



Πανεπιστημιακή Αιματολογική κλινική
Διευθυντής: Αναπληρωτής Καθηγητής Γεώργιος Βασιλόπουλος

Διδακτορική Διατριβή

**"ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ NPM1 ΚΑΙ FLT3
ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΟΞΕΙΑ ΜΥΕΛΟΓΕΝΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ ΚΑΙ MDS
(High IPSS, int-2 κατά WHO)"**

υπό

ΜΑΡΙΑΣ Ι. ΜΠΕΦΑΝΗ

Αιματολόγου

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των

απαιτήσεων για την απόκτηση του

Διδακτορικού Διπλώματος

Λάρισα, 2016

© 2016 Μαρία Μπεφάνη

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (Ν. 5343/32 αρ. 202 παρ. 2).

Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής (9^η/25-06-2015 ΓΣΕΣ):

1ος Εξεταστής (Επιβλέπων)	Δρ Νικόλαος Γιαννακούλας Επίκουρος Καθηγητής Παθολογίας-Αιματολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
2^{ος} Εξεταστής	Δρ Ματθαίος Σπελέτας Αναπληρωτής Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
3^{ος} Εξεταστής	Δρ Γεώργιος Βασιλόπουλος Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογίας-Αιματολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
4^{ος} Εξεταστής	Δρ Ιωάννης Στεφανίδης Καθηγητής Παθολογίας-Νεφρολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
5^{ος} Εξεταστής	Δρ Αναστάσιος Γερμενής Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
6^{ος} Εξεταστής	Δρ Μαρία Ιωάννου Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
7^{ος} Εξεταστής	Δρ Γεώργιος Ντάιος Επίκουρος καθηγητής Παθολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

(...) Από το σύνολο των πρωταρχικών
 τριχώνων, όσα ήταν τέλεια και λεία και
 εξαιτίας της ακρίβειάς τους ικανά να παράχουν
 πυρ, ύδωρ, αέρα και γη, ο Θεός τα ξεχώρισε
 από τα συγγενικά τους, τα ανέμειξε συμμετρικά
 μεταξύ τους, κατασκεύασε πανσπερμία για όλο
 το θνητό γένος και έφτιαξε από αυτά το μυελό,
 ενώ μετά εμφύτευσε και έδεσε σ' αυτόν τα γένη
 των ψυχών, έχοντας διαιρέσει ευθύς – κατά την
 αρχική κατανομή – το μυελό σε τόσα και τέτοια
 σχήματα, όσα θα λάμβαναν στη συνέχεια τα είδη
 των ψυχών (...)

ΠΛΑΤΩΝ (345-267 π.Χ.)
 Τίμαιος
 Περί Ατλαντίδος και φύσεως

Στον πατέρα μου

**" ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ NPM1 ΚΑΙ FLT3
ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΟΞΕΙΑ ΜΥΕΛΟΓΕΝΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ ΚΑΙ MDS
(High IPSS, int-2 κατά WHO) "**

Μαρία Ι. Μπεφάνη

Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή

1. **Δρ Νικόλαος Γιαννακούλας (Επιβλέπων),** Επίκουρος Καθηγητής
Παθολογίας-Αιματολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
2. **Δρ Ματθαίος Σπελέτας,** Αναπληρωτής Καθηγητής Εργαστηριακής
Ανοσολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
3. **Δρ Γεώργιος Βασιλόπουλος,** Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογίας-
Αιματολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Πίνακας περιεχομένων

Βιογραφικό σημείωμα.....	9
Πρόλογος.....	14
Εισαγωγή – Οξεία μυελογενής λευχαιμία και μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα	16
Ο υποδοχέας FLT3.....	21
Η FLT3-ITD μετάλλαξη.....	25
Η σημειακή μετάλλαξη του FLT3	30
Η πρωτεΐνη Νουκλεοφωσμίνη και οι μεταλλάξεις της.....	31
Η συνύπαρξη μεταλλάξεων του FLT3 και της NPM1.....	38
Ειδικό μέρος.....	41
Ασθενείς-Υλικό.....	41
Μέθοδοι.....	48
1) Διαχωρισμός κυττάρων	48
2) Απομόνωση DNA.....	48
3) PCR για την ανίχνευση ITD-μεταλλάξεων του FLT3.....	49
4) PCR –RFLP για την ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων του FLT3.....	50
5) Ανίχνευση μεταλλάξεων της Νουκλεοφωσμίνης	52
Αποτελέσματα	54
1. Ανίχνευση της μετάλλαξης FLT3-ITD	54
2. Ανίχνευση της σημειακής μετάλλαξης του FLT3	55
3. Ανίχνευση μεταλλάξεων της Νουκλεοφωσμίνης	57
4. Συσχετίσεις.....	58
Ανάλυση στο σύνολο των ασθενών της μελέτης.....	60
Ανάλυση στους ασθενείς με ΟΜΛ.....	71

<i>Ανάλυση στους ασθενείς με πρωτοπαθή ΟΜΛ</i>	<i>77</i>
<i>Ανάλυση στους ασθενείς με δευτεροπαθή ΟΜΛ</i>	<i>81</i>
<i>Ανάλυση στους ασθενείς με μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο</i>	<i>82</i>
 <i>Συμπεράσματα-συζήτηση</i>	<i>84</i>
 <i>Ελληνική περίληψη.....</i>	<i>90</i>
 <i>Αγγλική περίληψη</i>	<i>92</i>
 <i>Βιβλιογραφία</i>	<i>94</i>

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Όνοματεπώνυμο: Μαρία Μπεφάνη

Διεύθυνση: Κουμουνδούρου 61, Βόλος, τκ 38221, Ελλάς

Τηλ.: +30 24210 28928

Κιν.: +30 6948463367

E mail: mar_befani@yahoo.gr

Ημερομηνία Γέννησης: 05 Σεπτεμβρίου 1975

Τόπος Γέννησης: Βόλος

Υπηκοότητα: Ελληνική

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

05/11/2001 Δίπλωμα Ιατρικής, Ανώτατο Ιατρικό Ινστιτούτο Πλόθντιβ, Σχολή Ιατρικής
Πλόθντιβ (Φιλιππούπολης) Βουλγαρίας

Βαθμός πτυχίου [7.53]

Αναγνώριση σπουδών από το ΔΙ.Κ.Α.Τ.Σ.Α, με αριθμό πράξης 10-600/2003

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

- Από 12/02/2013 άσκηση ελεύθερου επαγγέλματος στο Βόλο.
- 05/11/08 έως και 17/11/12 ειδικευόμενη Αιματολογίας ΠΓΝ Λάρισας.
- 22/08/08 έως 09/09/08 ειδικευόμενη Αιματολογίας, ΑΧΕΠΑ Θεσσαλονίκης

- 01/06/08 έως 31/07/08 ειδικευόμενη παθολογίας σε παράταση στο ΑΓΝ Βόλου.
- 01/12/06 έως 31/05/08 ειδικευόμενη Παθολογίας στο ΑΓΝ Βόλου.
- 03/02/04 έως 02/02/05 υποχρεωτική υπηρεσία υπαίθρου στο Κέντρο Υγείας Ζαγοράς, Μαγνησία.
- 22/10/03 έως 21/01/04 τρίμηνη υποχρεωτική εκπαίδευση ΑΓΝ Βόλου.
- Ωρομίσθια εκπαιδύτρια σε ΙΕΚ (Α' και Β' Δημόσιο Ι.Ε.Κ. ΒΟΛΟΥ, ΘΕΣΣΑΛΙΚΟ Ι.Ε.Κ. ΓΙΑΤΣΟΥ Βόλου).

ΜΗΤΡΙΚΗ ΓΛΩΣΣΑ: Ελληνικά

ΆΛΛΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ:

Αγγλικά – Άριστη ικανότητα Ανάγνωσης, γραφής και ομιλίας (Certificate of Proficiency in English – University of Cambridge, University of Michigan).

Γαλλικά – Μέτρια ικανότητα ανάγνωσης, γραφής και ομιλίας (Certificat de langue francaise – Premier degre - Universite de Paris-Sorbonne).

Βουλγαρικά – Άριστη ικανότητα ανάγνωσης, γραφής και ομιλίας.

ΥΠΟΨΗΦΙΑ ΔΙΔΑΚΤΩΡ: Από Δεκέμβριο 2009 έως και σήμερα – υποψήφια Διδάκτωρ του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας με διδακτορική διατριβή με τίτλο «Ανίχνευση μεταλλάξεων των γονιδίων NPM1 και FLT3 σε ασθενείς με οξεία μυελογενή λευχαιμία και MDS (High IPSS, int-2 κατά WHO).

ΣΥΜΜΕΤΟΧΕΣ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ:

- ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΜΕ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΠΕΡΙΣΤΑΤΙΚΟΥ ΣΤΗ ΔΙΑΔΡΑΣΤΙΚΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ ΤΗΣ ΗΜΕΡΙΔΑΣ ΤΟΥ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ «ΟΞΕΙΩΝ ΛΕΥΧΑΙΜΙΩΝ & ΜΥΕΛΟΔΥΣΠΛΑΣΤΙΚΩΝ ΣΥΝΔΡΟΜΩΝ» ΤΗΣ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΗΣ ΕΤΑΙΡΙΑΣ, ΜΕ ΘΕΜΑ «ΟΞΕΙΑ ΜΥΕΛΟΓΕΝΗΣ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ», 13 ΙΟΥΝΙΟΥ 2009, ΙΩΑΝΝΙΝΑ.

- ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΤΟ 20ο ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΟ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ 4-7 ΝΟΕΜΒΡΙΟΥ 2009, ΗΡΑΚΛΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ.
 - Μ. Παλασοπούλου, Ε. Μπουρονικου, Ν. Γιαννακούλας, Κ. Ζησάκη, **Μ. Μπεφάνη**, Μ. Ιωάννου, Μ. Σπελέτας, Γ. Βασιλόπουλος, Π. Ματσουκά. Λεμφαδενοπάθεια ως πρώτη εκδήλωση οξείας Μυελογενούς Λευχαιμίας. Περιγραφή δύο περιστατικών. ΑΙΜΑ 12, suppl. 1, p. 211-212, 2009
 - Κ. Ζησάκη, **Μ. Μπεφάνη**, Μ. Ιωάννου, Π. Παπαχααραλάμπους, Π. Ματσουκά, Γ. Βασιλόπουλος. Θεραπευτική αντιμετώπιση της οξείας Μυελοσκλήρυνσης με Λεναλιδομίδη. ΑΙΜΑ 12, suppl. 1, p. 299-300, 2009.
- ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΤΟ 21ο ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΟ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ 10-12 ΝΟΕΜΒΡΙΟΥ 2010 ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ
 - Ε. Γιαμούρης, **Μ. Μπεφάνη**, Α. Μαμάρα, Μ. Παλασοπούλου, Φ. Καλαλά, Α. Τσέζου, Π. Ματσουκά, Μ. Σπελέτας. **Μελέτη του γονιδίου FLT3 σε ασθενείς με οξεία Μυελογενή Λευχαιμία. Πρόδρομα αποτελέσματα.** ΑΙΜΑ 2010; Suppl. 1 (3), p.52
 - Ν. Γιαννακούλας, Μ. Παλασοπούλου, Α. Μαμάρα, **Μ. Μπεφάνη**, Κ. Ζησάκη, Ε. Μπουρονικου, Γ. Βασιλόπουλος, Μ. Σπελέτας, Α. Γερμενής, Π. Ματσουκά. Ανοσοφαινοτυπική ανάλυση των πλασματοκυττάρων του μυελού των οστών σε ασθενείς με πολλαπλό μυέλωμα. ΑΙΜΑ 2010; suppl. 1(3), p. 111
 - Μ. Παλασοπούλου, Ν. Γιαννακούλας, Γ. Φιλιππίδης, Δ. Νικούλης, Κ. Ζησάκη, Σ. Γκολφινόπουλος, **Μ. Μπεφάνη**, Π. Κούρτη, Ε. Μπουρονίκου, Γ. Βασιλόπουλος, Α. Γερμενής, Ι. Στεφανίδης, Π. Ματσουκά. Θεραπεία ασθενών με Πολλαπλό Μυέλωμα και νεφρική ανεπάρκεια με συνδυασμό χημειοθεραπείας και αιμοκάθαρσης με νεώτερα φίλτρα υψηλής διαπερατότητας. Εμπειρία ενός κέντρου. ΑΙΜΑ 2010; suppl. 1(3), p 110-111
 - Ε. Μπουρονίκου, **Μ. Μπεφάνη**, Μ. Ιωάννου, Γ. Βασιλόπουλος, Π. Ματσουκά. IgE Πολλαπλούν Μυέλωμα : Ένα σπάνιο και θεραπευτικά «ανθεκτικό» Μυέλωμα. ΑΙΜΑ 2010; suppl. 1(3), p. 114

- Ν. Γιαννακούλας, Μ. Παλασσοπούλου, Κ. Ζησάκη, **Μ. Μπεφάνη**, Ε. Μπουρονίκου, Γ. Βασιλόπουλος, Π. Ματσουκά. Υψηλά ποσοστά ανταπόκρισης ασθενών με νεοδιαγνωσθέν Πολλαπλό Μυέλωμα μετά από θεραπεία με συνδυασμό Κυκλοφωσφαμίδης, Λιποσωμιακής Δοξορουμπικίνης, Δεξαμεθαζόνης και Μπορτεζομίδης. Εμπειρία ενός κέντρου. AIMA 2010; suppl. 1(3), p. 119-120
- Μ. Παλασσοπούλου, Ν. Γιαννακούλας, Π. Ζήκος, **Μ. Μπεφάνη**, Κ. Ζησάκη, Ε. Μπουρονίκου, Γ. Βασιλόπουλος, Π. Ματσουκά. Αποτελεσματικότητα του συνδυασμού Κυκλοφωσφαμίδης, Λιποσωμιακής Δοξορουμπικίνης και Δεξαμεθαζόνης σαν θεραπεία πρώτης γραμμής σε ασθενείς με Πολλαπλό Μυέλωμα. Πιθανός ευνοϊκός ρόλος της συντήρησης με Λεναλιδομίδη. AIMA 2010; suppl. 1(3), p. 124
- Ε. Μπουρονίκου, **Μ. Μπεφάνη**, Κ. Ζησάκη, Μ. Παλασσοπούλου, Ν. Γιαννακούλας, Γ. Βασιλόπουλος, Π. Ματσουκά. Συνδυασμός 5-Αζασουτιδίνης και Βαλπροϊκού οξέος σε ασθενείς με υψηλού κινδύνου Μυελοδυσπλαστικά Σύνδρομα. AIMA 2010; suppl. 1(3), p. 202-203
- ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΤΟ 22ο ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΟ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ, 24-26 ΝΟΕΜΒΡΙΟΥ 2011, ΑΘΗΝΑ
 - Ν. Γιαννακούλας, **Μ. Μπεφάνη**, Ε. Μπουρονίκου, Μ. Παλασσοπούλου, Π. Ζήκος, Κ. Ζησάκη, Γ. Βασιλόπουλος, Π. Ματσουκά. Θεραπεία συντήρησης με Rituximab σε ασθενείς με Διάχυτο Μη-Hodgkin Λέμφωμα από μεγάλα Β-Κύτταρα (DLBCL). AIMA 2011; suppl 1(3), p.185
- ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΜΕ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΠΕΡΙΣΤΑΤΙΚΟΥ ΣΤΗΝ ΗΜΕΡΙΔΑ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΗΣ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΟΥ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟΥ ΛΑΡΙΣΑΣ ΜΕ ΘΕΜΑ "Συμβουλευτική Αιματολογία II" 28/4/2012, ΛΑΡΙΣΑ
- **ΠΡΟΦΟΡΙΚΗ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΗ** ΣΤΟ 23^ο ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΟ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ, 22-24 ΝΟΕΜΒΡΙΟΥ 2012, ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ.

Μ. Μπεφάνη, Ε. Γιαμούρης, Α. Μαμάρα, Ν. Γιαννακούλας, Μ. Παλασσοπούλου, Π. Ματσουκά, Μ. Σπελέτας. **Μελέτη του γονιδίου FLT3 σε**

ασθενείς με οξεία μυελογενή λευχαιμία και Μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα.

ΣΥΜΜΕΤΟΧΕΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ ΤΟΥ ΕΞΩΤΕΡΙΚΟΥ:

- ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΤΟ 16ο ΠΑΝΕΥΡΩΠΑΙΚΟ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ (16th Congress of the European Hematology Association), ΛΟΝΔΙΝΟ, 9-12 ΙΟΥΝΙΟΥ 2011
 - C. Giannakoulas, D. Palassopoulou, **M. Befani**, T. Zisaki, A. Bouronikou, G. Vasilopoulos, T. Matsouka. High response rate in newly diagnosed Multiple Myeloma patients treated with a combination of Cyclophosphamide, Liposomal Doxorubicin, Dexamethasone and Bortezomib.
- ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΤΟ 22ο ΔΙΕΘΝΕΣ ΣΥΝΕΔΡΙΟ ΘΡΟΜΒΩΣΗΣ (International congress on Thrombosis), NICE Acropolis, France, 6-9 October 2012
 - V. Giamouris, **M. Befani**, E. Papadakis, E. Mandala, N. Papadoulis, S. Karamagiolis, V. Gastari, E. Verrou, E. Katodritou, S. Lafioniatis, Z. Kartasis, K. Magiannis, P. Marinaki, K. Tsioni, A. Kioumi, A. Germentis, M. Speletas. Influence of common Thrombophilia polymorphisms on the thrombosis risk in patients with JAK2-V617F-positive Myeloproliferative neoplasms.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΗ ΣΕ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΟ ΠΕΡΙΟΔΙΚΟ

G. Vassilopoulos, M. Palassopoulou, K. Zisaki, **M. Befani**, E. Bouronikou, N. Giannakoulas, E. Stathopoulou, and P. Matsouka. Successful Control of Acute Myelofibrosis with Lenalidomide. Case Report Med. 2010; 2010: 421239. Published online 2011 January 17. doi: 10.1155/2010/421239 PMID: PMC3026984

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η ευρεία εφαρμογή των μοριακών τεχνικών, συμπληρωματικά με άλλες κλασσικές μεθόδους, όπως η ανοσοφαινοτυπική ανάλυση με κυτταρομετρία ροής, η κλασσική κυτταρογενετική, η μοριακή κυτταρογενετική (FISH) κ.ά. οδήγησαν σε επαναπροσδιορισμό των διαγνωστικών κριτηρίων, της πρόγνωσης, αλλά και της θεραπευτικής αντιμετώπισης των ασθενών με οξεία λευχαιμία και μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο.

*Ένα από τα κύρια πλεονεκτήματα των μοριακών τεχνικών είναι η ανάδειξη γενετικών βλαβών (ανασυνδυασμών ή μεταλλάξεων) μη αντιληπτών με άλλες τεχνικές, όπως η κλασσική κυτταρογενετική ανάλυση. Ορισμένες από αυτές τις βλάβες είναι ουσιαστικές για τη σωστή διάγνωση και αντιμετώπιση των ασθενών με αιματολογικές κακοήθειες. Άλλες γενετικές βλάβες, ωστόσο, δεν χρησιμεύουν στη διάγνωση, αλλά έχουν σαφή προγνωστική αξία, επηρεάζοντας τις θεραπευτικές επιλογές εφόδου, σταθεροποίησης ή συντήρησης των ασθενών. Χαρακτηριστικό παράδειγμα τέτοιων γενετικών βλαβών θεωρούνται οι μεταλλάξεις των γονιδίων *NPM1* και *FLT3*, που έχουν ιδιαίτερη προγνωστική αξία σε ασθενείς με οξεία μυελογενή λευχαιμία (ΟΜΛ), η οποία αποτελεί το συχνότερο τύπο οξείας λευχαιμίας στους ενήλικες. Μάλιστα πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι ο συνδυασμός του γονοτύπου των ως άνω γονιδίων, μπορεί να αναδείξει υποπληθυσμούς ασθενών με ΟΜΛ με διαφορετική πρόγνωση, ανεξάρτητα από την παρουσία άλλων δεικτών, με ιδιαίτερη σημασία για τη θεραπεία, αλλά και τη συνολική τους επιβίωση.*

*Λαμβάνοντας υπόψιν ότι η επίπτωση, αλλά και η κλινική σημασία των μεταλλάξεων των *NPM1* και *FLT3* δεν έχουν καταγραφεί σε συνδυασμό στον Ελληνικό χώρο, σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η αναδρομική, παράλληλα με την προοπτική, μελέτη των ως άνω γονιδίων σε Έλληνες ασθενείς με ΟΜΛ και Μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα (RAEB και CMML). Επιπρόσθετα, θα αναζητηθούν πιθανές συσχετίσεις της παρουσίας των μεταλλάξεων με άλλες εργαστηριακές παραμέτρους, όπως ο*

κλασσικός καρυότυπος, αλλά και τα ανοσοφαινοτυπικά και λοιπά εργαστηριακά ευρήματα.

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο σύνολό της στο εργαστήριο Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (Νέα κτίρια Ιατρικής σχολής – Βιόπολις – Λάρισα, Διευθυντής Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας Αναστάσιος Γερμενής).

Η μαγεία της εργαστηριακής – ερευνητικής Αιματολογίας ήταν πάντα η αιτία της επιλογής μου όσον αφορά τις Ιατρικές Ειδικότητες. Ευχαριστώ θερμά τον Αναπληρωτή Καθηγητή Ανοσολογίας κύριο Ματθαίο Σπελέτα, μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής για τη συνεχή συμπαράσταση, τις γνώσεις και την αγάπη για την ερευνητική Αιματολογία που μου μετέδωσε. Χωρίς εκείνον αυτή η διατριβή κυριολεκτικά δεν θα είχε τελειώσει ποτέ. Ευχαριστώ πολύ τον Διευθυντή του εργαστηρίου Καθηγητή Ανοσολογίας Αναστάσιο Γερμενή που μου επέτρεψε να εργαστώ εκεί και να συμμετέχω και στις διάφορες δραστηριότητες του εργαστηρίου. Ευχαριστώ την Καθηγήτρια Αιματολογίας κυρία Παναγιώτα Ματσουκά που με πρότεινε για υποψήφια Διδάκτωρ και μου έδωσε τη δυνατότητα να μπω στο εργαστήριο, τον Αναπληρωτή καθηγητή Αιματολογίας κύριο Γεώργιο Βασιλόπουλο, μέλος της τριμελούς επιτροπής και τον Επίκουρο καθηγητή Αιματολογίας κύριο Νικόλαο Γιαννακούλα, Επιβλέπων, για τη βοήθειά τους. Ευχαριστώ θερμά την κυρία Μαρία Κομπότη, Επιμελήτρια στη Μονάδα Εντατικής Θεραπείας του Θριάσιου Νοσοκομείου Ελευσίνας και συνεργάτιδα του Εργαστηρίου Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας, για την ανεκτίμητη βοήθειά της στη στατιστική ανάλυση. Ευχαριστώ τον κύριο Ιωάννη Κάκκα, Επιμελητή του τμήματος Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας του Νοσοκομείου Ευαγγελισμός, για την παραχώρηση της μεθοδολογίας για την ανάλυση των μεταλλάξεων της Νουκλεοφωσμίνης. Και τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους νεαρούς ερευνητές του εργαστηρίου, τον Ευάγγελο Γιαμούρη που με βοήθησε να ξεκινήσω και ιδιαίτερα την Αντιγόνη Μαμάρα και την Ευαγγελία Καραμούτη για την ουσιαστική φιλία τους και τη συμμετοχή και βοήθειά τους στο εργαστηριακό κομμάτι αυτής της διατριβής.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ – ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Η οξεία μυελογενής λευχαιμία είναι μία κακοήθεια του αιμοποιητικού ιστού. Μέσα στο μυελό των οστών, η διαδικασία ωρίμανσης και διαφοροποίησης ενός δεσμευμένου για την κοκκιώδη σειρά προγονικού κυττάρου διακόπτεται, με αποτέλεσμα να συσσωρεύονται στο μυελό άωρα κύτταρα. Τα κύτταρα αυτά, δεν έχουν χάσει μόνο την ικανότητα διαφοροποίησης και απόπτωσης, αλλά δεν έχουν αποκτήσει και καμία από τις λειτουργίες των ώριμων κυττάρων της κοκκιώδους σειράς. Σταδιακά, διηθούν το μυελό, απωθώντας τις άλλες κυτταρικές σειρές και περνούν στην κυκλοφορία του αίματος, δίνοντας το όνομά της στη νόσο, οπότε και συνήθως τίθεται η διάγνωση. Τα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα (ΜΔΣ), είναι επίσης κλωνικές παθήσεις του μυελού των οστών, που χαρακτηρίζονται κυρίως από δυσπλασία, κυτταροπενίες και αυξημένο κίνδυνο μετάπτωσης σε οξεία μυελογενή λευχαιμία.

Οι επιπλοκές των νοσημάτων αυτών στον οργανισμό οφείλονται κυρίως στην έλλειψη ώριμων κοκκιοκυττάρων (λοιμώξεις) και την έκπτωση των άλλων κυτταρικών σειρών (βαριά αναιμία, αιμορραγία).

Η ταξινόμηση των οξείων μυελογενών λευχαιμιών και των μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων, ήταν μέχρι προσφάτως βασικά μορφολογική (Πίνακας 1).

Πολλά χρόνια έρευνας έχουν αφιερωθεί στη μελέτη της παθογένειας της ΟΜΛ, με τους περισσότερους ερευνητές να επικεντρώνονται στη μελέτη των γενετικών ιδιοτήτων του λευχαιμικού κυττάρου. Πριν 20 χρόνια, διαπιστώθηκε πως τα λευχαιμικά κύτταρα έχουν μειωμένη ικανότητα πολλαπλασιασμού και ο κλώνος διατηρείται από ένα μικρό αριθμό λευχαιμικών βλαστικών κυττάρων, με παρόμοιο τρόπο και ιεραρχεία όπως της φυσιολογικής αιμοποίησης,¹ συγκεντρώνοντας το ενδιαφέρον των ερευνητών στις δικές τους πια κυτταρικές και γενετικές ιδιότητες. Η ασταμάτητη έρευνα και οι αμέτρητες ανακοινώσεις χρωμοσωμικών βλαβών, αλλά και μεταλλάξεων διαφόρων γονιδίων σε ασθενείς με οξεία μυελογενή λευχαιμία,

οδήγησαν την Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας να δημοσιεύσει μία νέα ταξινόμηση των μυελικών νεοπλασμάτων και της Οξείας Λευχαιμίας το 2008 (Πίνακας 2).²

Πίνακας 1. Γαλλο-Αμερικανο-Βρετανική ταξινόμηση της οξείας μυελογενούς λευχαιμίας και των μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων.

AML	M0	ΟΜΛ με ελάχιστη διαφοροποίηση
	M1	ΟΜΛ χωρίς ωρίμανση
	M2	ΟΜΛ με ωρίμανση
	M3	Οξεία προμυελοκυτταρική λευχαιμία
	M4	Οξεία μυελομονοκυτταρική λευχαιμία
	M4 eos	Οξεία μυελομονοκυτταρική λευχαιμία με ηωσινοφιλία
	M5	Οξεία μονοβλαστική/μονοκυτταρική λευχαιμία
	M6	Οξεία ερυθρολευχαιμία
MDS	M7	Οξεία μεγακαρυοβλαστική λευχαιμία
	RA	<ul style="list-style-type: none"> • <1% βλάστες στο περιφερικό αίμα • <5% βλάστες στο μυελό των οστών
	RARS	<ul style="list-style-type: none"> • <1% βλάστες στο περιφερικό αίμα • <5% βλάστες στο μυελό των οστών • >15% δακτυλιοειδείς σιδηροβλάστες • Δυσπλαστικές αλλοιώσεις σε 2 ή περισσότερες κυτταρικές σειρές
	RAEB	<ul style="list-style-type: none"> • RAEB I - <5% βλάστες στο περιφερικό αίμα και 5-9% στο μυελό των οστών • RAEB II – 10-19% βλάστες στο μυελό των οστών
	CMML	<ul style="list-style-type: none"> • <5% βλάστες στο περιφερικό αίμα • <20% βλάστες στο μυελό των οστών • Μονοκυττάρωση στο περιφερικό αίμα
	RAEB-t	<ul style="list-style-type: none"> • 5% ή περισσότεροι βλάστες στο περιφερικό αίμα • 21-30% βλάστες στο μυελό των οστών

Επεξηγήσεις: AML - acute myeloid leukaemia - οξεία μυελογενής λευχαιμία - ΟΜΛ, MDS - myelodysplastic syndrome - μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο, RA - refractory anaemia - ανθεκτική αναιμία, RARS - refractory anaemia with ringed sideroblasts - ανθεκτική αναιμία με δακτυλιοειδείς σιδηροβλάστες, RAEB - refractory anaemia with excess blasts - ανθεκτική αναιμία με περίσσεια βλαστών, CMML - chronic myelomonocytic leukaemia - χρόνια μυελομονοκυτταρική λευχαιμία, RAEB-t - refractory anaemia with excess blasts in transformation - ανθεκτική αναιμία με περίσσεια βλαστών σε εκτροπή.

Πίνακας 2. Η αναθεώρηση το 2008 της ταξινόμησης της Παγκόσμιας Οργάνωσης Υγείας για τα μυελικά νεοπλασμάτα και τις οξείες λευχαιμίες.

Μυελοδυσπλαστικά/ Μυελοϋπερπλαστικά νεοπλασμάτα (ΜΔΣ/ΜΥΝ)	<ul style="list-style-type: none"> Χρόνια μυελομονοκυτταρική λευχαιμία Άτυπη χρόνια μυελογενής λευχαιμία, BCR-ABL-αρνητική Νεανική μυελομονοκυτταρική λευχαιμία ΜΔΣ/ΜΥΝ, αταξινόμητο Προσωρική οντότητα: Ανθεκτική αναιμία με δακτυλιοειδείς σιδηροβλάστες και θρομβοκυττάρωση
Μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα	<ul style="list-style-type: none"> Ανθεκτική αναιμία με μονογραμμική δυσπλασία (ανθεκτική αναιμία, ανθεκτική ουδετεροπενία, ανθεκτική θρομβοπενία) Ανθεκτική αναιμία με δακτυλιοειδείς σιδηροβλάστες Ανθεκτικές κυτταροπενίες με διγραμμική, ή τριγραμμική δυσπλασία ΜΔΣ με <i>del(5q)</i> ΜΔΣ, αταξινόμητο ΜΔΣ παιδικής ηλικίας Προσωρινή οντότητα: Ανθεκτικές κυτταροπενίες παιδικής ηλικίας
Οξεία μυελογενής λευχαιμία και συγγενή νεοπλασμάτα	<ul style="list-style-type: none"> ΟΜΛ με συχνές γενετικές βλάβες: <ul style="list-style-type: none"> ΟΜΛ με <i>t(8;21)(q22;q22)</i>; <i>RUNX1-RUNX1T1</i> ΟΜΛ με <i>inv(16)(p13.1;q22)</i>, or <i>t(16;16)(q13.1;q22)</i>; <i>CBFB-MYH11</i> Οξεία προμυελοκυτταρική λευχαιμία με <i>t(15;17)(q22;q12)</i>; <i>PML-RARA</i> ΟΜΛ με <i>t(9;11)(p22;q23)</i>; <i>MLLT3-MLL</i> ΟΜΛ με <i>t(6;9)(p23;q34)</i>; <i>DEK-NUP214</i> ΟΜΛ με <i>inv(3)(q21;q26.2)</i>, or <i>t(3;3)(q21;q26.2)</i>; <i>RPN1-EVI1</i> ΟΜΛ (μεγακαρυοβλαστική) με <i>t(1;22)(p13;q13)</i>; <i>RBM15-MKL1</i> Προσωρινή οντότητα: ΟΜΛ με μετάλλαξη της <i>NPM1</i> Προσωρινή οντότητα: ΟΜΛ με μετάλλαξη του <i>CEBPA</i> ΟΜΛ με μυελοδυσπλαστικές αλλοιώσεις Μυελοειδή νεοπλασμάτα συνδεδεμένα με προηγούμενη θεραπεία ΟΜΛ μη περαιτέρω ταξινομούμενη <ul style="list-style-type: none"> ΟΜΛ με ελάχιστη διαφοροποίηση ΟΜΛ χωρίς ωρίμανση ΟΜΛ με ωρίμανση Οξεία μυελομονοκυτταρική λευχαιμία Οξεία μονοβλαστική/μονοκυτταρική λευχαιμία Οξεία ερυθρολευχαιμία Οξεία μεγακαρυοβλαστική λευχαιμία Οξεία βασεοφιλική λευχαιμία Οξεία πανμυέλωση με μυελοϊνώση Μυελικό σάρκωμα Μυελοϋπερπλασία σχετιζόμενη με σύνδρομο Down <ul style="list-style-type: none"> Παροδική παθολογική μυελοποίηση Μυελογενής λευχαιμία σχετιζόμενη με σύνδρομο Down Νεόπλασμα από βλαστικά πλασματοκυτταροειδή δενδριτικά κύτταρα

Από τη νέα ταξινόμηση φαίνεται λοιπόν, πως σε κάθε διαγνωστική προσέγγιση είναι πλέον απαραίτητα, εκτός από Μυελόγραμμα:

1. Οστεομυελική βιοψία, για πιο ακριβή εκτίμηση της διήθησης, της κυτταροβρίθειας, της συνύπαρξης ίνωσης, της μορφολογίας των κυτταρικών σειρών, αλλά και για ανοσοϊστοχημική μελέτη με μονοκλωνικά αντισώματα – CD34, ki-67, δείκτες μυελικής ή λεμφικής διαφοροποίησης, δείκτες ωρίμανσης.
2. Καρυότυπος μυελού, για ανεύρεση χρωμοσωμικών ανωμαλιών, που θα ταξινομήσουν τη νόσο, αλλά και θα την κατατάξουν προγνωστικά. Ο καρυότυπος μάλιστα, θα πρέπει να επαναλαμβάνεται σε κάθε επανεξέταση του μυελού, για εκτίμηση της ανταπόκρισης στη θεραπεία, αλλά και πιθανές νέες γενετικές βλάβες.
3. Μοριακή μελέτη, βάσει των αποτελεσμάτων της οστεομυελικής βιοψίας και του καρυότυπου. Για παράδειγμα, σε περίπτωση αδυναμίας αναρρόφησης μυελού των οστών, λόγω πλήρους διήθησής του από το νεοπλασματικό πληθυσμό (“dry tap”), με ισχυρή υποψία προμυελοκυτταρικής λευχαιμίας από τη μορφολογία του επιχρίσματος περιφερικού, αποστέλλεται PCR για *t(15;17)*.

Η θεραπεία αυτού του αιματολογικού νεοπλάσματος δεν έχει αλλάξει ουσιαστικά, για πολλά χρόνια. Η ανταπόκριση στην κλασσική χημειοθεραπεία, εξαρτάται από πολλούς παράγοντες. Κάποιοι από αυτούς είναι ίδιοι για τα περισσότερα νεοπλάσματα, όπως η ηλικία, τα συμπαράμαρτούντα νοσήματα και η εμπειρία του θεραπευτικού κέντρου. Ειδικά όμως για την οξεία μυελογενή λευχαιμία, μελετώντας κυτταρογενετικά τους ασθενείς, βρέθηκε πως μπορούν να χωριστούν σε 3 προγνωστικές ομάδες:³

- **Καλής πρόγνωσης**, με *t(15;17)*, *t(8;21)* και *inv(16)*.
- **Ενδιάμεσης πρόγνωσης**, με φυσιολογικό καρυότυπο, +8, +21, +22, 11q23, *del(9q)*, *del(7q)* και βλάβες, που δεν περιλαμβάνονται στις άλλες κατηγορίες.
- **Κακής πρόγνωσης**, με σύνθετο (complex) καρυότυπο, *del(5q)*, -5, -7 και *abn(3q)*.

Δόθηκε έτσι η δυνατότητα στους Αιματολόγους να ξεχωρίσουν τους ασθενείς που ανταποκρίνονται καλύτερα στη θεραπεία, πιο σπάνια παρουσιάζουν ανθεκτική νόσο και σπανιότερα υποτροπιάζουν. Η μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων από την άλλη, θεωρείται η μόνη θεραπεία που δίνει πιθανότητα ίασης. Πρόκειται όμως για μία διαδικασία που παραμένει με μεγάλο ποσοστό θνητότητας, πολλές επιπλοκές και υψηλό κόστος. Η απόφαση για μεταμόσχευση εξαρτάται από την προγνωστική ομάδα και το διαθέσιμο δότη (Πίνακας 3).⁴

Πίνακας 3. Ενδείξεις για την τρέχουσα πρακτική αλλογενούς και αυτόλογης μεταμόσχευσης αιμοποιητικών κυττάρων (The EBMT Handbook 6th Edition, chapter 18).

Στάδιο νόσου	Τύπος δότη	Συμβατός μη-συγγενής (≥10/10 συμβατά αντιγόνα)	Μη-συμβατός δότης	Αυτόλογη μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων
	HLA συμβατός συγγενής δότης			
Καλής πρόγνωσης ΟΜΛ σε πλήρη ύφεση 1	Κλινική επιλογή, μπορεί να πραγματοποιηθεί μετά από προσεκτική αξιολόγηση κινδύνου-όφελους	Ερευνητική	Γενικά δεν συνιστάται	Κλινική επιλογή
Ενδιάμεσης πρόγνωσης ΟΜΛ σε πλήρη ύφεση 1	Απόλυτη ένδειξη	Κλινική επιλογή	Ερευνητική	Απόλυτη ένδειξη
Κακής πρόγνωσης ΟΜΛ σε πλήρη ύφεση 1	Απόλυτη ένδειξη	Απόλυτη ένδειξη	Κλινική επιλογή	Κλινική επιλογή
ΟΜΛ σε πλήρη ύφεση 2	Απόλυτη ένδειξη	Απόλυτη ένδειξη	Κλινική επιλογή	Κλινική επιλογή
ΟΜΛ σε πλήρη ύφεση 3, αρχόμενη υποτροπή	Απόλυτη ένδειξη	Κλινική επιλογή	Ερευνητική	Γενικά δεν συνιστάται
ΟΜΛ-M3, μοριακή επιμονή	Απόλυτη ένδειξη	Κλινική επιλογή	Γενικά δεν συνιστάται	Γενικά δεν συνιστάται
ΟΜΛ-M3, μοριακή πλήρης ύφεση 2	Απόλυτη ένδειξη	Κλινική επιλογή	Γενικά δεν συνιστάται	Απόλυτη ένδειξη
Υποτροπιάζουσα, ή ανθεκτική νόσος	Κλινική επιλογή	Ερευνητική	Ερευνητική	Γενικά δεν συνιστάται

Οι κατευθυντήριες οδηγίες όμως δίνουν μόνο προτάσεις, ξεκαθαρίζοντας πως η κάθε μεταμοσχευτική ομάδα θα πρέπει να καθορίσει τη δική της στρατηγική και πως εντέλλει η απόφαση θα πρέπει να είναι εξατομικευμένη.

