни маркери (в гените *NPM1*, *IDH2*, *DNMT3A*), каквито бяха отчетени у една трета (34,4%) от всички изследвани пациенти.
4. Методът MLPA позволи допълнително разкриване на хромозомни изменения спрямо КЦА, като MLPA даде информация за находки, пропуснати от КЦА при една пета (18%) от всички изследвани.
5. При близо една трета (27,9%) от пациентите при конвенционалния цитогенетичен анализ бе открита патология без аналогичен резултат от молекулярно-генетичния метод.
6. Комбинацията от двата метода – цитогенетичен и молекулярно-генетичен, даде информация за мнозинството (78,7%) от нашите пациенти.

9. ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Приноси с оригинален характер

1. За първи път в нашата страна се извършва и представя систематизирана информация и анализ на резултати от приложение на метода MLPA с оценка на неговия принос в обслужването на новодиагностицирани пациенти с ОМЛ над 18-годишна възраст. Получените резултати са база за сравнителни проучвания на национално и международно ниво.
2. Настоящата работа е едно от малкото проспективни проучвания у нас, разглеждащи и сравняващи диагностична успеваемост на генетичните лабораторни методи – в случая КЦА и MLPA, по отношение на този контингент пациенти с извличане на изводи за рутинната клинично-диагностична практика.

Приноси с потвърдителен характер

1. Потвърдена е трайната роля на цитогенетичния метод като практичен и изпитан такъв в уточняването на значими бройни и големи структурни хромозомни маркери, включени в съвременните класификации и алгоритми за терапевтично поведение.
2. Потвърдена е необходимостта от надграждане приложението на конвенционална цитогенетика със съвременни високо-резолютивни молекулярно-генетични методи за възпрепятстване на чести проблеми при последната и уточняване на по-детайлни, включително моногенни соматични промени при тези пациенти.
3. Потвърдена е водещата роля на комбинацията от цитогенетичен и молекулярно-генетичен метод в лабораторната диагностика за разкриване на генетичната основа на заболяването при пациенти с ОМЛ.

Приноси с приложен характер

1. Въведен е метод за молекулярно-генетичен анализ - MLPA, за генетичен скрининг на пациенти с новодиагностицирана ОМЛ, успоредно с рутинно провеждания цитогенетичен анализ в рамките на дейността на Лабораторията по медицинска генетика, Варна.

2. Изведени са насоки с цел подобряване на генетичната оценка на контингента новодиагностицирани пациенти с ОМЛ, касаещи подбора на генетични лабораторни методи, биологичен материал и генетични маркери.

10. БИБЛИОГРАФИЯ

1. Vakiti A, Mewawalla P. Acute Myeloid Leukemia. StatPearls [Internet]. 2021 Aug 17 [cited 2022 Jul 12]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507875/>
2. Ferguson-Smith MA. History and evolution of cytogenetics. Mol Cytogenet [Internet]. 2015 Mar 20 [cited 2022 Jul 12];8(1):1–8. Available from: <https://molecularcytogenetics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13039-015-0125-8>
3. Döhner H, Wei AH, Appelbaum FR, Craddock C, DiNardo CD, Dombret H, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN. Blood. 2022 Sep 22;140(12):1345–77.
4. Wheeler FC, Kim AS, Mosse CA, Shaver AC, Yenamandra A, Seegmiller AC. Limited Utility of Fluorescence In Situ Hybridization for Recurrent Abnormalities in Acute Myeloid Leukemia at Diagnosis and Follow-up. Am J Clin Pathol [Internet]. 2018 Mar 29 [cited 2022 Jul 12];149(5):418–24. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29538617/>
5. Gonzales PR, Mikhail FM. Diagnostic and Prognostic Utility of Fluorescence In situ Hybridization (FISH) Analysis in Acute Myeloid Leukemia. Curr Hematol Malig Rep [Internet]. 2017 Dec 1 [cited 2022 Jul 12];12(6):568–73. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29064023/>
6. Sandhöfer N, Metzeler KH, Kakadia PM, Pasalic Z, Hiddemann W, Neusser M, et al. A fluorescence in situ hybridization-based screen allows rapid detection of adverse cytogenetic alterations in patients with acute myeloid leukemia. Genes Chromosomes Cancer [Internet]. 2017 Aug 1 [cited 2022 Jul 12];56(8):632–8. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/gcc.22466>
7. Bartlett JMS, Stirling D. A Short History of the Polymerase Chain Reaction. PCR Protocols [Internet]. 2003 Nov 15 [cited 2022 Jul 12];3–6. Available from: <https://link.springer.com/protocol/10.1385/1-59259-384-4:3>
8. Ommen HB. Monitoring minimal residual disease in acute myeloid leukaemia: a review of the current evolving strategies. Ther Adv Hematol [Internet]. 2016 Feb [cited 2022 Jul 12];7(1):3. Available from: <https://pmc/articles/PMC4713887/>
9. Establishment of a Multiplex PCR-Based Procedure for Detection of Most Common Mutations in NPM1, FLT3 in Acute Myeloid Leukemia Patients - PubMed [Internet]. [cited 2022 Oct 30]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29530994/>
10. Ahn JW, Mackie Ogilvie C, Welch A, Thomas H, Madula R, Hills A, et al. Detection of subtelomere imbalance using MLPA: Validation, development of an analysis protocol, and application in a diagnostic centre. BMC Med Genet [Internet]. 2007 Mar 5 [cited 2022 Jul 12];8(1):1–13. Available from: <https://bmcmmedgenet.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2350-8-9>
11. Payne AB, Bean CJ, Hooper WC, Miller CH. Utility of multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) for hemophilia mutation screening. J Thromb Haemost

- [Internet]. 2012 Sep [cited 2022 Jul 12];10(9):1951–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22759210/>
12. Alpár D, de Jong D, Savola S, Yigittop HA, Kajtár B, Kereskai L, et al. MLPA is a powerful tool for detecting lymphoblastic transformation in chronic myeloid leukemia and revealing the clonal origin of relapse in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet* [Internet]. 2012 Sep [cited 2022 Jul 12];205(9):465–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22939399/>
 13. Alhourani E, Rincic M, Othman MAK, Pohle B, Schlie C, Glaser A, et al. Comprehensive chronic lymphocytic leukemia diagnostics by combined multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA) and interphase fluorescence in situ hybridization (iFISH). *Mol Cytogenet* [Internet]. 2014 Nov 19 [cited 2022 Jul 12];7(1):1–9. Available from: <https://molecularcytogenetics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13039-014-0079-2>
 14. Kosztolányi S, Kiss R, Atanesyan L, Gángó A, de Groot K, Steenkamer M, et al. High-Throughput Copy Number Profiling by Digital Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification in Multiple Myeloma. *The Journal of Molecular Diagnostics*. 2018 Nov 1;20(6):777–88.
 15. Yu CH, Lin TK, Jou ST, Lin CY, Lin KH, Lu MY, et al. MLPA and DNA index improve the molecular diagnosis of childhood B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Scientific Reports* 2020 10:1 [Internet]. 2020 Jul 13 [cited 2022 Jul 12];10(1):1–11. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-020-68311-9>
 16. Heather JM, Chain B. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics* [Internet]. 2016 Jan 1 [cited 2022 Jul 12];107(1):1. Available from: </pmc/articles/PMC4727787/>
 17. Leisch M, Jansko B, Zaborsky N, Greil R, Pleyer L. Next Generation Sequencing in AML—On the Way to Becoming a New Standard for Treatment Initiation and/or Modulation? *Cancers (Basel)* [Internet]. 2019 Feb 1 [cited 2022 Jul 12];11(2). Available from: </pmc/articles/PMC6406956/>
 18. Levine RL, Valk PJM. Next-generation sequencing in the diagnosis and minimal residual disease assessment of acute myeloid leukemia. *Haematologica* [Internet]. 2019 Apr 30 [cited 2022 Jul 12];104(5):868–71. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30923100/>
 19. Pourrajab F, Zare-Khormizi MR, Hashemi AS, Hekmatimoghaddam S. <p>Genetic Characterization and Risk Stratification of Acute Myeloid Leukemia</p>. *Cancer Manag Res* [Internet]. 2020 Mar 25 [cited 2022 Jul 12];12:2231–53. Available from: <https://www.dovepress.com/genetic-characterization-and-risk-stratification-of-acute-myeloid-leuk-peer-reviewed-fulltext-article-CMAR>
 20. Ladines-Castro W, Barragán-Ibañez G, Luna-Pérez MA, Santoyo-Sánchez A, Collazo-Jaloma J, Mendoza-García E, et al. Morphology of leukaemias. *Revista Médica del Hospital General de México*. 2016 Apr 1;79(2):107–13.

