ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΤΣΙΑΡΑ ΕΛΕΝΗ

ΛΑΡΙΣΑ 2019

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/02/2026 23:45:56 EET - 18.97.14.81

<u>ΤΙΤΛΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ (ΕΛΛΗΝΙΚΑ)</u>

Ανίχνευση μεταλλάξεων FLT3

σε ασθενείς με Οξεία Μυελογενή Λευχαιμία

<u>ΤΙΤΛΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ (ΑΓΓΛΙΚΑ)</u>

Detection of FLT3 mutations

in acute myelogenous leukemia patients

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/02/2026 23:45:56 EET - 18.97.14.81

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- Καλλιόπη Λιαδάκη, Επίκουρη Καθηγήτρια του Τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (επιβλέπουσα)

- Καλλιόπη Παπαδοπούλου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας του ΠανεπιστήμιουΘεσσαλίας

- Θεολογία Σαραφίδου, Επίκουρη Καθηγήτρια του Τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστήμιου Θεσσαλίας

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/02/2026 23:45:56 EET - 18.97.14.81

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/02/2026 23:45:56 EET - 18.97.14.81

<u>ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ ΓΙΑ ΤΟΥΣ ΠΙΝΑΚΕΣ (TABLES)</u>

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/02/2026 23:45:56 EET - 18.97.14.81

<u>ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ ΓΙΑ ΤΙΣ ΕΙΚΟΝΕΣ (FIGURES)</u>

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/02/2026 23:45:56 EET - 18.97.14.81

Η υγεία δεν εκτιμάται, μέχρι τη στιγμή που έρχεται η αρρώστια.

ThomasFuller

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/02/2026 23:45:56 EET - 18.97.14.81

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η οξεία μυελογενής λευχαιμία (ΟΜΛ) είναι η πιο κοινή μορφή οξείας λευχαιμίας σε εφήβους και ενήλικες και χαρακτηρίζεται από σημαντική φαινοτυπική και γενετική ετερογένεια. Έχουν γίνει προσπάθειες να αναγνωριστούν παράγοντες με σκοπό την ταξινόμηση των ΟΜΛ σε προγνωστικές ομάδες στοχεύοντας στην καλύτερη θεραπευτική αντιμετώπιση των ασθενών. Παρόλο που έχει σημειωθεί σημαντική πρόοδος στη θεραπεία της, παραμένει μια θανατηφόρα ασθένεια σε πολλές περιπτώσεις. Οι μεταλλάξεις των γονιδίων *FLT3, NPM1* και *C-KIT* έχουν ιδιαίτερη προγνωστική αξία στους ασθενείς με ΟΜΛ. Διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι ο συνδυασμός των ανωτέρω γονιδίων μπορεί να αναδείξει υποπληθυσμούς με διαφορετική πρόγνωση. Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η ανίχνευση μεταλλάξεων στο γονίδιο *FLT3* σε Έλληνες ασθενείς με ΟΜΛ. Πραγματοποιήθηκε απομόνωση γενετικού υλικού από το περιφερικό αίμα 15 ασθενών με ΟΜΛ. Η ανίχνευση μεταλλάξεων στο γονίδιο FLT3 επικεντρώθηκε στην ταυτοποίηση εσωτερικών διαδοχικών διπλασιασμών (Internal Tandem Duplication, ITD) μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σχεδιάζοντας εξειδικευμένους εκκινητές εκατέρωθεν της υπό μελέτη περιοχής. Όλοι οι ασθενείς έδωσαν μόνο μια ζώνη μεγέθους 329 bp, που αντιστοιχεί στο φυσιολογικό (μη μεταλλαγμένο) τμήμα του γονιδίου *FLT3*. Εντούτοις, δεν ταυτοποιήθηκε μετάλλαξη σε κανένα ασθενή καθώς δεν ανιχνεύθηκε καμιά άλλη ζώνη μεγαλύτερου μεγέθους. Λόγω του μικρού αριθμού των δειγμάτων που μελετήθηκαν, η ανίχνευση της συγκεκριμένης μετάλλαξης πρέπει να πραγματοποιηθεί σε μεγαλύτερο αριθμό ασθενών, ώστε να οδηγήσει σε αξιόπιστα συμπεράσματα.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/02/2026 23:45:56 EET - 18.97.14.81