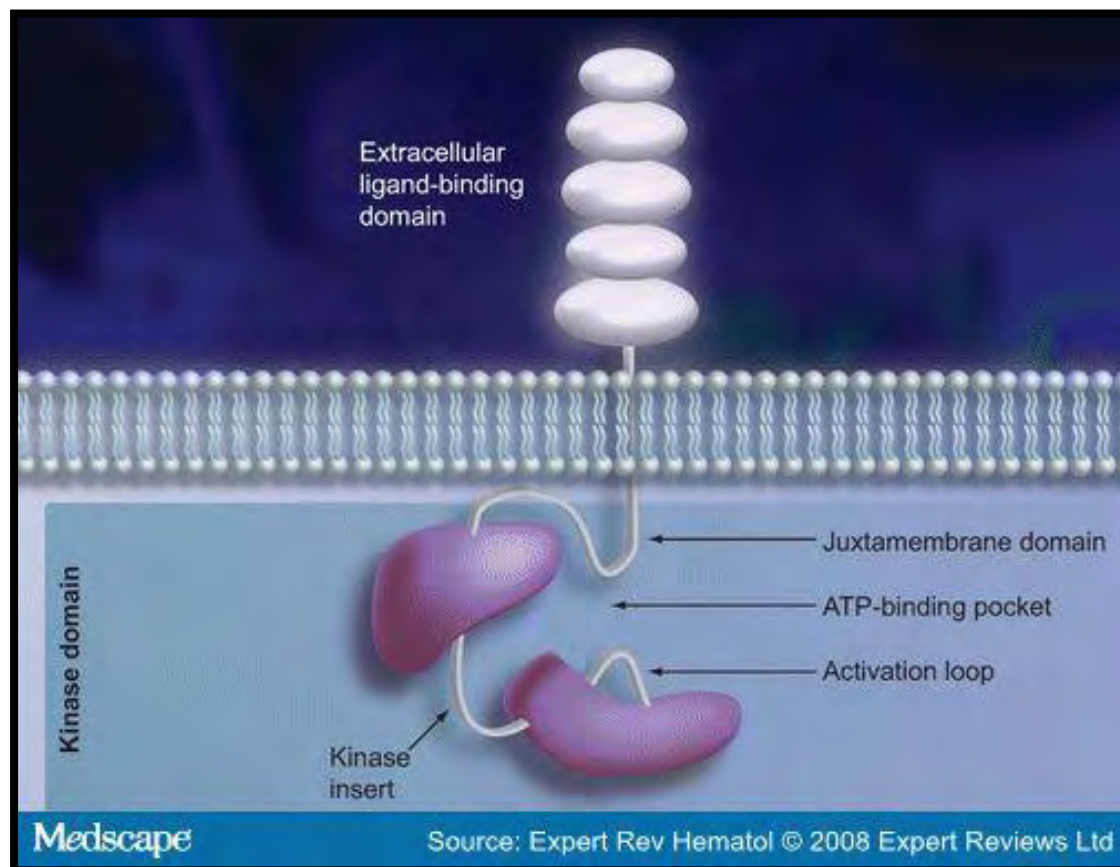
Οι μισοί περίπου ασθενείς με ΟΜΛ, ανήκουν στην ενδιάμεσης πρόγνωσης κατηγορία, με φυσιολογικό καρυότυπο. Μελετήθηκαν κάποιες μεταλλάξεις οι οποίες φαίνεται να ξεχωρίζουν ειδικά σε αυτή την ομάδα τους ασθενείς με μεγαλύτερο, ή μικρότερο κίνδυνο να εμφανίσουν υποτροπή, μετά την επίτευξη πλήρους ύφεσης με χημειοθεραπεία, βοηθώντας έτσι στην απόφαση για μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων. Τέτοιες είναι οι μεταλλάξεις του *FLT3*, της *NPM1* και του *CEBPA*, προτείνοντας μάλιστα να μελετώνται πάντα σε ασθενείς με φυσιολογικό καρυότυπο, που πρόκειται να πάρουν χημειοθεραπεία.⁵

Ο υποδοχέας FLT3

Το γονίδιο του υποδοχέα *FLT3* (*Fms-like tyrosine kinase 3*), βρίσκεται στο χρωμόσωμα 13q12 και αποτελείται από 3,422 νουκλεοτίδια (24 εξώνια), με ένα μεταγραφικό προϊόν 993 αμινοξέων.⁶ Η πρωτεΐνη-υποδοχέας αποτελείται από (Εικόνα 1):

- Μία εξωκυττάρια περιοχή (541 αμινοξέα), με 5 επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, με δομή όμοια με τις ανοσοσφαιρίνες (*Ig-like*), για τη σύνδεση με το συνδότη του (*ligand*).
- Ένα διαμεμβρανικό τμήμα (21 αμινοξέα).
- Ένα ενδοκυττάριο τμήμα (431 αμινοξέα):
 - Υπομεμβρανικό τμήμα (46 αμινοξέα)
 - Περιοχή τυροσινικής κινάσης 1, για σύνδεση ATP (103 αμινοξέα)
 - Περιοχή ενδιάμεση των κινασών (*Kinase insert domain*, 72 αμινοξέα)
 - Περιοχή τυροσινικής κινάσης 2, καταλυτική – βρόγχος ενεργοποίησης (*activation loop*, 167 αμινοξέα)
 - Και ένα καρβοξυτελικό τμήμα (*c-end*, 43 αμινοξέα).

Εικόνα 1. Σχηματική απεικόνιση της δομής του υποδοχέα (Khaled el-Shami et al. *Expert Rev Hematol.* 2008;1(2):153-160).



Ο *FLT3*-υποδοχέας, ανήκει στην οικογένεια των τάξεως *III* υποδοχέων τυροσινικής κινάσης, μαζί με τους *PDGFRα*, *PDGFRβ*, *c-KIT* και *CSF1R*, λόγω της όμοιας δομής τους με τις 5 εξωκυττάρια *Ig-like* αλληλουχίες και τις δύο ενδοκυττάρια περιοχές τυροσινικής κινάσης.

Ο υποδοχέας ενεργοποιείται φυσιολογικά από το συνδέτη του (*FLT3-ligand, FLT3-L*), ο οποίος συνδέεται στην εξωκυττάρια περιοχή. Κλωνοποιώντας τον ανθρώπινο συνδέτη, φάνηκε σε καλλιέργειες *CD34+* προγονικών κυττάρων μυελού πως προκαλούσε μόνος του μία μικρή δημιουργία αποικιών. Προσθέτοντας όμως *GM-CSF* (*granulocyte-macrophage colony stimulating factor*) και *IL3*, παρατηρούνταν συνεργική δράση, κατατάσσοντάς τον στους αυξητικούς παράγοντες, ενώ δεν

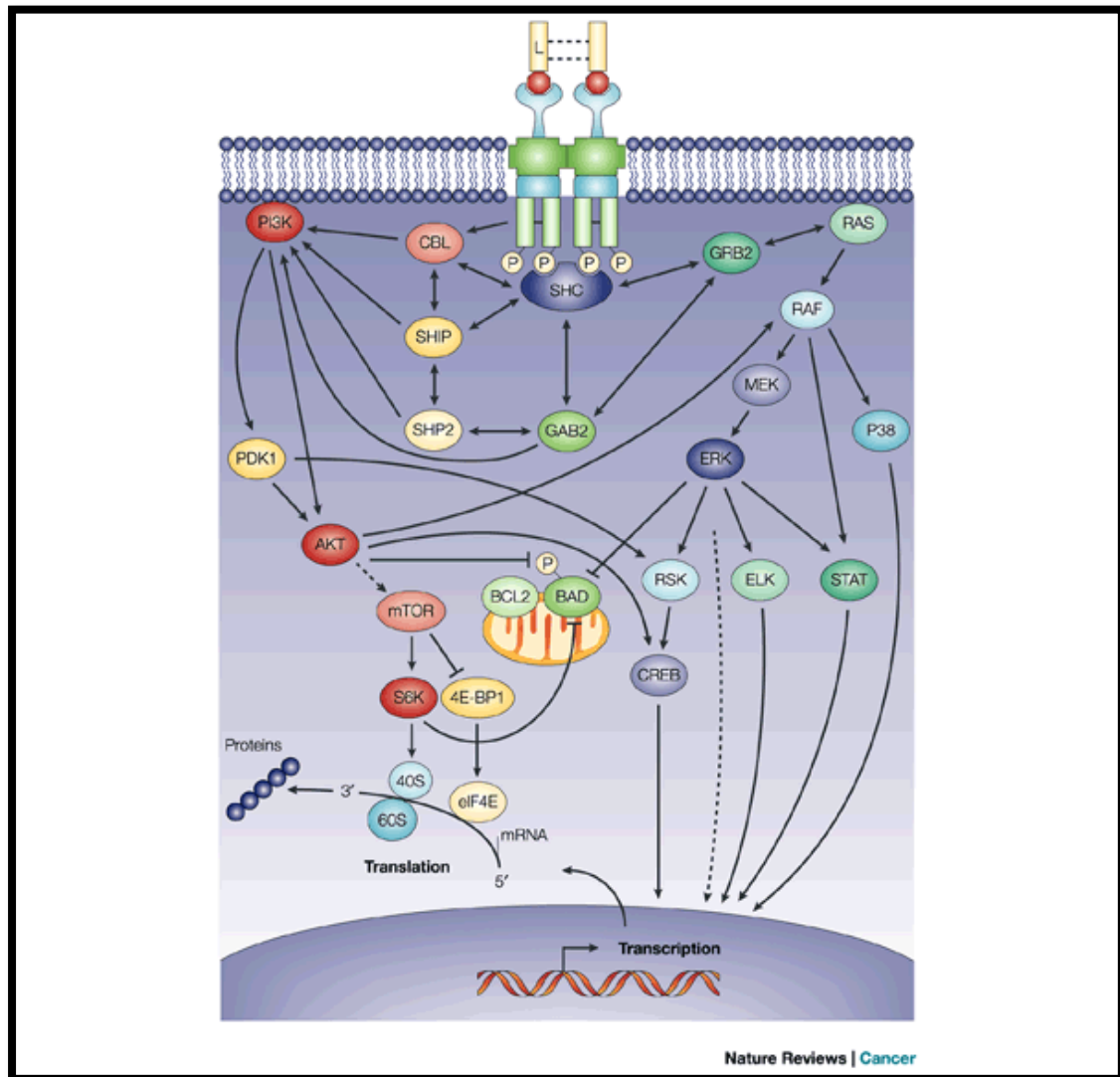
παρατηρούνταν καμία επίδραση στην ερυθρά σειρά, ακόμη και με την προσθήκη ερυθροποιητίνης.⁷ Γενετικά τροποποιημένα ποντίκια, με ανεπάρκεια του συνδέτη (FLT3L-/-), αναπτύχθηκαν φυσιολογικά, αλλά διαπιστώθηκαν ανεπάρκειες, με σημαντικά μειωμένη κυτταροβρίθεια από τη λευκή σειρά στο μυελό, το περιφερικό αίμα, το σπλήνα και τους λεμφαδένες τους. Πολύ μειωμένοι ήταν κυρίως οι αριθμοί των δενδριτικών κυττάρων και των NK-κυττάρων (υποδεικνύοντας το ρόλο του FLT3-L και στην ανοσιακή απάντηση), ενώ οι αριθμοί διορθώνονταν μετά από 10 ημέρες χορήγησης του συνδέτη στα πειραματόζωα.⁸ Ο FLT3-L, εκφράζεται σε μεγάλες ποσότητες σαν διαμεμβρανική πρωτεΐνη σε ενδοθηλιακά κύτταρα, στα στρωματικά κύτταρα του μικροπεριβάλλοντος του μυελού των οστών (ινοβλάστες), σε B- και T-λεμφοκύτταρα και σε κύτταρα της κοκκιώδους σειράς, από όπου μπορεί να αποσυνδεθεί και να κυκλοφορεί και σε διαλυτή μορφή.⁹⁻¹¹ Και οι δύο μορφές του συνδέτη είναι βιολογικά ενεργές. Το γονίδιο για τον FLT3-L, βρίσκεται στο χρωμόσωμα 19q13.3. Η τρισωμία 19, έχει βιβλιογραφικά συνδεθεί με αιματολογικές κακοήθειες.¹⁵

Όταν συνδεθεί με τον υποδοχέα, ο συνδέτης προκαλεί διμερισμό του δεύτερου, με αποτέλεσμα την φωσφορυλίωση και ενεργοποίησή του (Εικόνα 2).

Ένα από τα μονοπάτια που εμπλέκονται, είναι της PI3-κινάσης.¹² Το PI3K/AKT-μονοπάτι, είναι από τα πιο ενεργοποιημένα μονοπάτια στον καρκίνο γενικά. Η PI3-κινάση λοιπόν, φωσφορυλιώνει την AKT (protein-kinase B), την PDK1 (3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1) και τον mTOR (mammalian target of rapamycin), που ξεκινούν τη μεταγραφή και μετάφραση σημαντικών ρυθμιστικών του κυτταρικού κύκλου γονιδίων.¹² Επιπλέον φωσφορυλιώνει την BAD (BCL2-antagonist of cell death), αναστέλλοντας την απόπτωση.¹²

Άλλο μονοπάτι που συμμετέχει είναι το Ras-Raf-MEK-ERK.¹³ Ο FLT3 αλληλεπιδρά με τις RAS, που ενεργοποιούν φωσφορυλιώνοντας με τη σειρά τις πρωτεΐνες RAF, MAPK/ERK-κινάσες (MEKs), την ERK (extracellular-signal-regulated kinase) και την RSK (90 kDa Ribosomal protein S6 kinase).¹³ Όλοι αυτοί οι παράγοντες ενεργοποιούν τις STATs (signal transducer and activators of transcription), που οδηγούν σε μεταγραφή γονιδίων που ρυθμίζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.¹³

Εικόνα 2. Βιοχημικά μονοπάτια που πιθανώς ενεργοποιούνται μετά από φωσφορυλίωση του FLT3. Stirewalt DL, Radich JP. *Nature Reviews* 2003, *Cancer* 3, 650-665.



Ο υποδοχέας FLT3 εκφράζεται στο μυελό και στο ομφαλοπλακουντιακό αίμα, στα ικανά για αυτοανανέωση αρχέγονα πολυδύναμα αιμοποιητικά κύτταρα.¹⁴ Επιπλέον, εκφράζεται όχι μόνο σε προγονικά κύτταρα της λεμφικής, αλλά και της μυελικής σειράς,¹⁴ ενώ χάνεται στα πιο προχωρημένα στάδια ωρίμανσης.¹⁶ Γενετικά τροποποιημένα ποντίκια που τους έλειπε ο υποδοχέας ήταν φυσιολογικά, υγιή και γόνιμα. Δεν υπήρχε καμία διαφορά με τα άγριου-τύπου ποντίκια, όσον αφορά την κυτταροβρίθεια των αιμοποιητικών τους οργάνων.¹⁷ Στο μυελό τους όμως, είχαν

μειωμένους αριθμούς προ-B λεμφοκυττάρων, ενώ το ποσοστό των πιο ώριμων β-κυττάρων ήταν φυσιολογικό.¹⁷ Επιπλέον, παρουσίαζαν μειωμένη ικανότητα αποκατάστασης της κυτταροβρίθειας του μυελού ακτινοβολημένων πειραματόζων μετά από μεταμόσχευση.¹⁷ Όσον αφορά την έκφρασή του σε λευχαιμικά κύτταρα, έχει βρεθεί σε υψηλά επίπεδα στο 70-100% των οξείων μυελογενών και σε μεγάλο ποσοστό οξείων λεμφοβλαστικών λευχαιμιών.^{23,24} Για παράδειγμα, σε μία εργασία του 1996, FLT3-RNA ανιχνεύθηκε σε υψηλότερα επίπεδα από ό,τι στο φυσιολογικό μυελό, σε 33 από τις 33 Β-ΟΛΛ που μελετήθηκαν, σε 11 από τις 12 ΟΜΛ και 3 από τις 11 Τ-ΟΛΛ αντίστοιχα²⁴. Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν το ρόλο που μπορεί να παίζει ο FLT3 στην επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των λευχαιμικών κυττάρων.

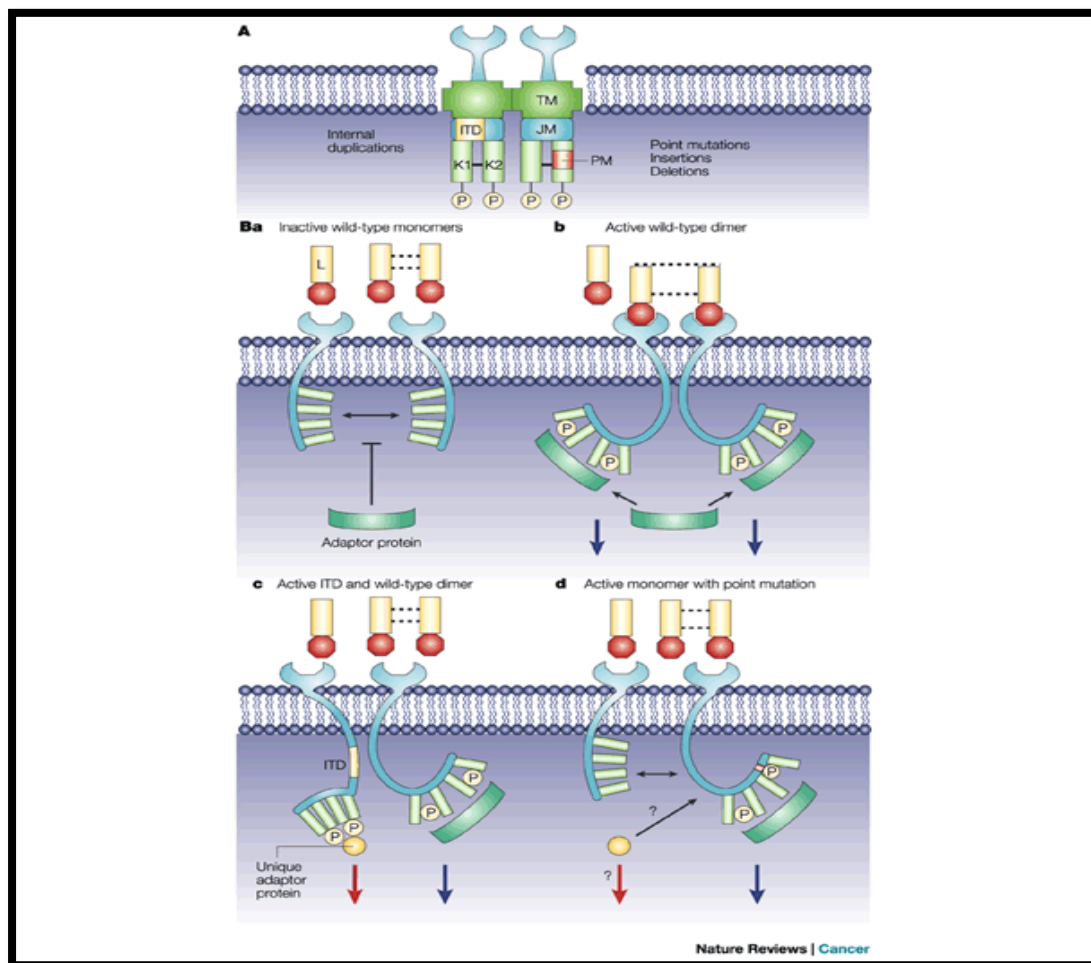
Μεταλλάξεις του FLT3 περιγράφηκαν πρώτη φορά το 1996, επιβεβαιώθηκαν και από άλλες ομάδες ερευνητών και από τότε ασταμάτητα είναι η έρευνα τα τελευταία 20 έτη, για το είδος των μεταλλάξεων, τη σημασία τους στη λευχαιμογένεση, ακόμη και τα αποτελέσματα της χορήγησης σε ασθενείς με λευχαιμία αναστολέων τυροσινικής κινάσης με πιθανή δράση και στον FLT3 (Midostaurin, Lestaurtinib, Tandutinib, Sunitinib, Sorafenib, Quizartinib).¹⁸ Δύο είναι οι μεταλλάξεις που φαίνεται πως παίζουν ρόλο στη λειτουργία του υποδοχέα και συναντώνται σε ασθενείς με οξεία μυελογενή λευχαιμία – η FLT3-ITD και μία σημειακή, συνήθως στο κωδικόνιο D835.

Η ITD-μετάλλαξη του υποδοχέα (internal tandem duplication), περιγράφηκε πρώτη φορά το 1996, όταν σε 5 από τους 30 ασθενείς με οξεία μυελογενή λευχαιμία που μελετήθηκαν, μετά από ενίσχυση του υπομεμβρανικού τμήματος του υποδοχέα, το προϊόν της PCR ήταν μεγαλύτερο και μετά από ανάλυση βρέθηκε ένας αναδιπλασιασμός τμήματος της αλληλουχίας.¹⁸ Σε διάφορες μελέτες και άλλων ερευνητών, η μετάλλαξη αυτή ανευρίσκονταν σε 20-30% των ασθενών με οξεία μυελογενή λευχαιμία. Μελετώντας άλλες κακοήθειες, δεν ανευρίσκεται σε ασθενείς με μη-Hodgkin λέμφωμα, πολλαπλούν μυέλωμα, χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία, ενώ ανευρίσκεται σε 3 έως 15% (ανάλογα με τη μελέτη) των ασθενών με μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα και σπάνια σε οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία και χρόνια μυελογενή λευχαιμία.^{19,21,22} Ανάλυση φυσιολογικών δειγμάτων μυελού και

ομφαλοπλακουντιακού αίματος δεν έδειξε την παρουσία της μετάλλαξης σε υγιείς ανθρώπους.²⁰

Η ITD-μετάλλαξη, ανεξάρτητα από το μήκος του αναδιπλασιασμού, οδηγεί σε ανεξάρτητη από το συνδέτη φωσφορυλίωση του υποδοχέα (Εικόνα 3).²⁵

Εικόνα 3. Α – Οι ITD-μεταλλάξεις συμβαίνουν στα εξώνια 14 ή 15 του υπομεμβρανικού τμήματος, ενώ οι σημειακές στο εξώνιο 20 της περιοχής τυροσινικής κινάσης 2. **Β** – Πιθανοί τρόποι ενεργοποίησης του άγριου τύπου και του μεταλλαγμένου υποδοχέα: **Ba** – Χωρίς το συνδέτη, ο υποδοχέας παραμένει στην ανενεργή μονομερή μορφή του. **Bb** – Μετά από τη σύνδεση του συνδέτη: διμερισμός, φωσφορυλίωση (P) και σύνδεση «πρωτεϊνών-προσαρμογέων», που μεταφέρουν τα σήματα στο εσωτερικό του κυττάρου. **Bc** – Η ITD-μετάλλαξη πιθανώς οδηγεί σε ανεξάρτητο από το συνδέτη διμερισμό, προκαλώντας ενεργοποίηση των μονοπατιών που ενεργοποιεί και ο φυσιολογικός υποδοχέας, αλλά και άλλων (unique adaptor protein – κόκκινο βέλος). **Bd** – Οι σημειακές μεταλλάξεις πιθανώς όμοια επάγουν το διμερισμό του υποδοχέα. (Stirewalt DL, Radich JP. *Nature Reviews* 2003, *Cancer* 3, 650-665).



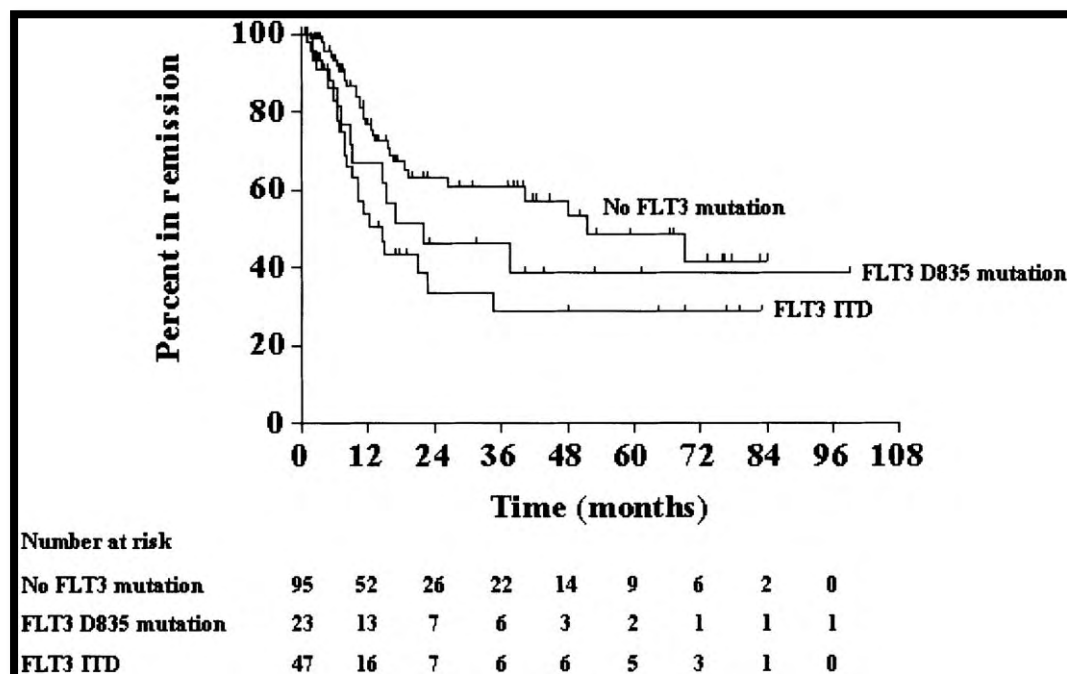
Μεταλλαγμένοι κλώνοι σε πειράματα πολλαπλασιάζονται και το 90% των κυττάρων παραμένουν ζωντανά, χωρίς την παρουσία IL-3.^{13,26} Στις ίδιες μελέτες, διαπιστώνεται φωσφορυλίωση της MAP-κινάσης και ενεργοποιημένος STAT5 στα FLT3-ITD λευχαιμικά κύτταρα, ενώ ο STAT5 δεν ενεργοποιείται στα άγριου-τύπου, μετά από προσθήκη του FLT3-ligand. Η φωσφορυλίωση δηλαδή του ενεργοποιητή μετάφρασης προκαλείται από τη μετάλλαξη και δεν ανήκει στα μονοπάτια που φυσιολογικά ενεργοποιούνται από τον υποδοχέα. Επίσης, δεν διαπιστώνεται ενεργοποίηση της JAK2, που στο φυσιολογικό κύτταρο είναι αυτή που, μετά από σύνδεση της ερυθροποιητίνης ενεργοποιεί τη STAT5. Η ενεργοποίηση του JAK-STAT – μονοπατιού θα μπορούσε να εξηγήσει και τον υψηλότερο αριθμό λευκών με τα οποία διαγιγνώσκονται οι FLT3-ITD+ ασθενείς.⁷⁹ Τα FLT3-μεταλλαγμένα ποντίκια είναι ανθεκτικά σε επαγωγή της απόπτωσης, π.χ. με ακτινοβολήση (γ-irradiation), ενώ ενσωμάτωση της ITD-μετάλλαξης σε συγγενή ποντίκια προκαλεί νόσο, ομοιάζουσα με λευχαιμία, με ηπατο-σπληνομεγαλία και διήθηση του μυελού από βλαστόμορφα κύτταρα.²⁶ Αυτά τα ποντίκια πεθαίνουν 5 εβδομάδες μετά την ένεση του μεταλλαγμένου γονιδίου.

Σε μία ανασκόπηση του 2002, ο συνδυαστικός υπολογισμός της συχνότητας της FLT3-ITD σε 1,595 ασθενείς με οξεία μυελογενή λευχαιμία από όλες τις μελέτες μέχρι τότε, ήταν 24% (385 ασθενείς).²⁷ Η συχνότητα στους παιδιατρικούς ασθενείς είναι μικρότερη από ό,τι στους ενήλικες (5-15% περίπου, ανάλογα με τη μελέτη).^{28,29,30} Η συσχέτιση της μετάλλαξης με τον υπότυπο FAB, δίνει διαφορετικά αποτελέσματα, ανάλογα με τη μελέτη. Σε μικρούς αριθμούς ασθενών, αναφέρονται οι M0,³¹ M4,^{18,34} και M5¹⁸ ως οι πιο συχνές υποκατηγορίες, ενώ σε 2 μεγάλες μελέτες, με 1000 ασθενείς η καθεμία, πάλι τα αποτελέσματα είναι διαφορετικά – στη μία το μεγαλύτερο ποσοστό θετικών ασθενών ήταν στη M5 υποκατηγορία και τα μικρότερα ποσοστά στη M2 και τη M6, με το 40% μάλιστα των M5 που εντάχθηκαν στη μελέτη να είναι θετικοί στη μετάλλαξη.³² Στην άλλη μεγάλη μελέτη, το 55% περίπου των θετικών στη μετάλλαξη ανήκαν στη M2 και M1 κατηγορία, ενώ στη M5 ανήκαν το 12.5% των ασθενών.³³

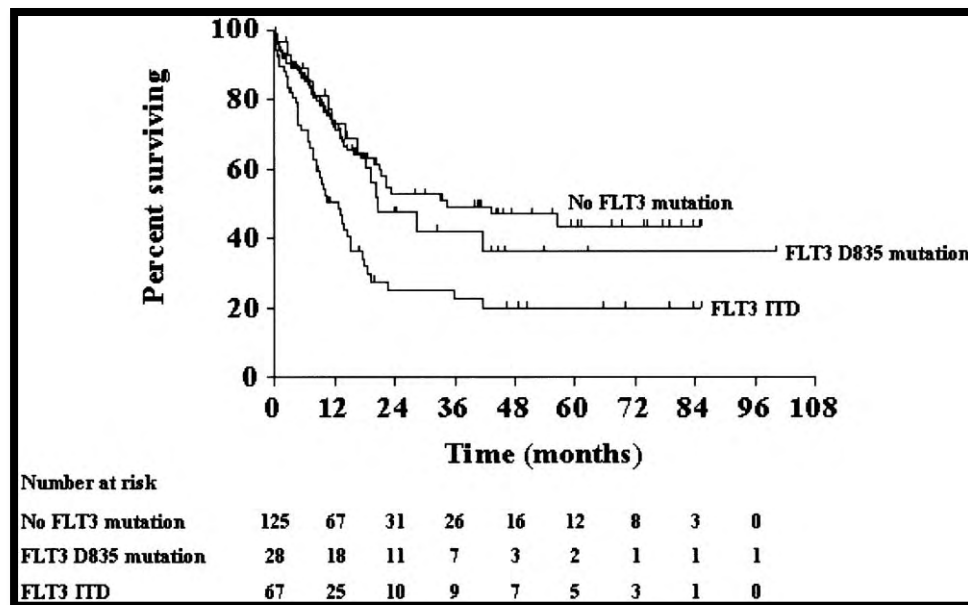
Ασθενείς με οξεία μυελογενή λευχαιμία και την FLT3-ITD-μετάλλαξη με φυσιολογικό καρυότυπο έχουν μελετηθεί πολλές φορές για να διευκρινιστεί η σημασία της στην

πορεία της νόσου, προσπαθώντας να ξεχωρίσουν εκείνοι οι ασθενείς της ενδιάμεσης πρόγνωσης λόγω του καρυότυπου, που θα επωφελούνταν από αλλογενή μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων. Σε 2 μεγάλες μετα-αναλύσεις οι ασθενείς κατά τη διάγνωση εμφανίζονται με υψηλότερες τιμές λευκοκυττάρων, βλαστών στο περιφερικό και το μυελό και τιμές γαλακτικής αφυδρογονάσης (LDH).^{35,36} Στην πρώτη ανάλυση, με 1,160 ασθενείς από 4 μελέτες, οι FLT3-ITD+ έχουν στατιστικά σημαντική χειρότερη πρόγνωση (συνολική επιβίωση και επιβίωση ελεύθερη νόσου). Στη δεύτερη ανάλυση, με 523 ασθενείς από 2 μελέτες, όπου έλαβαν χημειοθεραπεία με υψηλές δόσεις Κυταραβίνης ως σταθεροποίηση, οι FLT3-ITD+ έκαναν μικρότερης διάρκειας υφέσεις και είχαν μικρότερη συνολική επιβίωση (Εικόνα 4 και 5). Στη μελέτη υπήρχαν και παιδιατρικοί ασθενείς, οπότε φάνηκε πως και στα παιδιά η μετάλλαξη συνδέεται με χειρότερη πρόγνωση. Βάσει τέτοιων μελετών, η συμπεριφορά των μεταμοσχευτικών κέντρων είναι να μεταμοσχεύουν ασθενείς με FLT3-ITD και φυσιολογικό καρυότυπο στην πρώτη ύφεση.

Εικόνα 4. Διάρκεια ύφεσης για τους ασθενείς με φυσιολογικό καρυότυπο, ανάλογα με την παρουσία μεταλλάξεων του FLT3 (Fröhling et al).³⁶



Εικόνα 5. Συνολική επιβίωση για τους ασθενείς με φυσιολογικό καρυότυπο, ανάλογα με την παρουσία μεταλλάξεων του FLT3 (Fröhling et al).³⁶



Στη βιβλιογραφία όμως υπάρχουν και μελέτες (λιγότερες σε αριθμό), που δεν καταλήγουν στα ίδια συμπεράσματα. Σε μία μελέτη των ασθενών της AMLCG-study, όπου συγκρίνονταν 2 θεραπευτικά πρωτόκολλα, μεταξύ ασθενών με τη μετάλλαξη και φυσιολογικών δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στη συνολική επιβίωση και την επίτευξη ύφεσης.³³

Μελέτη του ποσοστού του υποδοχέα που είναι μεταλλαγμένος (ποσοτικό FLT3-ITD) ξεχώρισε 3 ομάδες ασθενών: Με χαμηλό (<25%), ενδιάμεσο (25-50%) και υψηλό επίπεδο μετάλλαξης (>50%). Στις 3 αυτές ομάδες δεν υπήρξε διαφορά στα ποσοστά ύφεσης, αλλά υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά στη συνολική επιβίωση και στην περίοδο ελεύθερη νόσου όσο αυξάνονταν το επίπεδο μετάλλαξης. Στην ίδια μελέτη, δεν συνδυάστηκε το μέγεθος της ITD με την πρόγνωση.⁷²

Η συχνότητα μεταλλάξεων του υποδοχέα FLT3 στα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα είναι βιβλιογραφικά μικρότερη από ό,τι σε ασθενείς με λευχαιμία. Σε 2 μεγάλες πρόσφατες μελέτες το 2011 και το 2013, με μεγάλο αριθμό ασθενών με μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα (1,025 και 1,232 ασθενείς αντίστοιχα), η συχνότητα ήταν 0.7-1.4% και αφορούσε κυρίως τον υπότυπο RAEB I & II.^{38,37} Στις ίδιες μελέτες,

υπήρχαν επιπλέον 291 και 302 αντίστοιχα ασθενείς με ΧΜΜΛ και σε αυτούς η συχνότητα FLT3-ITD ήταν 2.0-2.6%. Η μελέτη της επίπτωσης στην πρόγνωση των ασθενών στις ίδιες μελέτες είναι και εδώ αμφιλεγόμενη. Στη μία³⁸ η παρουσία της μετάλλαξης συνδέθηκε με την πρόοδο σε ΟΜΛ, ενώ στην άλλη³⁷ δεν συνδέθηκε με μειωμένη επιβίωση, ούτε με χειρότερη πρόγνωση.

Οι **σημειακές μεταλλάξεις του υποδοχέα FLT3**, διερευνήθηκαν πρώτη φορά το 2001, αναλύοντας το κωδικόνιο D835 του εξωνίου 20, αντιστοιχώντας το στις μεταλλάξεις στο D816 του c-KIT, που είχαν περιγραφεί μέχρι τότε.^{39,41} Από τότε, η μελέτη σημειακών μεταλλάξεων έχει επαναληφθεί, επιβεβαιώνοντας τα αποτελέσματα. Η συχνότητα είναι 7-11% των ΟΜΛ,³⁹⁻⁴² με πιο συχνή εμφάνιση στον M5 FAB-υπότυπο,³⁹ 0.2-0.5% των ΜΔΣ^{37,38} και 1.6% των CMMML.³⁷ Οι ασθενείς εμφανίζονται με υψηλότερους αριθμούς λευκοκυττάρων και βλαστών στο περιφερικό αίμα και στο μυελό των οστών.^{40,42} Επίσης, δεν ανευρίσκεται σε υγιείς εθελοντές.³⁹ Συνήθως πρόκειται για αντικατάσταση μίας θέσης στο κωδικόνιο D835 (GAT=Ασπαρτικό οξύ) του εξωνίου 20, που οδηγεί σε αλλαγή ενός αμινοξέως στην περιοχή τυροσινικής κινάσης 2 – καταλυτική (βρόγχος ενεργοποίησης - activation loop), ενώ έχουν περιγραφεί και μεταλλάξεις στο επόμενο κωδικόνιο (I836):^{39,41}

- Η συχνότερη είναι η αντικατάσταση της Γουανίνης σε Θυμίνη, που οδηγεί σε αλλαγή από Ασπαρτικό σε Τυροσίνη (D835Y)
- Η αλλαγή της Αδενίνης σε Θυμίνη, που οδηγεί σε αλλαγή από Ασπαρτικό σε Βαλίνη (D835V).
- Πιο σπάνια οι D835H (Γουανίνη σε Κυτοσίνη = Ασπαρτικό σε Ιστιδίνη), D835E (Θυμίνη σε Αδενίνη ή Γουανίνη = Ασπαρτικό σε Γλουταμάτη) και D835N (Γουανίνη σε Αδενίνη = Ασπαρτικό σε Ασπαραγίνη).