21. Morphologic Classification and Clinical and Laboratory Correlates - Holland-Frei Cancer Medicine - NCBI Bookshelf [Internet]. [cited 2022 Jul 12]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK13452/>
22. Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* [Internet]. 2002 Oct 1 [cited 2022 Jul 12];100(7):2292–302. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/100/7/2292/106107/The-World-Health-Organization-WHO-classification>
23. Harrison's Principles of Internal Medicine, 20e | AccessMedicine | McGraw Hill Medical [Internet]. [cited 2022 Jul 12]. Available from: <https://accessmedicine.mhmedical.com/book.aspx?bookid=2129>
24. Khoury JD, Solary E, Abla O, Akkari Y, Alaggio R, Apperley JF, et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. *Leukemia* 2022 36:7 [Internet]. 2022 Jun 22 [cited 2022 Oct 22];36(7):1703–19. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41375-022-01613-1>
25. t(15;17)(q24;q21) PML/RARA. Available from: [https://atlasgeneticsoncology.org/haematological/1035/t\(15;17\)\(q24;q21\)-pml-rara](https://atlasgeneticsoncology.org/haematological/1035/t(15;17)(q24;q21)-pml-rara)
26. Liquori A, Ibañez M, Sargas C, Sanz MÁ, Barragán E, Cervera J. Acute Promyelocytic Leukemia: A Constellation of Molecular Events around a Single PML-RARA Fusion Gene. *Cancers* 2020, Vol 12, Page 624 [Internet]. 2020 Mar 8 [cited 2022 Jul 12];12(3):624. Available from: <https://www.mdpi.com/2072-6694/12/3/624/htm>
27. Labrador J, Luño E, Vellenga E, Brunet S, González-Campos J, Chillón MC, et al. Clinical significance of complex karyotype at diagnosis in pediatric and adult patients with de novo acute promyelocytic leukemia treated with ATRA and chemotherapy. <https://doi.org/10.1080/1042819420181522438> [Internet]. 2018 Apr 16 [cited 2022 Jul 12];60(5):1146–55. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10428194.2018.1522438>
28. Al-Harbi S, Aljurf M, Mohty M, Almohareb F, Ahmed SOA. An update on the molecular pathogenesis and potential therapeutic targeting of AML with t(8;21)(q22;q22.1);RUNX1-RUNX1T1. *Blood Adv* [Internet]. 2020 Jan 14 [cited 2022 Jul 12];4(1):229–38. Available from: <https://ashpublications.org/bloodadvances/article/4/1/229/430197/An-update-on-the-molecular-pathogenesis-and>
29. Pathology Outlines - AML with t(8;21)(q22;q22); RUNX1-RUNX1T1 [Internet]. [cited 2022 Jul 12]. Available from: <https://www.pathologyoutlines.com/topic/leukemiaAMLwitht821q22q22.html>
30. Hirsch P, Zhang Y, Tang R, Joulin V, Boutroux H, Pronier E, et al. Genetic hierarchy and temporal variegation in the clonal history of acute myeloid leukaemia. *Nature Communications* 2016 7:1 [Internet]. 2016 Aug 18 [cited 2022 Jul 12];7(1):1–13. Available from: <https://www.nature.com/articles/ncomms12475>
31. Zhou F, Liu Y, Rohde C, Pauli C, Gerloff D, Köhn M, et al. AML1-ETO requires enhanced C/D box snoRNA/RNP formation to induce self-renewal and leukaemia.

- Nature Cell Biology 2017 19:7 [Internet]. 2017 Jun 26 [cited 2022 Jul 12];19(7):844–55. Available from: <https://www.nature.com/articles/ncb3563>
32. Lv L, Yu J, Qi Z. Acute myeloid leukemia with inv(16)(p13.1q22) and deletion of the 5'MYH11/3'CBFB gene fusion: A report of two cases and literature review. Mol Cytogenet [Internet]. 2020 Jan 30 [cited 2022 Jul 12];13(1):1–6. Available from: <https://molecularcytogenetics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13039-020-0474-9>
 33. Gene Help: Integrated Access to Genes of Genomes in the Reference Sequence Collection - Gene Help - NCBI Bookshelf [Internet]. [cited 2022 Jul 12]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK3841/>
 34. Pathology Outlines - AML with inv(16)(p13.1;q22) or t(16;16)(p13.1;q22); *CBFB-MYH11* [Internet]. [cited 2022 Jul 12]. Available from: <https://www.pathologyoutlines.com/topic/leukemiainv16.html>
 35. Pathology Outlines - AML with t(6;9)(p23;q34); *DEK-NUP214* [Internet]. [cited 2022 Jul 12]. Available from: <https://www.pathologyoutlines.com/topic/leukemiaAMLt69.html>
 36. t(6;9)(p22;q34) DEK/NUP214 [Internet]. [cited 2022 Jul 12]. Available from: [https://atlasgeneticsoncology.org/haematological/1014/t\(6;9\)\(p22;q34\)](https://atlasgeneticsoncology.org/haematological/1014/t(6;9)(p22;q34))
 37. Sandahl JD, Coenen EA, Forestier E, Harbott J, Johansson B, Kerndrup G, et al. t(6;9)(p22;q34)/DEK-NUP214-rearranged pediatric myeloid leukemia: an international study of 62 patients. Haematologica [Internet]. 2014 May 1 [cited 2022 Jul 12];99(5):865–72. Available from: <https://haematologica.org/article/view/7031>
 38. Pathology Outlines - AML (megakaryoblastic) with t(1;22)(p13.3;q13.1); *RBM15-MKL1* [Internet]. [cited 2022 Jul 12]. Available from: <https://www.pathologyoutlines.com/topic/bonemarrowneoplasticAMLmegakaryoblastic.html>
 39. Marques-Piubelli ML, Cordeiro MG, Cristofani L, Barroso R de S, Paes VR, Castelli JB, et al. Acute megakaryoblastic leukemia with t(1;22)(p13.3;q13.1); RBM15-MKL1 mimicking hepatoblastoma in an infant: The role of karyotype in differential diagnosis. Pediatr Blood Cancer [Internet]. 2020 Mar 1 [cited 2022 Jul 12];67(3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31802626/>
 40. t(1;22)(p13;q13) RBM15/MKL1 [Internet]. [cited 2022 Jul 13]. Available from: [https://atlasgeneticsoncology.org/haematological/1005/t\(1;22\)\(p13;q13\)-rbm15-mkl1](https://atlasgeneticsoncology.org/haematological/1005/t(1;22)(p13;q13)-rbm15-mkl1)
 41. Takeuchi A, Kondo T, Tasaka T, Yamada S, Hirose T, Fukuda H, et al. Successful treatment with ABL tyrosine kinase inhibitor for patients with acute myeloid leukemia with BCR-ABL1. Leuk Res Rep. 2021;15:100233.
 42. Neuendorff NR, Hemmati P, Arnold R, Ihlow J, Dörken B, Müller-Tidow C, et al. BCR-ABL + acute myeloid leukemia: are we always dealing with a high-risk disease? Blood Adv. 2018 Jun 26;2(12):1409–11.
 43. t(9;11)(p21;q23) KMT2A/MLLT3 [Internet]. [cited 2022 Jul 12]. Available from: [https://atlasgeneticsoncology.org/haematological/1001/t\(9;11\)\(p21;q23\)](https://atlasgeneticsoncology.org/haematological/1001/t(9;11)(p21;q23))

44. Balgobind B v., van den Heuvel-Eibrink MM, de Menezes RX, Reinhardt D, Hollink IHI, Arentsen-Peters STJCM, et al. Evaluation of gene expression signatures predictive of cytogenetic and molecular subtypes of pediatric acute myeloid leukemia. *Haematologica* [Internet]. 2011 Feb [cited 2022 Nov 1];96(2):221–30. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20971820/>
45. Mueller D, García-Cuellar MP, Bach C, Buhl S, Maethner E, Slany RK. Misguided Transcriptional Elongation Causes Mixed Lineage Leukemia. *PLoS Biol* [Internet]. 2009 Nov [cited 2022 Jul 12];7(11):e1000249. Available from: <https://journals.plos.org/plosbiology/article?id=10.1371/journal.pbio.1000249>
46. Issa GC, Zarka J, Sasaki K, Qiao W, Pak D, Ning J, et al. Predictors of outcomes in adults with acute myeloid leukemia and *KMT2A* rearrangements. *Blood Cancer J*. 2021 Sep 29;11(9):162.
47. Yang W, Qin M, Jia C, Yang J, Chen W, Luo Y, et al. Pediatric acute myeloid leukemia patients with *KMT2A* rearrangements: a single-center retrospective study. *Hematology*. 2022 Dec 31;27(1):583–9.
48. Pathology Outlines - AML with *inv(3)(q21.3;q26.2)* or *t(3;3)(q21.3;q26.2)*; *GATA2*, *MECOM* [Internet]. [cited 2022 Nov 2]. Available from: <https://www.pathologyoutlines.com/topic/bonemarrowneoplasticAMLinv3q21q26.html>
49. Gong X, Yu T, Tang Q, Fu Y, Wu J, Zhu Y, et al. Unusual findings of acute myeloid leukemia with *inv(3)(q21q26.2)* or *t(3;3)(q21;q26.2)*: A multicenter study. *Int J Lab Hematol* [Internet]. 2019 Jun 1 [cited 2022 Jul 12];41(3):380–6. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/ijlh.12987>
50. *inv(3)(q21q26) RPN1/MECOM* [Internet]. [cited 2022 Jul 12]. Available from: [https://atlasgeneticsoncology.org/haematological/1623/inv\(3\)\(q21q26\)-rpn1-mecom](https://atlasgeneticsoncology.org/haematological/1623/inv(3)(q21q26)-rpn1-mecom)
51. Michmerhuizen NL, Klco JM, Mullighan CG. Mechanistic insights and potential therapeutic approaches for NUP98-rearranged hematologic malignancies. *Blood* [Internet]. 2020 Nov 12 [cited 2022 Nov 2];136(20):2275–89. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/136/20/2275/461761/Mechanistic-insights-and-potential-therapeutic>
52. Struski S, Lagarde S, Bories P, Puiseux C, Prade N, Cuccuini W, et al. NUP98 is rearranged in 3.8% of pediatric AML forming a clinical and molecular homogenous group with a poor prognosis. *Leukemia*. 2017 Mar 3;31(3):565–72.
53. Heath EM, Chan SM, Minden MD, Murphy T, Shlush LI, Schimmer AD. Biological and clinical consequences of NPM1 mutations in AML. *Leukemia* [Internet]. 2017 Apr 1 [cited 2022 Jul 13];31(4):798–807. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28111462/>
54. Box JK, Paquet N, Adams MN, Boucher D, Bolderson E, O’Byrne KJ, et al. Nucleophosmin: from structure and function to disease development. *BMC Molecular Biology* 2016 17:1 [Internet]. 2016 Aug 24 [cited 2022 Jul 13];17(1):1–12. Available from: <https://bmcmolbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12867-016-0073-9>