Μελέτες φωσφορυλίωσης απέδειξαν ανεξάρτητη από το συνδέτη ενεργοποίηση, όπως και στην FLT3-ITD (Εικόνα 3).³⁹

Όσον αφορά την πρόγνωση, σε μελέτες ασθενών με ΟΜΛ φαίνεται να μην επηρεάζεται από την παρουσία της μετάλλαξης,^{41,73} ή αναφέρεται χειρότερη πρόγνωση,⁴⁰ ή επηρεάζει δυσμενώς την επιβίωση ελεύθερη νόσου, χωρίς όμως να επηρεάζει τη συνολική επιβίωση.³⁵ Σε μία μεγάλη μελέτη, με 1,107 ασθενείς και 127

θετικούς για σημειακές μεταλλάξεις, η πρόγνωση είναι σημαντικά καλύτερη από των ασθενών με την ITD, ενώ δεν υπάρχει διαφορά σε σχέση με τους ασθενείς χωρίς μετάλλαξη.⁴² Και στα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα, διαφορετικές μελέτες παρουσιάζουν διαφορετικά αποτελέσματα. Σε μία μελέτη με 1,232 ασθενείς με ΜΔΣ, η παρουσία της TKD ήταν συχνότερη στον RAEB υπότυπο, και δε συνδέθηκε με χειρότερη έκβαση.³⁷ Στην ίδια μελέτη μελετήθηκαν και 302 ασθενείς με CMML και δεν παρατηρήθηκε διαφορά στην επιβίωση μεταξύ αυτών που έφεραν τη μετάλλαξη και των ασθενών χωρίς μετάλλαξη. Σε άλλη μία μελέτη με 1,025 ασθενείς όμως, ενώ όμοια η μετάλλαξη ήταν παρούσα αποκλειστικά στον RAEB υπότυπο, συνδέθηκε με εξέλιξη σε ΟΜΛ.³⁸

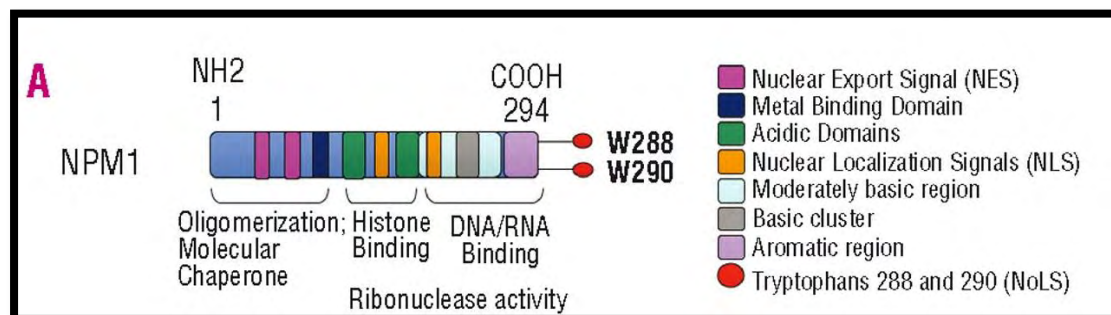
Τα 20 περίπου αυτά έτη της μελέτης της -ITD και της σημειακής μετάλλαξης του FLT3-υποδοχέα μάλλον έχουν μπερδέψει λοιπόν τον κλινικό Αιματολόγο, παρά έχουν βοηθήσει, αφού οι μελέτες κάθε φορά καταλήγουν σε διαφορετικά συμπεράσματα. Η σημειακή μετάλλαξη δεν συνδέεται με χειρότερη επιβίωση στις περισσότερες μελέτες, αλλά υπάρχουν και μελέτες με αντίθετα αποτελέσματα. Η ITD, σχεδόν πάντα έχει χειρότερη πρόγνωση, αλλά υπάρχουν και εργασίες χωρίς διαφορά στην επιβίωση. Αυτός είναι πιθανώς και ο λόγος που οι μεταλλάξεις του FLT3 δεν αναφέρονται στη νέα κατηγορία «ΟΜΛ με συχνές γενετικές βλάβες» (AML with recurrent genetic abnormalities) της νέας ταξινόμησης της Παγκόσμιας οργάνωσης Υγείας του 2008.

Νουκλεοφωσμίνη

Το γονίδιο της Νουκλεοφωσμίνης (αλλιώς NPM1, protein B23, NO38, numatrin), βρίσκεται στο χρωμόσωμα 5q35 και περιέχει 12 εξώνια.⁴⁵ Είναι μία πυρηνική φωσφοπρωτεΐνη, που ανήκει στην οικογένεια των πυρηνικών «συνοδών», μαζί με την NPM2 (nucleoplasm) και την NPM3.^{46,52} Είναι απαραίτητη για την επιβίωση των κυττάρων, αφού αποσιώπηση του γονιδίου σε ποντίκια οδηγεί σε εμβρυονικό θάνατο.⁴⁷ Το μόριο της NPM1 περιέχει διαφορετικούς τομείς, που ευθύνονται για τις διαφορετικές της λειτουργίες, ενώ το αμινοτελικό (N-terminal) υδροφοβικό

κομμάτι περιέχει τα τμήματα που είναι υπεύθυνα για την ολιγομερείωση και τις ιδιότητες συνοδού (Εικόνα 6).⁴⁸

Εικόνα 6. Δομή της Νουκλεοφωσμίνης (Brunangelo et al).⁴⁸



Η πρωτεΐνη NPM1 έχει υψηλή έκφραση σε πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα και αυξάνεται σαν απάντηση σε μιτογόνα ερεθίσματα.⁴⁹ Ανευρίσκεται κυρίως στον πυρηνίσκο, αλλά μετακινείται συνεχώς μεταξύ του πυρήνα και του κυτταροπλάσματος, μεταφέροντας νεοσυντιθέμενες ριβοσωμικές πρωτεΐνες στον πυρήνα.⁵³

Μία από τις κυριότερες λειτουργίες της NPM1, είναι η σύνδεσή της με πρωτεΐνες ARF (ADP Ribosylation Factors) του πυρηνίσκου, κρατώντας τις εκεί ανενεργές⁵¹—πρόκειται για καταστολείς ογκογένεσης της υπεροικογένειας RAS, αφού η ενεργοποίησή τους επάγει την απόπτωση ή την παύση του κυτταρικού κύκλου, μέσω σύνδεσης με την Mdm2 στον πυρήνα (Mouse double minute 2 homolog). Η Mdm2 έχει δράση ουμπικιτίνης, δηλαδή πρωτεΐνης που «σημαδεύει» στόχους για καταστροφή στο πρωτεάσωμα. Εκτός από τη σύνδεση με την Mdm2, οι ARF σταθεροποιούν τον p53 (ογκοκαταστολέας). Στους περισσότερους, αν όχι σε όλους τους καρκίνους ανευρίσκεται απενεργοποίηση του p53 ή των ARF, ή αυξημένη έκφραση της Mdm2.⁶² Η μεταλλαγμένη NPM1 δεν μετακινείται, αλλά παραμένει στο κυτταρόπλασμα και μετατοπίζει εκεί και τις ARF, καθιστώντας τις πιο ευαίσθητες σε αποδόμηση.⁴³

Η NPM1-πρωτεΐνη συμμετέχει στη ρύθμιση της δομής της χρωματίνης του πυρήνα, καθώς συνδέεται με Ιστόνες (H3) για να δημιουργηθεί το νουκλεόσωμα. Το

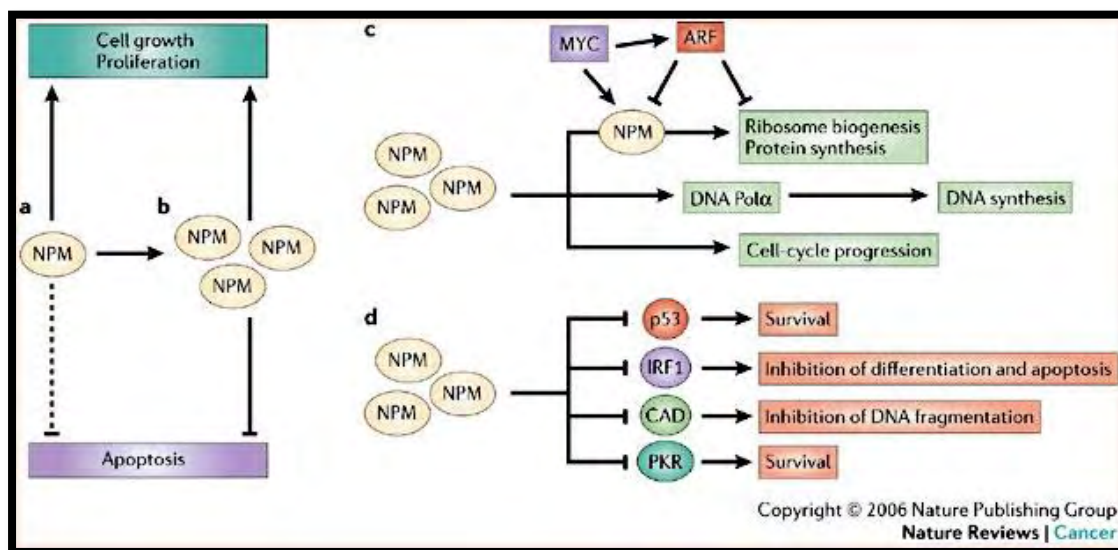
νουκλεόσωμα «διπλώνει» μαζί με τις ιστόνες το DNA, για να δημιουργηθεί η χρωματίνη. Είναι άρα σημαντική για τη σταθερότητα του γονιδιώματος.⁵⁰

Άλλη λειτουργία που αποδίδεται στην NPM1 είναι η συμμετοχή στον διπλασιασμό του κεντροσώματος,⁵⁴ το οποίο είναι οργανίδιο που οργανώνει τους μικροσωληνίσκους για τη δημιουργία της μιτωτικής ατράκτου. Η μεταφορά-μετακίνησή της είναι απαραίτητη για την πρόοδο της S-φάσης του κυτταρικού κύκλου. Όταν η NPM1-εξαγωγή από τον πυρήνα ανασταλεί από τις ARF, τα κύτταρα σταματούν στη φάση G1. Η νουκλεοφωσμίνη που είναι συνδεδεμένη με το κεντρόσωμα αποδομείται μέσω φωσφορυλίωσης από την CDK2/Cyclin E. Η CDK2 (cyclin-dependent kinase 2) είναι καταλυτικό ένζυμο και μαζί με την Cyclin E (πρωτεΐνη-ρυθμιστής του κυτταρικού κύκλου) είναι απαραίτητο σύμπλεγμα για τη μετάβαση από την G1 στην S φάση της κυτταρικής διαίρεσης. Η CDK2/Cyclin E, δίνει μετά το μήνυμα για το διπλασιασμό του κεντροσώματος. Κατά τη φάση S και G2, αποτρέπεται η σύνδεση της NPM1 με το κεντρόσωμα (πιθανώς μέσω του CDK2/Cyclin A συμπλέγματος). Κατά τη μίτωση ξανα-συνδέεται με το κεντρόσωμα, ώστε κάθε θυγατρικό κύτταρο να λάβει ένα κεντρόσωμα συνδεδεμένο με NPM1. Της αποδίδεται δηλαδή η ιδιότητα του «αδειοδότη» του διπλασιασμού του κεντροσώματος.

Άλλες λειτουργίες που έχουν περιγραφεί για τη Νουκλεοφωσμίνη είναι η δράση ενδοριβονουκλεάσης⁵⁵ και αναστολής της δράσης της CAD⁵⁷ (Caspase-activated DNase), πρωτεΐνη που διασπά το DNA κατά την απόπτωση του κυττάρου.

Οι λειτουργίες της Νουκλεοφωσμίνης, αλλά και η δράση της στον καρκίνο, περιγράφονται σχηματικά στην Εικόνα 7.⁵⁶

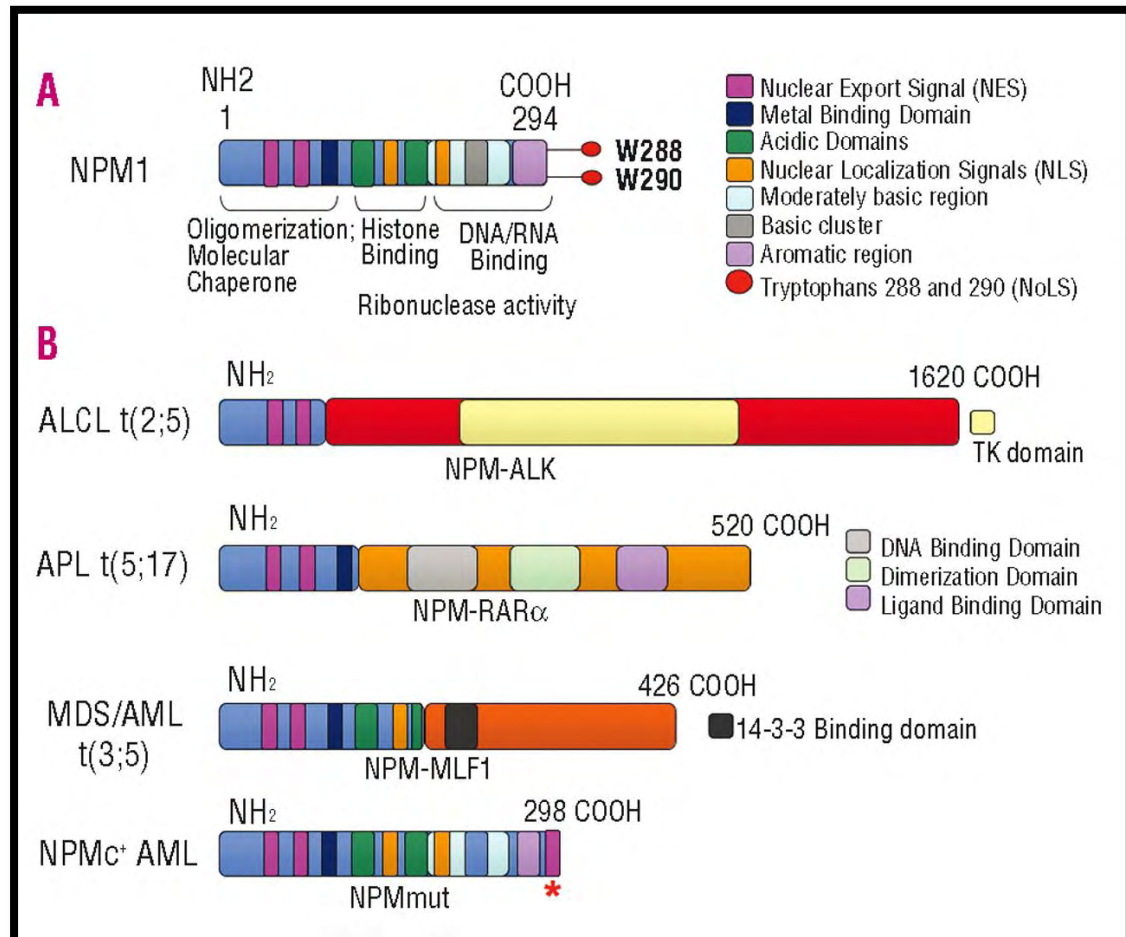
Εικόνα 7. Λειτουργίες της Νουκλεοφωσμίνης και η δράση της στον καρκίνο (Grisendi et al).⁵⁶



- Σε πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα, η NPM1 εκφράζεται σε φυσιολογικά επίπεδα και η ισορροπία μεταξύ πολλαπλασιασμού και απόπτωσης διατηρείται.
- Σε καρκινικά κύτταρα, συχνά υπερεκφράζεται και μπορεί να γίνει ογκογόνος, είτε μέσω αύξησης του πολλαπλασιασμού, είτε μέσω μείωσης της απόπτωσης.
- Η υπερέκφρασή της μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένο πολλαπλασιασμό, μέσω υπερενεργοποίησης της ριβοσωμιακής βιογένεσης. Η NPM1 είναι μεταγραφικός στόχος του MYC (φωσφοπρωτεΐνη-μεταγραφικός παράγοντας – επάγει την r-RNA σύνθεση στον πυρηνίσκο).⁵⁸ Επιπλέον, είναι υποτιθέμενη διεγέρτης της DNA-πολυμεράσης-α, άρα συμμετέχει στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου.
- Η υπερέκφραση της NPM1 αναστέλλει την απόπτωση μέσω διαφορετικών μηχανισμών:
 - Αποτρέπει τη δράση του IRF1 (interferon-regulatory factor 1, ενεργοποιητής μετάφρασης στη σύνθεση ιντερφερόνης).⁶⁰ Πρόκειται για ογκοκαταστολέα, του οποίου το γονίδιο εδράζεται στο 5q31 και έχει αναφερθεί ετερόζυγος απώλεια σε μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα με 5q-deletion.⁶¹
 - Αναστέλλει την καταλυτική δράση του PKR (Eukaryotic initiation factor 2 – σταματάει την m-RNA μετάφραση).⁵⁹
 - Αντιτίθεται στη δράση της CAD, καταστέλλοντας την προαποπτωτική της δράση.⁵⁷
 - Τέλος, αναστέλλει την p53-εξαρτώμενη διακοπή του κυτταρικού κύκλου.⁵¹

Το γονίδιο της Νουκλεοφωσμίνης ανευρίσκεται μεταλλαγμένο, ή αντιμετατεθειμένο σε διάφορα αιματολογικά νεοπλάσματα (Εικόνα 8):

Εικόνα 8. (Brunangelo et al).⁴⁸



- Στο 85% των Αναπλαστικών Λεμφωμάτων από μεγάλα κύτταρα, που ανευρίσκεται η t(2;5) αντιμετάθεση, τα καρκινικά κύτταρα εκφράζουν και άγριου-τύπου NPM1, και την NPM1-ALK χιμερική-πρωτεΐνη.⁶³ Σ'αυτά τα κύτταρα, η NPM1 εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και όχι στον πυρήνα.
- Σε σπάνιες περιπτώσεις Οξείας Προμυελοκυτταρικής Λευχαιμίας με την αντιμετάθεση t(5;17)(q32;q12).⁶⁴
- Στα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα / λευχαιμίες με την αντιμετάθεση t(3;5)(q25;q35) τα λευχαιμικά κύτταρα εκφράζουν και άγριου-τύπου και την

NPM1-MLF1 χειμερική-πρωτεΐνη (*Myelodysplasia/Myeloid leukaemia factor 1*), καθώς και κυτταροπλασματική παρουσία της *NPM1*.⁶⁵

- Βιβλιογραφικά, περίπου 1 στις 3 ΟΜΛ, έχουν μεταλλάξεις της *NPM1*. Μετά από ανάλυση αλληλουχίας ολόκληρου του γονιδίου, βρέθηκαν εισαγωγές 4 πάντα βάσεων^{71,72} (περίπου 50 διαφορετικές έχουν ανακαλυφθεί ως τώρα) στο εξώνιο 12, που προκαλούν μετατόπιση του πλαισίου ανάγνωσης και μακρύτερη πρωτεΐνη, με διαφορετική αλληλουχία αμινοξέων του καρβοξυτελικού άκρου της.^{44,66} Η πιο συχνή θέση εισαγωγής βάσεων είναι το νουκλεοτίδιο 960 (97%)⁷¹ και η συχνότερη τετράδα σε μία μεγάλη μελέτη με 408 θετικούς στη μετάλλαξη ασθενείς, αναφέρεται η TCTG.⁷¹ Με ανοσοϊστοχημεία αποδείχθηκε πως όλες οι μεταλλάξεις οδηγούν σε ανώμαλη κυτταροπλασματική εντόπισή της^{67,71} για το οποίο ευθύνεται η αλλαγή στη δομή του καρβοξυτελικού τμήματος⁴⁴ και κύριο ένοχο για τη λευχαιμογένεση το απορυθμισμένο p53-μονοπάτι.^{51,71}

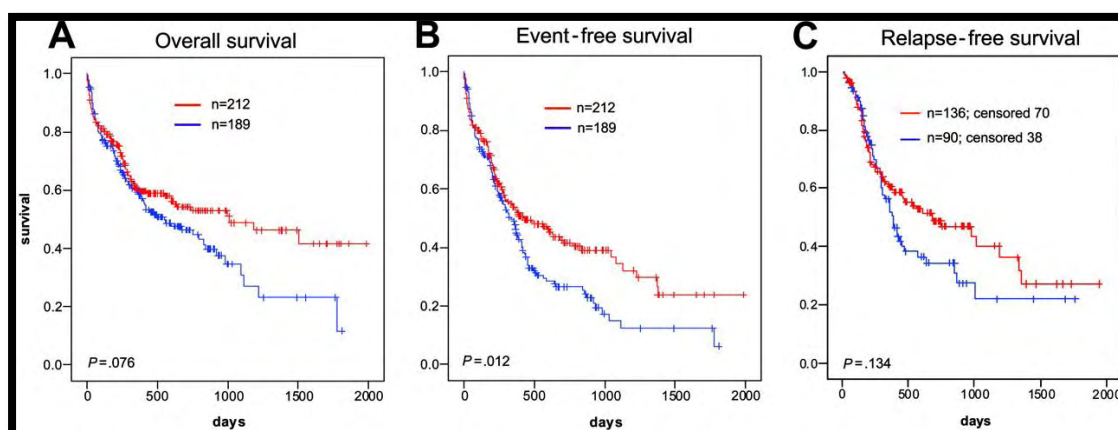
Η συχνότητα των μεταλλάξεων στην οξεία μυελογενή λευχαιμία ποικίλλει σε διάφορες μελέτες από 27.4% έως 41%,^{70,71,72} ενώ σε λευχαιμίες με φυσιολογικό καρυότυπο τα ποσοστά αυξάνονται, έως και 53%.^{68,73} Έχει συνδεθεί δηλαδή στατιστικά με φυσιολογικό καρυότυπο.^{70,71}

Τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών με μεταλλάξεις της Νουκλεοφωσμίνης είναι με υψηλότερα λευκά αιμοσφαίρια στο περιφερικό αίμα,⁶⁹⁻⁷² υψηλότερα ποσοστά θλαστών στο μυελό των οστών^{69,71} και υψηλότερες τιμές LDH,⁶⁹ ενώ έχει συνδεθεί με μονοκυτταρική, ή μυελομονοκυτταρική μορφολογία.^{69,70,72} Είναι πιο συχνές σε γυναίκες^{68,69,71} και σε μεγαλύτερες ηλικίες^{70,72} και συναντώνται πιο συχνά σε *de-novo*, παρά σε δευτεροπαθείς λευχαιμίες.⁷²

Οι ασθενείς με μεταλλάξεις της *NPM1* έχουν υψηλότερα ποσοστά πλήρους ύφεσης,^{68,69} μεγαλύτερες περιόδους ελεύθερες νόσου και καλύτερη συνολική επιβίωση⁶⁸⁻⁷² (Εικόνα 9), ενώ υποτροπιάζουν πιο σπάνια^{68,71} και δεν ωφελούνται από αλλογενή μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων.^{69,73} Αυτά τα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν σε αρκετές μελέτες με μεγάλους αριθμούς ασθενών και από τότε (2005-2006) προτείνεται η *NPM1* να μελετάται, ειδικά σε ασθενείς με φυσιολογικό

καρυότυπο και οι ασθενείς αυτοί να αντιμετωπίζονται βασικά με συμβατική χημειοθεραπεία (σχήματα βασισμένα στην κυταραβίνη).

Εικόνα 9. Kaplan-Meier ανάλυση λευχαιμιών με φυσιολογικό καρυότυπο - οι κόκκινες γραμμές είναι οι ασθενείς που φέρουν τη μετάλλαξη (Schnittger et al).⁶⁸



Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν πρόσφατες παράλληλες ανακοινώσεις για τη δράση των φαρμάκων που χρησιμοποιούμε στην οξεία προμυελοκυτταρική λευχαιμία σε NPM1-μεταλλαγμένες κυτταρικές σειρές.^{98,99} Οι ερευνητές αναφέρουν πως η προσθήκη ρετινοϊκού οξέος, ή αρσενικού στα κύτταρα, οδηγεί σε αποσύνθεση της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης, επαναφορά στον πυρήνα και επανενεργοποίηση της p53-σηματοδότησης. Έπονται μελέτες σε NPM1+ λευχαιμικούς ασθενείς και νέες εξατομικευμένες θεραπείες βάσει του γονιδιακού προφίλ του κάθε ασθενή.

Ανοσοφαινοτυπική ανάλυση των ασθενών με μεταλλαγμένη τη Νουκλεοφωσμίνη έδειξαν πως τα NPM1-μεταλλαγμένα λευχαιμικά κύτταρα είναι CD34-αρνητικά, όπως τα αιμοποιητικά στελεχιαία κύτταρα.⁷⁰

Στα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα αντίστοιχα, η συχνότητα της μετάλλαξης κυμαίνεται μεταξύ 1.5 και 4.4%,^{38,76,77} με μεγαλύτερη συχνότητα στα μυελοδυσπλαστικά/μυελοϋπερπλαστικά – γύρω στο 14%.³⁸ Λίγες μελέτες υπάρχουν στη βιβλιογραφία για μεταλλάξεις στη Νουκλεοφωσμίνη, με μικρούς αριθμούς θετικών ασθενών και μη-αξιόπιστα στατιστικά αποτελέσματα.^{74,75} Σε μία μεγάλη

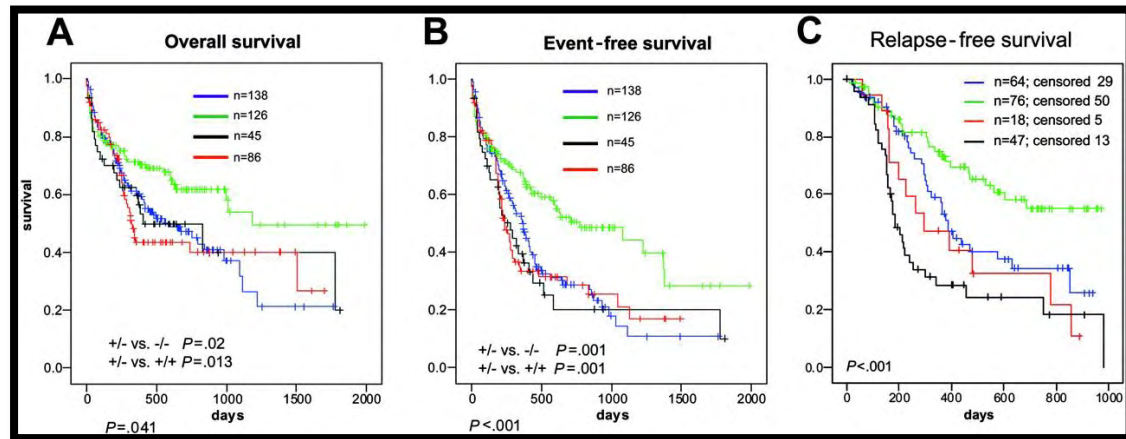
μελέτη από την Αμερική, με 160 ασθενείς με ΜΔΣ, μόνο 7 ασθενείς έφεραν μεταλλάξεις της *NPM1* – αυτοί συσχετίστηκαν θετικά με φυσιολογικό καρυότυπο και ανευρέθηκαν αποκλειστικά σε *RAEB* όσον αφορά τον τύπο, ενώ συσχετίστηκαν αρνητικά με την πρόοδο σε οξεία μυελογενή λευχαιμία.³⁸ Σε μία άλλη μεγάλη μελέτη του 2010, με 262 ασθενείς με μυελοδυσπλαστικό και 7 με *CMMI*, το ποσοστό θετικών ήταν μόλις 1.5% (4 ασθενείς).⁷⁷

Σε μεγάλη Αμερικάνικη μελέτη, αρχικά εντάχθηκαν 1,000 περιστατικά με μυελοδυσπλαστικό και 300 με μυελοδυσπλαστικό/μυελοϋπερπλαστικό, ενώ μελετήθηκαν και οι 2 μεταλλάξεις του *FLT3*. Μόνο σε 160 ασθενείς είχαν αποτελέσματα για *FLT3* και σε αυτούς έγινε και μελέτη της Νουκλεοφωσμίνης. Θετικοί στην *NPM1*-μετάλλαξη ήταν 7 ασθενείς, εκ των οποίων οι 4 είχαν και *FLT3-ITD*. Η μελέτη λοιπόν της πρόγνωσης έγινε πρακτικά σε μικρό αριθμό ασθενών. Ενδιαφέρον είναι πάντως πως στους 14 μήνες παρακολούθησης και οι 4 διπλά θετικοί ασθενείς εξελίχθηκαν σε λευχαιμία στον πρώτο χρόνο, ενώ οι 3 που έφεραν μόνο την *NPM1*-μετάλλαξη παρέμεναν με σταθερή νόσο.³⁸

Σε **διπλές μελέτες** με οξείες μυελογενείς λευχαιμίες, προκύπτει σαφώς και σε πολύ μεγαλύτερους αριθμούς, πως συχνότερα ανευρίσκεται η *FLT3-ITD* στους *NPM1+* από ό,τι στους άγριου-τύπου,^{68-70,72,73} ενώ για την *TKD*-μετάλλαξη υπάρχουν ενδείξεις ότι μπορεί να μην ισχύει το ίδιο.⁷⁰ Η καλή πρόγνωση των ασθενών με *NPM1*-μεταλλάξεις χάνεται χαρακτηριστικά όταν συνυπάρχει η *ITD*-μετάλλαξη του *FLT3*, κατατάσσοντας τους ασθενείς αυτούς ή στην κακή προγνωστική ομάδα των *FLT3-ITD+*,^{68,71} ή στην ομάδα αυτών που δεν φέρουν καμία μετάλλαξη.^{72,73} Οι ασθενείς λοιπόν με φυσιολογικό καρυότυπο, μπορούν να διαχωριστούν βάσει αυτών των 2 μεταλλάξεων σε 3 κατηγορίες (Εικόνα 10 και 11):^{72,73}

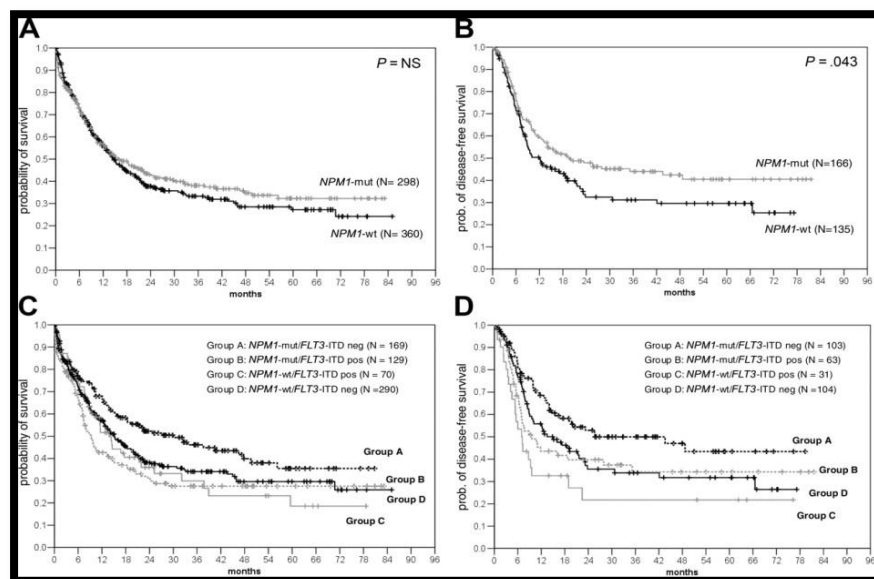
- Καλής πρόγνωσης – *NPM1+/FLT3-*
- Ενδιάμεσης πρόγνωσης – *NPM1-/FLT3-* και *NPM1+/FLT3+*
- Κακής πρόγνωσης – *NPM-/FLT3+*

Εικόνα 10. Kaplan-Meier ανάλυση των ασθενών με ΟΜΛ με φυσιολογικό καρύοτυπο και συνδυασμούς μεταλλάξεων του FLT3 και της NPM1. Οι μπλε γραμμές είναι οι NPM1-/FLT3-, οι πράσινες είναι οι NPM1+/FLT3-, οι μαύρες είναι οι NPM1-/FLT3+ και οι κόκκινες NPM1+/FLT3+ (Schnittger et al).⁶⁸



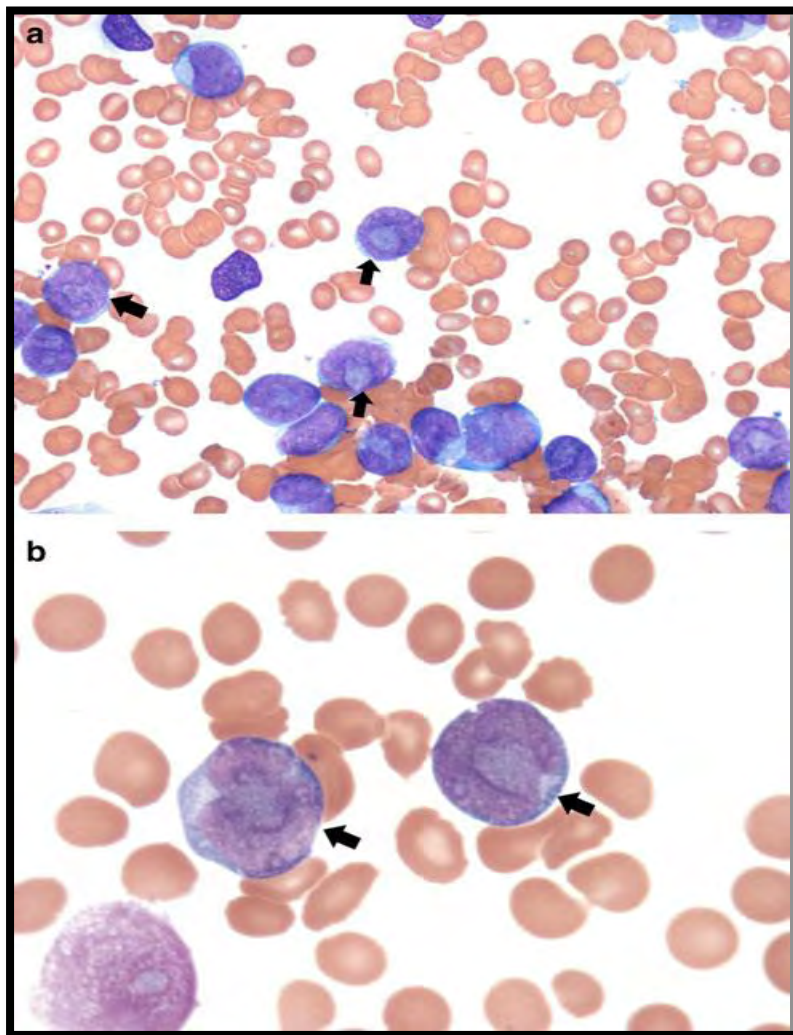
Σε μία μεγάλη μελέτη με 1,500 ασθενείς και μελέτη και των 2 μεταλλάξεων,⁷¹ αναφέρεται πως σε διπλά θετικούς ασθενείς, η NPM1-μετάλλαξη προϋπάρχει χρονικά, υποστηρίζοντας τη θεωρία πως είναι αναγκαία δύο μεταλλαξιγόνα γεγονότα για να προκύψει λευχαιμία.⁸⁹

Εικόνα 11. Kaplan-Meier ανάλυση ασθενών με φυσιολογικού καρύοτυπου ΟΜΛ και μεταλλάξεις της NPM1 και του FLT3. Οι ασθενείς της ομάδας A (NPM1-μετάλλαξη μόνο) είχαν μεγαλύτερη συνολική επιβίωση από τους ασθενείς της ομάδας B (διπλά θετικοί), της ομάδας C (FLT3-ITD μόνο) και της ομάδας D (καμία μετάλλαξη). (Thiede et al).⁷¹



Κάποιοι ερευνητές υποστηρίζουν πως οι διπλά θετικοί βλάστες (*FLT3-ITD+/NMP1+*), έχουν χαρακτηριστική μορφολογία, με «κυπελοειδείς» πυρήνες, ή «δίκην στόματος ψαριού» (Εικόνα 12).^{90,91}

Εικόνα 12. Μυελικό αναρρόφημα, στο οποίο φαίνονται βλάστες με πυρήνες «δίκην στόματος ψαριού» (Jain et al.).⁹⁰



Βάσει του γεγονότος λοιπόν, πως η συνύπαρξη των 2 μεταλλάξεων είναι πολύ συχνή και πως αλλάζει η πρόγνωση, δεν θα πρέπει να μελετώνται ποτέ σε ασθενή, ή σε εργασία μόνο οι μεταλλάξεις της Νουκλεοφωσμίνης, αλλά μαζί με την *ITD* του *FLT3* τουλάχιστον .

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΑΣΘΕΝΕΙΣ-ΥΛΙΚΟ:

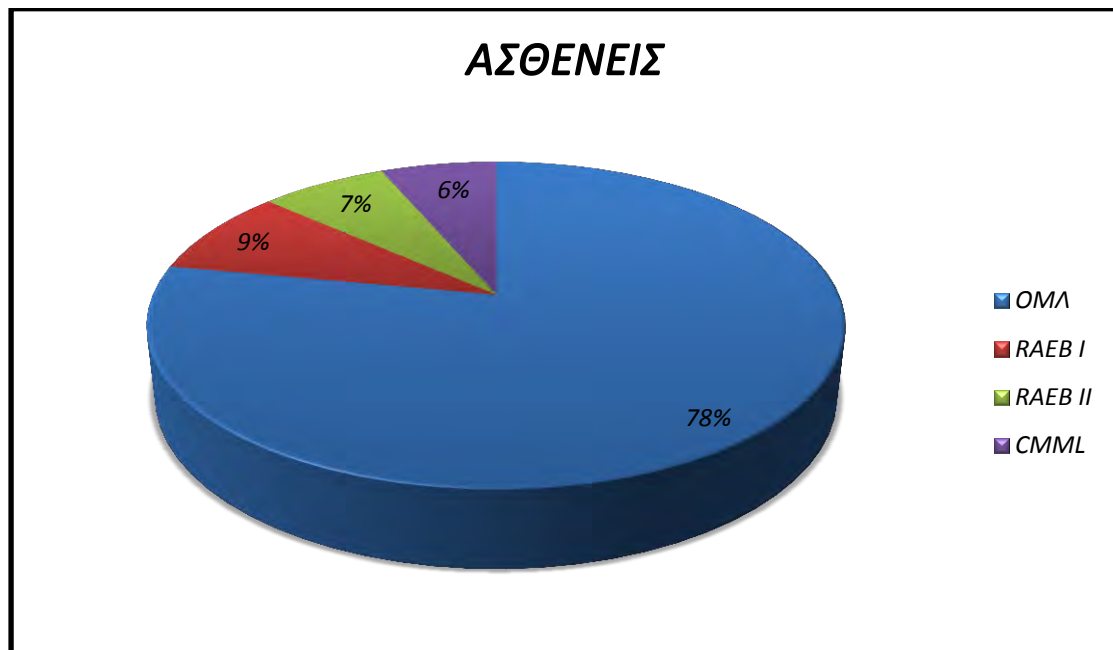
Το πιο παλιό περιστατικό της μελέτης διαγνώσθηκε στις 22/03/2006 και η απομόνωση του DNA είχε γίνει από το Εργαστήριο Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας, σε αποθηκευμένο δείγμα περιφερικού αίματος που είχε σταλεί από την Παθολογική Κλινική του Νοσοκομείου, για ασθενή με λευκοκυττάρωση.

Η συλλογή των δειγμάτων σε αυτή τη διατριβή έγινε μελετώντας τα αρχείο του Εργαστηρίου Ανοσολογίας (DNA, περιφερικό αίμα και στοιβάδα μονοπύρηνων κυττάρων), και το αρχείο γενετικού υλικού της Αιματολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας (επιχρίσματα μυελού των οστών) και έκλεισε 23/11/2011, με δείγμα μυελού των οστών, το οποίο απεστάλη στο εργαστήριο για ανοσοφαινοτυπική ανάλυση. Στο μεγαλύτερο ποσοστό των ασθενών που διαγνώσθηκαν στην Αιματολογική Κλινική, υπήρχαν επιχρίσματα μυελού των οστών κατά τη διάγνωση, αλλά και σε άλλες χρονικές στιγμές κατά την πορεία της νόσου (μετά τη θεραπεία για έλεγχο υπολειπόμενης νόσου, σε ύφεση, στην υποτροπή). Μέσα σε αυτά τα 5 ½ έτη, όσοι ασθενείς είχαν διαγνωσθεί με AML, ή MDS και CMML αρχικά εντάχθηκαν στη μελέτη.

Από τους ασθενείς που αρχικά εντάχθηκαν στη μελέτη, απορρίφθηκαν εκείνοι, στους οποίους δεν υπήρχε φάκελος στην Αιματολογική Κλινική με αναλυτικό ιστορικό, εργαστηριακή παρακολούθηση και πορεία νόσου. Επίσης απορρίφθηκαν ασθενείς στους οποίους ήταν αδύνατον να ανευρεθεί γενετικό υλικό της Διάγνωσης, ή τουλάχιστον δείγμα σε εκτροπή, υποτροπή, ή ανθεκτική νόσο.

Έτσι, τελικά εντάχθηκαν στη μελέτη 140 ασθενείς, 109 Οξείες μυελογενείς Λευχαιμίες και 31 ασθενείς με μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα (RAEB και CMML) –
Εικόνα 13:

Εικόνα 13. Διάγραμμα ασθενών βάσει της διάγνωσης.



Σε κάθε ασθενή καταγράφηκαν:

- ✓ Ηλικία
- ✓ Φύλο
- ✓ Διάγνωση
- ✓ Στους ασθενείς με οξεία μυελογενή λευχαιμία, καταγράφηκε αν η λευχαιμία ήταν *de novo*, μετά από Μυελοδυσπλαστικό/Μυελοϋπερπλαστικό, ή μετά από θεραπεία για άλλο νεόπλασμα.
- ✓ Ο υπότυπος της οξείας λευχαιμίας στην FAB-ταξινόμηση.
- ✓ Ο υπότυπος του μυελοδυσπλαστικού συνδρόμου (RAEB I, II και CMML)
- ✓ Ιστορικό νεοπλασίας
- ✓ Ιστορικό αγγειακής νόσου, αλκοολισμού, σκαχαρώδους διαβήτη, HBV- και HCV-λοίμωξης, θυρεοειδοπάθειας, χρόνιας αποφρακτικής πνευμονοπάθειας
- ✓ Επιβίωση
- ✓ Καρυότυπος
- ✓ Παρουσία της PML-RARA αντιμετάθεσης και της JAK2 V617F μετάλλαξης
- ✓ Εργαστηριακά ευρήματα κατά τη διάγνωση (αιμοσφαιρίνη, αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων, αριθμός αιμοπεταλίων, επίπεδα γαλακτικής αφυδρογονάσης)

- ✓ Παρουσία λεμφαδενοπάθειας και σπληνομεγαλίας
- ✓ Ανοσοφαινοτυπική ανάλυση

Καρυοτυπική ανάλυση έγινε στο Εργαστήριο Κυτταρογενετικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας.

Ανοσοφαινοτυπική ανάλυση έγινε στο εργαστήριο Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας.

Μοριακός έλεγχος έγινε στο Εργαστήριο Κυτταρογενετικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας.

Από τους 140 ασθενείς της μελέτης, 92 ασθενείς είναι άντρες και οι 48 γυναίκες, καταδεικνύοντας διπλάσια επίπτωση αυτών των αιματολογικών κακοηθειών στους άντρες. Τα ποσοστά είναι ακριβώς ίδια και αν υπολογιστούν ξεχωριστά τα νοσήματα: το 65% των ΟΜΛ είναι άντρες, όπως και το 64% των ΜDS.

Οι ασθενείς είναι μόνο ενήλικες (το 80% >60 ετών, μέση ηλικία – 68.5 έτη, εύρος 23-87 έτη):

- 21-30 ετών – 2 ασθενείς
- 31-40 ετών – 4 ασθενείς
- 41-50 ετών – 8 ασθενείς
- 51-60 ετών – 8 ασθενείς
- 61-70 ετών – 28 ασθενείς
- 71-80 ετών – 49 ασθενείς
- >80 ετών – 8 ασθενείς

Από τους 109 ασθενείς με ΟΜΛ, οι 76 είχαν *de novo* AML (69.7% των ΟΜΛ και 54.3% των ασθενών της μελέτης), 23 ασθενείς είχαν AML *post* MDS/MPN (ποσοστό 21.1% των ΟΜΛ και 16.4% των ασθενών της μελέτης). Εννέα (9) ασθενείς με ΟΜΛ είχαν στο ιστορικό τους προηγούμενη νεοπλασία (8.2% των ασθενών με ΟΜΛ) και 1 ασθενής είχε ιστορικό μυελοδυσπλαστικού νεοπλασματος και άλλης κακοήθειας.

Όσον αφορά την FAB-ταξινόμηση:

- M0 – 2 ασθενείς

- M1 – 37 ασθενείς
- M2 – 7 ασθενείς
- M3 – 4 ασθενείς
- M4 – 13 ασθενείς
- M5 – 11 ασθενείς
- M6 – 2 ασθενείς
- 30 ασθενείς περιγράφονται ως αταξινόμητη οξεία μυελογενής λευχαιμία, ή λευχαιμία με δυσπλαστικές αλλοιώσεις, ή λευχαιμία πιθανώς δευτεροπαθής, μετά από Μυελοδυσπλαστικό/Μυελοϋπερπλαστικό νόσημα (Unclassifiable Leukemia).
- Διφαινοτυπική Λευχαιμία – 3 ασθενείς

Κλινικά και εργαστηριακά ευρήματα των ασθενών με ΟΜΛ κατά τη διάγνωση, περιγράφονται στον Πίνακα 4.

Πίνακας 4. Κλινικά και εργαστηριακά ευρήματα των ασθενών με ΟΜΛ

α/α	ΦΥΛΟ	ΗΛΙΚΙΑ	WBC (/μl)	Hb (g/dl)	Plts (/μl)	LDH (U/L)	ΔΙΑΓΝΩΣΗ	ΣΠΛΗΝΟΜΕΓΑΛΙΑ	ΛΕΜΦΑΔΕΝΟ-ΠΑΘΕΙΑ
ΟΜΛ 1	A	71	790	8.3	63,000	197	M1	0	0
ΟΜΛ 2	A	81	4,200	4.9	27,000	153	UC	0	0
ΟΜΛ 3	A	75	41,300	10.7	54,000	423	UC	1	0
ΟΜΛ 4	A	65	30,000	15.1	58,000	578	UC	1	0
ΟΜΛ 5	A	78	17,000	9.7	162,000	223	M2	0	0
ΟΜΛ 6	A	69	2,400	8.6	53,000	197	UC	0	0
ΟΜΛ 7	Γ	51	13,500	7.1	100,000	1,038	M1	0	0
ΟΜΛ 8	A	75	1,800	8.6	226,000	227	M1	0	0
ΟΜΛ 9	A	79	1,500	11.2	52,000	149	M1	0	1
ΟΜΛ 10	A	85	1,700	8.4	78,000	158	UC	0	0
ΟΜΛ 11	Γ	86	1,700	10.0	14,000	325	M1	0	0
ΟΜΛ 12	A	65	2,200	11.6	88,000	238	M1	1	1
ΟΜΛ 13	A	67	8,300	17.0	72,000	608	M2	0	0
ΟΜΛ 14	Γ	58	5,300	9.2	20,000	146	M5	0	0
ΟΜΛ 15	A	73	1,800	8.4	160,000	340	M1	0	1
ΟΜΛ 16	A	39	1,900	14.0	162,000	213	M2	0	0
ΟΜΛ 17	A	72	3,800	9.3	88,000	2,988	M4	0	0
ΟΜΛ 18	A	75	4,600	7.4	70,000	315	UC	0	0
ΟΜΛ 19	A	69	12,300	9.5	54,000	343	M1	0	0
ΟΜΛ 20	A	76	7,400	7.9	37,000	179	UC	0	0
ΟΜΛ 21	A	78	33,500	10.0	52,000	742	UC	1	0

OMΛ 22	A	48	23,000	9.4	101,000	368	M5	0	0
OMΛ 23	A	76	51,000	10.0	47,000	423	M4	0	0
OMΛ 24	A	75	2,600	7.1	30,000	382	M1	1	0
OMΛ 25	A	65	2,200	9.4	56,000	176	UC	0	0
OMΛ 26	Γ	69	2,200	9.3	9,000	428	M2	0	0
OMΛ 27	Γ	82	900	10.0	102,000	213	M1	0	0
OMΛ 28	Γ	72	10,600	7.2	40,000	438	UC	1	0
OMΛ 29	A	75	7,200	8.5	485,000	370	M5	0	0
OMΛ 30	A	80	1,600	7.4	43,000	243	UC	0	0
OMΛ 31	A	79	15,000	9.5	166,000	389	M1	0	0
OMΛ 32	A	84	1,700	9.1	5,000	417	UC	1	0
OMΛ 33	Γ	80	33,000	9.8	185,000	160	M1	0	0
OMΛ 34	Γ	67	8,800	8.2	52,000	381	M1	0	0
OMΛ 35	Γ	65	2,500	10.0	194,000	196	M1	0	0
OMΛ 36	A	80	7,300	9.6	178,000	297	M1	0	0
OMΛ 37	A	25	3,800	4.6	8,000	172	M5	0	0
OMΛ 38	Γ	67	1,500	8.0	55,000	299	UC	0	0
OMΛ 39	A	61	2,400	13.0	145,000	123	M1	0	0
OMΛ 40	A	72	70,000	10.3	19,000	432	M4	1	0
OMΛ 41	A	71	800	7.9	52,000	208	M6	1	0
OMΛ 42	A	62	22,500	10.0	100,000	824	M2	0	0
OMΛ 43	Γ	79	220,000	9.1	30,000	480	M3	0	0
OMΛ 44	Γ	74	121,000	10.4	59,000	1,139	M1	0	1
OMΛ 45	Γ	80	8,900	8.5	56,000	354	UC	0	0
OMΛ 46	A	73	5,200	9.7	159,000	198	UC	0	0
OMΛ 47	A	80	8,800	6.0	40,000	369	UC	0	0
OMΛ 48	A	43	85,000	9.6	5,000	412	M1	0	0
OMΛ 49	A	70	4,700	8.3	62,000	246	M4	0	0
OMΛ 50	Γ	72	3,900	10.0	210,000	234	M1	0	0
OMΛ 51	A	78	49,000	11.9	110,000	232	M2	0	0
OMΛ 52	A	71	3,400	8.8	302,000	158	UC	0	0
OMΛ 53	Γ	74	102,000	9.0	27,000	900	UC	0	0
OMΛ 54	Γ	85	102,000	9.5	32,000	1,258	M4	0	0
OMΛ 55	Γ	76	1,300	6.7	20,000	111	M4	0	0
OMΛ 56	A	78	33,500	10.3	47,000	401	UC	0	0
OMΛ 57	Γ	80	14,000	8.3	110,000	544	M1	0	0
OMΛ 58	A	34	2,100	11.9	270,000	452	M1	0	0
OMΛ 59	A	77	800	10.6	10,000	239	M4	0	0
OMΛ 60	Γ	78	130,000	5.9	28,000	1,854	M5	0	0
OMΛ 61	Γ	76	21,000	9.5	198,000	223	M1	0	0
OMΛ 62	A	81	1,800	10.2	217,000	158	UC	0	0
OMΛ 63	A	75	4,700	8.1	23,000	254	UC	0	0
OMΛ 64	A	76	160,000	11.7	50,000	935	M1	0	0
OMΛ 65	A	70	2,700	9.8	90,000	154	M0	0	0
OMΛ 66	A	40	12,600	8.3	420,000	525	M1	1	1
OMΛ 67	A	64	2,900	8.6	123,000	485	UC	1	0
OMΛ 68	Γ	67	53,000	10.3	12,000	172	M2	1	0
OMΛ 69	Γ	45	2,960	7.8	40,000	664	UC	1	0
OMΛ 70	A	62	390,000	8.1	105,000	3,730	M5	0	0
OMΛ 71	A	60	24,000	14.0	73,000	292	M5	1	0
OMΛ 72	A	75	48,000	8.9	12,000	10,120	M3	1	0
OMΛ 73	Γ	78	180,000	9.3	46,000	1,475	M5	0	0
OMΛ 74	Γ	80	4,100	9.2	42,000	196	UC	0	0
OMΛ 75	A	72	39,000	10.9	90,000	511	M5	1	1
OMΛ 76	A	66	8,500	8.5	82,000	225	M5	0	0
OMΛ 77	Γ	41	117,000	10.0	76,000	1,331	M4	0	1
OMΛ 78	A	65	2,000	8.5	66,000	166	M1	0	0
OMΛ 79	A	32	3,600	8.4	140,000	378	ΔΙΦΑΙΝ	1	0
OMΛ 80	A	67	24,000	10.2	184,000	305	UC	0	0
OMΛ 81	A	58	1,800	9.7	137,000	147	UC	0	0

ΟΜΛ 82	A	70	60,500	7.8	56,000	476	M1	0	0
ΟΜΛ 83	A	60	1,200	7.5	30,000	131	M1	0	0
ΟΜΛ 84	A	42	285,000	5.8	10,000	1,370	M4	1	1
ΟΜΛ 85	Γ	70	3,500	10.7	180,000	216	M1	0	0
ΟΜΛ 86	Γ	75	1,400	10.4	173,000	154	M1	0	0
ΟΜΛ 87	Γ	76	26,600	10.8	160,000	1,080	M1	1	0
ΟΜΛ 88	Γ	64	2,300	7.1	38,000	300	M6	0	0
ΟΜΛ 89	Γ	72	3,500	11.1	36,000	201	M1	0	0
ΟΜΛ 90	A	64	1,100	11.6	111,000	165	M1	0	0
ΟΜΛ 91	A	87	1,800	8.3	32,000	319	M1	0	0
ΟΜΛ 92	A	73	700	9.4	70,000	146	M4	0	0
ΟΜΛ 93	Γ	76	1,900	7.1	12,000	384	M1	0	0
ΟΜΛ 94	A	23	60,000	7.6	90,000	552	M1	0	0
ΟΜΛ 95	A	60	35,000	12.0	230,000	311	M4	0	0
ΟΜΛ 96	A	67	1,900	7.2	34,000	146	UC	0	0
ΟΜΛ 97	Γ	68	63,000	7.8	4,000	699	ΔΙΦΑΙΝ	0	0
ΟΜΛ 98	Γ	73	7,100	10.8	360,000	419	M3	0	0
ΟΜΛ 99	A	63	1,600	7.6	25,000	140	M1	0	0
ΟΜΛ 100	A	64	4,500	7.5	55,000	300	UC	0	0
ΟΜΛ 101	A	68	6,500	7.4	59,000	141	M5	0	0
ΟΜΛ 102	Γ	46	2,600	7.8	15,000	816	M3	0	0
ΟΜΛ 103	Γ	76	306,000	7.9	69,000	713	UC	1	0
ΟΜΛ 104	A	41	85,000	6.8	297,000	767	M1	0	0
ΟΜΛ 105	A	60	12,600	8.5	78,000	315	UC	1	0
ΟΜΛ 106	Γ	42	5,700	7.1	90,000	222	M0	0	0
ΟΜΛ 107	A	73	14,300	12.7	46,000	629	ΔΙΦΑΙΝ	0	0
ΟΜΛ 108	Γ	78	175,000	9.7	55,000	1,326	M4	0	0
ΟΜΛ 109	Γ	56	194,000	10.1	64,000	1,067	M4	0	0

Επεξηγήσεις: WBC – white blood cells – λευκά αιμοσφαίρια, Hb – hemoglobin – αιμοσφαιρίνη, Plts – platelets – αιμοπετάλια, LDH – lactat dehydrogenase – γαλακτική αφυδρογονάση, UC – unclassifiable – αταξινόμητη, η διάγνωση είναι βάσει της ταξινόμησης FAB.

Από τους 31 ασθενείς με μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα, οι 12 είχαν RAEB I – Ανθεκτική αναιμία με περίσσεια βλαστών I (38.7% των ασθενών με MDS και 8.6% των ασθενών της μελέτης), οι 10 είχαν RAEB II (32.2% και 7.1% αντίστοιχα) και οι 9 είχαν CMM1 – χρόνια μυελομονοκυτταρική λευχαιμία (29% και 6.4%).

Κλινικά και εργαστηριακά ευρήματα των ασθενών με MDS κατά τη διάγνωση, περιγράφονται στον Πίνακα 5.

Πίνακας 5. Κλινικά και εργαστηριακά ευρήματα των ασθενών με MDS.

α/α	ΗΛΙΚΙΑ	ΦΥΛΟ	WBC (/μl)	Hb (g/dl)	Plts (/μl)	LDH (U/L)	ΔΙΑΓΝΩΣΗ	ΣΠΛΗΝΟΜΕΓΑΛΙΑ	ΛΕΜΦΑΔΕΝΟΠΑΘΕΙΑ
ΜΔΣ 1	68	Α	43,500	4.7	10,000	400	RAEB II	1	0
ΜΔΣ 2	79	Γ	1,800	7.5	35,000	211	RAEB I	0	0
ΜΔΣ 3	78	Γ	2,700	11.0	120,000	274	RAEB I	0	0
ΜΔΣ 4	78	Γ	19,000	8.9	72,000	229	CMML	0	0
ΜΔΣ 5	77	Γ	1,800	10.0	21,000	152	RAEB I	0	0
ΜΔΣ 6	73	Α	8,000	11.0	50,000	341	RAEB II	0	0
ΜΔΣ 7	74	Γ	56,000	7.5	129,000	370	CMML	1	0
ΜΔΣ 8	71	Α	20,000	8.2	7,000	281	RAEB II	0	0
ΜΔΣ 9	77	Α	6,300	11.6	175,000	198	RAEB I	0	0
ΜΔΣ 10	69	Α	400	7.0	18,000	155	RAEB II	0	0
ΜΔΣ 11	67	Α	1,700	8.9	39,000	170	RAEB II	1	0
ΜΔΣ 12	76	Α	2,700	7.2	20,000	579	RAEB I	1	0
ΜΔΣ 13	78	Α	320,000	7.8	43,000	776	CMML	1	0
ΜΔΣ 14	19	Γ	35,000	6.3	34,000	260	RAEB II	1	0
ΜΔΣ 15	76	Α	3,600	5.4	11,000	127	RAEB I	1	0
ΜΔΣ 16	85	Α	20,000	8.5	21,000	751	CMML	1	0
ΜΔΣ 17	78	Α	123,000	7.4	53,000	414	CMML	1	0
ΜΔΣ 18	66	Α	5,700	5.8	90,000	103	RAEB II	0	0
ΜΔΣ 19	72	Α	80,000	8.2	100,000	564	CMML	1	1
ΜΔΣ 20	78	Γ	3,500	9.8	444,000	187	RAEB II	0	0
ΜΔΣ 21	80	Α	83,000	8.4	108,000	526	CMML	1	0
ΜΔΣ 22	72	Α	124,000	7.8	62,000	352	CMML	1	0
ΜΔΣ 23	65	Α	2,500	7.7	91,000	229	RAEB I	0	0
ΜΔΣ 24	74	Γ	2,700	8.4	3,000	218	RAEB I	0	0
ΜΔΣ 25	68	Α	2,600	9.5	11,000	295	RAEB I	0	0
ΜΔΣ 26	64	Α	38,000	8.4	20,000	500	CMML	1	0
ΜΔΣ 27	75	Γ	2,600	8.0	6,000	345	RAEB II	0	0
ΜΔΣ 28	66	Α	33,200	9.3	8,000	474	RAEB II	1	0
ΜΔΣ 29	78	Α	7,300	7.7	146,000	156	RAEB I	0	0
ΜΔΣ 30	73	Α	5,400	12.1	289,000	249	RAEB I	0	0
ΜΔΣ 31	50	Γ	3,600	10.7	11,000	187	RAEB I	0	0

Επεξηγήσεις: WBC – white blood cells – λευκά αιμοσφαίρια, Hb – hemoglobin – αιμοσφαιρίνη, Plts – platelets – αιμοπετάλια, LDH – lactat dehydrogenase – γαλακτική αφυδρογονάση, η διάγνωση είναι βάσει της ταξινόμησης FAB.

ΜΕΘΟΔΟΙ:

1) Διαχωρισμός κυττάρων:

Ο διαχωρισμός στοιβάδας μονοπύρηνων κυττάρων από δείγμα περιφερικού αίματος, ή μυελού των οστών έγινε μετά από φυγοκέντρηση σε Ficoll 1077 g/ml για 30 λεπτά στις 1200 στροφές. Ακολουθούσε πλύσιμο των κυττάρων με στείρο PBS και διαδικασία απομόνωσης DNA, ή αποθήκευση στους -80°C.

2) Απομόνωση DNA:

Η απομόνωση DNA έγινε από στοιβάδες μονοπύρηνων κυττάρων από περιφερικό αίμα, ή μυελό των οστών, ή από ξέσματα επιχρισμάτων μυελού των οστών, αυτοματοποιημένα, με το DNA extraction kit της Qiagen (QIAamp DNA mini kit). Σε ειδικό σωληνάριο φυγοκέντρησης των 1.5ml τοποθετούνταν 20μL Qiagen πρωτεάσης, για απομάκρυνση πρωτεϊνών. Στο ίδιο σωληνάριο, προστίθονταν 200μL δείγματος (περιφερικό αίμα ή μυελός) και 200μL διαλύματος λύσης (Buffer AL). Ακολουθούσε επώαση σε υδατόλουτρο στους 56°C για 20 min (40 min για ξέσματα μυελού από αντικειμενοφόρα πλακίδια) και στη συνέχεια προστίθονταν 200μL απόλυτης αιθανόλης 96-100%. Το μείγμα φυγοκεντρούνταν σε ειδική στήλη (QIAamp Spin Column, Qiagen) στις 8,000rpm για 1 min. Ακολουθούσαν 2 πλύσεις με τα διαλύματα AW1 και AW2 στις 8,000rpm για 1 min και 14000rpm για 3 min, αντίστοιχα, για αλλαγή του pH ώστε να απομακρυνθούν πρωτεΐνες και άλλα υλικά. Αποτέλεσμα της επεξεργασίας αυτής είναι η βελτίωση της ποιότητας του DNA. Έπειτα, αφού προστίθονταν σε κάθε στήλη 100μL διαλύματος εκχύλισης AE (Elution Buffer), ακολουθούσε επώαση 1 min και τελική φυγοκέντρηση στις 8,000rpm για 1 min. Η συγκέντρωση του DNA ήταν περίπου 50-200ng/μL. Το αποτέλεσμα της διαδικασίας ήταν η απομόνωση καθαρού DNA από τα λευκά αιμοσφαίρια, αφού είχαν απομακρυνθεί πρωτεΐνες, άλατα και άλλα μόρια που θα μπορούσαν να λειτουργήσουν ανασταλικά στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Τα δείγματα DNA που απομονώνονταν, αποθηκεύονταν μέχρι τη χρήση τους σε βαθιά κατάψυξη.

3) PCR για την ανίχνευση ITD-μεταλλάξεων του FLT3:

Για την ενίσχυση του εξωνίου 14 του γονιδίου FLT3, όπου συνήθως εντοπίζονται οι ITD-μεταλλάξεις, χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές:

- Πρόσθιος – 14F-5'-CAATTTAGGTATGAAAGCC-3'
- Ανάστροφος – 14R-5'-GTACCTTTCAGCATTTTGAC-3'

Για DNA-πολυμεράση, χρησιμοποιήθηκε έτοιμο μείγμα της QIAGEN (Taq PCR Master mix), και το αποστειρωμένο νερό της συσκευασίας. Το Master mix περιέχει την DNA-πολυμεράση, PCR-Buffer και dNTPs (τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια). Το Buffer είναι ρυθμιστικό διάλυμα με μαγνήσιο (δρα ως συμπράγοντας της πολυμεράσης), KCl (διευκολύνει την αναδιάταξη του εκκινητή), Tris-HCl, για pH 8,3, σταθεροποιητές ενζύμου και απορρυπαντικά.

Σε στείρο σωληνάριο τοποθετούνταν:

1. 15 μ l master mix
2. 1,2 μ l primers, σε συγκέντρωση 25 pmol/ μ l
3. 1,8 μ l DMSO
4. 10 μ l H₂O
5. Και 2 μ l DNA

Το DMSO [dimethyl sulfoxide (CH₃)₂SO], είναι οργανικός διαλύτης, για προαγωγή της μετουσίωσης – ωφέλιμος σε δείγματα που περιέχουν υψηλό ποσοστό γουανίνης και κυτοσίνης.

Το δείγμα τοποθετούνταν σε θερμικό κυκλοποιητή, με συνθήκες:

- Αρχική μετουσίωση (denaturation) για 2 λεπτά στους 94°C
- Ακολουθούμενη από 39 κύκλους: Μετουσίωση (denaturation) στους 94°C για 1 λεπτό, πρόσδεση των εκκινητών (annealing) στους 53°C για 1 λεπτό και σύνδεση-επέκταση (extension) στους 68°C για 2 λεπτά
- Και 1 κύκλος τελικής επέκτασης στους 68°C για 5 λεπτά.

Το μέγεθος του προϊόντος της PCR σε δείγματα άγριου τύπου (*wild type*) ήταν 337 βάσεις, ενώ σε μεταλλαγμένα δείγματα, το προϊόν ήταν κατά 15-150 νουκλεοτίδια μεγαλύτερο.

Τα προϊόντα ηλεκτροφορούνταν σε γέλη αгарόζης, συγκέντρωσης 2%. Δύο (2) gr αгарόζης (πολυσακχαρίτης από φύκια) διαλύονταν με βρασμό σε 100ml TBE – διάλυμα με Tris-HCl, για να διατηρηθεί το pH, βορικό οξύ για τη διέλευση του ηλεκτρικού ρεύματος και EDTA, που δεσμεύει κατιόντα και αποτρέπει τη διάσπαση του προϊόντος κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης. Όσο ήταν ρευστό το διάλυμα, τοποθετούνταν σε αυτό 10 μl βρωμιούχο αιθίδιο, το οποίο προσκολλάται στο DNA και του παρέχει τη δυνατότητα να φωσφορίζει κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία. Το διάλυμα τοποθετούνταν μετά σε δοχείο ηλεκτροφόρησης και αφηνόταν να κρυώσει και να στερεοποιηθεί. Μετά η γέλη καλυπτόταν από διάλυμα TBE.

Στη θέση 1 της γέλης τοποθετούνταν 5 μl ladder (τμήματα DNA γνωστού μεγέθους) και στις επόμενες θέσεις 6 μl προϊόντος που αναμειγνύονταν με 1 μl χρωστική (loading dye). Έτσι το προϊόν αποκτούσε μεγαλύτερο ειδικό βάρος από το TBE για να μείνει στη θέση του.

Μετά εφαρμοζόταν στη γέλη ηλεκτρικό ρεύμα 120 volt, για 45 λεπτά και τέλος, τοποθετούνταν σε ειδική συσκευή, που εκπέμπει υπεριώδη ακτινοβολία και φωτογραφιζόταν.

Αλληλούχιση (*sequencing analysis*) έγινε για να επιβεβαιωθούν τα αποτελέσματα, με τη χρήση ειδικού kit (Applied Biosystems, Big Dye Terminator DNA sequencing kit) και γινόταν στο γενετικό αναλυτή ABI Prism 3730 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Πριν την Αλληλούχιση γινόταν καθαρισμός του ενισχυμένου προϊόντος της PCR με τη χρήση ειδικού kit (Purelink Quick PCR-gel-extraction kit, Invitrogen).

4) PCR-RFLP για την ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων του FLT3:

Για την ενίσχυση του εξωνίου 20 του γονιδίου του FLT3, όπου συνήθως εντοπίζονται οι σημειακές μεταλλάξεις, χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές:

- Πρόσθιος - 20F primer : 5'-AGTGTGTTACAGAGACCTGG-3'
- Ανάστροφος – 20R primer : 5'-ATTGCCCCTGACAACATAGTT-3'

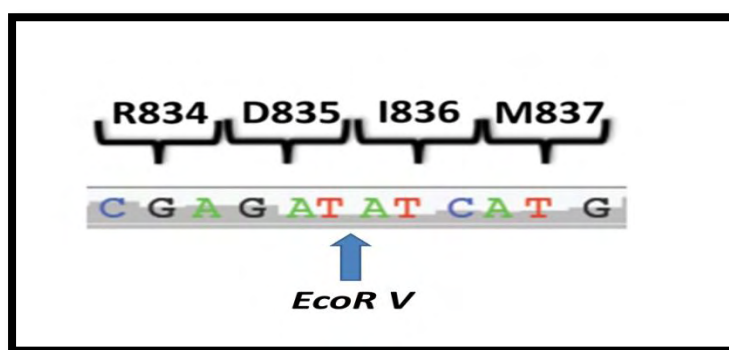
Δημιουργούνται διάλυμα από 235 μl H_2O , 10 μl 10xbuffer, 10 μl dNTPs (2,5 mM), 15 μl MgCl_2 και από 10 μl από κάθε εκκινητή (50 pmol/l). Σε αποστειρωμένο σωληνάριο, τοποθετούνταν 22 μl από αυτό το διάλυμα, 2 μl DNA και 6 μl Taq-πολυμεράση (από διάλυμα 50 μl H_2O + 2,2 μl Taq).

Το δείγμα τοποθετούνταν σε θερμικό κυκλοποιητή με συνθήκες:

- Αρχική μετουσίωση (denaturation) για 2 λεπτά στους 94°C
- Ακολουθούμενη από 35 κύκλους: Μετουσίωση στους 94°C για 30 δευτερόλεπτα, πρόσδεση των εκκινητών στους 60°C για 30 δευτερόλεπτα και σύνθεση-επέκταση στους 72°C για 30 δευτερόλεπτα
- Και 1 κύκλος τελικής επέκτασης στους 72°C για 10 λεπτά.

Τα προϊόντα (μεγέθους 125 βάσεων), ηλεκτροφορούνταν σε γέλη αγαρόζης 3% για έλεγχο και μετά τοποθετούνταν σε αποστειρωμένο σωληνάριο, μαζί με ένα ένζυμο πέψης, το EcoRV (New England Biolabs), στους 37°C σε υδατόλουτρο για 16 ώρες. Το EcoRV είναι μία τύπου 2 ενδονουκλεάση, που απομονώνεται από στελέχη *E. Coli*, από όπου και παίρνει το όνομά της. Το περιοριστικό ένζυμο αναγνωρίζει την αλληλουχία 5'-GAT/ATC-3' και την κόβει στη μέση. Η συγκεκριμένη αλληλουχία βρίσκεται στο εξώνιο 20 του γονιδίου του FLT3 – πρόκειται για τα κωδικόνια D835 και I836 (που κωδικοποιούν αντίστοιχα ασπαρτικό οξύ και ισολευκίνη), όπου συνήθως συμβαίνει η σημειακή μετάλλαξη (Εικόνα 14).

Εικόνα 14: Αλληλουχία που αναγνωρίζει το περιοριστικό ένζυμο



Μετά την πέψη, το προϊόν επαναηλεκτροφορούνταν σε γέλη αγαρόζης 3% και στα φυσιολογικά δείγματα υπήρχε διάσπαση σε 2 προϊόντα, 89 και 36 βάσεων, ενώ στα μεταλλαγμένα δείγματα, όπου η ενδονουκλεάση δεν έβρισκε την αλληλουχία που αναγνωρίζει, παρέμενε μία «άπεπτη» μπάντα με το αρχικό μέγεθος των 125 βάσεων.

Αλληλούχιση (*sequencing analysis*) έγινε για να επιβεβαιωθούν τα αποτελέσματα, με τη χρήση ειδικού kit (*Applied Biosystems, Big Dye Terminator DNA sequencing kit*) και γινόταν στο γενετικό αναλυτή *ABI Prism 3730* (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*). Πριν την Αλληλούχιση γινόταν καθαρισμός του ενισχυμένου προϊόντος της PCR με τη χρήση ειδικού kit (*Purelink Quick PCR-gel-extraction kit, Invitrogen*).

5) Ανίχνευση μεταλλάξεων της Νουκλεοφωσμίνης

Για ανίχνευση μεταλλάξεων της Νουκλεοφωσμίνης, μετά την PCR, ακολουθήθηκε η μεθοδολογία της ανάλυσης μήκους θραυσμάτων (*fragment analysis*), με τριχοειδική ηλεκτροφόρηση, μία ευαίσθητη, σύγχρονη μέθοδος για την ανίχνευση διαφορών στο μέγεθος θραυσμάτων DNA, που έχει τη δυνατότητα να ανιχνεύει θραύσματα DNA με διαφορά ακόμη και μίας βάσης.

Στην τριχοειδική ηλεκτροφόρηση, χρησιμοποιείται τριχοειδής σωλήνας με διάμετρο 50 μm , τα άκρα του οποίου τοποθετούνται σε δοχεία ηλεκτρολυτών, με ηλεκτρόδια. Παρέχεται διαφορά δυναμικού, για να προκαλέσει μετακίνηση των μορίων και μετά το διαχωρισμό τους βάσει μεγέθους μέσα στον τριχοειδή σωλήνα, προκαλείται διέγερση της χρωστικής από ακτίνα *laser*. Τα κλάσματα ανιχνεύονται από οπτικό ανιχνευτή, μετατρέπονται σε ψηφιακό σήμα και καταγράφονται από ηλεκτρονικό υπολογιστή ως κορυφές σε ηλεκτροφόρημα.

Όλες οι μεταλλάξεις της Νουκλεοφωσμίνης έχουν ως αποτέλεσμα μία αύξηση του εξωνίου 12, κατά 4 βάσεις. Αφού προστεθεί ανάστροφος εκκινητής που φέρει φθορίζουσα χρωστική, ενισχύεται με απλή PCR.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του εξωνίου 12 του γονιδίου της Νουκλεοφωσμίνης, ήταν:

- Πρόσθιος: 5'-TTAACTCTCTGGTGGTAGAATGAA-3'
- Ανάστροφος: 5'-TGTTACAGAAATGAAATAAGACGG-3'. Ο ανάστροφος εκκινητής φέρει στο 5'-άκρο του τη φθορίζουσα χρωστική 6-FAM.

Το PCR-mix περιλάμβανε: 225 μ l H₂O, 96 μ l PCR-buffer10x και από 17 μ l από κάθε εκκινητή (20 μ mol). Το Taq-mix περιλάμβανε 50 μ l H₂O και 2,2 μ l Taq-polymerase.

Σε κάθε σωληνάριο τοποθετούνταν 22 μ l PCR-mix, 6 μ l Taq-mix και 2 μ l DNA.

Συνθήκες απλής PCR:

- Αρχική μετουσίωση για 15 λεπτά στους 95°C
- Ακολουθούμενη από 35 κύκλους: Μετουσίωση στους 95°C για 30 δευτερόλεπτα, πρόσδεση των εκκινητών στους 59°C για 90 δευτερόλεπτα και σύνθεση-επέκταση στους 72°C για 90 δευτερόλεπτα
- Και 1 κύκλος τελικής επέκτασης στους 72°C για 10 λεπτά.

Τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορούνταν σε γέλη αγαρόζης 2% για έλεγχο και ακολουθούσε η τριχοειδική ηλεκτροφόρηση (3730/3730xl Genetic Analyzer, by Applied Biosystems), ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή, αφού γίνονταν η διαστασιολόγηση των τμημάτων του DNA με τον GeneScan 500 LIZ dye Size Standard από Thermo Fisher Scientific. Η ανάλυση των δεδομένων γινόταν με το Peak scanner software v1.0 της Applied Biosystems.

Στα μη-μεταλλαγμένα δείγματα φαινόταν μία κορυφή στη θέση 215, ενώ στα μεταλλαγμένα φαινόταν και δεύτερη κορυφή στη θέση 219 του ηλεκτροφορήματος.