55. Kunchala P, Kuravi S, Jensen R, McGuirk J, Balusu R. When the good go bad: Mutant NPM1 in acute myeloid leukemia. *Blood Rev* [Internet]. 2018 May 1 [cited 2022 Jul 13];32(3):167–83. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29157973/>
56. Issa GC, Bidikian A, Venugopal S, Konopleva MY, DiNardo CD, Kadia TM, et al. Clinical outcomes associated with NPM1 mutations in patients with relapsed or refractory AML. *Blood Adv* [Internet]. 2022 Nov 4 [cited 2022 Nov 22]; Available from: <https://ashpublications.org/bloodadvances/article/doi/10.1182/bloodadvances.2022008316/486963/Clinical-outcomes-associated-with-NPM1-mutations>
57. Wilhelmson AS, Porse BT. CCAAT enhancer binding protein alpha (CEBPA) biallelic acute myeloid leukaemia: cooperating lesions, molecular mechanisms and clinical relevance. *Br J Haematol* [Internet]. 2020 Aug 1 [cited 2022 Jul 13];190(4):495–507. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32086816/>
58. Su L, Tan Y, Lin H, Liu X, Yu L, Yang Y, et al. Mutational spectrum of acute myeloid leukemia patients with double CEBPA mutations based on next-generation sequencing and its prognostic significance. *Oncotarget* [Internet]. 2018 May 18 [cited 2022 Jul 13];9(38):24970–9. Available from: <https://www.oncotarget.com/article/23873/text/>
59. CEBPA (CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha) [Internet]. [cited 2022 Jul 13]. Available from: <https://atlasgeneticsoncology.org/gene/40050/cebpa>
60. Konstandin NP, Pastore F, Herold T, Dufour A, Rothenberg-Thurley M, Hinrichsen T, et al. Genetic heterogeneity of cytogenetically normal AML with mutations of CEBPA. *Blood Adv* [Internet]. 2018 Oct 23 [cited 2022 Jul 13];2(20):2724–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30337300/>
61. Mannelli F, Ponziani V, Bencini S, Bonetti MI, Benelli M, Cutini I, et al. CEBPA-double-mutated acute myeloid leukemia displays a unique phenotypic profile: a reliable screening method and insight into biological features. *Haematologica* [Internet]. 2017 Feb 28 [cited 2022 Jul 13];102(3):529–40. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28250006/>
62. Koenig KL, Sahasrabudhe KD, Sigmund AM, Bhatnagar B. AML with Myelodysplasia-Related Changes: Development, Challenges, and Treatment Advances. *Genes (Basel)* [Internet]. 2020 Aug 1 [cited 2022 Jul 13];11(8):1–13. Available from: [/pmc/articles/PMC7464320/](https://pmc/articles/PMC7464320/)
63. Arber DA, Erba HP. Diagnosis and Treatment of Patients With Acute Myeloid Leukemia With Myelodysplasia-Related Changes (AML-MRC). *Am J Clin Pathol* [Internet]. 2020 Nov 4 [cited 2022 Jul 13];154(6):731–41. Available from: <https://academic.oup.com/ajcp/article/154/6/731/5899448>
64. Baer C, Walter W, Stengel A, Hutter S, Meggendorfer M, Kern W, et al. Molecular Classification of AML-MRC Reveals a Distinct Profile and Identifies MRC-like Patients with Poor Overall Survival. *Blood* [Internet]. 2019 Nov 13 [cited 2022 Jul 13];134(Supplement_1):2735–2735. Available from: https://ashpublications.org/blood/article/134/Supplement_1/2735/423254/Molecular-Classification-of-AML-MRC-Reveals-a

65. Prats-Martín C, Burillo-Sanz S, Morales-Camacho RM, Pérez-López O, Suito M, Vargas MT, et al. ASXL1 mutation as a surrogate marker in acute myeloid leukemia with myelodysplasia-related changes and normal karyotype. *Cancer Med* [Internet]. 2020 Jun 1 [cited 2022 Jul 13];9(11):3637–46. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/cam4.2947>
66. Acute myeloid leukemia with myelodysplasia related changes [Internet]. [cited 2022 Jul 13]. Available from: <https://atlasgeneticsoncology.org/haematological/2041/acute-myeloid-leukemia-with-myelodysplasia-related-changes>
67. Chen J, Kao YR, Sun D, Todorova TI, Reynolds D, Narayanagari SR, et al. Publisher Correction: Myelodysplastic syndrome progression to acute myeloid leukemia at the stem cell level. *Nat Med* [Internet]. 2019 Mar 1 [cited 2022 Jul 13];25(3):529. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30568307/>
68. Asada S, Kitamura T. Aberrant histone modifications induced by mutant ASXL1 in myeloid neoplasms. *Int J Hematol* [Internet]. 2019 Aug 5 [cited 2022 Jul 13];110(2):179–86. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12185-018-2563-7>
69. Fujino T, Kitamura T. ASXL1 mutation in clonal hematopoiesis. *Exp Hematol* [Internet]. 2020 Mar 1 [cited 2022 Jul 13];83:74–84. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31945396/>
70. Lin Y, Wang Y, Zheng Y, Wang Z, Wang Y, Wang S. Clinical characteristics and prognostic study of adult acute myeloid leukemia patients with ASXL1 mutations. *Hematology (United Kingdom)* [Internet]. 2020 [cited 2022 Jul 13];25(1):446–56. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/16078454.2020.1847801>
71. Terada K, Yamaguchi H, Ueki T, Usuki K, Kobayashi Y, Tajika K, et al. Usefulness of *BCOR* gene mutation as a prognostic factor in acute myeloid leukemia with intermediate cytogenetic prognosis. *Genes Chromosomes Cancer*. 2018 Aug;57(8):401–8.
72. Schaefer EJ, Wang HC, Karp HQ, Meyer CA, Cejas P, Gearhart MD, et al. *BCOR* and *BCORL1* Mutations Drive Epigenetic Reprogramming and Oncogenic Signaling by Unlinking PRC1.1 from Target Genes. *Blood Cancer Discov*. 2022 Mar 1;3(2):116–35.
73. Zhang A, Liu Y, Wei S, Gong B, Zhou C, Wang Y, et al. *BCOR* Mutations in Acute Myeloid Leukemia: Clonal Evolution and Prognosis. *Blood*. 2020 Nov 5;136(Supplement 1):4–4.
74. TET2 (tet methylcytosine dioxygenase 2) [Internet]. [cited 2022 Nov 13]. Available from: [https://atlasgeneticsoncology.org/gene/40597/tet2-\(tet-methylcytosine-dioxygenase-2\)](https://atlasgeneticsoncology.org/gene/40597/tet2-(tet-methylcytosine-dioxygenase-2))
75. Wang J, He N, Wang R, Tian T, Han F, Zhong C, et al. Analysis of TET2 and EZH2 gene functions in chromosome instability in acute myeloid leukemia. *Scientific Reports* 2020 10:1 [Internet]. 2020 Feb 17 [cited 2022 Jul 13];10(1):1–11. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-020-59365-w>

76. Rinke J, Chase A, Cross NCP, Hochhaus A, Ernst T. EZH2 in Myeloid Malignancies. *Cells* [Internet]. 2020 Jul 8 [cited 2022 Jul 13];9(7). Available from: [/pmc/articles/PMC7407223/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/347407223/)
77. Wang R, Gao X, Yu L. The prognostic impact of tet oncogene family member 2 mutations in patients with acute myeloid leukemia: A systematic-review and meta-analysis. *BMC Cancer* [Internet]. 2019 Apr 25 [cited 2022 Jul 13];19(1):1–11. Available from: <https://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12885-019-5602-8>
78. Stasik S, Middeke JM, Kramer M, Röllig C, Krämer A, Scholl S, et al. EZH2 mutations and impact on clinical outcome: an analysis in 1,604 patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia. *Haematologica* [Internet]. 2020 May 1 [cited 2022 Jul 13];105(5):e228–31. Available from: <https://haematologica.org/article/view/9408>
79. Bergaggio E, Piva R. Wild-Type IDH Enzymes as Actionable Targets for Cancer Therapy. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2019 Apr 1 [cited 2022 Jul 13];11(4). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31010244/>
80. ElNahass YH, Badawy RH, ElRefaey FA, Nooh HA, Ibrahim D, Nader HA, et al. IDH Mutations in AML Patients; A higher Association with Intermediate Risk Cytogenetics. *Asian Pac J Cancer Prev* [Internet]. 2020 Mar 1 [cited 2022 Jul 13];21(3):721–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32212799/>
81. Study Offers Insights on Prognostic Significance of IDH Mutations Across Age Groups in AML. *Oncologist* [Internet]. 2021 Feb 1 [cited 2022 Jul 13];26 Suppl 1(Suppl 1):S13–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33368799/>
82. Lachowicz CA, Reville PK, Kantarjian H, Jabbour E, Borthakur G, Daver N, et al. Contemporary outcomes in *IDH*-mutated acute myeloid leukemia: The impact of co-occurring *NPM1* mutations and venetoclax-based treatment. *Am J Hematol*. 2022 Nov 15;97(11):1443–52.
83. van der Werf I, Wojtuszkiewicz A, Meggendorfer M, Hutter S, Baer C, Heymans M, et al. Splicing factor gene mutations in acute myeloid leukemia offer additive value if incorporated in current risk classification. *Blood Adv*. 2021 Sep 14;5(17):3254–65.
84. Bamopoulos SA, Batcha AMN, Jurinovic V, Rothenberg-Thurley M, Janke H, Ksienzyk B, et al. Clinical presentation and differential splicing of SRSF2, U2AF1 and SF3B1 mutations in patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2020 34:10 [Internet]. 2020 May 1 [cited 2022 Nov 13];34(10):2621–34. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41375-020-0839-4>
85. Heimbruch KE, Meyer AE, Agrawal P, Viny AD, Rao S. A cohesive look at leukemogenesis: The cohesin complex and other driving mutations in AML. *Neoplasia*. 2021 Mar;23(3):337–47.
86. Viny AD, Levine RL. Cohesin mutations in myeloid malignancies made simple. *Curr Opin Hematol*. 2018 Mar;25(2):61–6.
87. Han C, Gao X, Li Y, Zhang J, Yang E, Zhang L, et al. Characteristics of Cohesin Mutation in Acute Myeloid Leukemia and Its Clinical Significance. *Front Oncol*. 2021 Apr 13;11.