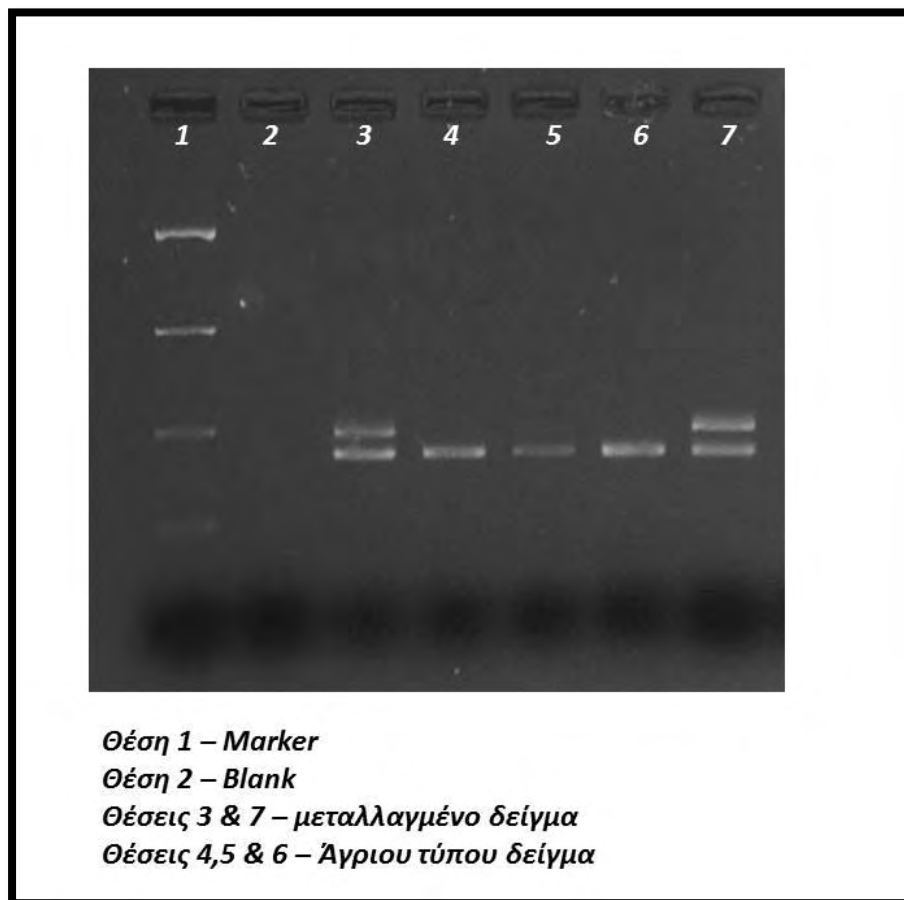
Η στατιστική ανάλυση έγινε με τη βοήθεια του στατιστικού προγράμματος Wizard, version 1.7.12 (Boston, MA, USA) και SPSS 19.0 (IBM Corporation, NY) Σημαντική θεωρήθηκε μια απόκλιση όταν $p < 0,05$.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Ανίχνευση της FLT3-ITD-μετάλλαξης

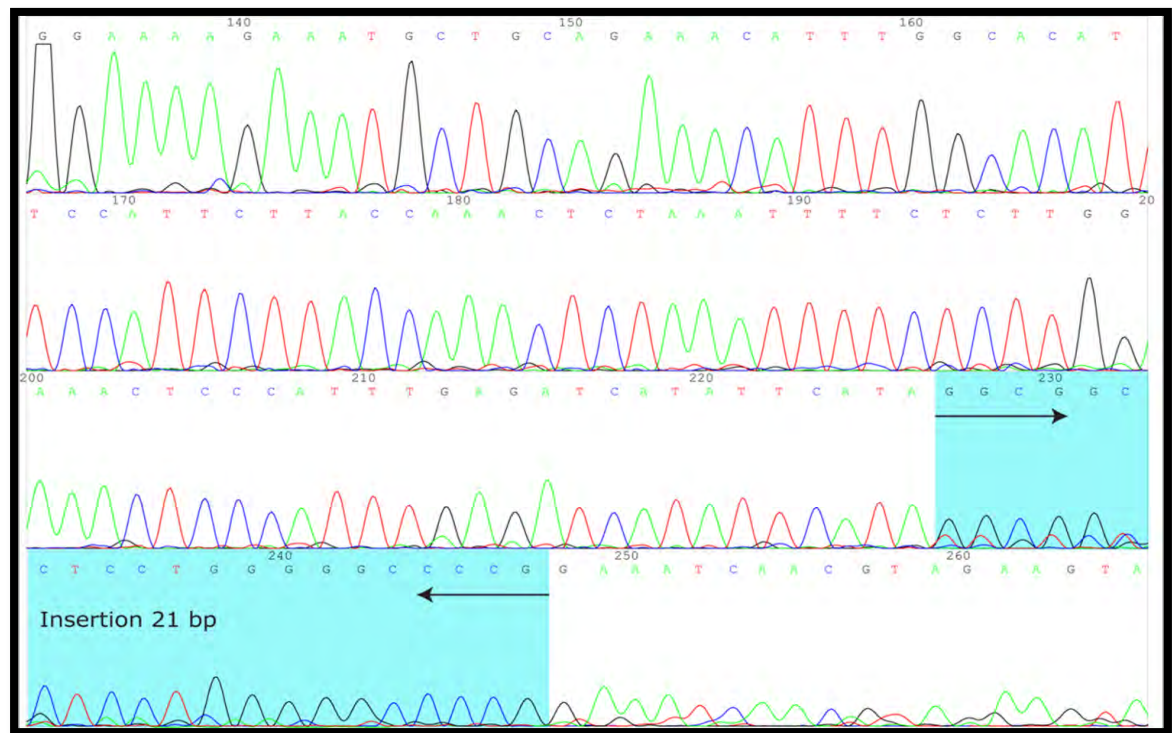
Από τους 140 ασθενείς, οι 15 βρέθηκαν θετικοί στην ITD-μετάλλαξη του FLT3. Από αυτούς, οι 11 είχαν *de novo* λευχαιμία, οι 2 είχαν δευτεροπαθή λευχαιμία και 2 είχαν χρόνια μυελομονοκυτταρική λευχαιμία. Στην ηλεκτροφόρηση στη γέλη αγαρόζης, στα δείγματα ασθενών που έφεραν τη μετάλλαξη, φαίνονταν δεύτερο, μεγαλύτερο προϊόν (Εικόνα 15).

Εικόνα 15: Παραδείγματα ITD-μεταλλάξεων.



Σε έναν ασθενή που επιβεβαιώθηκε με αλληλούχιση η βλάβη FLT3-ITD, αυτή αφορούσε την εισαγωγή 21bp και όχι τυχαίο διπλασιασμό, φαινόμενο εξαιρετικά σπάνιο (Εικόνα 16).

Εικόνα 16: Sequencing analysis σε έναν από τους θετικούς για την ITD-μετάλλαξη.

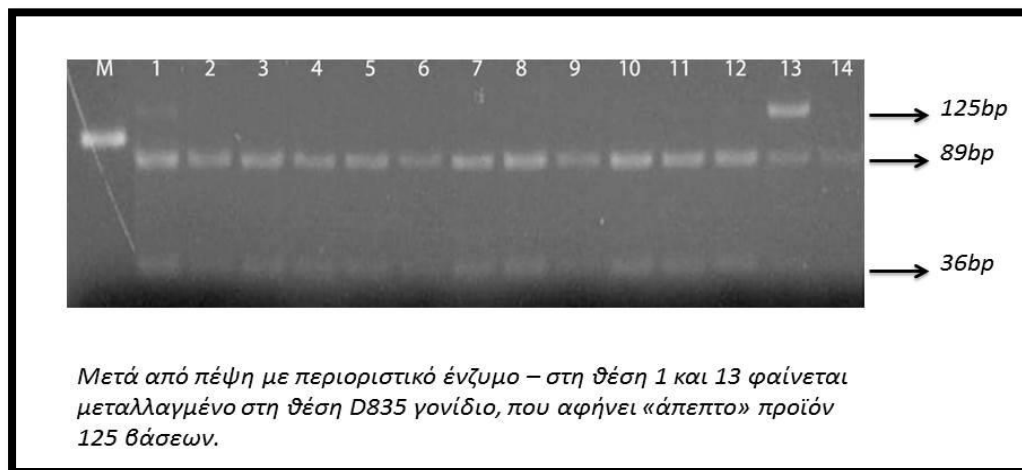


2. Ανίχνευση της σημειακής μετάλλαξης του FLT3

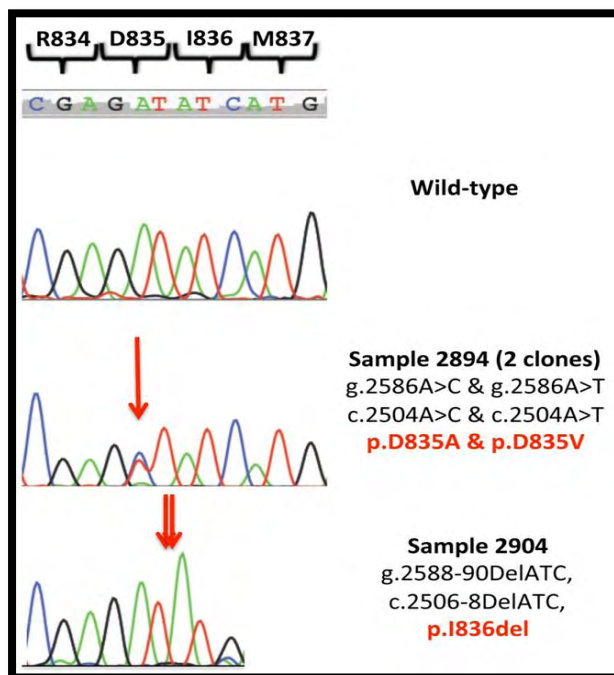
Από τους 140 ασθενείς, οι 9 βρέθηκαν θετικοί στη σημειακή μετάλλαξη του FLT3. Οι 5 είχαν *de novo* οξεία μυελογενή λευχαιμία, οι 2 δευτεροπαθή, ένας ασθενής είχε RAEB I και ένας ασθενής είχε χρόνια μυελομονοκυτταρική λευχαιμία. Στην ηλεκτροφόρηση σε γέλη αгарόζης, μετά από πέψη με περιοριστικό ένζυμο φαίνονταν άπεπτο προϊόν με το αρχικό μέγεθος των 125 βάσεων (Εικόνα 17).

Και στο δεύτερο πείραμα, έγινε sequencing, για να επιβεβαιωθούν τα αποτελέσματα (Εικόνα 18).

Εικόνα 17: Παράδειγμα σημειακής μετάλλαξης στη θέση D835 του FLT3.



Εικόνα 18: Sequencing analysis κάποιων από τους θετικούς για την TKD-μετάλλαξη - Σε μία ασθενή με ΟΜΛ βρέθηκαν 2 κλώνοι (Asp835Ala & Asp835Val), ενώ ασθενής με ΟΜΛ έφερε τη βλάβη I836del.

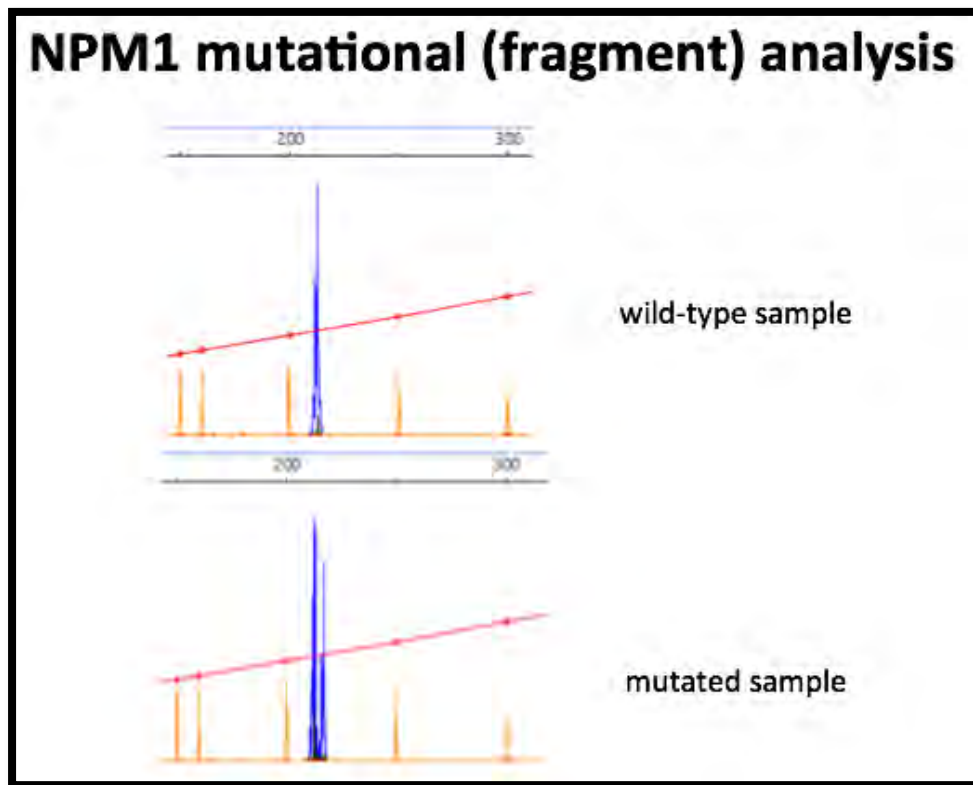


3. Ανίχνευση μεταλλάξεων της Νουκλεοφωσμίνης

Από τους 140 ασθενείς, 21 βρέθηκαν να φέρουν μετάλλαξη της NPM1. Από αυτούς, οι 17 είχαν *de novo* ΟΜΛ, οι 2 είχαν δευτεροπαθή, ένας ασθενής είχε RAEB I και

ένας ασθενής είχε RAEB II. Παράδειγμα ηλεκτροφορήματος δείγματος που έφερε τη μετάλλαξη δίδεται στην Εικόνα 19.

Εικόνα 19: Παράδειγμα ηλεκτροφορήματος φυσιολογικής και μεταλλαγμένης Νουκλεοφωσμίνης.



Συχνότητα εμφάνισης των μεταλλάξεων:

	AML (n=109)	AML de novo (n=76)	AML secondary (n=33)
FLT3-ITD	13, ποσοστό 11,9%	11 (14,5%)	2 (6%)
FLT3-TKD	7, ποσοστό 6,4%	5 (6,6%)	2 (6%)
NPM1	19, ποσοστό 17,4%	17 (22,4%)	2 (6%)

	MDS (n=31)	RAEB I (n=12)	RAEB II (n=10)	CMML (n=9)
FLT3-ITD	2 (6,4%)	(-)	(-)	2 (22,2%)
FLT3-TKD	2 (6,4%)	1 (8,3%)	(-)	1 (11%)
NPM1	2 (6,4%)	1 (8,3%)	1 (10%)	(-)

Η μέση ηλικία όλων των ασθενών στη μελέτη είναι τα 68,5 έτη. Η μέση ηλικία των θετικών στην FLT3-ITD μετάλλαξη είναι 70,5 έτη, των TKD+ είναι 65,3 έτη και των NPM1+ είναι 70,1 έτη.

4. Συσχετίσεις

Εργαστηριακά, δημογραφικά και κλινικά δεδομένα ήταν διαθέσιμα σε όλους τους ασθενείς της μελέτης. Αναλυτικά, στον Πίνακα 6, φαίνονται όλοι οι θετικοί ασθενείς και στις 3 μεταλλάξεις, με τις μορφολογικές τους διαγνώσεις και τα εργαστηριακά ευρήματα κατά τη διάγνωση.

Πίνακας 6: Εργαστηριακά και δημογραφικά δεδομένα των ασθενών με παρουσία μεταλλάξεων της NPM1 και του FLT3.

Ασθενής	Φύλο	Ηλικία	WBC(/μl)	Hb(g/dl)	Plts(/μl)	LDH(U/L)	FAB	FLT3-ITD	FLT3-TKD	NPM1
ΟΜΛ 11	Γ	86	1,700	10.0	14,000	325	M1	0	0	1
ΟΜΛ 13	Α	67	8,300	17.0	72,000	608	M2	1	0	1
ΟΜΛ 17	Α	72	3,800	9.3	88,000	2,988	M4	0	1	0
ΟΜΛ 21	Α	78	33,500	10.0	52,000	742	UC	0	0	1
ΟΜΛ 22	Α	48	23,000	9.4	101,000	368	M5	1	0	1
ΟΜΛ 23	Α	76	51,000	10.0	47,000	423	M4	0	0	1
ΟΜΛ 34	Γ	67	8,800	8.2	52,000	381	M1	0	0	1
ΟΜΛ 43	Γ	79	220,000	9.1	30,000	480	M3	1	0	1
ΟΜΛ 44	Γ	74	121,000	10.4	59,000	1,139	M1	1	0	1
ΟΜΛ 50	Γ	72	3,900	10.0	210,000	234	M1	1	0	0
ΟΜΛ 51	Α	78	49,000	11.9	110,000	232	M2	0	0	1
ΟΜΛ 54	Γ	85	102,000	9.5	32,000	1,258	M4	1	1	1
ΟΜΛ 58	Α	34	2,100	11.9	270,000	452	M1	0	1	0
ΟΜΛ 60	Γ	78	130,000	5.9	28,000	1,854	M5	0	0	1
ΟΜΛ 64	Α	76	160,000	11.7	50,000	935	M1	1	0	0
ΟΜΛ 68	Γ	67	53,000	10.3	12,000	172	M2	1	0	0
ΟΜΛ 70	Α	62	390,000	8.1	105,000	3730	M5	0	1	0
ΟΜΛ 71	Α	60	24,000	14.0	73,000	292	M5	0	0	1
ΟΜΛ 72	Α	75	48,000	8.9	12,000	10,120	M3	1	0	0
ΟΜΛ 73	Γ	78	180,000	9.3	46,000	1475	M5	0	0	1
ΟΜΛ 75	Α	72	39,000	10.9	90,000	511	M5	0	1	0
ΟΜΛ 77	Γ	41	117,000	10.0	76,000	1,331	M4	0	1	1
ΟΜΛ 82	Α	70	60,500	7.8	56,000	476	M1	0	0	1
ΟΜΛ 85	Γ	70	3,500	10.7	180,000	216	M1	1	0	0
ΟΜΛ 87	Γ	76	26,600	10.8	160,000	1,080	M1	0	0	1
ΟΜΛ 100	Α	64	4,500	7.5	55,000	300	UC	0	1	0
ΟΜΛ 103	Γ	76	306,000	7.9	69,000	713	UC	1	0	0
ΟΜΛ 104	Α	41	85,000	6.8	297,000	767	M1	1	0	1
ΟΜΛ 107	Α	73	14,300	12.7	46,000	629	ΔΙΦΑΙΝ	0	0	1
ΟΜΛ 108	Γ	78	175,000	9.7	55,000	1,326	M4	1	0	1
ΜΔΣ 13	Α	78	320,000	7.8	43,000	776	CMML	1	0	0
ΜΔΣ 15	Α	76	3,600	5.4	11,000	127	RAEB I	0	0	1
ΜΔΣ 16	Α	85	20,000	8.5	21,000	751	CMML	0	1	0
ΜΔΣ 22	Α	72	124,000	7.8	62,000	352	CMML	1	0	0
ΜΔΣ 28	Α	66	33,200	9.3	8,000	474	RAEB II	0	0	1
ΜΔΣ 30	Α	73	5,400	12.1	289,000	249	RAEB I	0	1	0

Επεξηγήσεις: WBC – white blood cells – λευκοκύτταρα, Hb – hemoglobin – αιμοσφαιρίνη, Plts – platelets – αιμοπετάλια, LDH – lactat dehydrogenase – γαλακτική αφυδρογονάση, η διάγνωση είναι βάσει της FAB-ταξινόμησης.

Καρυοτυπική ανάλυση ήταν διαθέσιμη σε 94 από τους 140 ασθενείς της μελέτης:

- Δεν διαπιστώθηκαν κυτταρογενετικές ανωμαλίες σε 64 ασθενείς.
- Έλλειψη στο βραχύ σκέλος του 1^{ου} χρωμοσώματος (*del 1p*) σε μία ασθενή με ΟΜΛ, βλάβη που ανευρίσκεται στο 20-30% των ασθενών με πολλαπλούν μυέλωμα.
- Τρισωμία 8 σε 12 ασθενείς: 7 ασθενείς με οξεία μυελογενή λευχαιμία, 2 από τους 3 ασθενείς με διφαινοτυπική λευχαιμία, 1 ασθενής με RAEB I, 1 ασθενής με RAEB II και 1 ασθενής με CMML.
- Έλλειψη του Υ-χρωμοσώματος σε 2 ασθενείς με ΟΜΛ.
- Complex καρυότυπος (>2 βλάβες) σε 6 ασθενείς: 4 ασθενείς με ΟΜΛ και 2 ασθενείς με RAEB II.
- Inversion 16 σε 1 ασθενή με ΟΜΛ.
- Τρισωμία 13 σε 1 ασθενή με ΟΜΛ.
- Τρισωμία 12 και 19 σε 1 ασθενή με RAEB I.
- Deletion 7q σε 1 ασθενή με ΟΜΛ.
- Τρισωμία 11 σε 1 ασθενή με ΟΜΛ.
- Τρισωμία 21 σε 1 ασθενή με RAEB II.
- Τρισωμία 8 και 10 σε 1 ασθενή με ΟΜΛ.
- Έλλειψη του 7 σε 2 ασθενείς με RAEB II και ΟΜΛ.
- Τρισωμία 3 σε 1 ασθενή με ΟΜΛ.
- Translocation 15;17 σε 1 ασθενή.
- Και σε 1 ασθενή με ΟΜΛ ανευρέθηκε 1 marker-χρωμόσωμα.

Δεδομένα **Ανοσοφαινοτυπικής ανάλυσης** υπήρχαν για τους 124 από τους 140 ασθενείς της μελέτης.

Μοριακός έλεγχος για PML-RARA έγινε σε 14 ασθενείς με μορφολογική υπόνοια οξείας προμυελοκυτταρικής λευχαιμίας, ενώ θετικοί για την JAK2V617F-μετάλλαξη, ήταν 9 ασθενείς.

A. Συσχετίσεις των μεταλλάξεων FLT3 και NPM1 για το σύνολο των ασθενών της μελέτης (n=140):

Από τους 140 ασθενείς, 23 είχαν κάποια από τις μεταλλάξεις FLT3 (FLT3-total = 16.4%). Από αυτούς, 14 ασθενείς είχαν μόνο τον τύπο FLT3-ITD, 8 ασθενείς είχαν τον τύπο FLT3-TKD και ένας ασθενής είχε και τους δύο τύπους της μετάλλαξης.

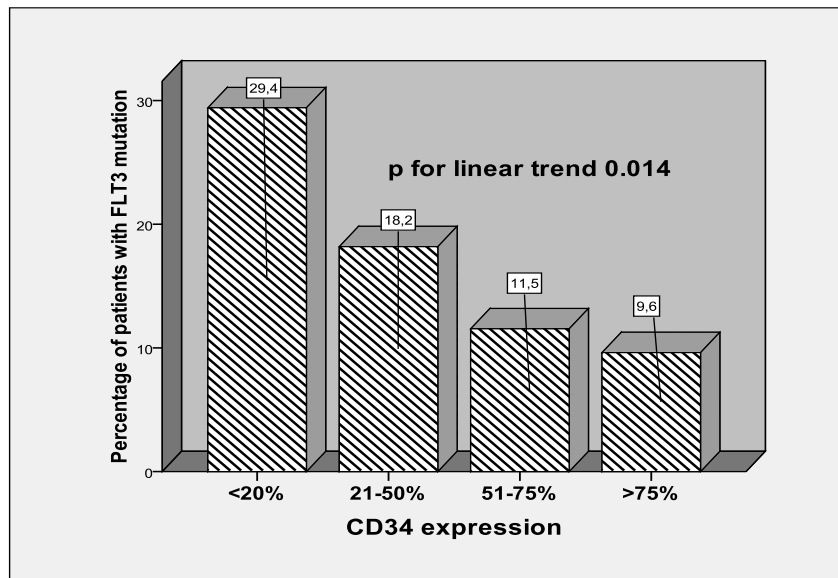
Σε μελέτη των **μεταλλάξεων του FLT3 στο σύνολο** (είτε ITD, είτε TKD), ανευρέθηκε θετική συσχέτιση με τον αριθμό των λευκών. Οι ασθενείς με μετάλλαξη FLT3-total είχαν σημαντικά μεγαλύτερο αριθμό λευκών συγκριτικά με τους ασθενείς χωρίς μετάλλαξη (*mean* \pm *SD*: 101,500 \pm 113,792 vs. 21,848 \pm 41,720/μl, Mann-Whitney $p < 0.001$). Μάλιστα, τιμή λευκών $\geq 100,000/\mu\text{l}$ είχε ειδικότητα 95% για την ανεύρεση της μετάλλαξης, ενώ τιμή λευκών κάτω από 2,000/μl πρακτικά απέκλειε με ευαισθησία 100% την παρουσία της μετάλλαξης.

Το ίδιο ίσχυε και με τις τιμές της LDH. Οι ασθενείς με μετάλλαξη FLT3-total είχαν σημαντικά υψηλότερη τιμή LDH στον ορό συγκριτικά με τους ασθενείς χωρίς μετάλλαξη (1,294 \pm 2,109 vs. 364 \pm 284 IU/l, Mann-Whitney $p < 0.001$). Μάλιστα, τιμή LDH ≥ 900 IU/l είχε ειδικότητα 95% για την ανεύρεση της μετάλλαξης, ενώ φυσιολογική τιμή LDH ορού πρακτικά απέκλειε με ευαισθησία 90% την παρουσία της μετάλλαξης.

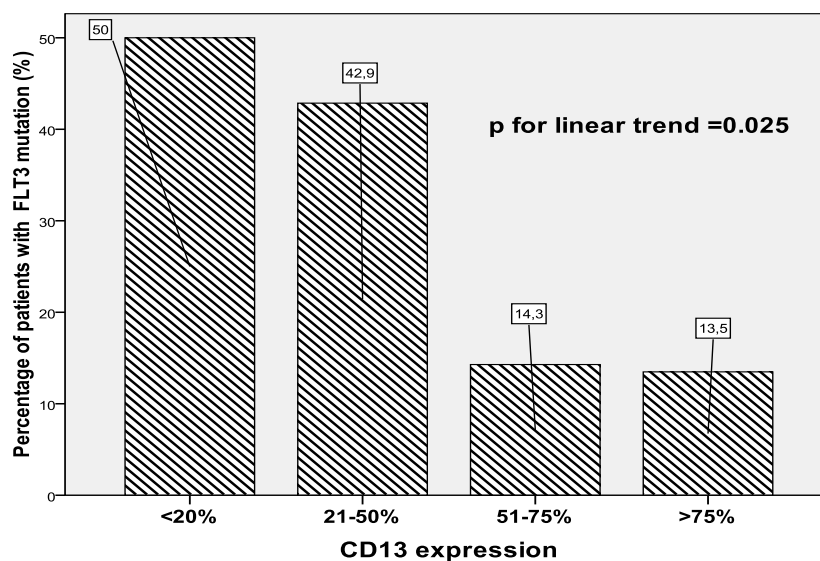
Η παρουσία της μετάλλαξης συσχετίστηκε αρνητικά με την έκφραση CD34 και CD13 από τους μυελοβλάστες (Εικόνα 20 και 21), ενώ συσχετίστηκε θετικά με την έκφραση CD36 (p for linear trend=0.03). Το CD36 είναι δείκτης μονοκυτταρικής διαφοροποίησης και ταιριάζει σαν εύρημα με τη χαμηλή έκφραση CD34, αλλά δεν σχετίστηκε αναλόγως με τις FAB-διαγνώσεις των ασθενών της μελέτης.

Η παρουσία των μεταλλάξεων σχετίστηκε θετικά με την εμφάνιση και μεταλλάξεων της Νουκλεοφωσμίνης (Fisher's exact $p=0.008$), εύρημα συμβατό με τη μέχρι τώρα βιβλιογραφία.

Εικόνα 20. Έκφραση CD34 από τους FLT3 θετικούς μυελοβλάστες.



Εικόνα 21. Έκφραση CD13 από τους FLT3 θετικούς μυελοβλάστες.



A.1. Συσχετίσεις της FLT3-ITD-μετάλλαξης στο σύνολο των ασθενών της μελέτης

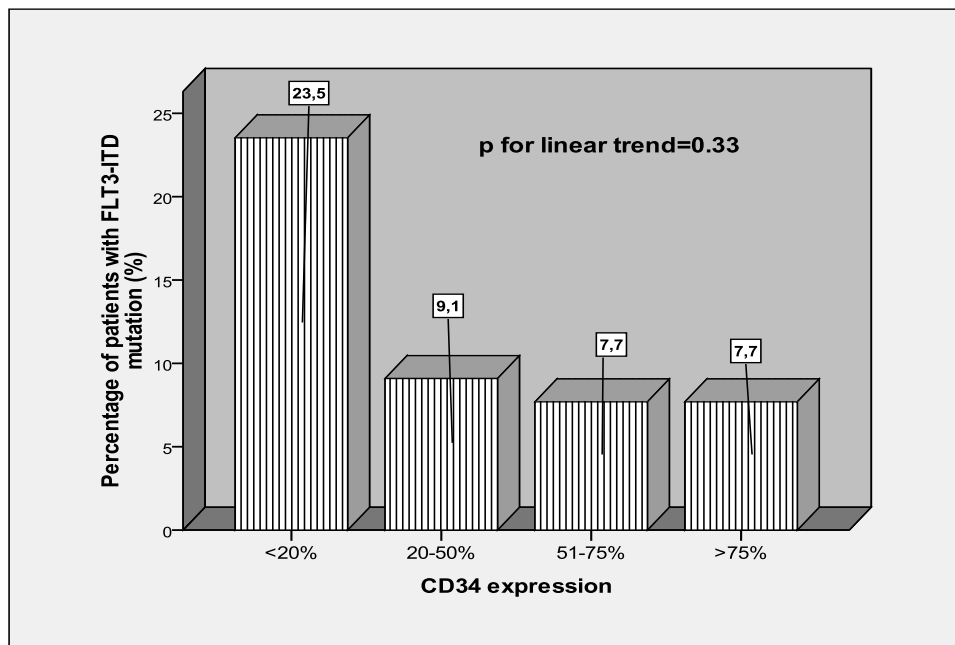
Οι ασθενείς με μετάλλαξη FLT3-ITD είχαν σημαντικά μεγαλύτερο αριθμό λευκών συγκριτικά με τους ασθενείς χωρίς μετάλλαξη (mean \pm SD: 116,847 \pm 103,250 vs. 25,104 \pm 52,881/μl, Mann-Whitney $p < 0.001$). Η προβλεπτική αξία του αριθμού των

λευκών για την παρουσία της μετάλλαξης *FLT3-ITD* ήταν πολύ καλή ($AUC=0.841$, $p<0.001$). Τιμή λευκών $\geq 65,000/\mu l$ είχε ειδικότητα 90% για την ανεύρεση της μετάλλαξης, ενώ τιμή λευκών κάτω από $3,500/\mu l$ πρακτικά απέκλειε με ευαισθησία 100% την παρουσία της μετάλλαξης *FLT3-ITD*.

Οι ασθενείς με μετάλλαξη *FLT3-ITD* είχαν σημαντικά υψηλότερη τιμή LDH στον ορό συγκριτικά με τους ασθενείς χωρίς μετάλλαξη ($1,298 \pm 2,469$ vs. 423 ± 477 IU/l, Mann-Whitney $p=0.002$). Μάλιστα, τιμή LDH ≥ 700 IU/l είχε ειδικότητα 90% για την ανεύρεση της μετάλλαξης, ενώ φυσιολογική τιμή LDH ορού απέκλειε με ευαισθησία 95% την παρουσία της μετάλλαξης.

Η παρουσία της μετάλλαξης *FLT3-ITD* συσχετίσθηκε αρνητικά με την έκφραση CD34 από τους μυελοβλάστες (p for linear trend=0.033, Εικόνα 22).

Εικόνα 22. Έκφραση CD34 από τους *FLT3-ITD*+ μυελοβλάστες.



A.2. Συσχετίσεις της σημειακής μετάλλαξης του *FLT3* στο σύνολο των ασθενών της μελέτης.

Οι ασθενείς με τη σημειακή μετάλλαξη είχαν σημαντικά υψηλότερη τιμή LDH στον ορό συγκριτικά με τους ασθενείς χωρίς μετάλλαξη ($1,286 \pm 1,250$ vs. 464 ± 902 IU/l, Mann-Whitney $p=0.002$). Η προβλεπτική αξία του αριθμού των λευκών για την παρουσία της μετάλλαξης *FLT3*-TKD ήταν καλή (AUC=0.808, $p=0.002$). Τιμή LDH ≥ 800 IU/l είχε ειδικότητα 90% για την ανεύρεση της μετάλλαξης, ενώ τιμή LDH ορού <240 IU/l απέκλειε με ευαισθησία $\approx 100\%$ την παρουσία της μετάλλαξης.

Υπήρχε μια τάση συσχέτισης της μετάλλαξης *FLT3*-TKD με ιστορικό νεοπλασίας (συχνότητα προηγούμενης νεοπλασίας 33.3% σε ασθενείς με σημειακή μετάλλαξη, έναντι 9.2% σε ασθενείς που δεν είχαν τη μετάλλαξη) που όμως δεν έφθασε στη στατιστική σημαντικότητα (Fisher's exact $p=0.057$). Επίσης υπήρχε μια τάση συσχέτισης της ανωτέρω μετάλλαξης με την παρουσία λεμφαδενοπάθειας, το οποίο ταιριάζει με το μονοκυτταρικό στοιχείο από τη FAB-ταξινόμηση, αφού 6 από τους 9 TKD+ ασθενείς ήταν M4, M5 και CMMI (συχνότητα λεμφαδενοπάθειας 22.2% σε ασθενείς με *FLT3*-TKD έναντι 5.3% σε ασθενείς που δεν είχαν τη μετάλλαξη, Fisher's exact $p=0.105$).

A.3. Επιβίωση σε ασθενείς με *FLT3*-total mutation

Οι ασθενείς με τη μετάλλαξη *FLT3* είχαν μια τάση βραχύτερης επιβίωσης συγκριτικά με τους ελεύθερους μετάλλαξης ασθενείς. Συγκεκριμένα, η διάμεση επιβίωση στην ομάδα της μετάλλαξης ήταν 4 μήνες (ενδοτεταρτημοριακό εύρος, interquartile range 1 – 10). Αντίστοιχα, στην ομάδα χωρίς μετάλλαξη η διάμεση επιβίωση ήταν 9 μήνες (IQR 2 – 18), log rank $p=0.088$.

Με Cox regression φάνηκε ότι η παρουσία της μετάλλαξης έτεινε να επηρεάζει δυσμενώς την επιβίωση των ασθενών. Παρακάτω αναλύονται τρία μοντέλα (Πίνακας 7). Λόγω του ότι το φύλο δε συσχετίσθηκε, γι' αυτό δε συμπεριλήφθηκε. Από την ανάλυση φάνηκε ότι είναι ο αριθμός των λευκοκυττάρων που συσχετίσθηκε με την επιβίωση και όχι η παρουσία της μετάλλαξης.

Πίνακας 7.

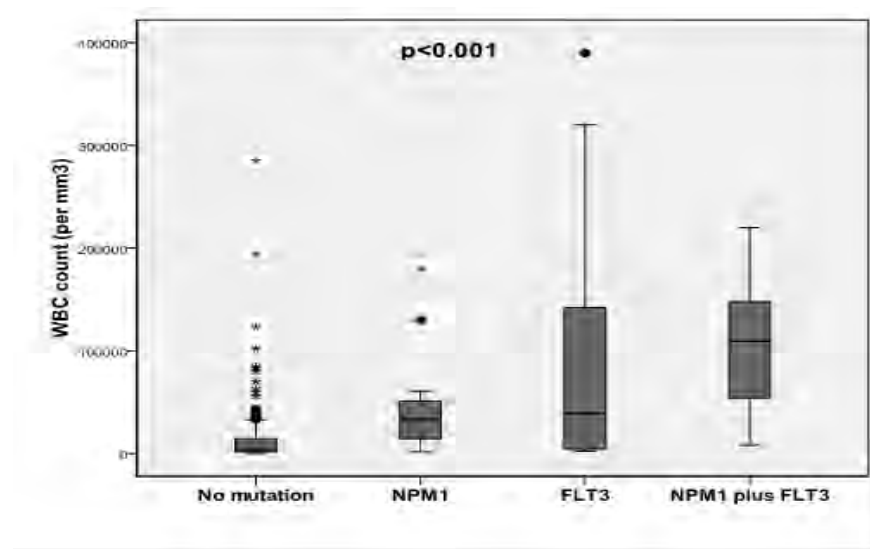
<i>Variable</i>	<i>Hazard ratio (HR)</i>	<i>95% confidence interval</i>	<i>p value</i>
Model 1			
<i>FLT3_total</i>	1.61	0.96 – 2.69	0.071
Ηλικία	1.02	1.00 – 1.03	0.076
Model 2			
<i>FLT3_total</i>	1.56	0.93 – 2.62	0.094
Ηλικία	1.03	1.01 – 1.04	0.005
>20% θλάστες στο μυελό	3.32	1.89 – 5.81	<0.001
Model 3			
<i>FLT3_total</i>	1.27	0.73 – 2.21	0.398
Ηλικία	1.03	1.01 – 1.05	0.003
>20% θλάστες στο μυελό	3.19	1.83 – 5.57	<0.001
Αριθμός λευκοκυττάρων (ανά 1000/μλ αύξησης)	1.005	1.002 – 1.008	0.002

A.4. Συσχετίσεις της *NPM1* –μετάλλαξης στο σύνολο των ασθενών της μελέτης

Η παρουσία μετάλλαξης *NPM1* συσχετίστηκε με την παρουσία της μετάλλαξης *FLT3* (Fischer's exact $p=0.008$), εύρημα που έχει ξαναπεριγραφεί. Ειδικότερα, φάνηκε πως η συνεμφάνιση αφορούσε στον τύπο *FLT3-ITD* (Fischer's exact $p=0.002$) και όχι στον *FLT3-TKD* ($p=NS$):

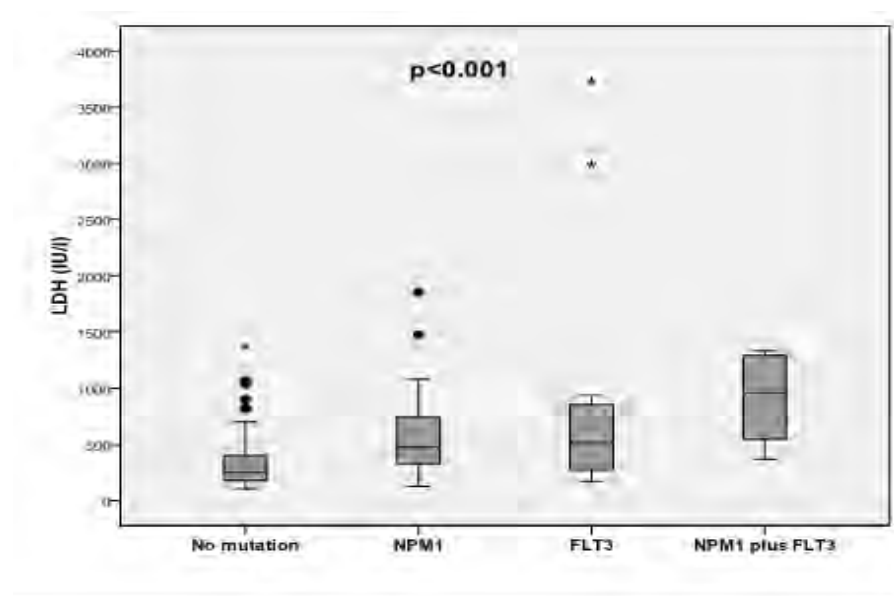
Οι μεταλλάξεις της Νουκλεοφωσμίνης σχετίστηκαν θετικά με υψηλότερο αριθμό λευκών ($p<0.001$). Στην Εικόνα 23, φαίνεται σε γράφημα πώς διακυμαίνονται τα λευκά ανάλογα με την παρουσία των μεταλλάξεων. Όπως φαίνεται στο γράφημα, στους ασθενείς που είχαν μία από τις δύο μεταλλάξεις ο αριθμός των λευκών ήταν μεγαλύτερος συγκριτικά με τους ασθενείς που δεν είχαν μετάλλαξη. Επίσης οι ασθενείς που έφεραν και τις δύο μεταλλάξεις είχαν το μεγαλύτερο αριθμό λευκών συγκριτικά με τις υπόλοιπες ομάδες. Σε *post hoc* ανάλυση (Bonferroni's test) οι ομάδες που διέφεραν σημαντικά ήταν οι *FLT3* και *NPM-plus-FLT3* με την ελεύθερη μετάλλαξης ομάδα.

Εικόνα 23. Αριθμός λευκοκυττάρων σε όλους τους ασθενείς της μελέτης, με βάση την παρουσία μεταλλάξεων *NPM1* και *FLT3*.



Παρόλο που η παρουσία της μετάλλαξης *NPM1* συσχετίστηκε με υψηλότερες τιμές *LDH* (752 ± 481 IU/l σε ασθενείς με *NPM1* vs. 475 ± 999 IU/l σε ασθενείς χωρίς μετάλλαξη, Mann-Whitney $p < 0.001$), οι μεγαλύτερες τιμές *LDH* παρατηρήθηκαν στους ασθενείς που έφεραν και τις δύο μεταλλάξεις (*NPM1-plus-FLT3*) και αυτή η ομάδα ήταν που διέφερε σημαντικά από τους ασθενείς χωρίς μετάλλαξη (post hoc ανάλυση με στατιστικό έλεγχο Dunnett C, Εικόνα 24) :

Εικόνα 24. Τιμές *LDH* σε όλους τους ασθενείς της μελέτης, με βάση την παρουσία μεταλλάξεων *NPM1* και *FLT3*.



Η επιβίωση στους φορείς της μετάλλαξης *NPM1* έτεινε να είναι βραχύτερη συγκριτικά με τους ασθενείς που δεν είχαν τη μετάλλαξη, αλλά η διαφορά δεν έφθασε στη στατιστική σημαντικότητα. Συγκρίνοντας και τις τέσσερις ομάδες, η βραχύτερη επιβίωση έδειξε να είναι στην ομάδα *NPM1-plus-FLT3*, αλλά η διαφορά πάλι δεν ήταν στατιστικά σημαντική.

Με *Cox proportional hazards regression* όπως και στην προηγούμενη ανάλυση, η επιβίωση φάνηκε να συσχετίζεται με τον αριθμό των λευκοκυττάρων στο περιφερικό αίμα, το ποσοστό βλαστών στο μυελό των οστών και την ηλικία, ενώ ο τύπος της μετάλλαξης δε συσχετίστηκε ανεξάρτητα (Πίνακας 8).

Πίνακας 8. Συσχέτιση της επιβίωσης με τον τύπο της μετάλλαξης, την ηλικία της διάγνωσης, τον αριθμό των λευκοκυττάρων στο περιφερικό αίμα και το ποσοστό βλαστών στο μυελό των οστών.

Τύπος μετάλλαξης			0.816
Καμία	1.00		
<i>FLT3</i>	1.17	0.62 – 2.21	
<i>NPM1</i>	1.28	0.67 – 2.43	
<i>FLT3-plus NPM1</i>	1.34	0.56 - 3.22	
Ηλικία κατά τη διάγνωση (έτη)	1.03	1.01 – 1.05	0.003
>20% βλάστες στο μυελό των οστών	3.18	1.82 – 5.56	<0.001
Λευκοκύτταρα (ανά 1,000/μl άυξης)	1.005	1.002 – 1.008	0.002

Ανοσοφαινοτυπικά, στο σύνολο των ασθενών, οι μεταλλάξεις της *NPM1* σχετίστηκαν θετικά με χαμηλή έκφραση *CD34* ($p<0.001$), δηλαδή εμφανίζονταν πιο σπάνια όταν η έκφραση *CD34* ήταν >50%. Η παρουσία τους επίσης σχετίστηκε με χαμηλή έκφραση *CD117* ($p=0.024$), *HLA-DR* ($p=0.029$), *CD15* ($p=0.019$) και *CD14*

($p=0.011$) και με υψηλότερη έκφραση CD13 ($p=0.028$), CD116 ($p<0.001$), CD64 ($p=0.016$) και CD36 ($p=0.002$).

A.5. Συσχετίσεις της παρουσίας συνδυασμού μεταλλάξεων του FLT3 και της NPM1 με άλλα κλινικά και εργαστηριακά ευρήματα.

Αιμοπετάλια-Σπληνομεγαλία

Δεν παρατηρήθηκε διαφορά στον αριθμό των αιμοπεταλίων ανάλογα με την παρουσία των μεταλλάξεων FLT3 total και επιμέρους, NPM1, ή της συνύπαρξής τους. Ο αριθμός των αιμοπεταλίων διέφερε οριακά στους ασθενείς με σπληνομεγαλία συγκριτικά με ασθενείς ελεύθερους σπληνομεγαλίας ($65,229 \pm 74,242$ / μ l vs. $95,314 \pm 91,912$ / μ l αντίστοιχα, Mann-Whitney $p=0.051$).

Επίσης, παρόλο που στη μονομεταβλητή ανάλυση ο μεγαλύτερος αριθμός αιμοπεταλίων είχε ευνοϊκή επίδραση στην επιβίωση, στην πολυμεταβλητή ανάλυση παρατηρήθηκε ότι η μεταβλητή που συσχετίσθηκε ανεξάρτητα με την επιβίωση ήταν η παρουσία σπληνομεγαλίας (αύξηση κατά 1,9 φορές του κινδύνου θανάτου), ενώ υπήρχε οριακή διαφορά στη συχνότητα εμφάνισης σπληνομεγαλίας ανάλογα με την παρουσία μετάλλαξης (Pearson's chi-square $p=0.043$).

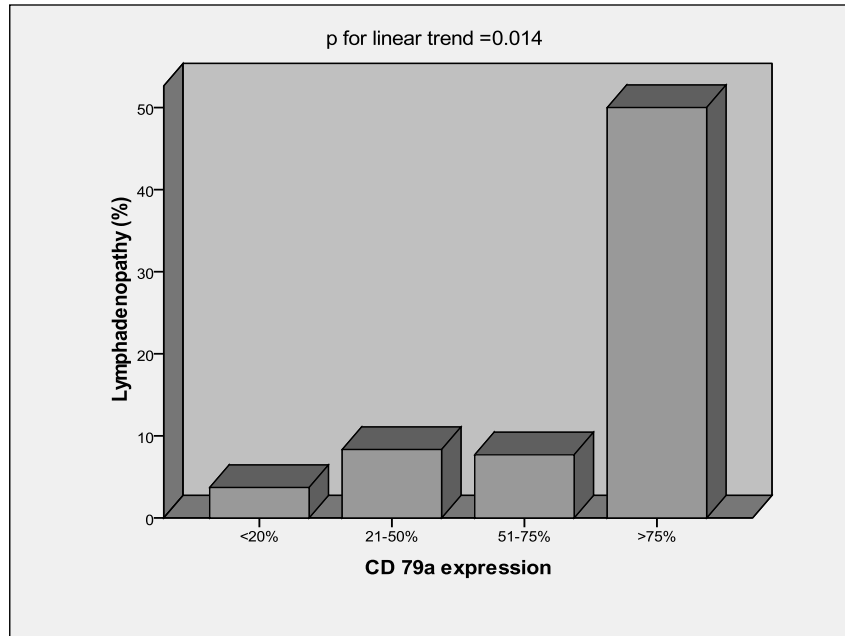
Δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση της παρουσίας σπληνομεγαλίας ή λεμφαδενοπάθειας και της έκφρασης όλων των CD και λοιπών μορίων από τους βλάστες, εκτός από το CD79a, που όσο μεγαλύτερη ήταν η έκφρασή του, τόσο πιο συχνή η παρουσία λεμφαδενοπάθειας (p for linear trend = 0.014, Εικόνα 25), ενώ αντίστοιχη συμπεριφορά είχε το CD7 ($p=0.019$), δείκτες B- και T- λεμφικής σειράς αντίστοιχα.

Αριθμός λευκών και μεταλλάξεις

Όταν προσαρμόσθηκε γραμμικό μοντέλο με τον αριθμό των λευκών αιμοσφαιρίων και τις τρεις μεταλλάξεις (FLT3-ITD, FLT3-TKD και NPM1), οι δύο τύποι μεταλλάξεων του FLT3 συσχετίσθηκαν ανεξάρτητα με τον αριθμό των λευκοκυττάρων στο

περιφερικό αίμα, ενώ οι συσχετίσεις για τις μεταλλάξεις της *NPM1* δεν έφθασαν στη στατιστική σημαντικότητα ($p=0.078$).

Εικόνα 25. Συσχέτιση της έκφρασης *CD79a* και της παρουσίας λεμφαδενοπάθειας.



LDH και μεταλλάξεις

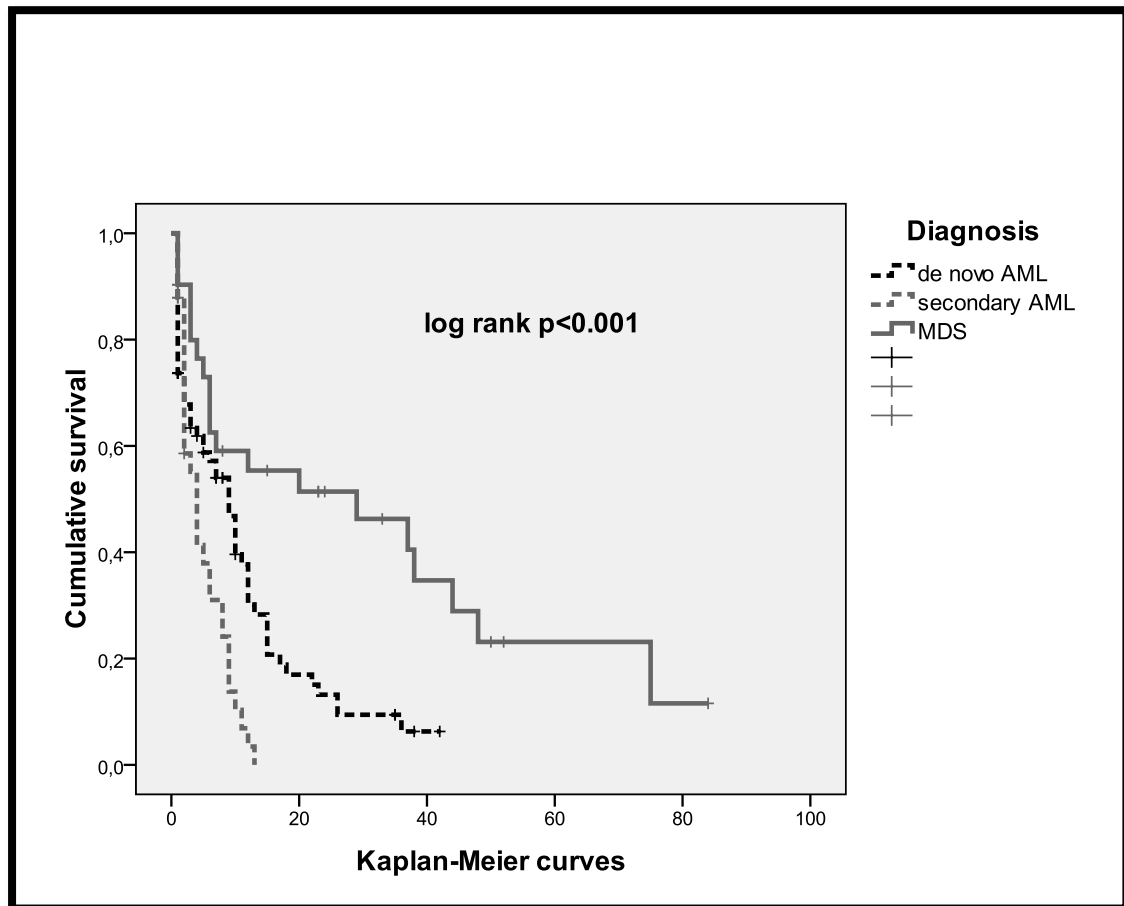
Και για την LDH υπήρχε αντίστοιχη παρατήρηση. Η ανεξάρτητη συσχέτιση ήταν με τους δύο τύπους μεταλλάξεων του *FLT3*, ενώ τα επίπεδα LDH δεν συσχετίστηκαν με την *NPM1*. Εδώ υπήρχε και μια σημαντική αλληλεπίδραση της *FLT3-ITD* με την *NPM1*. Η συνύπαρξή τους φάνηκε ότι σχεδόν αναιρούσε την αύξηση που προκαλούσε καθεμιά ξεχωριστά.

A.6. Ανάλυση επιβίωσης στο σύνολο των ασθενών της μελέτης (n=140).

Η επιβίωση βάσει της διάγνωσης, όπως θα αναμενόταν ήταν καλύτερη στους ασθενείς με μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο, ακολουθούσαν οι ασθενείς με

πρωτοπαθή οξεία μυελογενή λευχαιμία και χειρότερη επιβίωση είχαν οι ασθενείς με δευτεροπαθή ΟΜΛ (Εικόνα 26).

Εικόνα 26. Ανάλυση επιβίωσης βάσει της διάγνωσης. (*De novo AML* – πρωτοπαθής ΟΜΛ, *secondary AML* – δευτεροπαθής ΟΜΛ, *MDS* – μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο).



Με *Cox proportional hazards regression* ανάλυση, παρατηρήθηκε πως οι ασθενείς με δευτεροπαθή ΟΜΛ είχαν 5πλάσιο κίνδυνο θανάτου συγκριτικά με τους ασθενείς με μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο, ενώ αντίστοιχα οι ασθενείς με πρωτοπαθή ΟΜΛ, είχαν 2,7 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο να πεθάνουν από τους ασθενείς με ΜΔΣ. Επίσης η μετάλλαξη *FLT3-ITD* αύξανε κατά 1,9 φορές τον κίνδυνο θανάτου, όπως διαπιστώθηκε στο μοντέλο του Πίνακα 9, που είναι διορθωμένο για την ηλικία των ασθενών.

Πίνακας 9. Κίνδυνος θανάτου βάσει της διάγνωσης και της παρουσίας μεταλλάξεων του FLT3 και της NPM1.

<i>Variable</i>	<i>Hazard ratio (HR)</i>	<i>95% confidence interval</i>	<i>p value</i>
Ηλικία κατά τη διάγνωση (ανά έτος αύξησης)	1.02	1.00 – 1.04	0.034
Διάγνωση			<0.001
ΜΔΣ	1.0*		
Πρωτοπαθής ΟΜΛ	2.71	1.50 – 4.89	0.001
Δευτεροπαθής ΟΜΛ	5.08	2.61 – 9.89	<0.001
FLT3-ITD	1.93	1.03 – 3.63	0.04
FLT3-TKD	1.07	0.46 – 2.47	0.883
NPM1	1.35	0.77 – 2.37	0.296

Όταν στο μοντέλο προστέθηκε και ο αριθμός λευκοκυττάρων, διαπιστώθηκε ότι η συσχέτιση του κινδύνου θανάτου **μετατίθονταν από την FLT3-ITD στον αριθμό των λευκοκυττάρων** (ανά 1,000/μl αύξησης, Πίνακας 10).

Πίνακας 10. Κίνδυνος θανάτου, βάσει της διάγνωσης, του αριθμού των λευκοκυττάρων και της παρουσίας μεταλλάξεων του FLT3 και της NPM1.

	<i>Sig.</i>	<i>Exp(B)</i>	<i>95,0% CI for Exp(B)</i>	
			<i>Lower</i>	<i>Upper</i>
Ηλικία	,022	1,022	1,003	1,041
Διάγνωση	,001	2,626	1,464	4,713
FLT3-ITD	,224	1,509	,777	2,928
FLT3-TKD	,974	,986	,423	2,300
NPM1	,422	1,259	,718	2,206
Αριθμός λευκοκυττάρων	,003	1,005	1,002	1,008

Ωστόσο, σε GLM μοντέλο γραμμικής παλινδρόμησης, με εξαρτημένη μεταβλητή τον αριθμό των λευκών και επεξηγηματικές τη διάγνωση (ΜΔΣ, πρωτοπαθή ΟΜΛ και δευτεροπαθή ΟΜΛ) και την παρουσία των μεταλλάξεων, φάνηκε ότι η FLT3-ITD ($p<0.001$) και η FLT3-TKD ($p=0.036$) συσχετίστηκαν ανεξάρτητα με αύξηση του αριθμού των λευκών.

Από τα παραπάνω συνάγεται ότι η παρουσία των μεταλλάξεων του FLT3, ιδιαίτερα η FLT3-ITD, αποτελούσε δυσμενή προγνωστικό παράγοντα στην επιβίωση των ασθενών.

Η Αιματολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας, άρχισε να λειτουργεί και να θεραπεύει αιματολογικές κακοήθειες 1 έτος μετά το πιο παλιό περιστατικό της μελέτης και τα πρώτα χρόνια λειτουργίας της συστεγαζόταν με την Ογκολογική Κλινική. Αρκετοί ασθενείς αποφάσιζαν να απευθυνθούν σε κέντρα της πρωτεύουσας για θεραπεία, ή μετά την ύφεση, για μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων, με αποτέλεσμα να μη γνωρίζουμε τη συνολική τους επιβίωση. Επιπρόσθετα, ορισμένοι νεότεροι ασθενείς προτιμούσαν μεγαλύτερα κέντρα της πρωτεύουσας, με αποτέλεσμα οι περισσότεροι ασθενείς που έμεναν να λάβουν θεραπεία να είναι άνω των 70 ετών. Τα πιο πάνω δεδομένα, θα πρέπει να ληφθούν υπόψη κατά την ανάλυση της επιβίωσης των ασθενών.

Β. Συσχετίσεις των μεταλλάξεων του FLT3 και της NPM1 για τους ασθενείς με οξεία μυελογενή λευχαιμία (n=109):

Και στην ομάδα των ΟΜΛ, οι ασθενείς με μετάλλαξη FLT3-total είχαν σημαντικά μεγαλύτερο αριθμό λευκοκυττάρων συγκριτικά με τους ασθενείς χωρίς μετάλλαξη ($\text{mean} \pm \text{SD}$: $98,163 \pm 110,688$ vs. $21,845 \pm 44,539/\mu\text{l}$, Mann-Whitney $p<0.001$). Μάλιστα, τιμή λευκοκυττάρων $\geq 60,000/\mu\text{l}$ είχε ειδικότητα 90% για την ανεύρεση της μετάλλαξης, ενώ τιμή κάτω από $2,000/\mu\text{l}$ πρακτικά απέκλειε με ευαισθησία 100% την παρουσία της μετάλλαξης.

Οι ασθενείς με μετάλλαξη *FLT3-total* είχαν σημαντικά υψηλότερη τιμή *LDH* στον ορό συγκριτικά με τους ασθενείς χωρίς μετάλλαξη ($1,455 \pm 2,295$ vs. 384 ± 312 IU/l, Mann-Whitney $p < 0.001$). Μάλιστα, τιμή *LDH* ≥ 800 IU/l είχε ειδικότητα 90% για την ανεύρεση της μετάλλαξης, ενώ φυσιολογική τιμή *LDH* ορού πρακτικά απέκλειε με ευαισθησία 90% την παρουσία της μετάλλαξης.

Οι ασθενείς με τη μετάλλαξη *FLT3-total* εμφάνιζαν σημαντικά μεγαλύτερο ποσοστό διήθησης του μυελού συγκριτικά με τους ασθενείς χωρίς τη μετάλλαξη ($69.4\% \pm 24.2\%$ vs. $55.9\% \pm 24.5\%$ αντίστοιχα, Mann-Whitney $p = 0.031$).

Δεν υπήρχε διαφορά στον αριθμό των αιμοπεταλίων ανάλογα με την παρουσία ή όχι της μετάλλαξης *FLT3-total*.

Η παρουσία *FLT3* συσχετίσθηκε με την παρουσία *NPM1* (Fisher's exact $p = 0.005$). Συγκεκριμένα, οι ασθενείς που είχαν τη μετάλλαξη *FLT3-total* είχαν 5πλάσια πιθανότητα να φέρουν και τη μετάλλαξη της *NPM1* συγκριτικά με τους ασθενείς που δεν είχαν τη μετάλλαξη *FLT3-total* (OR=5.2, 95% confidence interval 1.7 – 15.8, $p = 0.003$).

Όσον αφορά τα ανοσοφαινοτυπικά χαρακτηριστικά των κυττάρων με μετάλλαξη του *FLT3*, δεν διέφεραν στην έκφραση *CD34* με τους ελεύθερους μετάλλαξης ασθενείς. Επιπλέον, η *FLT3-total* συσχετίσθηκε θετικά με υψηλή έκφραση *CD13* (Pearson's chi square $p = 0.030$), *CD117* ($p = 0.032$) και χαμηλή έκφραση *MPO* ($p = 0.022$), *CD116* ($p < 0.001$), *CD64* ($p = 0.007$), *HLA-DR* ($p = 0.035$), *CD15* ($p = 0.020$), *CD36* ($p = 0.002$) και *CD14* ($p = 0.003$).

B.1. Συσχετίσεις της *FLT3-ITD*-μετάλλαξης στους ασθενείς με *OML*.

Φάνηκε πως οι *FLT3-ITD+* ασθενείς ήταν συνήθως γυναίκες, ή αλλιώς γυναίκες με *OML*, είχαν 3,5πλάσια πιθανότητα να είναι φορείς της μετάλλαξης, συγκριτικά με τους άνδρες (OR=3.52, 95% CI 1.06 - 11.66, $p = 0.039$).

Οι ασθενείς με *OML* που έφεραν τη μετάλλαξη *FLT3-ITD*, είχαν 7πλάσια πιθανότητα να έχουν και τη μετάλλαξη *NPM1* μετά από διόρθωση ως προς το φύλο (OR=7.02,

95% CI 1.96 – 25.14, $p=0.003$). Εδώ αξίζει να σημειωθεί το εξής: Η ανεξάρτητη συσχέτιση ήταν με τη μετάλλαξη NPM1 και όχι με το φύλο. Δηλαδή, επειδή οι γυναίκες με ΟΜΛ έτειναν να είναι πιο συχνά φορείς της NPM1 και η NPM1 είχε ισχυρή συσχέτιση με τη συνύπαρξη FLT3-ITD, αν κανείς εξέταζε μόνο το φύλο, φαινόταν αυτό να συσχετίζεται με την FLT3-ITD, όμως σε μοντέλο που περιλάμβανε και την NPM1, η συσχέτιση αυτή εξασθενούσε.

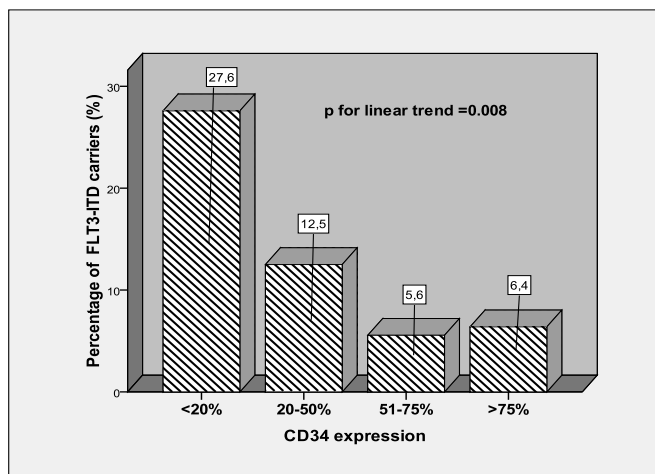
Οι ασθενείς με ΟΜΛ που έφεραν τη μετάλλαξη FLT3-ITD είχαν σημαντικά μεγαλύτερο αριθμό λευκοκυττάρων συγκριτικά με τους ασθενείς χωρίς μετάλλαξη ($mean \pm SD$: $100,669 \pm 93,329$ vs. $26,276 \pm 58,090/\mu l$, Mann-Whitney $p<0.001$). Αριθμός λευκοκυττάρων $>60,000/\mu l$ είχε ειδικότητα 90% για την ανεύρεση της μετάλλαξης, ενώ αριθμός λευκοκυττάρων $<3,500/\mu l$ πρακτικά απέκλειε την παρουσία της μετάλλαξης.

Οι ασθενείς με ΟΜΛ που έφεραν τη μετάλλαξη FLT3-ITD είχαν σημαντικά υψηλότερη τιμή LDH στον ορό συγκριτικά με τους ασθενείς χωρίς μετάλλαξη ($1,410 \pm 2,646$ vs. 457 ± 539 IU/l, Mann-Whitney $p=0.006$). Μάλιστα, τιμή LDH ≥ 700 IU/l είχε ειδικότητα 90% για την ανεύρεση της μετάλλαξης, ενώ φυσιολογική τιμή LDH ορού απέκλειε με ευαισθησία 95% την παρουσία της μετάλλαξης.

Η μετάλλαξη FLT3-ITD δεν συσχετίστηκε με λεμφαδενοπάθεια ή σπληνομεγαλία.

Η μετάλλαξη FLT3-ITD συσχετίστηκε με μειωμένη έκφραση του CD34 (Εικόνα 27).

Εικόνα 27. Έκφραση του CD34 από τους FLT3-ITD+ μυελοβλάστες.



Υπήρχε μία τάση αρνητικής συσχέτισης της μετάλλαξης FLT3-ITD με την έκφραση του CD13 (p for linear trend=0.023). Η συσχέτιση δεν άγγιξε τη στατιστική σημαντικότητα (Pearson's chi square $p=0.145$), όμως η γραμμικότητα της τάσης ήταν αξιοσημείωτη.

Οι FAB διαγνώσεις των FLT3-ITD+ ασθενών ήταν 38% M1, και σχετικά μοιρασμένα ποσοστά στις άλλες μορφολογίες: από 15% στις M2, M3 και M4, 8% M5 και 8% αταξινόμητη λευχαιμία. Ενδιαφέρον είναι, πως το 50% των ασθενών με Προμυελοκυτταρική λευχαιμία που εντάχθηκαν στη μελέτη ήταν θετικοί στην ITD-μετάλλαξη (2 στους 4). Στον ένα μάλιστα συνυπήρχε και μετάλλαξη της Νουκλεοφωσμίνης, το οποίο δεν είναι σπάνιο.

B.2. Συσχετίσεις της σημειακής μετάλλαξης του FLT3 στους ασθενείς με ΟΜΛ.

Οι ασθενείς με ΟΜΛ που έφεραν τη σημειακή μετάλλαξη, έτειναν να έχουν πιο συχνά λεμφαδενοπάθεια συγκριτικά με τους ελεύθερους μετάλλαξης ασθενείς (28.6% vs 5.9%, Fischer's exact $p=0.083$, αλλά Pearson's chi square $p=0.026$).

Αυστηρά μιλώντας υπήρχε μια τάση συσχέτισης της μετάλλαξης FLT3-TKD με το ιστορικό χολολιθίασης (Fischer's exact $p=0.103$, Pearson's chi square $p=0.44$). Προσπαθώντας να ξεκαθαρίσει σαν εύρημα, προσαρμόστηκαν μοντέλα με μεταβλητές όπως φύλο, ηλικία, ΣΔ, αλκοολισμός, αλλά ΠΑΝΤΑ υπήρχε αυτή η τάση με odds ratios από 5 έως 6.5 και p values μικρότερα του 0.100. Διατηρώντας κάθε επιφύλαξη για την κλινική σημασία του ευρήματος, χαρακτηρίστηκε ως άγνωστης σημασίας τάση συσχέτισης, που χρήζει διερεύνησης με μεγαλύτερο αριθμό ασθενών.

Ανοσοφαινοτυπικά, υπήρχε μια οριακή θετική συσχέτιση της μετάλλαξης με την έκφραση HLA-DR ($p=0.044$) και μια επίσης οριακή θετική συσχέτιση με το CD15 ($p=0.034$), ενώ υπήρχε σημαντική θετική συσχέτιση με την έκφραση CD14 ($p<0.001$). Αυτό το εύρημα ταιριάζει και με τις μορφολογικές διαγνώσεις των ασθενών, αφού 5 από τους 7 FLT3-TKD+ ασθενείς ανήκαν στις M4 και M5 FAB-μορφολογικές κατηγορίες (Πίνακας 6).

B.3. Συσχετίσεις των μεταλλάξεων της NPM1 στους ασθενείς με ΟΜΛ.

Υπήρχε μία τάση αυξημένης συχνότητας της μετάλλαξης NPM1 σε ασθενείς με *de novo* ΟΜΛ συγκριτικά με τους ασθενείς με δευτεροπαθή ΟΜΛ (22.4% vs. 6.1%, Pearson's chi square $p=0.039$).

Οι ασθενείς με μετάλλαξη NPM1 είχαν σημαντικά μεγαλύτερο αριθμό λευκοκυττάρων συγκριτικά με τους ασθενείς χωρίς μετάλλαξη ($mean \pm SD$: 75,300 \pm 66,040 vs. 26,072 \pm 64,726/μl, Mann-Whitney $p<0.001$). Μάλιστα, τιμή λευκοκυττάρων $\geq 60,000/\mu l$ είχε ειδικότητα 90% για την ανεύρεση της μετάλλαξης, ενώ τιμή κάτω από 1,700/μl πρακτικά απέκλειε με ευαισθησία περίπου 100% την παρουσία της μετάλλαξης.

Οι ασθενείς με μετάλλαξη NPM1 είχαν σημαντικά υψηλότερη τιμή LDH στον ορό συγκριτικά με τους ασθενείς χωρίς μετάλλαξη (799 \pm 478 vs. 523 \pm 1,142 IU/l, Mann-Whitney $p<0.001$). Μάλιστα, τιμή LDH $\geq 1,350$ IU/l είχε ειδικότητα 90% για την ανεύρεση της μετάλλαξης, ενώ φυσιολογική τιμή LDH ορού πρακτικά απέκλειε με ευαισθησία 100% την παρουσία της μετάλλαξης.

Η ασθενείς με την FLT3-ITD-μετάλλαξη είχαν 8πλάσια πιθανότητα να έχουν μεταλλάξεις της NPM1 συγκριτικά με τους ασθενείς που δεν είχαν την FLT3-ITD (OR=8.2, 95% CI 2.4 – 28.7, $p=0.001$), ενώ η σημειακή μετάλλαξη δε συσχετίστηκε.

Η παρουσία της μετάλλαξης NPM1 συσχετίστηκε με μειωμένη έκφραση CD34 ($p<0.001$), CD13 ($p=0.009$), CD117 (p for linear trend =0.004) και HLA-DR ($p=0.038$). Από την άλλη, συσχετίστηκε με οριακά αυξημένη έκφραση MPO ($p=0.060$) και αυξημένη έκφραση CD116 (p for linear trend <0.001), CD64 ($p=0.025$), cCD68 (p for linear trend=0.008), CD15 ($p=0.014$) και CD36 (p for linear trend=0.001).

Οι FAB-διαγνώσεις των NPM1+ λευχαιμικών ασθενών ήταν συχνότερα M1 – 31%, αλλά όταν προστέθηκαν οι M4 και M5 ως «μονοκυτταρικές», μαζί αποτελούσαν το 42% των θετικών στη μετάλλαξη ασθενών. Από τους 19 θετικούς στη Νουκλεοφωσμίνη λευχαιμικούς ασθενείς, οι 8 είχαν και κάποια μετάλλαξη στον FLT3: Οι 6 ασθενείς ήταν NPM1+/ITD+, ένας ασθενής ήταν NPM1+/TKD+ και ένας ήταν NPM1+/ITD+/TKD+. Το 1/3 δηλαδή των NPM1+ είχαν και ITD. Όσον αφορά τις

FAB-διαγνώσεις των διπλά θετικών ασθενών, το 50% των ασθενών ανήκαν στη M4-M5 κατηγορία και το 25% στη M1.

B.4. Συσχετίσεις της παρουσίας συνδυασμού μεταλλάξεων του FLT3 και της NPM1 με άλλα κλινικά και εργαστηριακά ευρήματα των ασθενών με ΟΜΛ.

Αριθμός λευκών και μεταλλάξεις

Όταν προσαρμόσαμε γραμμικό μοντέλο με τον αριθμό των λευκών και τις τρεις μεταλλάξεις (FLT3-ITD, FLT3-TKD και NPM1), οι μεταλλάξεις που συσχετίστηκαν ανεξάρτητα ήταν οι δύο τύποι της FLT3, ενώ η NPM1 εμφάνισε οριακή συσχέτιση.

LDH και μεταλλάξεις:

Και για την LDH υπήρχε αντίστοιχη παρατήρηση. Η ανεξάρτητη συσχέτιση ήταν με τους δύο τύπους FLT3-μετάλλαξης.

Λεμφαδενοπάθεια

Σε μοντέλο λογιστικής παλινδρόμησης με εξαρτημένη μεταβλητή την παρουσία λεμφαδενοπάθειας και επεξηγηματικές μεταβλητές τις μεταλλάξεις FLT3-ITD, FLT3-TKD και NPM1, η FLT3-TKD είχε την τάση να αυξάνει την πιθανότητα εμφάνισης λεμφαδενοπάθειας, χωρίς όμως η τάση αυτή να φθάσει τη στατιστική σημαντικότητα.

Έκφραση μορίων

Παρακάτω ακολουθούν κάποιες **τάσεις** συσχέτισης μεταξύ της έκφρασης των μορίων και της παρουσίας μεταλλάξεων σε ασθενείς με ΟΜΛ.

- α. CD34: η παρουσία της μετάλλαξης NPM1 μόνης ή μαζί με την FLT3 συσχετίστηκε με χαμηλή έκφραση ($p < 0.001$).
- β. CD13: όταν ανιχνεύονταν NPM1, με ή χωρίς την FLT3, η έκφραση έτεινε να είναι χαμηλή ($p = 0.030$).

- γ. CD117: η παρουσία μεταλλάξεων (της μίας ή και των δύο) έτεινε να συνοδεύεται από χαμηλή έκφραση ($p=0.032$).
- δ. CD116: η παρουσία της NPM1 έτεινε να αυξάνει την έκφραση ($p<0.001$).
- ε. CD64: η NPM1 μόνη της έτεινε να αυξάνει την έκφραση ($p<0.007$).
- στ. CD56: η συνύπαρξη των μεταλλάξεων έτεινε να μειώνει την έκφραση ($p=0.076$).
- ζ. HLA-DR: η συνύπαρξη των μεταλλάξεων έτεινε να μειώνει την έκφραση ($p=0.035$).
- η. CD36: η μετάλλαξη NPM1 μόνη της έτεινε να αυξάνει την έκφραση ($p=0.002$).
- θ. CD14: η μετάλλαξη NPM1 μόνη της έτεινε να αυξάνει την έκφραση ($p=0.003$).

Θέλοντας να μελετήσουμε λίγο αναλυτικότερα τους ασθενείς με ΟΜΛ, ξεχωρίσαμε σε *de novo* και δευτεροπαθείς:

Γ. Συσχετίσεις των μεταλλάξεων του FLT3 και της NPM1 στους ασθενείς με πρωτοπαθή ΟΜΛ ($n=76$):

Οι μεταλλάξεις του FLT3 συνολικά, παρέμεναν σε θετική συσχέτιση με υψηλό αριθμό λευκοκυττάρων ($mean \pm SD$: $99,853 \pm 106,092$ vs. $24,020 \pm 48,798/\mu l$, Mann-Whitney $p<0.001$). Μάλιστα, τιμή λευκών $\geq 65,000/\mu l$ είχε ειδικότητα 90% για την ανεύρεση της μετάλλαξης, ενώ τιμή κάτω από $2,000/\mu l$ πρακτικά απέκλειε με ευαισθησία 100% την παρουσία της μετάλλαξης.

Οι ασθενείς με μετάλλαξη FLT3-total είχαν σημαντικά υψηλότερη τιμή LDH στον ορό συγκριτικά με τους ασθενείς χωρίς μετάλλαξη ($1,565 \pm 2,518$ vs. 389 ± 336 IU/l, Mann-Whitney $p<0.001$). Μάλιστα, τιμή LDH ≥ 860 IU/l είχε ειδικότητα 90% για την ανεύρεση της μετάλλαξης, ενώ φυσιολογική τιμή LDH ορού πρακτικά απέκλειε με ευαισθησία 90% την παρουσία της μετάλλαξης.

Η μετάλλαξη FLT3-ITD, θρέθηκε σε 11 ασθενείς με πρωτοπαθή οξεία μυελογενή λευχαιμία. Εργαστηριακά, κλινικά και δημογραφικά χαρακτηριστικά των ασθενών παρουσιάζονται στον Πίνακα 11.

Πίνακας 11: De novo AML, FLT3-ITD+.