88. West RR, Calvo KR, Embree LJ, Wang W, Tuschong LM, Bauer TR, et al. *ASXL1* and *STAG2* are common mutations in GATA2 deficiency patients with bone marrow disease and myelodysplastic syndrome. *Blood Adv.* 2022 Feb 8;6(3):793–807.
89. Kennedy VE, Smith CC. FLT3 Mutations in Acute Myeloid Leukemia: Key Concepts and Emerging Controversies. *Front Oncol* [Internet]. 2020 Dec 23 [cited 2022 Jul 13];10. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33425766/>
90. FLT3 (FMS-like tyrosine kinase 3) [Internet]. [cited 2022 Jul 13]. Available from: [https://atlasgeneticsoncology.org/gene/144/flt3-\(fms-like-tyrosine-kinase-3\)](https://atlasgeneticsoncology.org/gene/144/flt3-(fms-like-tyrosine-kinase-3))
91. Kiyoi H, Kawashima N, Ishikawa Y. FLT3 mutations in acute myeloid leukemia: Therapeutic paradigm beyond inhibitor development. *Cancer Sci* [Internet]. 2020 Feb 1 [cited 2022 Jul 13];111(2):312–22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31821677/>
92. Carbonell D, Chicano M, Cardero AJ, Gómez-Centurión I, Bailén R, Oarbeascoa G, et al. FLT3-ITD Expression as a Potential Biomarker for the Assessment of Treatment Response in Patients with Acute Myeloid Leukemia. *Cancers (Basel)*. 2022 Aug 19;14(16):4006.
93. Song MK, Park BB, Uhm JE. Clinical Efficacies of FLT3 Inhibitors in Patients with Acute Myeloid Leukemia. *International Journal of Molecular Sciences* 2022, Vol 23, Page 12708 [Internet]. 2022 Oct 21 [cited 2022 Nov 17];23(20):12708. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/20/12708/htm>
94. Sood R, Kamikubo Y, Liu P. Role of RUNX1 in hematological malignancies. *Blood* [Internet]. 2017 Apr 13 [cited 2022 Jul 13];129(15):2070–82. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28179279/>
95. Yokota A, Huo L, Lan F, Wu J, Huang G. The Clinical, Molecular, and Mechanistic Basis of RUNX1 Mutations Identified in Hematological Malignancies. *Mol Cells* [Internet]. 2020 Feb 29 [cited 2022 Jul 13];43(2):145–52. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31964134/>
96. Mill CP, Fiskus W, DiNardo CD, Birdwell C, Davis JA, Kadia TM, et al. Effective therapy for AML with RUNX1 mutation by cotreatment with inhibitors of protein translation and BCL2. *Blood* [Internet]. 2022 Feb 10 [cited 2022 Nov 17];139(6):907–21. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/139/6/907/477139/Effective-therapy-for-AML-with-RUNX1-mutation-by>
97. DNMT3A (DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 alpha) [Internet]. [cited 2022 Jul 13]. Available from: [https://atlasgeneticsoncology.org/gene/40349/dnmt3a-\(dna-\(cytosine-5-\)-methyltransferase-3-alpha\)](https://atlasgeneticsoncology.org/gene/40349/dnmt3a-(dna-(cytosine-5-)-methyltransferase-3-alpha))
98. Park DJ, Kwon A, Cho BS, Kim HJ, Hwang KA, Kim M, et al. Characteristics of DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *Blood Res* [Internet]. 2020 Mar 1 [cited 2022 Jul 13];55(1):17. Available from: [/pmc/articles/PMC7106122/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33425766/)
99. Yuan XQ, Chen P, Du YX, Zhu KW, Zhang DY, Yan H, et al. Influence of DNMT3A R882 mutations on AML prognosis determined by the allele ratio in Chinese patients.

- J Transl Med [Internet]. 2019 Jul 10 [cited 2022 Jul 13];17(1):1–10. Available from: <https://translational-medicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12967-019-1959-3>
100. Sandoval JE, Huang YH, Muise A, Goodell MA, Reich NO. Mutations in the DNMT3A DNA methyltransferase in acute myeloid leukemia patients cause both loss and gain of function and differential regulation by protein partners. J Biol Chem [Internet]. 2019 Mar 29 [cited 2022 Jul 13];294(13):4898–910. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30705090/>
 101. Ahn JS, Kim HJ, Kim YK, Lee SS, Jung SH, Yang DH, et al. DNMT3A R882 Mutation with FLT3-ITD Positivity Is an Extremely Poor Prognostic Factor in Patients with Normal-Karyotype Acute Myeloid Leukemia after Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. Biol Blood Marrow Transplant [Internet]. 2016 Jan 1 [cited 2022 Jul 13];22(1):61–70. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26234722/>
 102. Chu X, Zhong L, Dan W, Wang X, Zhang Z, Liu Z, et al. DNMT3A R882H mutation drives daunorubicin resistance in acute myeloid leukemia via regulating NRF2/NQO1 pathway. Cell Communication and Signaling [Internet]. 2022 Dec 1 [cited 2022 Nov 25];20(1):1–14. Available from: <https://biosignaling.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12964-022-00978-1>
 103. BAALC | Cancer Genetics Web [Internet]. [cited 2022 Jul 13]. Available from: <https://www.cancer-genetics.org/BAALC.htm>
 104. XIAO SJ, SHEN JZ, HUANG JL, FU HY. Prognostic significance of the BAALC gene expression in adult patients with acute myeloid leukemia: A meta-analysis. Mol Clin Oncol [Internet]. 2015 Jul [cited 2022 Jul 13];3(4):880–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26171200/>
 105. Aleksov E, Spasov B, Balatsenko G. ЗНАЧЕНИЕТО НА ВААЛС ГЕНА ПРИ РАЗВИТИЕТО НА НЕОПЛАСТИЧНИТЕ ЗАБОЛЯВАНИЯ НА МИЕЛОИДНАТА РЕДИЦА, Алексов Е., Спасов Б., Балащенко Г. IMPORTANCE OF BAALC GENE IN THE DEVELOPMENT OF NEOPLASTIC DISEASES OF MYELOID CELLS. 32(6).
 106. WT1 Gene - GeneCards | WT1 Protein | WT1 Antibody [Internet]. [cited 2022 Jul 13]. Available from: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=WT1>
 107. Rampal R, Figueroa ME. Wilms tumor 1 mutations in the pathogenesis of acute myeloid leukemia. Haematologica [Internet]. 2016 May 31 [cited 2022 Jul 13];101(6):672. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26171200/>
 108. Wang Y, Weng WJ, Zhou DH, Fang JP, Mishra S, Chai L, et al. Wilms Tumor 1 Mutations Are Independent Poor Prognostic Factors in Pediatric Acute Myeloid Leukemia. Front Oncol [Internet]. 2021 Apr 21 [cited 2022 Jul 13];11. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33968731/>
 109. Zhou JD, Yao DM, Li XX, Zhang TJ, Zhang W, Ma JC, et al. KRAS overexpression independent of RAS mutations confers an adverse prognosis in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. Oncotarget. 2017 Sep 12;8(39):66087–97.
 110. Wang S, Wu Z, Li T, Li Y, Wang W, Hao Q, et al. Mutational spectrum and prognosis in NRAS-mutated acute myeloid leukemia. Scientific Reports 2020 10:1 [Internet].