Ασθενής	Φύλο	Ηλικία	WBC (/μl)	LDH (IU/l)	FAB	FLT3-ITD	FLT3-TKD	NPM1	Διήθηση μυελού (%)
ΟΜΛ 13	A	67	8,300	608	M2	1	0	1	95
ΟΜΛ 22	A	48	23,000	368	M5	1	0	1	65
ΟΜΛ 43	Γ	79	220,000	480	M3	1	0	1	93
ΟΜΛ 44	Γ	74	121,000	1,139	M1	1	0	1	70
ΟΜΛ 50	Γ	72	3,900	234	M1	1	0	0	70
ΟΜΛ 54	Γ	85	102,000	1,258	M4	1	1	1	40
ΟΜΛ 64	A	76	160,000	935	M1	1	0	0	90
ΟΜΛ 72	A	75	48,000	10,120	M3	1	0	0	70
ΟΜΛ 85	Γ	70	3,500	216	M1	1	0	0	60
ΟΜΛ 104	A	41	85,000	767	M1	1	0	1	30
ΟΜΛ 108	Γ	78	175,000	1,326	M4	1	0	1	95

Επεξηγήσεις: WBC – white blood cells – λευκά αιμοσφαίρια, LDH – lactat dehydrogenase – γαλακτική αφυδρογονάση.

Η παρουσία της μετάλλαξης FLT3-ITD αύξησε κατά 9.4 φορές την πιθανότητα να συνυπάρχει και η μετάλλαξη της NPM1 (OR=9.44; 95% confidence interval 2.23 – 39.97, $p=0.002$) σε μοντέλο διορθωμένο ως προς την ηλικία, ενώ η σημειακή μετάλλαξη δεν φάνηκε να συσχετίζεται.

Σε GLM μοντέλο με εξαρτημένη μεταβλητή την LDH και με διόρθωση για την ηλικία, η μετάλλαξη FLT3-ITD φάνηκε να συσχετίζεται ανεξάρτητα με αυξημένη LDH ($p=0.002$). Η FLT3-TKD εμφάνισε τάση συσχέτισης που δεν έφτασε τη στατιστική σημαντικότητα ($p=0.092$), ενώ η NPM1 δεν συσχετίστηκε ανεξάρτητα.

Οι FLT3-ITD+ de novo λευχαιμικοί ανήκαν κατά το 45.5% στη M1-μορφολογία, μέση ηλικία είχαν τα 69.5 έτη, και ήταν 6 γυναίκες και 5 άντρες. Ύφεση είχαν κάνει οι 2 από αυτούς τους ασθενείς, με κλασσικό σχήμα Χημειοθεραπείας, βασισμένο σε Κυταραβίνη: Ο ΟΜΛ13, με συνύπαρξη και NPM1-μετάλλαξης και η ΟΜΛ85, μόνο ITD+. Υποτροπίασαν σε 8 και 6 μήνες αντίστοιχα και στην υποτροπή ήταν χημειοανθεκτικοί. Καρυότυπος υπήρχε σε 5 από τους ασθενείς – οι 2 είχαν φυσιολογικό καρυότυπο, 2 ασθενείς είχαν τρισωμία 8 και ένας ασθενής είχε

τρισωμία 13. Από συνοδά νοσήματα δεν υπήρχε κάτι άξιο λόγου, εκτός από ένα ασθενή με HCV-λοίμωξη.

Η σημειακή μετάλλαξη του FLT3, βρέθηκε σε 5 ασθενείς με πρωτοπαθή οξεία μυελογενή λευχαιμία. Εργαστηριακά, κλινικά και δημογραφικά χαρακτηριστικά των ασθενών παρουσιάζονται στον Πίνακα 12.

Πίνακας 12: De novo AML, FLT3-TKD+.

Ασθενής	Φύλο	Ηλικία	WBC (/μl)	LDH (IU/l)	FAB	FLT3- ITD	FLT3- TKD	NPM1	Καρυότυ- πος	Λεμφαδενο- πάθεια
ΟΜΛ 54	Γ	85	102,000	1,258	M4	1	1	1	46XX	-
ΟΜΛ 58	A	34	2,100	452	M1	0	1	0	Tris 8	-
ΟΜΛ 70	A	62	390,000	3,730	M5	0	1	0	-	-
ΟΜΛ 75	A	72	39,000	511	M5	0	1	0	-	+
ΟΜΛ 77	Γ	41	117,000	1,331	M4	0	1	1	46XX	+

Επεξηγήσεις: WBC – white blood cells – λευκά αιμοσφαίρια, LDH – lactat dehydrogenase – γαλακτική αφυδρογονάση.

Σε GLM μοντέλο με εξαρτημένη μεταβλητή τον αριθμό λευκών και με διόρθωση για την ηλικία, η μετάλλαξη FLT3-TKD φάνηκε να συσχετίζεται ανεξάρτητα με αυξημένο αριθμό λευκών ($p=0.003$). Η FLT3-ITD εμφάνισε τάση συσχέτισης που δεν έφτασε τη στατιστική σημαντικότητα ($p=0.055$), ενώ η NPM1 δεν συσχετίστηκε ανεξάρτητα.

Οι FLT3-TKD+ de novo λευχαιμικοί, ήταν 5 ασθενείς, οι 4 από τους οποίους ανήκαν στις «μονοκυτταρικές» λευχαιμίες M4 και M5. Ύφεση είχαν κάνει 2 από τους ασθενείς, ο ένας εκ των οποίων είχε υποβληθεί σε αλλογενή μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων από συμβατή αδελφή. Και οι δύο αυτοί ασθενείς ήταν εν ζωή κατά το κλείσιμο της μελέτης. Καρυότυπος υπήρχε σε 3 από τους ασθενείς. Ο ασθενής που μεταμοσχεύθηκε είχε τρισωμία 8 και οι άλλοι είχαν φυσιολογικό καρυότυπο. Δύο από τους 5 ασθενείς είχαν και μετάλλαξη της Νουκλεοφωσμίνης, ο ένας εκ των οποίων είχε και ITD-μετάλλαξη του FLT3.

Μετάλλαξη της NPM1, βρέθηκε σε 5 ασθενείς με πρωτοπαθή οξεία μυελογενή λευχαιμία. Εργαστηριακά, κλινικά και δημογραφικά χαρακτηριστικά των ασθενών παρουσιάζονται στον Πίνακα 13.

Πίνακας 13: De novo AML, NPM1+.

Ασθενής	Φύλο	Ηλικία	WBC (/μl)	LDH (IU/l)	FAB	NPM 1	FLT3- ITD	FLT3- TKD	καρυότυπος
ΟΜΛ 11	Γ	86	1,700	325	M1	1	0	0	46XX
ΟΜΛ 13	Α	67	8,300	608	M2	1	1	0	-
ΟΜΛ 21	Α	78	33,500	742	UC	1	0	0	-
ΟΜΛ 22	Α	48	23,000	368	M5	1	1	0	-
ΟΜΛ 23	Α	76	51,000	423	M4	1	0	0	46XY
ΟΜΛ 34	Γ	67	8,800	381	M1	1	0	0	-
ΟΜΛ 43	Γ	79	220,000	480	M3	1	1	0	-
ΟΜΛ 44	Γ	74	121,000	1,139	M1	1	1	0	-
ΟΜΛ 51	Α	78	49,000	232	M2	1	0	0	46XY
ΟΜΛ 54	Γ	85	102,000	1,258	M4	1	1	1	46XX
ΟΜΛ 60	Γ	78	130,000	1,854	M5	1	0	0	-
ΟΜΛ 77	Γ	41	117,000	1,331	M4	1	0	1	46XX
ΟΜΛ 82	Α	70	60,500	476	M1	1	0	0	46XY
ΟΜΛ 87	Γ	76	26,600	1,080	M1	1	0	0	-
ΟΜΛ 104	Α	41	85,000	767	M1	1	1	0	-
ΟΜΛ 107	Α	73	14,300	629	ΔΙΦΑΙΝ	1	0	0	+8+8
ΟΜΛ 108	Γ	78	175,000	1,326	M4	1	1	0	+8

Επεξηγήσεις: WBC – white blood cells – λευκά αιμοσφαίρια, LDH – lactat dehydrogenase – γαλακτική αφυδρογονάση.

Οι NPM1+ de novo λευχαιμικοί ήταν 17 ασθενείς. Το 35% είχε μορφολογία M1 και άλλοι 35% είχαν μονοκυτταρική μορφολογία (M4-M5). Εδώ υπήρχε και ένας ασθενής με Διφαινοτυπική λευχαιμία. Καρυότυπος υπήρχε σε 8 ασθενείς, 6 είχαν φυσιολογικό και 2 είχαν τρισωμία και τετρασωμία του 8^{ου} χρωμοσώματος.

Έκφραση μορίων

- CD34: η παρουσία της μετάλλαξης NPM1 συσχετίστηκε ανεξάρτητα με χαμηλή έκφραση ($p < 0.001$).
- HLA-DR: η παρουσία της μετάλλαξης NPM1 συσχετίστηκε ανεξάρτητα με χαμηλή έκφραση ($p < 0.035$).
- CD15: η παρουσία της μετάλλαξης NPM1 συσχετίστηκε ανεξάρτητα με αυξημένη έκφραση ($p = 0.002$).

Οι παραπάνω συσχετίσεις είναι διορθωμένες ως προς την ηλικία. Πρόκειται για ανεξάρτητες συσχετίσεις σε μοντέλα που περιλαμβάνουν τις τρεις μεταλλάξεις και την ηλικία.

Δ. Συσχετίσεις των μεταλλάξεων του FLT3 και της NPM1 στους ασθενείς με δευτεροπαθή λευχαιμία (n=33):

Μεταλλάξεις FLT3-ITD βρέθηκαν σε 2 ασθενείς με δευτεροπαθή λευχαιμία, FLT3-TKD σε 2 ασθενείς και μεταλλάξεις της Νουκλεοφωσμίνης επίσης σε 2 ασθενείς (Πίνακες 14,15,16). Στους λίγους ασθενείς με δευτεροπαθή λευχαιμία δεν υπήρχε συνύπαρξη μεταλλάξεων της Νουκλεοφωσμίνης και του FLT3.

Πίνακας 14: Secondary AML, FLT3-ITD+.

Ασθενής	Φύλο	Ηλικία	WBC (/μl)	Hb (g/dl)	Plts (/μl)	LDH (IU/l)	FAB	FLT3-ITD	FLT3-TKD	NPM1
ΟΜΛ 68	Γ	67	53,000	10.3	12,000	172	M2	1	0	0
ΟΜΛ 103	Γ	76	306,000	7.9	69,000	713	UC	1	0	0

Πίνακας 15: Secondary AML, FLT3-TKD+.

Ασθενής	Φύλο	Ηλικία	WBC (/μl)	Hb (g/dl)	Plts (/μl)	LDH (IU/l)	FAB	FLT3-ITD	FLT3-TKD	NPM1
ΟΜΛ 17	A	72	3,800	9.3	88,000	2,988	M4	0	1	0
ΟΜΛ 100	A	64	4,500	7.5	55,000	300	UC	0	1	0

Πίνακας 16: Secondary AML, NPM1+.

Ασθενής	Φύλο	Ηλικία	WBC (/μl)	Hb (g/dl)	PLTs (/μl)	LDH (IU/l)	FAB	NPM1	FLT3-ITD	FLT3-TKD
ΟΜΛ 71	A	60	24,000	14.0	73,000	292	M5	1	0	0
ΟΜΛ 73	Γ	78	180,000	9.3	46,000	1,475	M5	1	0	0

Επεξηγήσεις: WBC – white blood cells – λευκά αιμοσφαίρια, Hb – hemoglobin – αιμοσφαιρίνη, Plts – platelets – αιμοπετάλια, LDH – lactat dehydrogenase – γαλακτική αφυδρογονάση

Λόγω του μικρού μεγέθους του δείγματος, είναι φρόνιμο να μιλήσουμε μόνο για τάσεις και όχι για συσχετίσεις:

- Μειωμένη έκφραση του CD34 στους φορείς μεταλλάξεων, ιδίως της NPM1.
- Αυξημένη έκφραση του CD116 στους φορείς μεταλλάξεων, ιδίως της NPM1.
- Αυξημένη έκφραση του CD64 στους φορείς μεταλλάξεων, ιδίως της FLT3.
- Αυξημένη έκφραση του CD15, CD36, CD14 και CD2 στους φορείς μεταλλάξεων.

Παρατηρήθηκε μια τάση συσχέτισης της FLT3-ITD με το θήλυ φύλο, που όμως δεν έφθασε τη στατιστική σημαντικότητα (Fisher's exact $p=0.104$). Υπήρχαν μόνο δύο γυναίκες στο δείγμα, με σημαντικά υψηλότερο αριθμό λευκών συγκριτικά με τους ασθενείς χωρίς τη μετάλλαξη. Και οι δύο ανέπτυξαν οξεία λευχαιμία μετά από χρόνια μυελομονοκυτταρική λευχαιμία, εξ' ου και η τάση συσχέτισης με σπληνομεγαλία (Fisher's exact $p=0.085$). Η πρώτη ασθενής εξετράπη σε 18 μήνες και η δεύτερη σε 13 μήνες από την εμφάνιση του MDS/MPN. Καρυότυπος υπήρχε και στις δύο, με έλλειψη του 7 χρωμοσώματος και 46XX αντίστοιχα. Η πρώτη ασθενής έζησε 6 μήνες από την εκτροπή, χωρίς να καταφέρει να κάνει ύφεση και η δεύτερη απεβίωσε μέσα σε δύο ημέρες, από λευκόσταση. Λόγω του κοινού ιστορικού, αναζητήθηκαν δείγματα στη φάση της CMML για να μελετηθούν οι μεταλλάξεις του FLT3, αλλά η μία ασθενής διαγνώστηκε σε άλλο κέντρο και στη δεύτερη δεν ανευρέθηκε υλικό της διάγνωσης.

Οι FLT3-TKD+ ήταν 2 ασθενείς, άνδρες. Ο πρώτος είχε στο ιστορικό του αδενοκαρκίνωμα νεφρού, φυσιολογικό καρυότυπο και απεβίωσε 13 ημέρες μετά τη διάγνωση. Ο δεύτερος ασθενής εξετράπη σε OML, 25 μήνες μετά από RAEB II, είχε φυσιολογικό καρυότυπο και έζησε 4 μήνες μετά την εκτροπή, χωρίς να κάνει ύφεση.

Οι ασθενείς με NPM1-μετάλλαξη ήταν 2 ασθενείς με οξεία μονοκυτταρική λευχαιμία (FAB-M5).

Ε. Συσχετίσεις των μεταλλάξεων του FLT3 και της NPM1 στους ασθενείς με μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα (n=31):

Σε αυτή την ομάδα ελέγχου δεν βρέθηκαν σημαντικές συσχετίσεις, ενώ δεν υπήρχαν διπλά θετικοί ασθενείς.

Πίνακας 17: Ασθενείς με μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα και μεταλλάξεις του FLT3.

Ασθενής	Φύλο	Ηλικία	WBC (/μl)	Hb (g/dl)	Plts (/μl)	LDH (IU/l)	FAB	FLT3-ITD	FLT3-TKD	NPM1
ΜΔΣ 13	A	78	320,000	7.8	43,000	776	CMML	1	0	0
ΜΔΣ 22	A	72	124,000	7.8	62,000	352	CMML	1	0	0
ΜΔΣ 16	A	85	20,000	8.5	21,000	751	CMML	0	1	0
ΜΔΣ 30	A	73	5,400	12.1	289,000	249	RAEB I	0	1	0

Πίνακας 18: Ασθενείς με μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα και μεταλλάξεις της *NPM1*.

Ασθενής	Φύλο	Ηλικία	WBC (/μl)	Hb (g/dl)	PLTs (/μl)	LDH (IU/l)	FAB	NPM1	FLT3- ITD	FLT3- TKD
ΜΔΣ 15	76	A	3,600	5.4	11,000	127	RAEB I	1	0	0
ΜΔΣ 28	66	A	33,200	9.3	8,000	474	RAEB II	1	0	0

ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα μελέτη ανιχνεύθηκε η επίπτωση μεταλλάξεων του υποδοχέα *FLT3* και της πυρηνικής πρωτεΐνης-συνοδού Νουκλεοφωσμίνης σε 140 ασθενείς, 109 με οξεία μυελογενή λευχαιμία και 31 με μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα (RAEB I, RAEB II και CMML).

FLT3-ITD μεταλλάξεις ανευρέθηκαν σε 13 ασθενείς με **ΟΜΛ**, ποσοστό 11.9%, περίπου μισό από ό,τι αναφέρεται στη βιβλιογραφία, παρά το γεγονός πως οι ασθενείς της μελέτης μας ήταν κυρίως ηλικιωμένοι, στους οποίους η συχνότητα είναι μεγαλύτερη από το μέσο όρο. Σε μία ακόμη ελληνική μελέτη (www.didaktorika.gr, DOI 10.12681/eadd/2291), το ποσοστό ανευρέθηκε 17.8%, επίσης μικρότερο από ό,τι βιβλιογραφικά, αλλά με περισσότερους νέους ασθενείς (<60 ετών) από τη δική μας μελέτη.

Οι θετικοί ασθενείς εμφανίστηκαν κατά τη διάγνωση με υψηλότερα λευκοκύτταρα στο περιφερικό αίμα και υψηλότερη γαλακτική αφυδρογονάση, δηλαδή με πιο επιθετική νόσο. Μάλιστα, οι τιμές των λευκών αιμοσφαιρίων και της LDH μπορούσαν να προβλέψουν με υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα την παρουσία της μετάλλαξης, αφού τιμές λευκοκυττάρων >60,000/μl και τιμές LDH ≥700 IU/l προέβλεπαν την παρουσία της με ειδικότητα 90%. Από την άλλη, τιμές λευκοκυττάρων <3500/μl και φυσιολογική LDH, πρακτικά απέκλειαν με ευαισθησία >95% την παρουσία της.

Ανοσοφαινοτυπικά επρόκειτο για βλάστες με χαμηλή (<50%) έκφραση CD34, εύρημα που έχει ξαναπεριγραφεί στη βιβλιογραφία. Αρνητικές για έκφραση CD34 είναι στις περισσότερες περιπτώσεις οι οξείες λευχαιμίες με μονοκυτταρική διαφοροποίηση, η χρόνια μυελομονοκυτταρική λευχαιμία, αλλά και η οξεία προμυελοκυτταρική. Όλο και περισσότεροι υποστηρίζουν, πως υπάρχει ένα CD34(-), ακόμη πιο άωρο στελεχιαίο κύτταρο, που δίνει τα CD34(+)/CD38(-) πολυδύναμα αιμοποιητικά κύτταρα.⁸⁰⁻⁸³ Ενδιαφέρον θα ήταν να σκεφθούμε πως οι *FLT3-ITD*+ μυελοβλάστες είναι άωρα λευχαιμικά στελεχιαία κύτταρα, ικανά να διατηρήσουν την παραγωγή μεταλλαγμένων μυελοβλαστών με την ίδια ιεραρχία όπως της

φυσιολογικής αιμοποίησης. Στους ITD+ ασθενείς της μελέτης μας πάντως δεν υπερίσχυε FAB-διάγνωση με μονοκυτταρικό στοιχείο. Βιβλιογραφικά, εκτός από τη χαμηλή έκφραση CD34 και τη συχνή έκφραση μονοκυτταρικών δεικτών, οι FLT3-ITD+ βλάστες δεν συνδέονται με χαρακτηριστικό ανοσοφαινότυπο.⁷⁹ Συχνά είναι HLA-DR, CD13, CD33 θετικοί, CD15 θετικοί, CD36 και 64 θετικοί, MPO και TdT θετικοί, CD117, CD11b και CD4 θετικοί. Πάντα είναι CD3,5,10,20 και 22 αρνητικοί. Άρα, βάσει αυτών πρόκειται για ώριμο μυελοκυτταρικό πληθυσμό με μονοκυτταρική διαφοροποίηση. Ένα ποσοστό ασθενών παρουσιάζουν τον ανοσοφαινότυπο της οξείας προμυελοκυτταρικής λευχαιμίας (CD34-, CD13+, CD33+, MPO+ και HLA-DR-), χωρίς τα μονοκυτταρικά αντιγόνα. Πρόσφατα, ένα άρθρο αναφέρει ανοσοφαινοτυπικά χαρακτηριστικά που μπορούν να προβλέψουν τους FLT3-ITD+ βλάστες με ειδικότητα και ευαισθησία >90% αλλά αυτοί σύμφωνα με τους ερευνητές είναι CD123+/CD99+/CD25+/CD34+, όπου το CD123 είναι η α-αλυσίδα του υποδοχέα της IL3, το CD25 είναι η α-αλυσίδα του υποδοχέα της IL2 και το CD99, ή MIC-2 ανευρίσκεται σε όλα τα λευκά, αλλά έχει την υψηλότερη έκφραση στα θυμοκύτταρα.⁷⁸

Οι ασθενείς άρα του Θεσσαλικού κάμπου ασθενούν από λευχαιμία που συνοδεύεται από τη μετάλλαξη με τη μισή συχνότητα, αλλά με βιολογικά χαρακτηριστικά ίδια με ό,τι έχει περιγραφεί μέχρι τώρα.

Στη μελέτη έχουν συμπεριληφθεί μόλις 4 ασθενείς με οξεία προμυελοκυτταρική λευχαιμία, αλλά οι μισοί βρέθηκαν να φέρουν τη μετάλλαξη, ποσοστό που συμφωνεί με το αναφερόμενο υψηλότερο ποσοστό εμφάνισης σε αυτούς τους ασθενείς. Βιβλιογραφικά, η FLT3-ITD ανευρίσκεται συχνότερα από ό,τι γενικά στις AML (35-40%). Έχει μελετηθεί αν η παρουσία της μετάλλαξης επηρεάζει δυσμενώς τη γενικά καλή πορεία των ασθενών με M3, όσο επηρεάζει τις άλλες μυελογενείς λευχαιμίες. Φαίνεται πως η FLT3-ITD+ APL, είναι βιολογικά διαφορετική. Οι ασθενείς έχουν υψηλότερα λευκά, έχουν συχνότερα την M3variant και την bcr3-ισομορφή του PML-RARA.⁹²⁻⁹⁷ Υπάρχουν μελέτες που περιγράφουν χειρότερη επιβίωση ελεύθερη νόσου και συνολική επιβίωση,⁹² άλλες που συνδέουν τη μετάλλαξη με πρόωρους θανάτους,^{95,96} αλλά οι περισσότερες μελέτες με μεγάλους αριθμούς ασθενών υποστηρίζουν πως οι θετικοί δεν έχουν χειρότερη

πρόγνωση.^{93,94,97} Στη δική μας μελέτη πάντως, αν και οι ασθενείς είναι πολύ λίγοι για να συναχθούν ασφαλή συμπεράσματα, και οι 2 ασθενείς που έφεραν τη μετάλλαξη απεβίωσαν τη δεύτερη ημέρα χημειοθεραπείας.

Στη μελέτη μας, η παρουσία της ITD-μετάλλαξης ήταν πιο συχνή σε ασθενείς με μεταλλάξεις της Νουκλεοφωσμίνης, παρά σε NPM1-άγριου-τύπου, εύρημα πολύ ενδιαφέρον, που επίσης έχει ξαναπεριγραφεί στη βιβλιογραφία. Από τους 13 ασθενείς, στους 7 συνυπήρχε NPM1-μετάλλαξη.

Οι ασθενείς με **ΟΜΛ** στους οποίους ανευρέθηκε η **σημειακή μετάλλαξη** ήταν 7, ποσοστό 6.4%, που συμφωνεί με τη βιβλιογραφία. Οι ασθενείς αυτοί είχαν συχνά λεμφαδενοπάθεια, αφού οι 5 από τους 7 κατατάχθηκαν στις M4 και M5 FAB-μορφολογικές κατηγορίες, στις οποίες υπάρχει συχνά ιστική νόσος. Συχνά οι ασθενείς αυτοί είχαν χολολιθίαση, ενώ ανοσοφαινοτυπικά οι βλάστες συνήθως εξέφραζαν CD14 ($p < 0.001$), συμβατό με τις FAB-διαγνώσεις.

Οι ασθενείς με **ΟΜΛ** και μεταλλάξεις της **Νουκλεοφωσμίνης** ήταν 19, ποσοστό 17.4%, επίσης μικρότερο (το μισό) από τα ποσοστά που αναφέρονται στη βιβλιογραφία. Η μετάλλαξη εμφανίζονταν συχνότερα σε ασθενείς με *de novo* λευχαιμία.

Στους ασθενείς μπορούσε να προβλεφθεί η παρουσία της μετάλλαξης από τον αριθμό των λευκοκυττάρων και της LDH, αφού τιμές $\geq 60,000/\mu\text{l}$ και $\geq 1,350 \text{ IU/l}$ αντίστοιχα, προέβλεπαν την παρουσία της με ευαισθησία 90%, ενώ φυσιολογική τιμή LDH πρακτικά την απέκλειε με ευαισθησία 100%.

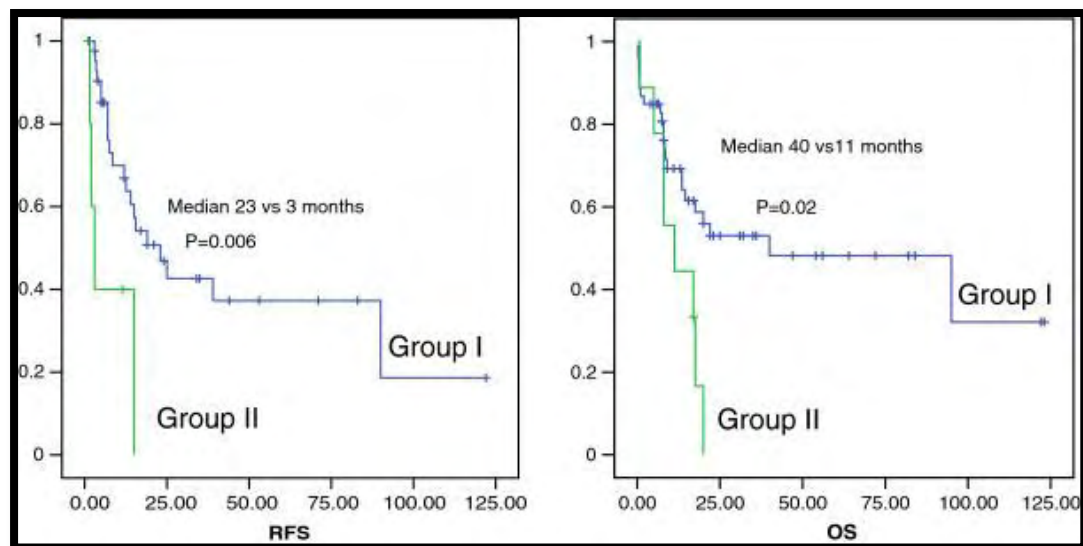
Ανοσοφαινοτυπικά, η παρουσία συσχετίστηκε με χαμηλή έκφραση CD34 και CD117, απουσία έκφρασης HLA-DR, ενώ συσχετίστηκε θετικά με έκφραση CD116, CD15 και CD36, αφού το 42% των θετικών, ανήκαν στις «Μονοκυτταρικές» M4 και M5.

Βιβλιογραφικά, ανοσοφαινοτυπικές αναλύσεις NPM1-μεταλλαγμένων ασθενών δεν δείχνουν χαρακτηριστικό φαινότυπο των βλαστών, πέρα από χαμηλότερη έκφραση άωρων δεικτών διαφοροποίησης (CD34, 117, 38, HLA-DR), όπως και στη δική μας μελέτη, και υψηλότερη έκφραση CD 13, 33 και 123.^{84,86,88} Αρκετοί συμφωνούν πως η υψηλή έκφραση CD34 στους NPM1+ βλάστες, αν ανευρεθεί είναι κακός

προγνωστικός δείκτης της επιβίωσης ελεύθερης νόσου.^{85,87} Έχουν γίνει απόπειρες ανοσοφαινοτυπικού διαχωρισμού της *NPM1+* λευχαιμίας σε Μονοκυτταρική και Μυелоκυτταρική, με υψηλότερη έκφραση *HLA-DR*, *CD64*, *CD14*, *CD15*, *CD11b*, *CD4*, *CD9* και *CD10* στη Μονοκυτταρική,⁸⁶ ενώ άλλοι ερευνητές τη διαχωρίζουν σε *CD34* θετική και αρνητική, με διαφορετική βιολογική συμπεριφορά.⁸⁷ Πιο αναλυτικά, αναφέρονται 2 ομάδες ασθενών με *NPM1*-μεταλλάξεις (Εικόνα 28):

- Ομάδα 1 – *CD34neg/NPM1mut* AML, με *HLA-DR*+/-, *CD7*-, *CD13*+, *CD33*+, με υψηλότερες τιμές αιμοπεταλίων, υψηλότερη πιθανότητα να συνυπάρχει *FLT3-ITD* και καλύτερη συνολική επιβίωση (μπλε γραμμή).
- Ομάδα 2 – *CD34pos/NPM1mut* AML, με *HLA-DR*+, *CD7*+, *CD13*+, *CD33*+, με χειρότερη συνολική επιβίωση, παρόλο που έχουν χαμηλότερη πιθανότητα να συνυπάρχει *FLT3-ITD* (πράσινη γραμμή).

Εικόνα 28: Kaplan-Meier καμπύλες επιβίωσης 94 ασθενών με μεταλλάξεις της *NPM1*, ανάλογα με το ανοσοφαινοτυπικό προφίλ των βλαστών (Chen et al).⁸⁷



Στη μελέτη μας, η μετάλλαξη της *NPM1* συνυπήρχε συχνά με μεταλλάξεις του *FLT3*. Οι μεταλλάξεις της Νουκλεοφωσμίνης αρχικά είχε σχεδιασθεί να μελετηθούν με *Nested-PCR*, *Gel-extraction* του προϊόντος, καθαρισμό και *sequencing* της αλληλουχίας. Με τη μέθοδο όμως της *Fragment-analysis*, ο χρόνος που χρειάστηκε ήταν πολύ μικρότερος και η ευαισθησία ανίχνευσης ακόμη και μίας βάσης διαφορά στο DNA ήταν μεγάλη, ενώ το κόστος πολύ μικρότερο.

Οι 8 από τους 19 ασθενείς είχαν μετάλλαξη και του υποδοχέα *FLT3*: 6 ήταν *NPM1+/FLT3-ITD+*, ένας *NPM1+/FLT3-TKD+* και ένας *NPM1+/FLT3-ITD+/FLT3-TKD+*. Οι ασθενείς με **ΟΜΛ που έφεραν και τις δύο μεταλλάξεις**, είχαν υψηλότερα λευκά, στατιστικά όσο οι *ITD+*. Επίσης εμφάνιζαν υψηλότερη *LDH* και συχνά λεμφαδενοπάθεια, αφού το 50% των ασθενών ανήκαν στις *M4-M5 FAB*-κατηγορίες. Ανοσοφαινοτυπικά, οι βλάστες είχαν χαμηλή έκφραση *CD34* και απουσία έκφρασης *HLA-DR*. Φάνηκε δηλαδή, πως στους διπλά θετικούς ασθενείς, η νόσος βιολογικά είχε χαρακτηριστικά και από τη μία και από την άλλη ομάδα ασθενών, εύρημα που συμφωνεί με τη βιβλιογραφία, αφού η καλή πρόγνωση των *NPM1+*, χάνεται όταν συνυπάρχουν μεταλλάξεις του υποδοχέα. Η συχνή μάλιστα συνύπαρξη επιβάλλει σε κάθε ασθενή να μελετώνται πάντα μαζί, πράγμα που από ό,τι φαίνεται από την παρούσα μελέτη ισχύει και για τους Έλληνες ασθενείς.

Στους ασθενείς με **Μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο**, οι συσχετίσεις δεν ήταν ασφαλείς, αφού οι μεταλλάξεις εμφανίζονταν με μικρότερη συχνότητα από ό,τι στους ασθενείς με ΟΜΛ. Για ασφαλή συμπεράσματα απαιτούνται μεγάλοι αριθμοί ασθενών, πράγμα δύσκολο στην Ελλάδα, αν αναλογιστεί κανείς τη σπανιότητα των νοσημάτων και την έλλειψη κέντρων αναφοράς.

Από τους 31 ασθενείς με Μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα, συμπεριλαμβανομένων 9 ασθενών με *CMML*, η *ITD*-μετάλλαξη ανευρέθηκε σε 2 ασθενείς με *CMML* - ποσοστό 6.4% των μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων (πενταπλάσιο από τη βιβλιογραφία) και 22,2 % των χρόνιων μυελομονοκυτταρικών λευχαιμιών (δεκαπλάσιο από τη βιβλιογραφία). Οι Έλληνες ασθενείς δηλαδή με *ΜΔΣ* έφεραν πολύ συχνότερα τη μετάλλαξη, ενώ αν μελετηθούν οι *ΧΜΜΛ* ξεχωριστά, αυτοί

έφεραν τη μετάλλαξη 10 φορές συχνότερα από ό,τι αναφέρεται στη διεθνή αρθρογραφία.

Η TKD-μετάλλαξη του FLT3, ανευρέθηκε σε 2 ασθενείς, 6.4% των ΜΔΣ, ποσοστό δεκαπλάσιο από ό,τι αναφέρεται στη βιβλιογραφία. Οι διαγνώσεις ήταν RAEB I και CMML.

Η μετάλλαξη της Νουκλεοφωσμίνης ανευρέθηκε σε 2 ασθενείς, ποσοστό επίσης 6.4% των ΜΔΣ, με διαγνώσεις RAEB I και II, δηλαδή ποσοστό 9% των ΜΔΣ, διπλάσιο από τα ποσοστά στη διεθνή βιβλιογραφία, αν αφαιρεθούν οι ΧΜΜΛ. Καμία συσχέτιση στατιστικά σημαντική δεν υπάρχει να αναφερθεί σε αυτή την ομάδα ασθενών.

Σε αντίθεση με τις ΟΜΛ, δεν ανευρέθηκε κανένας ασθενής που να έφερε μεταλλάξεις και της Νουκλεοφωσμίνης και του FLT3.

Οι Έλληνες ασθενείς λοιπόν δε φαίνεται να φέρουν τόσο συχνά τις μεταλλάξεις όταν πάσχουν από ΟΜΛ, αλλά οι Μυελοδυσπλαστικοί/Μυελοϋπερπλαστικοί ασθενείς είναι πολύ συχνότερα θετικοί, καθιστώντας πιθανώς τους Θεσσαλούς ιδανικούς για μεγάλες μελέτες των μεταλλάξεων σε τέτοιες παθήσεις.

Η μελέτη αυτή συμβάλλει στη κατανόηση του ρόλου των μεταλλάξεων του υποδοχέα FLT3 και της Νουκλεοφωσμίνης στη βιολογία της οξείας μυελογενούς λευχαιμίας και προλευχαιμικών καταστάσεων. Είναι η πρώτη ελληνική μελέτη που συμπεριλαμβάνει ασθενείς με μυελοδυσπλαστικά/μυελοϋπερπλαστικά σύνδρομα και η πρώτη που μελέτησε τα δύο γονίδια μαζί.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή: Οι μεταλλάξεις των γονιδίων *NPM1* και *FLT3*, έχουν ιδιαίτερη προγνωστική αξία σε ασθενείς με οξεία μυελογενή λευχαιμία (ΟΜΛ). Μελέτες δείχνουν ότι ο συνδυασμός των ως άνω γονιδίων, μπορεί να αναδείξει υποπληθυσμούς με διαφορετική πρόγνωση, με ιδιαίτερη σημασία για τη θεραπεία και τη συνολική τους επιβίωση. Η επίπτωση, αλλά και η κλινική σημασία των μεταλλάξεων των *NPM1* και *FLT3* δεν έχουν καταγραφεί σε συνδυασμό στον Ελληνικό χώρο. Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η μελέτη των γονιδίων σε Έλληνες ασθενείς με ΟΜΛ και Μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα (RAEB και CMML) και η αναζήτηση πιθανών συσχετίσεων της παρουσίας των μεταλλάξεων με τα ανοσοφαινοτυπικά και λοιπά εργαστηριακά ευρήματα.

Υλικό και Μέθοδοι: Απομονώθηκε γενετικό υλικό από 140 ασθενείς, 109 με ΟΜΛ και 31 με μυελοδυσπλαστικά/μυελοϋπερπλαστικά νεοπλάσματα (RAEB και ΧΜΜΛ). Η *FLT3*-ITD μετάλλαξη μελετήθηκε με PCR, η σημειακή μετάλλαξη με PCR-RFLP, ενώ της Νουκλεοφωσμίνης με τη μέθοδο του Fragment analysis. Καταγράφηκαν τα κλινικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά των ασθενών, ο καρυότυπος και η ανοσοφαινοτυπική υπογραφή των βλαστών, με κυτταρομετρία ροής.

Αποτελέσματα: Στους ασθενείς με ΟΜΛ η συχνότητα εμφάνισης της *FLT3*-ITD, της *FLT3*-TKD και της μετάλλαξης της *NPM1* ήταν 11,9%, 6,4% και 17,4% αντίστοιχα. Οι *FLT3*-ITD+ είχαν επιθετικότερη νόσο, με υψηλότερα λευκά ($p<0.001$), έτσι που αριθμός λευκών $>60000/\text{mm}^3$ είχε ειδικότητα 90% για ανεύρεση της μετάλλαξης και υψηλότερη LDH ($p=0.006$), έτσι που φυσιολογική τιμή απέκλειε με ευαισθησία 95% την παρουσία της. Οι ασθενείς είχαν 7πλάσια πιθανότητα να έχουν και τη μετάλλαξη της *NPM1* και οι βλάστες είχαν χαμηλότερη ($<50\%$) έκφραση CD34 ($p=0,008$). Οι *FLT3*-TKD+ είχαν συνήθως λεμφαδενοπάθεια ($p=0,026$) και οι βλάστες τους εξέφραζαν CD14 ($p<0,001$). Οι *NPM1*+ είχαν συνήθως *de novo* ΟΜΛ ($p=0,039$) και υψηλότερη LDH ($p<0,001$). Μάλιστα, φυσιολογική τιμή LDH πρακτικά επέκλειε

με ευαισθησία περίπου 100% την παρουσία της. Ανοσοφαινοτυπικά, οι βλάστες είχαν χαμηλότερη έκφραση CD34 ($p < 0,001$), CD13 ($p = 0,009$) και CD117 ($p = 0,003$), απουσία έκφρασης HLA-DR ($p = 0,038$), ενώ σχετίσθηκαν θετικά με την έκφραση CD116 (p for linear trend $< 0,001$), CD15 ($p = 0,014$) και CD36 ($p = 0,007$). Οι ασθενείς είχαν 8πλάσια πιθανότητα να φέρουν και την FLT3-ITD, ενώ με τη σημειακή δεν συσχετίσθηκαν.