- 2020 Jul 22 [cited 2022 Nov 19];10(1):1–9. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-020-69194-6>
111. Ball BJ, Hsu M, Devlin SM, Famulare C, Cai SF, Dunbar A, et al. RAS Mutations Are Independently Associated with Decreased Overall Survival and Event-Free Survival in Patients with AML Receiving Induction Chemotherapy. *Blood* [Internet]. 2019 Nov 13 [cited 2022 Nov 19];134(Supplement_1):18–18. Available from: https://ashpublications.org/blood/article/134/Supplement_1/18/427843/RAS-Mutations-Are-Independently-Associated-with
 112. Akram AM, Chaudhary A, Kausar H, Althobaiti F, Abbas AS, Hussain Z, et al. Analysis of RAS gene mutations in cytogenetically normal de novo acute myeloid leukemia patients reveals some novel alterations. *Saudi J Biol Sci*. 2021 Jul;28(7):3735–40.
 113. Molica M, Mazzone C, Niscola P, de Fabritiis P. TP53 Mutations in Acute Myeloid Leukemia: Still a Daunting Challenge? *Front Oncol*. 2021 Feb 8;10.
 114. Granowicz EM, Jonas BA. Targeting TP53-Mutated Acute Myeloid Leukemia: Research and Clinical Developments. *Onco Targets Ther*. 2022 Apr;Volume 15:423–36.
 115. van Vlierberghe P, Patel J, Abdel-Wahab O, Lobry C, Hedvat C v, Balbin M, et al. PHF6 mutations in adult acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2011 Jan 29;25(1):130–4.
 116. Jalnapurkar SS, Pawar A, Somers P, Ochoco G, George SS, Pimkin M, et al. PHF6 Restricts AML Acceleration By Promoting Myeloid Differentiation Genes in Leukemic Cells. *Blood*. 2020 Nov 5;136(Supplement 1):42–3.
 117. Kurzer JH, Weinberg OK. PHF6 Mutations in Hematologic Malignancies. *Front Oncol*. 2021;11:704471.
 118. Tsai H i, Wu Y, Huang R, Su D, Wu Y, Liu X, et al. PHF6 functions as a tumor suppressor by recruiting methyltransferase SUV39H1 to nucleolar region and offers a novel therapeutic target for PHF6-mutant leukemia. *Acta Pharm Sin B*. 2022 Apr;12(4):1913–27.
 119. Shafik NF, Ibraheem D, Selim MM, Allam RM, Fathalla LA. The Prognostic Significance of c-KIT Mutations in Core Binding Factor Acute Myeloid Leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2022 Jun;22(6):e363–75.
 120. Ishikawa Y, Kawashima N, Atsuta Y, Sugiura I, Sawa M, Dobashi N, et al. Prospective evaluation of prognostic impact of KIT mutations on acute myeloid leukemia with RUNX1-RUNX1T1 and CBFβ-MYH11. *Blood Adv*. 2020 Jan 14;4(1):66–75.
 121. Qin YZ, Zhu HH, Jiang Q, Xu LP, Jiang H, Wang Y, et al. Heterogeneous prognosis among KIT mutation types in adult acute myeloid leukemia patients with t(8;21). *Blood Cancer J*. 2018 Aug 7;8(8):76.
 122. Heo SK, Noh EK, Kim JY, Jeong YK, Jo JC, Choi Y, et al. Targeting c-KIT (CD117) by dasatinib and radotinib promotes acute myeloid leukemia cell death. *Sci Rep*. 2017 Dec 10;7(1):15278.

123. Katagiri S, Chi S, Minami Y, Fukushima K, Shibayama H, Hosono N, et al. Mutated KIT Tyrosine Kinase as a Novel Molecular Target in Acute Myeloid Leukemia. *Int J Mol Sci*. 2022 Apr 23;23(9):4694.
124. Arber DA, Orazi A, Hasserjian RP, Borowitz MJ, Calvo KR, Kvasnicka HM, et al. International Consensus Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemias: integrating morphologic, clinical, and genomic data. *Blood*. 2022 Sep 15;140(11):1200–28.
125. Demir D. Insights into the New Molecular Updates in Acute Myeloid Leukemia Pathogenesis. *Genes (Basel)*. 2023 Jul 10;14(7):1424.
126. Elgarten CW, Aplenc R. Pediatric acute myeloid leukemia: updates on biology, risk stratification, and therapy. *Curr Opin Pediatr* [Internet]. 2020 Feb 1 [cited 2022 Jul 13];32(1):57–66. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31815781/>
127. Conneely SE, Stevens AM. Acute Myeloid Leukemia in Children: Emerging Paradigms in Genetics and New Approaches to Therapy. *Curr Oncol Rep* [Internet]. 2021 Jan 13 [cited 2022 Jul 13];23(2):16. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33439382/>
128. del(5q) in myeloid neoplasms [Internet]. [cited 2022 Jul 13]. Available from: [https://atlasgeneticsoncology.org/haematological/1092/del\(5q\)-in-myeloid-neoplasms](https://atlasgeneticsoncology.org/haematological/1092/del(5q)-in-myeloid-neoplasms)
129. Douet-Guilbert N, de Braekeleer E, Basinko A, Herry A, Gueganic N, Bovo C, et al. Molecular characterization of deletions of the long arm of chromosome 5 (del(5q)) in 94 MDS/AML patients. *Leukemia* 2012 26:7 [Internet]. 2012 Jan 17 [cited 2022 Jul 13];26(7):1695–7. Available from: <https://www.nature.com/articles/leu20129>
130. Zhang R, Kim YM, Wang X, Li Y, Lu X, Sternenberger AR, et al. Genomic Copy Number Variations in the Myelodys-plastic Syndrome and Acute Myeloid Leukemia Patients with del(5q) and/or-7/del(7q). *Int J Med Sci* [Internet]. 2015 [cited 2022 Jul 13];12. Available from: <http://www.medsci.org>
131. Wang L, Luo J, Nian Q, Xiao Q, Yang Z, Liu L. Ribosomal protein S14 silencing inhibits growth of acute myeloid leukemia transformed from myelodysplastic syndromes via activating p53. *Hematology* [Internet]. 2014 [cited 2022 Jul 13];19(4):225–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24074450/>
132. Grimwade D, Hills RK, Moorman A v., Walker H, Chatters S, Goldstone AH, 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* [Internet]. 2010 Jul 22 [cited 2022 Jul 13];116(3):354–65. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20385793/>
133. Eisfeld AK, Kohlschmidt J, Mrózek K, Volinia S, Blachly JS, Nicolet D, et al. Mutational Landscape and Gene Expression Patterns in Adult Acute Myeloid Leukemias with Monosomy 7 as a Sole Abnormality. *Cancer Res* [Internet]. 2017 Jan 1 [cited 2022 Jul 13];77(1):207–18. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27784745/>

134. Breem DA, Löwenberg B. Acute myeloid leukemia with monosomal karyotype at the far end of the unfavorable prognostic spectrum. *Haematologica* [Internet]. 2011 Apr [cited 2022 Jul 13];96(4):491–3. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21454879/>
135. Poiré X, Labopin M, Polge E, Volin L, Finke J, Ganser A, et al. The impact of concomitant cytogenetic abnormalities on acute myeloid leukemia with monosomy 7 or deletion 7q after HLA-matched allogeneic stem cell transplantation. *Am J Hematol* [Internet]. 2020 Mar 1 [cited 2022 Jul 13];95(3):282–94. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ajh.25714>
136. Ezekwudo DE, Gbadosi B, Blankenship L, Bastola S, Gaikazian S, Zakalik D, et al. Prognostic Significance of Monosomy 7 with and without Complex Karyotypes in Acute Myeloid Leukemia (AML): A Single Institutional Analysis. *Blood* [Internet]. 2017 Dec 7 [cited 2022 Jul 13];130(Supplement 1):5104–5104. Available from: https://ashpublications.org/blood/article/130/Supplement_1/5104/81074/Prognostic-Significance-of-Monosomy-7-with-and
137. Mori J, Yanada M, Uchida N, Fukuda T, Sakura T, Hidaka M, et al. Outcomes of Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation in Acute Myeloid Leukemia Patients with Abnormalities of the Short Arm of Chromosome 17. *Biol Blood Marrow Transplant* [Internet]. 2017 Aug 1 [cited 2022 Jul 13];23(8):1398–404. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28455005/>
138. Poiré X, Labopin M, Maertens J, Yakoub-Agha I, Blaise D, Ifrah N, et al. Allogeneic stem cell transplantation in adult patients with acute myeloid leukaemia and 17p abnormalities in first complete remission: a study from the Acute Leukemia Working Party (ALWP) of the European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *J Hematol Oncol* [Internet]. 2017 Jan 18 [cited 2022 Jul 13];10(1):1–10. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28100265/>
139. Seifert H, Mohr B, Thiede C, Oelschlägel U, Schäkel U, Illmer T, et al. The prognostic impact of 17p (p53) deletion in 2272 adults with acute myeloid leukemia. *Leukemia* [Internet]. 2009 [cited 2022 Jul 13];23(4):656–63. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19151774/>
140. Pogosova-Agadjanyan EL, Moseley A, Othus M, Appelbaum FR, Chauncey TR, Chen IML, et al. AML risk stratification models utilizing ELN-2017 guidelines and additional prognostic factors: A SWOG report. *Biomark Res* [Internet]. 2020 Aug 12 [cited 2022 Jul 12];8(1):1–13. Available from: <https://biomarkerres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40364-020-00208-1>
141. Strimbu K, Tavel JA. What are biomarkers? *Curr Opin HIV AIDS*. 2010 Nov;5(6):463–6.
142. Nair M, Sandhu SS, Sharma AK. Cancer molecular markers: A guide to cancer detection and management. *Semin Cancer Biol*. 2018 Oct 1;52:39–55.
143. Verma M. Personalized Medicine and Cancer. *J Pers Med* [Internet]. 2012 [cited 2022 Jul 13];2(1):1. Available from: [/pmc/articles/PMC4251363/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21454879/)

144. Yohe S. Molecular Genetic Markers in Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Med* [Internet]. 2015 Mar 12 [cited 2022 Jul 13];4(3):460. Available from: [/pmc/articles/PMC4470139/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28066929/)
145. Weinberg OK, Sohani AR, Bhargava P, Nardi V. Diagnostic work-up of acute myeloid leukemia. *Am J Hematol* [Internet]. 2017 Mar 1 [cited 2022 Jul 13];92(3):317–21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28066929/>
146. M N, SS S, AK S. Prognostic and Predictive Biomarkers in Cancer. *Curr Cancer Drug Targets* [Internet]. 2014 Dec [cited 2022 Jul 14];14(5):331–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24807144/>
147. Ibáñez M, Such E, Onecha E, Gómez-Seguí I, Liquori A, Sellés J, et al. Analysis of SNP Array Abnormalities in Patients with DE NOVO Acute Myeloid Leukemia with Normal Karyotype. *Scientific Reports* 2020 10:1 [Internet]. 2020 Apr 3 [cited 2022 Jul 14];10(1):1–12. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-020-61589-9>
148. Berry NK, Scott RJ, Rowlings P, Enjeti AK. Clinical use of SNP-microarrays for the detection of genome-wide changes in haematological malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol* [Internet]. 2019 Oct 1 [cited 2022 Aug 30];142:58–67. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31377433/>
149. The Cost of Sequencing a Human Genome [Internet]. [cited 2022 Jul 14]. Available from: <https://www.genome.gov/about-genomics/fact-sheets/Sequencing-Human-Genome-cost>
150. Jaiswal S, Natarajan P, Silver AJ, Gibson CJ, Bick AG, Shvartz E, et al. Clonal Hematopoiesis and Risk of Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *N Engl J Med* [Internet]. 2017 Jul 13 [cited 2022 Jul 14];377(2):111–21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28636844/>
151. Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, Gaidzik VI, Paschka P, Roberts ND, et al. Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med* [Internet]. 2016 Jun 9 [cited 2022 Jul 14];374(23):2209–21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27276561/>
152. Arteche-López A, Ávila-Fernández A, Romero R, Riveiro-Álvarez R, López-Martínez MA, Giménez-Pardo A, et al. Sanger sequencing is no longer always necessary based on a single-center validation of 1109 NGS variants in 825 clinical exomes. *Scientific Reports* 2021 11:1 [Internet]. 2021 Mar 11 [cited 2022 Jul 14];11(1):1–7. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-021-85182-w>
153. Gauthier MG. Simulation of polymer translocation through small channels A Molecular Dynamics study and a new Monte Carlo approach. 2007;
154. The Biotechnology Revolution: PCR and Cloning Expressed Genes | Learn Science at Scitable [Internet]. [cited 2022 Jul 14]. Available from: <https://www.nature.com/scitable/topicpage/the-biotechnology-revolution-pcr-and-the-use-553/>
155. Guo Y, Sun H, Zhang D, Zhao Y, Shi M, Yang M, et al. Development of a highly sensitive method for detection of FLT3D835Y. *Biomark Res* [Internet]. 2020 Aug 12

- [cited 2022 Jul 14];8(1):1–8. Available from: <https://biomarkerres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40364-020-00210-7>
156. Gorniak P, Ejduk A, Borg K, Makuch-Lasica H, Nowak G, Lech-Maranda E, et al. Comparison of high-resolution melting analysis with direct sequencing for the detection of recurrent mutations in DNA methyltransferase 3A and isocitrate dehydrogenase 1 and 2 genes in acute myeloid leukemia patients. *Eur J Haematol* [Internet]. 2016 Feb 1 [cited 2022 Jul 14];96(2):181–7. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/ejh.12566>
 157. Kumar D, Mehta A, Panigrahi MK, Nath S, Saikia KK. NPM1 Mutation Analysis in Acute Myeloid Leukemia: Comparison of Three Techniques - Sanger Sequencing, Pyrosequencing, and Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Turk J Haematol* [Internet]. 2018 [cited 2022 Jul 14];35(1):49–53. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29129825/>
 158. Huijsmans CJJ, Poodt J, Damen J, van der Linden JC, Savelkoul PHM, Pruijt JFM, et al. Single nucleotide polymorphism (SNP)-based loss of heterozygosity (LOH) testing by real time PCR in patients suspect of myeloproliferative disease. *PLoS One* [Internet]. 2012 Jul 2 [cited 2022 Jul 14];7(7). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22768290/>
 159. Garibyan L, Avashia N. Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR). *J Invest Dermatol* [Internet]. 2013 [cited 2022 Jul 14];133(3):e6. Available from: </pmc/articles/PMC4102308/>
 160. Hömig-Hölzel C, Savola S. Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) in tumor diagnostics and prognostics. *Diagn Mol Pathol* [Internet]. 2012 Dec [cited 2022 Jul 14];21(4):189–206. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23111197/>
 161. Rack KA, van den Berg E, Haferlach C, Beverloo HB, Costa D, Espinet B, et al. European recommendations and quality assurance for cytogenomic analysis of haematological neoplasms. *Leukemia* 2019 33:8 [Internet]. 2019 Jan 29 [cited 2022 Aug 30];33(8):1851–67. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41375-019-0378-z>
 162. Shimony S, Stahl M, Stone RM. Acute myeloid leukemia: 2023 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol*. 2023 Mar 13;98(3):502–26.
 163. Hou HA, Lin CC, Chou WC, Liu CY, Chen CY, Tang JL, et al. Integration of cytogenetic and molecular alterations in risk stratification of 318 patients with de novo non-M3 acute myeloid leukemia. *Leukemia* [Internet]. 2014 [cited 2022 Jul 14];28(1):50–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23929217/>
 164. WMA Declaration of Helsinki – Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects – WMA – The World Medical Association [Internet]. [cited 2022 Jul 14]. Available from: <https://www.wma.net/policies-post/wma-declaration-of-helsinki-ethical-principles-for-medical-research-involving-human-subjects/>
 165. What control samples should be included in (digital)MLPA experiments? - Help Centre / MLPA / Experimental Setup - MRC Holland Support [Internet]. [cited 2022 Jul 14].

Available from: <https://support.mrcholland.com/kb/articles/what-control-samples-should-be-included-in-digital-mlpa-experiments>

166. Hoermann G, Greiner G, Griesmacher A, Valent P. Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential: A Multidisciplinary Challenge in Personalized Hematology. *J Pers Med* [Internet]. 2020 Sep 1 [cited 2022 Jul 14];10(3):1–12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32825226/>
167. Rasmussen HB. Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of PCR-Amplified Fragments (PCR-RFLP) and Gel Electrophoresis-Valuable Tool for Genotyping and Genetic Fingerprinting. In. Available from: www.intechopen.com
168. Machin D, Cheung Y, Parmar M. Survival Curves. In: *Survival Analysis*. 2nd ed. Wiley; 2006. p. 23–49.
169. Герчева Л, Желязкова А, Геров Вл, Върбанов Х, Рачев Р, Мичева И, et al. РЕТРОСПЕКТИВЕН АНАЛИЗ НА ТЕРАПЕВТИЧНИТЕ РЕЗУЛТАТИ ПРИ ПАЦИЕНТИ С ОСТРА МИЕЛОИДНА ЛЕВКЕМИЯ В КЛИНИКА ПО ХЕМАТОЛОГИЯ – ВАРНА. *Клин трансфуз хематол*. 2010;46(1):63–8.
170. Appelbaum FR, Gundacker H, Head DR, Slovak ML, Willman CL, Godwin JE, et al. Age and acute myeloid leukemia. *Blood*. 2006 May 1;107(9):3481–5.
171. Шемелекова Л, Зюмбюлева М, Василева Цв, Попова Д, Балащенко Г, Велизарова М, et al. РЕЗУЛТАТИ ОТ ЛЕЧЕНИЕТО НА ПАЦИЕНТИ НАД 60 ГОД. С ОСТРИ МИЕЛОИДНИ ЛЕВКЕМИИ В КЛИНИКАТА ПО ХЕМАТОЛОГИЯ КЪМ УМБАЛ АЛЕКСАНДРОВСКА. *Клин трансфуз хематол*. 2010;46(1):69–72.
172. Srivastava VM, Nair SC, Sappani M, Manipadam MT, Kulkarni UP, Devasia AJ, et al. Cytogenetic profile of 1791 adult acute myeloid leukemia in India. *Mol Cytogenet*. 2023 Sep 16;16(1):24.
173. Stabellini N, Tomlinson B, Cullen J, Shanahan J, Waite K, Montero AJ, et al. Sex differences in adults with acute myeloid leukemia and the impact of sex on overall survival. *Cancer Med* [Internet]. 2023 Mar 1 [cited 2023 Sep 8];12(6):6711. Available from: [/pmc/articles/PMC10067038/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/40067038/)
174. Hochman MJ, Othus M, Hasserjian RP, Ambinder A, Brunner A, Percival MEM, et al. Prognostic impact of secondary versus de novo ontogeny in acute myeloid leukemia is accounted for by the European LeukemiaNet 2022 risk classification. *Leukemia*. 2023 Sep 31;37(9):1915–8.
175. Bănescu C, Tripon F, Trifa AP, Crauciuc AG, Bogliș A, Lazar E, et al. Presence of copy number aberration and clinical prognostic factors in patients with acute myeloid leukemia: an analysis of effect modification. *Pol Arch Intern Med*. 2019 Dec 6;
176. Marcinkowska-Swojak M, Handschuh L, Wojciechowski P, Goralski M, Tomaszewski K, Kazmierczak M, et al. Simultaneous detection of mutations and copy number variation of NPM1 in the acute myeloid leukemia using multiplex ligation-dependent probe amplification. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2016 Apr;786:14–26.