Η συχνότητα των τριών μεταλλάξεων στους Μυελοδυσπλαστικούς ασθενείς ήταν 6,4% για την καθεμία.

Συμπεράσματα: Οι Θεσσαλοί ασθενείς με ΟΜΛ φέρουν την FLT3-ITD μετάλλαξη με τη μισή συχνότητα από ό,τι αναφέρεται στη βιβλιογραφία, ενώ παρουσιάζουν ίδια βιολογικά χαρακτηριστικά. Το ίδιο συμβαίνει και για τις μεταλλάξεις της Νουκλεοφωσμίνης. Οι 2 μεταλλάξεις συχνότατα συνυπάρχουν, συνδυάζοντας τα βιολογικά χαρακτηριστικά των νόσων, καθιστώντας απαραίτητη τη μελέτη και των 2 γονιδίων και στους Έλληνες ασθενείς. Από την ανάλυσή μας προκύπτει επίσης, πως απλές και χωρίς ιδιαίτερο κόστος μετρήσεις (αριθμός λευκών και LDH) έχουν ίσως μεγαλύτερη σημασία για την πρόγνωση, αλλά και θα μπορούσαν να βοηθήσουν τον κλινικό Αιματολόγο στην Ελλάδα να επιλέξει σε ποιους ασθενείς να στείλει μοριακό έλεγχο, μειώνοντας το κόστος της αρχικής διάγνωσης και κατάταξης του λευχαιμικού σε ομάδα κινδύνου. Στους 31 ασθενείς με RAEB και CMML που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη, η συχνότητα είναι διπλάσια, εως δεκαπλάσια από ό,τι αναφέρεται στη διεθνή αρθρογραφία, το οποίο μπορεί να κάνει στους Έλληνες πιο εύκολες τις μελέτες των μεταλλάξεων σε προλευχαιμικές καταστάσεις.

ABSTRACT

Purpose: *NPM1 and FLT3-mutations have a prognostic significance in patients with AML. Studies show that their co-existence can highlight subpopulations with different prognosis, important for their therapy approach and survival. The purpose of this study was to determine the incidence of the mutations in Greek patients with AML, CMML and RAEB and to detect correlations with other clinical and laboratory characteristics.*

Materials and methods: *DNA was extracted from 140 patients – 109 with de novo and secondary AML, 12 with RAEB I, 10 with RAEB II and 9 patients with CMML. The FLT3-ITD length mutation was estimated by PCR, the point-mutation of FLT3 by PCR-RFLP and the NPM1-mutations by Fragment-analysis. We searched associations with clinical characteristics, laboratory and immunohistochemical findings and karyotype.*

Results: *In Greek patients with AML, the incidence of the FLT3-ITD, FLT3-TKD and NPM1-mutations was 11.9%, 6.4% and 17.4% respectively. FLT3-ITD-positive patients had a more aggressive leukaemia, with higher leucocytes ($p < 0.001$). WBC numbers higher than $60000/\text{mm}^3$, predicted the presence of the mutation with 90% specificity. The same patients had higher LDH-values ($p = 0.006$). A normal LDH, excluded the mutation with 95% sensitivity. The patients were 7 times more likely to be NPM1-mutated too and their blasts had lower ($< 50\%$) expression of CD34 ($p = 0.008$). FLT3-TKD-positive patients had often lymphadenopathy ($p = 0.026$) and their blasts expressed CD14 ($p < 0.001$). NPM1-mutated patients usually had de novo leukaemia ($p = 0.039$), and higher LDH-values ($p < 0.001$). A normal LDH, practically excluded the presence of the mutation with a 100% sensitivity. Immunohistochemically the blasts had a lower expression of CD34 ($p < 0.001$), CD13 ($p = 0.009$) and CD117 ($p = 0.003$), absence of HLA-DR ($p = 0.038$) and a higher expression of CD116 (p for linear trend < 0.001), CD15 ($p = 0.014$) and CD36 ($p = 0.007$). The patients were 8 times more*

likely to carry the FLT3-ITD, but no correlation was made with the point mutation of the receptor.

The incidence of the 3 mutations in MDS/MPN patients was 6.4% each.

Conclusions: *Greek patients with AML carry the FLT3-mutation with half the frequency compared to the literature, but the same biological characteristics. This is the same with the Nucleophosmin-mutations. The 2 mutated genes often co-exist and combine the biological characteristics of the diseases, making it necessary to always search them both in a Greek patient too. In our analysis, we saw that simple and low cost exams (WBC and LDH) can be very important for prognosis and could help the Clinical Hematologist choose the patients who are more likely to carry the mutations, lowering the cost of risk stratification. In our 31 RAEB and CMML-patients, the incidence of the three mutations is two to ten times higher than the literature, which makes greek patients with myelodysplastic syndromes ideal to research the mutations.*

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, et al. **A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice.** *Nature*. 1994;367(6464):645–8.
2. **WHO Classification of Tumors of Hematopoietic and Lymphoid Tissues** (4th Ed). Lyon, France: International Agency for Research and Cancer (IARC); 2008:54-63.
3. Grimwade D, Walker H, Oliver F, et al, on behalf of the Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. **The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1612 patients entered into the MRC AML10 trial.** *Blood* 1998; 92(7):2322-2333.
4. The EBMT Handbook 6th Edition, chapter 18 – indications for and current practice of allogeneic and autologous HSCT.
5. Dohner H, Estey EH, Amadori S, et al. **Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet.** *Blood* 2010; 115(3):453-474.
6. O Rosnet, C Schiff, MJ Pebusque, S Marchetto, C Tonnelle, Y Toiron, F Birg, and D Birnbaum. **Human FLT3/FLK2 gene: cDNA cloning and expression in hematopoietic cells.** *Blood* 1993;82(4).
7. Lyman SD, James L, Johnson L, Brasel K, de Vries P, Escobar SS, Downey H, Splett RR, Beckmann MP, McKenna HJ: **Cloning of the human homologue of the murine *flt3* ligand: A growth factor for early hematopoietic progenitor cells.** *Blood* 83:2795, 1994
8. Hilary J. McKenna, Kim L. Stocking, Robert E. Miller, Kenneth Brasel, Thibaut De Smedt, Eugene Maraskovsky, Charles R. Maliszewski, David H. Lynch, Jeffrey Smith, Bali Pulendran, Eileen R. Roux, Mark Teepe, Stewart D. Lyman, and Jacques J. Peschon: **Mice lacking *flt3* ligand have deficient**

- hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells.** *Blood* 2000;95(11).
9. Solanilla A, Grosset C, Lemerrier C, et al. **Expression of Flt3-ligand by the endothelial cell.** *Leukemia* 2000;14:153-162
 10. Lisovsky M1, Braun SE, Ge Y, Takahira H, Lu L, Savchenko VG, Lyman SD, Broxmeyer HE. **Flt3-ligand production by human bone marrow stromal cells.** *Leukemia*. 1996 Jun;10(6):1012-8
 11. Brasel K, Escobar S, Anderberg R, de Vries P, Gruss HJ, Lyman SD. **Expression of the flt3 receptor and its ligand on hematopoietic cells.** *Leukemia*. 1995;9:1212-1218.
 12. M Dosil, S Wang and I R Lemischka. **Mitogenic signaling and substrate specificity of the Flk2/Flt3 receptor tyrosine kinase in fibroblasts and interleukin 3-dependent hematopoietic cells.** *Mol. Cell. Biol.* 13, 6572–6585
 13. Hayakawa F, Towatari M, Kiyoi H, Tanimoto M, Kitamura T, Saito H, Naoe T. **Tandem-duplicated Flt3 constitutively activates STAT5 and MAP kinase and introduces autonomous cell growth in IL-3-dependent cell lines.** *Oncogene*. 2000 Feb 3; 19(5):624-31.
 14. Kikushige Y1, Yoshimoto G, Miyamoto T, Iino T, Mori Y, Iwasaki H, Niino H, Takenaka K, Nagafuji K, Harada M, Ishikawa F, Akashi K.: **Human Flt3 is expressed at the hematopoietic stem cell and the granulocyte/macrophage progenitor stages to maintain cell survival.** *J Immunol*. 2008 Jun 1;180(11):7358-67.
 15. Johansson B, Billstrom R, Mauritzson N, Mitelman F. **Trisomy 19 as the sole chromosomal anomaly in hematologic neoplasms.** *Cancer Genet Cytogenet* 1994;74:62.
 16. Small D, Levenstein M, Kim E, Carow C, Amin S, Rockwell P, Witte L, Burrow C, Ratajczak MZ, Gewirtz AM, Civin CI. **STK-1, the human homolog of Flk-2/Flt-3, is selectively expressed in CD34+ human bone marrow cells and is involved in the proliferation of early progenitor/stem cells.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:459.
 17. Katrin Mackarehtschian ,Jeff D. Hardin ,Katrd A. Moore ,Sharon Boast ,Stephen P. Goff ,Ihor R. Lemischka.: **Targeted disruption of the flk2/flt3 gene**

- leads to deficiencies in primitive hematopoietic progenitors. Immunity, Volume 3, Issue 1, p147–161, July 1995*
18. Nakao M, Yokota S, Iwai T, Kaneko H, Horiike S, Kashima K, Sonoda Y, Fujimoto T, Misawa S. : **Internal tandem duplication of the *flt3* gene found in acute myeloid leukemia.** *Leukemia* [1996, 10(12):1911-1918].
 19. Yokota S, Kiyoi H, Nakao M, Iwai T, Misawa S, Okuda T, Sonoda Y, Abe T, Kahsima K, Matsuo Y, Naoe T.: **Internal tandem duplication of the *FLT3* gene is preferentially seen in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome among various hematological malignancies. A study on a large series of patients and cell lines.** *Leukemia.* 1997 Oct;11(10):1605-9.
 20. Ishii E, Zaitzu M, Ihara K, Hara T, Miyazaki S.: **High expression but no internal tandem duplication of *FLT3* in normal hematopoietic cells.** *Pediatr Hematol Oncol.* 1999 Sep-Oct;16(5):437-41.
 21. M Nakao, J W G Janssen, D Erz, T Seriu and C R Bartram.: **Tandem duplication of the *FLT3* gene in acute lymphoblastic leukemia: a marker for the monitoring of minimal residual disease.** *Leukemia*, March 2000, Volume 14, Number 3, Pages 522-524.
 22. Xu B, Tian H, Zhou SY. : **Detection of *FLT3* gene and *FLT3/ITD* gene mutation in chronic myeloid leukemia and its significance.** *Ai Zheng.* 2004 Oct;23(10):1218-21.
 23. Birg F, Courcoul M, Rosnet O, et al. **Expression of the *FMS/KIT*-like gene *FLT3* in human acute leukemias of the myeloid and lymphoid lineages.** *Blood.* 1992;80:2584-2593.
 24. Carow CE, Levenstein M, Kaufmann SH, et al. **Expression of the hematopoietic growth factor receptor *FLT3* (*STK-1/Flk2*) in human leukemias.** *Blood.* 1996;87:1089-1096.
 25. H Kiyoi, M Towatari, S Yokota, M Hamaguchi, R Ohno, H Saito, T Naoe. **Internal tandem duplication of the *FLT3* gene is a novel modality of elongation mutation which causes constitutive activation of the product.** *Leukemia.* September 1998, Volume 12, Number 9, Pages 1333-1337.

26. Mizuki M, Fenski R, Halfter H, et al. ***Flt3 mutations from patients with acute myeloid leukemia induce transformation of 32D cells mediated by the Ras and STAT5 pathways.*** *Blood.* 2000;96: 3907-3914.
27. D. Gary Gilliland and James D. Griffin. ***The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia.*** *Blood,* 2002 100: 1532-1542.
28. Iwai T, Yokota S, Nakao M, Okamoto T, Taniwaki M, Onodera N, Watanabe A, Kikuta A, Tanaka A, Asami K, Sekine I, Mugishima H, Nishimura Y, Koizumi S, Horikoshi Y, Mimaya J, Ohta S, Nishikawa K, Iwai A, Shimokawa T, Nakayama M, Kawakami K, Gushiken T, Hyakuna N, Fujimoto T, et al. ***Internal tandem duplication of the FLT3 gene and clinical evaluation in childhood acute myeloid leukemia. The Children's Cancer and Leukemia Study Group, Japan.*** *Leukemia.* 1999 Jan;13(1):38-43.
29. Meshinchi S, Woods WG, Stirewalt DL, et al. ***Prevalence and prognostic significance of Flt3 internal tandem duplication in pediatric acute myeloid leukemia.*** *Blood.* 2001;97:89-94.
30. Kondo M, Horibe K, Takahashi Y, et al. ***Prognostic value of internal tandem duplication of the FLT3 gene in childhood acute myelogenous leukemia.*** *Med Pediatr Oncol.* 1999;33:525-529.
31. Govedarovic N, Marjanovic G. ***Frequency and prognostic impact of FLT3/ITD mutation in patients with acute myeloid leukaemia.*** *J BUON.* 2011 Jan-Mar;16(1):108-11.
32. Christian Thiede, Christine Steudel, Brigitte Mohr, Markus Schaich, Ulrike Scha" kel, Uwe Platzbecker, Martin Wermke, Martin Bornhauser, Markus Ritter, Andreas Neubauer, Gerhard Ehninger, and Thomas Illmer. ***Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis.*** *BLOOD,* 15 JUNE 2002 VOLUME 99, NUMBER 12
33. Susanne Schnittger, Claudia Schoch, Martin Dugas, Wolfgang Kern, Peter Staib, Christian Wuchter, Helmut Loffler, Cristina Maria Sauerland, Hubert Serve, Thomas Buchner, Torsten Haferlach, and Wolfgang Hiddemann. ***Analysis of FLT3 length mutations in 1003 patients with acute myeloid leukemia: correlation to cytogenetics, FAB subtype, and prognosis in the***

- AMLCG study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease.** *BLOOD*, 1 JULY 2002 VOLUME 100, NUMBER 1
34. Mohammad Hasan Sheikhha, Abida Awan, Khalid Tobal, and John Ahman Liu Yin. **Prognostic significance of FLT3 ITD and D835 mutations in AML patients.** *The Hematology Journal* (2003) 4, 41–46.
 35. M Yanada, K Matsuo, T Suzuki, H Kiyoi and T Naoe. **Acute Non-Lymphocytic Leukemias. Prognostic significance of FLT3 internal tandem duplication and tyrosine kinase domain mutations for acute myeloid leukemia: a meta-analysis.** *Leukemia* (2005) 19, 1345–1349. doi:10.1038/sj.leu.2403838;
 36. Stefan Fröhling, Richard F. Schlenk, Jochen Breitruck, Axel Benner, Sylvia Kreitmeier, Karen Tobis, Hartmut Döhner, and Konstanze Döhner. **Prognostic significance of activating FLT3 mutations in younger adults (16 to 60 years) with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the AML Study Group Ulm.** December 15, 2002; *Blood*: 100 (13)
 37. Daver N, Strati P, Jabbour E, Kadia T, Luthra R, Wang S, Patel K, Ravandi F, Cortes J, Qin Dong X, Kantarjian H, Garcia-Manero G. **FLT3 mutations in myelodysplastic syndrome and chronic myelomonocytic leukemia.** *Am J Hematol.* 2013 Jan;88(1):56-9. doi: 10.1002/ajh.23345.
 38. Ashish Bains, Rajyalakshmi Luthra, L. Jeffrey Medeiro, and Zhuang Zuo. **FLT3 and NPM1 Mutations in Myelodysplastic Syndromes. Frequency and Potential Value for Predicting Progression to Acute Myeloid Leukemia.** (2011) *American Journal of Clinical Pathology*, 135, 62-69.
 39. Yukiya Yamamoto, Hitoshi Kiyoi, Yasuyuki Nakano, Ritsuro Suzuki, Yoshihisa Kodaera, Shuichi Miyawaki, Norio Asou, Kazutaka Kuriyama, Fumiharu Yagasaki, Chihiro Shimazaki, Hideki Akiyama, Kenji Saito, Miki Nishimura, Toshiko Motoji, Katsuji Shinagawa, Akihiro Takeshita, Hidehiko Saito, Ryuzo Ueda, Ryuzo Ohno, and Tomoki Naoe. **Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies.** April 15, 2001; *Blood*: 97 (8)
 40. Susan P. Whitman, Amy S. Ruppert, Michael D. Radmacher, Krzysztof Mrózek, Peter Paschka, Christian Langer, Claudia D. Baldus, Jing Wen, Frederick Racke, Bayard L. Powell, Jonathan E. Kolitz, Richard A. Larson, Michael A. Caligiuri,

- Guido Marcucci, and Clara D. Bloomfield. **FLT3 D835/I836 mutations are associated with poor disease-free survival and a distinct gene-expression signature among younger adults with de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia lacking FLT3 internal tandem duplications.** February 1, 2008; *Blood*: 111 (3)
41. Abu-Duhier FM, Goodeve AC, Wilson GA, Care RS, Peake IR, and Reilly JT (2001). **Identification of novel FLT-3 Asp835 mutations in adult acute myeloid leukaemia.** *Br J Haematol* 113(4):983–988.
 42. Adam J. Mead, David C. Linch, Robert K. Hills, Keith Wheatley, Alan K. Burnett, and Rosemary E. Gale. **FLT3 tyrosine kinase domain mutations are biologically distinct from and have a significantly more favorable prognosis than FLT3 internal tandem duplications in patients with acute myeloid leukemia.** August 15, 2007; *Blood*: 110 (4)
 43. Colombo E, Martinelli P, Zamponi R, Shing DC, Bonetti P, Luzi L, Volorio S, Bernard L, Pruneri G, Alcalay M, Pelicci PG. **Delocalization and destabilization of the Arf tumor suppressor by the leukemia-associated NPM mutant.** *Cancer Res.* 2006 Mar 15;66(6):3044-50.
 44. Brunangelo Falini, Niccolo` Bolli, Jing Shan, Maria Paola Martelli, Arcangelo Liso, Alessandra Pucciarini, Barbara Bigerna, Laura Pasqualucci, Roberta Mannucci, Roberto Rosati, Paolo Gorello, Daniela Diverio, Giovanni Roti, Enrico Tiacci, Giovanni Cazzaniga, Andrea Biondi, Suzanne Schnittger, Torsten Haferlach, Wolfgang Hiddemann, Massimo F. Martelli, Wei Gu, Cristina Mecucci, and Ildo Nicoletti. **Both carboxy-terminus NES motif and mutated tryptophan(s) are crucial for aberrant nuclear export of nucleophosmin leukemic mutants in NPMc+ AML.** *BLOOD*, 1 JUNE 2006 VOLUME 107, NUMBER 11.
 45. Chang JH, Olson MO (1990). **Structure of the gene for rat nucleolar protein B23.** *J Biol Chem* 265:18227–33.
 46. Eirin-Lopez JM, Frehlick LJ, Ausio J. (2006) **Long-term evolution and functional diversification in the members of the nucleophosmin/nucleoplasmin family of nuclear chaperones.** *Genetics* 173:1835–50.

47. Grisendi S, Bernardi R, Rossi M, Cheng K, Khandker L, Manova K, et al. (2005) **Role of nucleophosmin in embryonic development and tumorigenesis.** *Nature* 437:147–53.
48. Brunangelo Falini, Ildo Nicoletti, Niccolò Bolli, Maria Paola Martelli, Arcangelo Liso, Paolo Gorello, Franco Mandelli, Cristina Mecucci, Massimo Fabrizio Martelli. **Translocations and mutations involving the nucleophosmin (NPM1) gene in lymphomas and leukemias.** *Haematologica* April 2007 92: 519-532
49. Dergunova N, Bulycheva TI, Artemenko EG, Shpakova AP, Pegova AN, Gemjian EG, Dudnik OA, Zatsepina OV, Malashenko OS. **A major nucleolar protein B23 as a marker of proliferation activity of human peripheral lymphocytes.** *Immunol Lett.* 2002 Aug 1;83(1):67-72.
50. Mitsuru Okuwakia, Ken Matsumotoa, Masafumi Tsujimotoa, Kyosuke Nagatab; **Function of nucleophosmin/B23, a nucleolar acidic protein, as a histone chaperone.** *Federation of European Biochemical Societies, Letters* 506 (2001) 272-276.
51. Chandrashekhar Korgaonkar, Jussara Hagen, Van Tompkins, April A. Frazier, Chantal Allamargot, Frederick W. Quelle, and Dawn E. Quelle. **Nucleophosmin (B23) Targets ARF to Nucleoli and Inhibits Its Function.** *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY*, Feb. 2005, p. 1258–1271.
52. Lindsay J. Frehlick, Jose Maria Eirin-Lopez, and Juan Ausio. **New insights into the nucleophosmin/nucleoplasmin family of nuclear chaperones.** *BioEssays* 29:49–59.
53. Yue Yu, Leonard B. Maggi, Jr., Suzanne N. Brady, Anthony J. Apicelli, Mu-Shui Dai, Hua Lu, and Jason D. Weber. **Nucleophosmin Is Essential for Ribosomal Protein L5 Nuclear Export.** *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY*, May 2006, p. 3798–3809.
54. Masaru Okuda. **The role of nucleophosmin in centrosome duplication.** *Oncogene* (2002) 21, 6170 – 6174.
55. Rajesh S. Savkur and Mark O. J. Olson. **Preferential cleavage in pre-ribosomal RNA by protein B23 endoribonuclease.** *Nucleic Acids Research*, 1998, Vol. 26, No. 19.

56. Silvia Grisendi, Cristina Mecucci, Brunangelo Falini & Pier Paolo Pandolfi **Nucleophosmin and cancer.** *Nature Reviews Cancer* 6, 493-505 (July 2006).
57. Jee-Yin Ahn, Xia Liu, Dongmei Cheng, Junmin Peng, Pui-Kwang Chan, Paul A. Wade, and Keqiang Ye. **Nucleophosmin/B23, a Nuclear PI(3,4,5)P3 Receptor, Mediates the Antiapoptotic Actions of NGF by Inhibiting CAD.** *Molecular Cell*, Vol. 18, 435–445, May 13, 2005.
58. Zhaoliang Li and Stephen R. Hann. **Nucleophosmin is essential for c-Myc nucleolar localization and c-Myc-mediated rDNA transcription.** *Oncogene*. 2013 April 11; 32(15)
59. Qishen Pang, Tracy A. Christianson, Tara Koretsky, Hanqian Carlson, Larry David, Winifred Keeble, Gregory R. Faulkner, Ashley Speckhart, and Grover C. Bagby. **Nucleophosmin Interacts with and Inhibits the Catalytic Function of Eukaryotic Initiation Factor 2 Kinase PKR.** *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*. Vol. 278, No. 43, Issue of October 24, pp. 41709–41717, 2003.
60. Takeshi Kondo, Naoto Minamino, Tokiko Nagamura-Inoue, Masahito Matsumoto, Tadatsugu Taniguchi and Nobuyuki Tanaka. **Identification and characterization of nucleophosmin/B23/numatrin which binds the anti-oncogenic transcription factor IRF-1 and manifests oncogenic activity.** *Oncogene* (1997) 15, 1275 - 1281.
61. Willman CL, Sever CE, Pallavicini MG, Harada H, Tanaka N, Slovak ML, Yamamoto H, Harada K, Meeker TC, List AF, et al. **Deletion of IRF-1, mapping to chromosome 5q31.1, in human leukemia and preleukemic myelodysplasia.** *Science*. 1993 Feb 12;259(5097):968-71.
62. Scott W Lowe and Charles J Sherr. **Tumor suppression by Ink4a-Arf: Progress and puzzles.** *Current opinion in genetics & development*. 2003, 13:77-83.
63. Morris SW, Kirstein MN, Valentine MB, Dittmer KG, Shapiro DN, Saltman DL et al. **Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma.** *Science* 1994; 263: 1281–1284.
64. Robert L. Redner, Elizabeth A. Rush, Susan Faas, William A. Rudert, and Seth J. Corey. **The t(5;17) Variant of Acute Promyelocytic Leukemia Expresses a Nucleophosmin-Retinoic Acid Receptor Fusion.** *Blood*, Vol 87, No 3 (February I), 1996: pp 882-886.

65. Yoneda-Kato N, Look AT, Kirstein MN, Valentine MB, Raimondi SC, Cohen KJ, Carroll AJ, Morris SW. **The t(3;5)(q25.1;q34) of myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia produces a novel fusion gene, NPM-MLF1.** *Oncogene* [1996, 12(2):265-275].
66. Brunangelo Falini, M.D., Cristina Mecucci, M.D., Ph.D., Enrico Tiacci, M.D., Myriam Alcalay, M.D., Ph.D., Roberto Rosati, Ph.D., Laura Pasqualucci, M.D., Roberta La Starza, M.D., Ph.D., Daniela Diverio, M.D., Emanuela Colombo, Ph.D., Antonella Santucci, M.D., Barbara Bigerna, Roberta Pacini, Alessandra Pucciarini, Ph.D., Arcangelo Liso, M.D., Marco Vignetti, M.D., Paola Fazi, M.D., Natalia Meani, Ph.D., Valentina Pettirossi, Ph.D., Giuseppe Saglio, M.D., Franco Mandelli, M.D., Francesco Lo-Coco, M.D., Pier-Giuseppe Pelicci, M.D., Ph.D., and Massimo F. Martelli, M.D., for the GIMEMA Acute Leukemia Working Party. **Cytoplasmic Nucleophosmin in Acute Myelogenous Leukemia with a Normal Karyotype.** *N Engl J Med* 2005;352:254-66.
67. Brunangelo Falini, Ildo Nicoletti, Massimo F. Martelli, and Cristina Mecucci. **Acute myeloid leukemia carrying cytoplasmic/mutated nucleophosmin (NPMc+ AML): biologic and clinical features.** *BLOOD*, 1 FEBRUARY 2007 VOLUME 109, NUMBER 3.
68. Susanne Schnittger, Claudia Schoch, Wolfgang Kern, Cristina Mecucci, Claudia Tschulik, Massimo F. Martelli, Torsten Haferlach, Wolfgang Hiddemann, and Brunangelo Falini. **Nucleophosmin gene mutations are predictors of favorable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype.** *BLOOD*, 1 DECEMBER 2005 VOLUME 106, NUMBER 12.
69. Konstanze Dohner, Richard F. Schlenk, Marianne Habdank, Claudia Scholl, Frank G. Rucker, Andrea Corbacioglu, Lars Bullinger, Stefan Frohling, and Hartmut Dohner, for the AML Study Group (AMLSG). **Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: interaction with other gene mutations.** *BLOOD*, 1 DECEMBER 2005 VOLUME 106, NUMBER 12.
70. Roel G. W. Verhaak, Chantal S. Goudswaard, Wim van Putten, Maarten A. Bijl, Mathijs A. Sanders, Wendy Hagens, Andre G. Uitterlinden, Claudia A. J. Erpelinck, Ruud Delwel, Bob Lowenberg, and Peter J. M. Valk. **Mutations in**

nucleophosmin (NPM1) in acute myeloid leukemia (AML): association with other gene abnormalities and previously established gene expression signatures and their favorable prognostic significance. *BLOOD*, 1 DECEMBER 2005 VOLUME 106, NUMBER 12.

71. Christian Thiede, Sina Koch, Eva Creutzig, Christine Steudel, Thomas Illmer, Markus Schaich, and Gerhard Ehninger, for the Deutsche Studieninitiative Leukämie. **Prevalence and prognostic impact of NPM1 mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML).** *BLOOD*, 15 MAY 2006 VOLUME 107, NUMBER 10.
72. Rosemary E. Gale, Claire Green, Christopher Allen, Adam J. Mead, Alan K. Burnett, Robert K. Hills, and David C. Linch, on behalf of the Medical Research Council Adult Leukaemia Working Party. **The impact of FLT3 internal tandem duplication mutant level, number, size, and interaction with NPM1 mutations in a large cohort of young adult patients with acute myeloid leukemia.** *BLOOD*, 1 MARCH 2008 VOLUME 111, NUMBER 5.
73. Richard F. Schlenk, M.D., Konstanze Döhner, M.D., Jürgen Krauter, M.D., Stefan Fröhling, M.D., Andrea Corbacioglu, Ph.D., Lars Bullinger, M.D., Marianne Habdank, Daniela Späth, Michael Morgan, Ph.D., Axel Benner, M.Sc., Brigitte Schlegelberger, M.D., Gerhard Heil, M.D., Arnold Ganser, M.D., and Hartmut Döhner, M.D., for the German–Austrian Acute Myeloid Leukemia Study Group. **Mutations and Treatment Outcome in Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia.** *N Engl J Med* 2008;358:1909-18.
74. Joao Agostinho Machado-Neto, Fabiola Traina, Mariana Lazarini, Paula de Melo Campos, Katia Borgia Barbosa Pagnano, Irene Lorand-Metze, Fernando Ferreira Costa, Sara T Olalla Saad. **Screening for hotspot mutations in PI3K, JAK2, FLT3 and NPM1 in patients with myelodysplastic syndromes.** *CLINICS* 2011;66(5):793-799.
75. Biliana Jekic, Vera Bunjevacki, Valerija Dobricic, Ivana Novakovic, Jelena Milasin, Branka Popovic, Tatjana Damnjanovic, Nela Maksimovic, V.Perovic and Liliana Lukovic. **NPM1 gene mutations in children with myelodysplastic syndromes.** *Arch. Biol. Sci., Belgrade*, 63 (3), 649-653, 2011.

76. Li L1, Zhang Y, Ma XT, Yang L, Xu ZF, Xiao ZJ. **Study on NPM1 gene mutations in patients with primary myelodysplastic syndromes.** *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi.* 2010 Dec;31(12):809-812.
77. F Dicker, C Haferlach, J Sundermann, N Wendland, T Weiss, W Kern, T Haferlach and S Schnittger. **Mutation analysis for RUNX1, MLL-PTD, FLT3-ITD, NPM1 and NRAS in 269 patients with MDS or secondary AML.** *Leukemia* (2010) 24, 1528–1532.
78. Angelini DF, Ottone T, Guerrera G, Lavorgna S, Cittadini M, Buccisano F, Bardi M, Gargano F, Maurillo L, Divona M, Noguera NI, Consalvo MI, Borsellino G, Bernardi G, Amadori S, Venditti A, Battistini L, Lo-Coco F. **A Leukemia-Associated CD34/CD123/CD25/CD99+ Immunophenotype Identifies FLT3-Mutated Clones in Acute Myeloid Leukemia.** *Clin Cancer Res.* 2015 May 8. [Epub ahead of print].
79. Luz Munoz, Ana Aventin, Neus Villamor, Jordi Junca, Gemma Acebedo, Alicia Domingo, Maria Rozman, J Pio Torres, Mar Tormo, Josep F. Nomdedeu. **Immunophenotypic findings in acute myeloid leukemia with FLT3 internal tandem duplication.** *Haematologica/journal of hematology* vol. 88(06): June 2003.
80. Y Matsuoka, K Sumide, H Kawamura, R Nakatsuka, T Fujioka, Y Sasaki and Y Sonoda. **Human cord blood-derived primitive CD34-negative hematopoietic stem cells (HSCs) are myeloid-biased long-term repopulating HSCs.** *Blood Cancer Journal* (2015) 5, e290.
81. Zanjani ED1, Almeida-Porada G, Livingston AG, Flake AW, Ogawa M. **Human bone marrow CD34- cells engraft in vivo and undergo multilineage expression that includes giving rise to CD34+ cells.** *Exp Hematol.* 1998 Apr;26(4):353-60.
82. Mickie Bhatia, Dominique Bonnet, Barbara Murdoch, Olga I. Gan & John E. Dick. **A newly discovered class of human hematopoietic cells with SCID-repopulating activity.** *Nature Medicine* 4, 1038 - 1045 (1998).
83. Takashi Sato, Joseph H. Laver, and Makio Ogawa. **Reversible Expression of CD34 by Murine Hematopoietic Stem Cells.** *Blood*, Vol 94, No 8 (October 15), 1999: pp 2548-2554.

84. Liu YR, Lai YY, Chang Y, Ruan GR, Qin YZ, Wang YZ, Zhu HH, Shi HX, Jiang B, Jiang H, Jiang Q, Hao L, Li JL. **Immunophenotypic and clinical characteristic analysis of NPM1 mutated acute myeloid leukemia with a normal karyotype.** *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi.* 2013 Dec;21(6):1385-9. doi: 10.7534/j.issn.1009-2137.2013.06.004.
85. Dang H, Chen Y, Kamel-Reid S, Brandwein J, Chang H. **CD34 expression predicts an adverse outcome in patients with NPM1-positive acute myeloid leukemia.** *Hum Pathol.* 2013 Oct;44(10):2038-46.
86. Liu YR, Zhu HH, Ruan GR, Qin YZ, Shi HX, Lai YY, Chang Y, Wang YZ, Lu D, Hao L, Li JL, Li LD, Jiang B, Huang XJ. **NPM1-mutated acute myeloid leukemia of monocytic or myeloid origin exhibit distinct immunophenotypes.** *Leuk Res.* 2013 Jul;37(7):737-41.
87. Chien-Yuan Chen, Wen-Chien Chou, Woei Tsay, Jih-Luh Tang, Ming Yao, Sheng-Yi Huang and Hwei-Fang Tien. **Hierarchical cluster analysis of immunophenotype classify AML patients with NPM1 gene mutation into two groups with distinct prognosis.** *BMC Cancer* 2013, 13:107.
88. W Kern, C Haferlach, U Bacher, T Haferlach and S Schnittger. **Flow cytometric identification of acute myeloid leukemia with limited differentiation and NPM1 type A mutation: a new biologically defined entity.** *Leukemia* (2009) 23, 1361–1364.
89. D. Gary Gilliland, Craig T. Jordan, and Carolyn A. Felix. **The Molecular Basis of Leukemia.** *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2004:80-97.
90. Preetesh Jain, Francisco Vega-Vazquez, Stefan Faderl. **“Cup-like” blasts and NPM1 and FLT3 (ITD) mutations in acute myeloid leukemia (AML).** *Int J Hematol* (2013) 98:3.
91. Park BG, Chi HS, Jang S, Park CJ, Kim DY, Lee JH, Lee JH, Lee KH. **Association of cup-like nuclei in blasts with FLT3 and NPM1 mutations in acute myeloid leukemia.** *Ann Hematol.* 2013 Apr;92(4):451-7.
92. Massimo Breccia, Giuseppina Loggisci, Maria Giovanna Loggisci, Roberto Ricci, Daniela Diverio, Roberto Latagliata, Robin Foa, Francesco Lo-Coco. **FLT3-ITD confers poor prognosis in patients with acute promyelocytic leukemia**

- treated with AIDA protocols: long term follow-up analysis.** *Haematologica* 2013; 98:e161.
93. Xavier Poiré, Barry K. Moser, Robert E. Gallagher, Kristina Laumann, Clara D. Bloomfield, Bayard L. Powell, Gregory Koval, Kabir Gulati, Nicholas Holowka, Richard A. Larson, Martin S. Tallman, Frederick R. Appelbaum, Dorie Sher, Cheryl Willman, Elisabeth Paietta, and Wendy Stock. **Arsenic trioxide in front-line therapy of acute promyelocytic leukemia (C9710): prognostic significance of FLT3 mutations and complex karyotype.** *Leuk Lymphoma*. 2014 July ; 55(7): 1523–1532.
 94. Susanne Schnittger, Ulrike Bacher, Claudia Haferlach, Wolfgang Kern, Tamara Alpermann and Torsten Haferlach. **Clinical impact of FLT3 mutation load in acute promyelocytic leukemia with t(15;17)/PML-RARA.** *Haematologica* | 2011; 96(12).
 95. Yoo SJ, Park CJ, Jang S, Seo EJ, Lee KH, Chi HS. **Inferior prognostic outcome in acute promyelocytic leukemia with alterations of FLT3 gene.** *Leuk Lymphoma*. 2006 Sep;47(9):1788-93.
 96. Rosemary E. Gale, Robert Hills, Arnold R. Pizzey, Panagiotis D. Kottaridis, David Swirsky, Amanda F. Gilkes, Elizabeth Nugent, Kenneth I. Mills, Keith Wheatley, Ellen Solomon, Alan K. Burnett, David C. Linch, and David Grimwade, for the NCRI Adult Leukaemia Working Party. **Relationship between FLT3 mutation status, biologic characteristics, and response to targeted therapy in acute promyelocytic leukemia.** *BLOOD*, 1 DECEMBER 2005 VOLUME 106, NUMBER 12.
 97. C Callens, S Chevret, J-M Cayuela, B Cassinat, E Raffoux, S de Botton, X Thomas, A Guerci, N Fegueux, A Pigneux, A-M Stoppa, T Lamy, F Rigal-Huguet, A Vekhoff, S Meyer-Monard, A Ferrand, M Sanz, C Chomienne, P Fenaux and H Dombret¹ for the European APL Group. **Prognostic implication of FLT3 and Ras gene mutations in patients with acute promyelocytic leukemia (APL): a retrospective study from the European APL Group.** *Leukemia* (2005) 19, 1153–1160.
 98. Hiba El Hajj, Zeina Dassouki, Caroline Berthier, Emmanuel Raffoux, Lionel Ades, Olivier Legrand, Rita Hleihel, Umut Sahin, Nadim Tawil, Ala Salameh,

Kazem Zibara, Nadine Darwiche, Mohamad Mohty, Herve Dombret, Pierre Fenaux, Hugues de The, and Ali Bazarbachi. **Retinoic acid and arsenic trioxide trigger degradation of mutated NPM1, resulting in apoptosis of AML cells.** BLOOD, 28 MAY 2015, VOLUME 125, NUMBER 22.

99. Maria Paola Martelli, Ilaria Gionfriddo, Federica Mezzasoma, Francesca Milano, Sara Pierangeli, Floriana Mulas, Roberta Pacini, Alessia Tabarrini, Valentina Pettirossi, Roberta Rossi, Calogero Vetro, Lorenzo Brunetti, Paolo Sportoletti, Enrico Tiacci, Francesco Di Raimondo, and Brunangelo Falini. **Arsenic trioxide and all-trans retinoic acid target NPM1 mutant oncoprotein levels and induce apoptosis in NPM1-mutated AML cells.** Blood. 2015 May 28;125(22):3455-65.