177. Tripon F, Crauciuc GA, Moldovan VG, Bogliş A, Benedek I, Lázár E, et al. Simultaneous FLT3, NPM1 and DNMT3A mutations in adult patients with acute myeloid leukemia – case study. *Rev Rom Med Lab.* 2019 Jul 1;27(3):245–54.
178. Santos MFM dos, Lara CC, Velloso EDRP. Molecular genetic techniques for gains and losses of genomic material in a case of acute myeloid leukemia. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2017 Oct;39(4):385–7.
179. Donahue AC, Abdool AK, Gaur R, Wohlgemuth JG, Yeh CH. Multiplex ligation-dependent probe amplification for detection of chromosomal abnormalities in myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. *Leuk Res.* 2011 Nov;35(11):1477–83.
180. Balatzenko G, Spassov B, Stoyanov N, Ganeva P, Dikov T, Konstantinov S, et al. NPM1 Gene Type A Mutation in Bulgarian Adults with Acute Myeloid Leukemia: A Single-Institution Study. *Turkish Journal of Hematology.* 2014 Mar 1;31(1):40–8.
181. Stein EM. IDH2 inhibition in AML. *Blood.* 2023 Jan 12;141(2):124–5.
182. Abbas S, Lugthart S, Kavelaars FG, Schelen A, Koenders JE, Zeilemaker A, et al. Acquired mutations in the genes encoding IDH1 and IDH2 both are recurrent aberrations in acute myeloid leukemia: prevalence and prognostic value. *Blood.* 2010 Sep 23;116(12):2122–6.
183. Amaya ML, Pollyea DA. Targeting the *IDH2* Pathway in Acute Myeloid Leukemia. *Clinical Cancer Research.* 2018 Oct 15;24(20):4931–6.
184. Bacher U, Haferlach C, Kern W, Haferlach T, Schnittger S. Prognostic relevance of FLT3-TKD mutations in AML: the combination matters—an analysis of 3082 patients. *Blood.* 2008 Mar 1;111(5):2527–37.
185. Shankaralingappa S, Joshi HD, Patel JB, Patel P, Sawhney J. FLT3 Gene Mutation in Acute Myeloid Leukemia: Correlation with Hematological, Immunophenotypic, and Cytogenetic Characteristics. *Asian Journal of Oncology.* 2022 Jan 31;08:22.
186. Konialis C, Savola S, Karapanou S, Markaki A, Bela MK, Polychronopoulou S, et al. Routine application of a novel MLPA-based first-line screening test uncovers clinically relevant copy number aberrations in haematological malignancies undetectable by conventional cytogenetics. <https://doi.org/10.1179/1607845413Y0000000112> [Internet]. 2014 [cited 2023 Sep 12];19(4):217–24. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1179/1607845413Y.0000000112>
187. Levy B, Baughn LB, Akkari Y, Chartrand S, LaBarge B, Claxton D, et al. Optical genome mapping in acute myeloid leukemia: a multicenter evaluation. *Blood Adv.* 2023 Apr 11;7(7):1297–307.
188. Cirakoglu A, Dilhan Kuru R, Yilmaz S, Deviren A, Ongoren S, Firat Yalniz F, et al. Cytogenetic profile of adult AML patients in Turkey: a single center study with comprehensive comparison with literature. *Afr Health Sci.* 2022 Oct 27;22(3):183–91.
189. НАРЕДБА № 38 от 20.08.2010 г. за утвърждаване на медицински стандарт “Медицинска генетика” [Internet]. 2010 [cited 2023 Sep 23]. Available from: https://www.mh.government.bg/media/filer_public/2015/11/18/medicinska-genetika.pdf

190. Yahya D, Ruseva T, Tsvetkova M, Stoyanova M, Levkova M, Miteva V, et al. Tendencies of cytogenetic analysis of patients with acute myeloid leukemia -an 11-year single-centre experience report. In: 13th EUROPEAN CYTOGENOMICS CONFERENCE . E.C.A.; 2021.
191. Marcucci G, Mrózek K, Ruppert AS, Archer KJ, Pettenati MJ, Heerema NA, et al. Abnormal cytogenetics at date of morphologic complete remission predicts short overall and disease-free survival, and higher relapse rate in adult acute myeloid leukemia: Results from Cancer and Leukemia Group B study 8461. *Journal of Clinical Oncology* [Internet]. 2004 [cited 2022 Aug 30];22(12):2410–8. Available from: <https://utsouthwestern.pure.elsevier.com/en/publications/abnormal-cytogenetics-at-date-of-morphologic-complete-remission-p>
192. Chen Y, Cortes J, Estrov Z, Faderl S, Qiao W, Abruzzo L, et al. Persistence of cytogenetic abnormalities at complete remission after induction in patients with acute myeloid leukemia: prognostic significance and the potential role of allogeneic stem-cell transplantation. *J Clin Oncol* [Internet]. 2011 Jun 20 [cited 2022 Aug 30];29(18):2507–13. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21555694/>
193. Велизарова М, Хаджиев Е, Александрова К, Димова И, Захаријева Б, Тончева Д. ИЗСЛЕДВАНЕ НА СПЕЦИФИЧНИ МОЛЕКУЛЯРНИ ПРОМЕНИ ПРИ ОСТРА ЛЕВКЕМИЯ ЧРЕЗ МЕТОДА НА ФЛУОРЕСЦЕНТНА IN SITU ХИБРИДИЗАЦИЯ И КОНВЕНЦИОНАЛНА ЦИТОГЕНЕТИКА. *Съвременна медицина*. 2009;60(5–6):31–7.
194. Hastings R, Howell R, Bricarelli D, Kristoffersson U, Cavani S. General Guidelines and Quality Assurance for Cytogenetics A common European framework for quality assessment for constitutional, acquired and molecular cytogenetic investigations. E.C.A. Permanent Working Group for Cytogenetics and Society. 2012.
195. Hastings R, Howell R, Betts D, Porter S, Haferlach C, Dastugue N, et al. Guidelines and Quality Assurance for Acquired Cytogenetics A. Permanent Working Group for Cytogenetics and Society Index [Internet]. 2013. Available from: <http://cgap.nci.nih.gov/>
196. Tripon F, Crauciuc GA, Moldovan VG, Bogliş A, Benedek I, Lázár E, et al. Simultaneous FLT3, NPM1 and DNMT3A mutations in adult patients with acute myeloid leukemia – case study. *Rev Rom Med Lab*. 2019 Jul 1;27(3):245–54.
197. Bănescu C, Tripon F, Trifa AP, Crauciuc AG, Bogliş A, Lazar E, et al. Presence of copy number aberrations and clinical prognostic factors in patients with acute myeloid leukemia: an analysis of effect modification. Authors' reply. *Pol Arch Intern Med*. 2020 Apr 30;130(4):347–8.
198. Lachowiez CA, Long N, Saultz J, Gandhi A, Newell LF, Hayes-Lattin B, et al. Comparison and validation of the 2022 European LeukemiaNet guidelines in acute myeloid leukemia. *Blood Adv*. 2023 May 9;7(9):1899–909.
199. Rausch C, Rothenberg-Thurley M, Dufour A, Schneider S, Gittinger H, Sauerland C, et al. Validation and refinement of the 2022 European LeukemiaNet genetic risk stratification of acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2023 Jun 11;37(6):1234–44.

200. Döhner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. Vol. 129, Blood. American Society of Hematology; 2017. p. 424–47.
201. Jagurinoski M, Aleksov E, Stojcov-Jagurinoska M, Tonev I, Vladimirova R, Davidkova Y, et al. PB1823: SECONDARY ACUTE MYELOID LEUKEMIA AND DE NOVO ACUTE MYELOID LEUKEMIA WITH MYELOYDYSPLASIA-RELATED CHANGES DISTINCT LANDSCAPE, OR THE SAME DISEASE? Hemasphere. 2022 Jun 23;6:1703–4.

11. НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ ПО ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИЯТА

1. Пълнотекстови публикации в научни списания, свързани с темата на дисертационния труд:

- **Dinnar Yahya**, Mari Nachmeriyan, Iina Micheva, Trifon Chervenkov. Acute myelogenous leukemia - current recommendations and approaches in molecular-genetic assessment. Romanian Journal of Internal Medicine. 2022;60(2):103-114
- **Диннар Яхя**, Милена Стоянова, Мари Хачмериян, Людмила Ангелова, Илиана Мичева, Трифон Червенков. Молекулярно-генетични маркери при остра миелоидна левкемия – добрите, лошите и интермедиерните. Варненски Медицински Форум. 2022;11(2):7-19
- **Yahya, Dinnar**, Nachmeriyan, Mari, Ruseva, Tsanka, Chervenkov, Trifon and Micheva, Iina. “MLPA in the initial genetic screening of patients with acute myeloid leukemia”; Romanian Journal of Internal Medicine, vol.0, no.0, 2023, pp.-. <https://doi.org/10.2478/rjim-2023-0027>

2. Научни прояви, свързани с темата на дисертационния труд, публикувани в резюме:

- **D. Yahya**, T. Ruseva, M. Tsvetkova, M. Stoyanova, M. Levkova, V. Miteva, M. Nachmeriyan, L. Angelova, I. Micheva, T. Chervenkov. Tendencies of cytogenetic analysis of patients with acute myeloid leukemia an 11-year single-centre experience report. 13th EUROPEAN CYTOGENOMICS CONFERENCE. ECA newsletter (2021).
- **Яхя Д.**, Хачмериян М., Русева Ц., Мичева И, Ангелова Л. Цитогенетична стратификация спрямо риск при Остра миелоидна левкемия – ретроспективен анализ върху 10-годишен период. Национална конференция по хематология (2021)
- **D. Yahya**, T. Ruseva, M. Nachmeriyan, L. Angelova, T. Chervenkov, I. Micheva. Cytogenetic profile of newly diagnosed patients with acute myeloid leukemia – a single centre retrospective study. European Journal of Human Genetics (2022), vol 3. Sup. 1

- **Яхя Д., Хачмериян М., Русева Ц., Червенков Т., Мичева И.** MLPA като метод за генетичен скрининг на пациенти с остра миелоидна левкемия. XII Национален конгрес по хематология (2023)

12. БЛАГОДАРНОСТИ

Авторът изказва най-сърдечни благодарности, тъй като настоящият дисертационен труд би бил невъзможен без участието на:

- *Ръководителя на Катедрата по Медицинска генетика – проф. д-р Людмила Ангелова, д.м, и разпознатия у автора на този труд интерес към специалността Медицинска генетика и оказаната подкрепа в реализацията като академичен кадър;*
- *Научните ръководители – проф. д-р Илина Мичева, д.м, и доц. д-р Трифон Червенков, д.б., чрез тяхното активното насърчаване, насоките в практическата дейност и по написването на дисертационния труд;*
- *Неуморния екип на Лабораторията по Медицинска генетика и членовете на Катедрата по Медицинска генетика с тяхната константна подкрепа и съдействие по време и извън работно време;*
- *Всички пациенти и доброволци, които се съгласиха да участват в проведените молекулярно-генетични изследвания в името най-вече на научния прогрес;*
- *Не на последно място - семейството и приятелите, и в частност - Стелиан Димов, с проявените вяра, разбиране и обич.*

13. ПРИЛОЖЕНИЯ

13.1 Приложение 1

ИНФОРМАЦИЯ ЗА ПАЦИЕНТА И КОНТРОЛНИТЕ ЛИЦА

ТЕМА НА ПРОУЧВАНЕТО: „МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕН АНАЛИЗ ПРИ НОВОДИАГНОСТИЦИРАНИ ПАЦИЕНТИ С ОСТРА МИЕЛОГЕННА ЛЕВКЕМИЯ“

Исходна информация за проучването:

Острата миелогенна левкемия (ОМЛ) е заболяване от неопластичен произход, засягащо прогениторните клетки на миелоидния кръвен ред. Среща се предимно при възрастни с честота 4,2 на 100000 души. Характеризира се с изключителна генетична хетерогенност, която определя и различния характер на еволюция и прогноза на заболяването. Поради това съвременните международни препоръки включват изясняване на генетичната природа на всеки клиничен случай като част от първоначалната диагностична оценка с цел максимално прецизиране и персонализиране на терапевтичния подход. Молекулярно-генетичните маркери имат освен диагностично, също и прогностично и/или предиктивно значение и затова е необходимо да се извърши както цитогенетичен анализ, така и допълнителен молекулярно-генетичен анализ. Последният допълва информацията от цитогенетичния резултат, като отчита субмикрокропски и молекулярни генетични промени, отвъд разрешителната способност на светлинната микроскопия.

Ние целим да проучим ефективността и информативността на метода Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA), използвайки периферна кръв като източник на ядрени клетки, и съответно на ДНК. Внедряването на този метод успоредно с извършване на цитогенетичен анализ в самото начало на диагностичния процес би могло да обогати представата за генетичния характер на даден случай на ОМЛ и да спомогне за подобряването на прогнозата на пациентите.

MLPA е все още нов метод, датиращ от 2002г, и публикациите, свързани с неговото приложение, особено по отношение на ОМЛ, са малко. Нашият опит би имал оригинален принос за разбирането на неговото място в рутинната клинично-лабораторна дейност както на локално, така и на международно ниво.

Цел на научното проучване:

С настоящото проучване ние целим да проучим ефективността и информативността на метода MLPA, използвайки периферна кръв като източник на ядрени клетки, и съответно на ДНК за отчитане на характерни за ОМЛ молекулярно-генетични маркери;

Също така целим да оценим потенциала на този метод за внедряване в рутинната клинично-диагностична дейност по оценка на новодиагностицирани с ОМЛ пациенти.

Дизайн на проучването:

Пациенти с новодиагностицирана и нелекувана ОМЛ и контролна група от здрави индивиди.

Вашето участие в проучването:

На пациентите с ОМЛ и на контролните индивиди ще бъдат вземани по 10 ml периферна венозна кръв еднократно. Тази кръв ще послужи за изолиране на ДНК и за провеждане на молекулярно-генетичния анализ MLPA, описан по-горе. Последният анализира няколко конкретни хромозомни сегмента (на хромозоми 4,5,6,7,11,12,17,20,21), поради лежащите в тях ОМЛ-асоциирани гени (съответно TET2, CTNNA, NPM1, JARID2, IKZF1, CUX1, MLL5, EZH2, ATM, KMT2A, ETV6, AEBP2, TP53, NF1, SUZ12, ASXL1, RUNX1, U2AF1).

Изследват се още 7 гена (DNMT3A, SF3B1, IDH1, NPM, FLT3, IDH2, ASXL1) с конкретни в тях соматични, т.е случайно възникнали, неунаследени мутации. Откритите мутации в единични гени подлежат на потвърждаване чрез друг молекулярно-генетичен метод, наречен секвениране по Сангер, признат за златен стандарт.

Резултати от научното проучване:

Резултатите от проекта ще бъдат популяризирани сред научната общност като се представят на научни форуми и публикуват в научни списания в обобщен вид без да се разкрива самоличността на участниците в проучването.

Възможни рискове и дискомфорт от включването Ви в научното проучване:

Настоящото проучване няма да предизвика допълнителни медицински рискове. Основните рискове са такива, свързани с вземането на венозна кръв, които са част от стандартна процедура и включват дискомфорт от вкарването на иглата и кръвонасядане на мястото на убождането. Количеството взета кръв не застрашава здравето на индивида, тъй като представлява по малко от 0,25% от стандартния обем циркулираща кръв в организма.

Ползи от включването Ви в научното проучване:

Знанията, получени от участието Ви в това проучване, могат да бъдат полезни за пациенти в бъдеще под формата на нов рутинен диагностичен метод при пациенти с ОМЛ.

Компенсации от включването Ви в научното проучване:

Няма да Ви бъде заплатено за участието в това проучване.

Поверителност от включването Ви в научното проучване:

Имате право на анонимност и цялата информация, получена във връзка с настоящото проучване, която може да Ви идентифицира, ще бъде запазена в тайна в съответствие с Европейския регламент за защита на личните данни 2016/679. Вашият лекуващ лекар ще запази тайната на Вашата медицинска документация, свързана с настоящото проучване.

Доброволно участие в научното проучване:

Участието в това изследователско проучване е доброволно. Отказът да участвате в проучването няма да бъде свързан със загуба на ползи или да промени стандарта на грижите и лечението за Вас.

Въпроси:

Възникналите въпроси преди включването Ви в проучването и по време на провеждането му можете да задавате на главния изследовател: д-р Диннар Яхя. Ако имате въпроси относно защитата на личните Ви данни, можете да се свържете с главния изследовател: д-р Диннар Али Яхя, тел. 0889113424, адрес: Лаборатория по медицинска генетика, УМБАЛ Света Марина ЕАД Варна, бул. „Христо Смирненски“ №1, Варна. За второ мнение относно въпроси, свързани с проучването може да се свържете с биолог Светлана Димитрова Койнова, тел. 0885739210, Лаборатория по Медицинска генетика, УМБАЛ Света Марина ЕАД Варна, бул. „Христо Смирненски“ №1, Варна.

Оттегляне от научното проучване:

Имате правото да откажете да се присъедините или да се оттеглите от настоящото проучване по всяко време, без това да промени грижата за Вашето здраве.

Етични аспекти от включването Ви в научното проучване:

Това проучване е разгледано от Комисията по етика към Медицински Университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“- Варна и е получено положително становище, което означава, че проучването е било сметнато за етично приемливо за провеждане.

13.2 Приложение 2

ИНФОРМИРАНО СЪГЛАСИЕ ЗА УЧАСТИЕ В ПРОУЧВАНЕТО:

Аз,

.....
(трите имена на пациента)

давам съгласието си да участвам в проучването „Молекулярно-генетичен анализ при новодиагностицирани пациенти с Остра миелогенна левкемия“. Прочетох и разбирам информацията по-горе, описваща изследователското проучване. Имах време и възможност да задавам въпроси за проучването на моя лекуващ лекар. Получих задоволителни отговори на всичките си въпроси. Беше ми дадена възможност да обмисля дали да се включа в проучването. Знам достатъчно за целта на проучването, методите, ползите и рисковете, за да се съглася да участвам в него.

Информиран/а съм, че мога да оттегля съгласието си и да прекратя участието си по всяко време без това да има негативни последици за мен.

Информиран/а съм, че анонимността при изследването е гарантирана и данните ще бъдат представени в обобщен вид.

Дата:
(подпис на пациента)

Подпис:

Име:

.....
(собственооръчно изписване на името)

Предоставил информирано съгласие:
(подпис)

Подпис:

Име:

.....
(собственооръчно изписване на името)

ИНФОРМИРАНО СЪГЛАСИЕ ЗА ЗДРАВО КОНТРОЛНО ЛИЦЕ:

Аз,

.....
(трите имена на контролния индивид)

давам съгласието си да участвам в проучването „Молекулярно-генетичен анализ при новодиагностицирани пациенти с Остра миелогенна левкемия“. Прочетох и разбирам информацията по-горе, описваща изследователското проучване. Имах време и възможност да задавам въпроси за проучването на моя лекуващ лекар. Получих задоволителни отговори на всичките си въпроси. Беше ми дадена възможност да обмисля дали да се включа в проучването. Знам достатъчно за целта на проучването, методите, ползите и рисковете, за да се съглася да участвам в него.

Информиран/а съм, че мога да оттегля съгласието си и да прекратя участието си по всяко време без това да има негативни последици за мен.

Информиран/а съм, че анонимността при изследването е гарантирана и данните ще бъдат представени в обобщен вид.

Дата:
(подпис на лицето)

Подпис:

Име:

.....
(собственоръчно изписване на името)

Предоставил информирано съгласие:
(подпис)

Подпис:

Име:

.....
(собственоръчно изписване на името)