ABSTRACT

Acute myelogenous leukemia (AML) is the most common form of acute leukemia in adolescents and adults and is characterized by significant phenotypic and genetic heterogeneity. Efforts have been made to identify factors for the classification of AML in prognostic groups aiming at better treatment of patients. Although significant progress has been made in its treatment, AML remains a deadly disease in many cases. It has been established that *FLT3*, *NPM1* and *C-KIT* mutations have a particular predictive value in patients with AML. Several studies have shown that the combination of the above genes may reveal subpopulations with different prognosis. The purpose of this study is to detect mutations in the *FLT3* gene in Greek patients with AML. The experimental procedure included the isolation of genomic DNA from peripheral blood of 15 patients with AML. The detection of mutations in the *FLT3* gene was focused on the identification of Internal Tandem Duplication (ITD) through the polymerase chain reaction by designing specific primers on either side of the region of interest. In all patients a PCR product of 329 bp was obtained, which corresponds to the wild-type (non-mutated) portion of the *FLT3* gene. However, no mutation was identified in any patient as no bigger size bands were detected. Due to the small number of specimens studied, the detection of this mutation should be performed in a larger number of patients in order to allow us to draw reliable conclusions.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/02/2026 23:45:56 EET - 18.97.14.81

ΑΝΤΙ ΠΡΟΛΟΓΟΥ…..

Η παρούσα διπλωματική εργασία έγινε στα πλαίσια του Μ.Δ.Ε. «Εφαρμογές μοριακής βιολογίας, Μοριακή γενετική, Διαγνωστικοί δείκτες» του Τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίαςτου Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και της Αιματολογικής κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας.
Εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών & Περιβάλλοντος υπό την εποπτεία της βιολόγου-βιοχημικής φαρμακολογίας Δρ. Καλλιόπης Λιαδάκη (Επίκουρος Καθηγήτρια) κατά το ακαδημαϊκό έτος 2018-2019.
Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω την Διευθύντρια του μεταπτυχιακού,για την δυνατότητα που μου προσέφερε νασυμμετάσχω στο συγκεκριμένο πρόγραμμα, την Δρ.Καλλιόπη Παπαδοπούλου, Αναπληρώτρια καθηγήτρια του τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και μέλος της τριμελούς επιτροπής της διπλωματικής μου, καθώς και την Δρ. Καλλιόπη Λιαδάκη, Επίκουρο Καθηγήτρια του Τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, επιβλέπουσα της διπλωματικής μου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την Δρ. Καλλιόπη Λιαδάκη, Επίκουρο Καθηγήτρια του Τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για την υπόδειξη του θέματος, τη καθοδήγηση και την πολύτιμη βοήθεια που μου προσέφερε στην κατανόηση του θεωρητικού και την διεκπεραίωσητου πρακτικού μέρους της εργασίας, όσο και στη συγγραφή της παρούσας διπλωματικής.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως τη Νταντάμη Έλενα, για την καταλυτική βοήθειά της στη εκμάθηση των τεχνικών που χρησιμοποιήθηκαν στηδιεξαγωγή του πειραματικού μέρους της διπλωματικής μου εργασίας, η οποίααποτελεί μέρος της διδακτορικής διατριβής της.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τις συμφοιτήτριες μου Σοφία Αλεξούδα και Κωνσταντίνα Πάχη, για την βοήθεια τους καθώς καιγια τις σημαντικές συζητήσεις και την ηθική συμπαράστασή της καθ’ όλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών.

Θα ήταν παράλειψη να μην ευχαριστήσω τον διευθυντή της Αιματολογικής κλινικής, καθηγητή Παθολογίας-Αιματολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Δρ. Βασιλόπουλο Γεώργιο.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένεια μου και τους φίλους μου για την αμέριστη συμπαράσταση, την στήριξη και την κατανόηση που έδειξαν καθ όλη την διάρκεια εκπόνησης της εργασίας αυτής.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/02/2026 23:45:56 EET - 18.97.14.81

1. <u>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</u>

1.1. <u>ΟΞΕΙΑ ΜΥΕΛΟΓΕΝΗΣ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ</u>

Η Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία, ΟΜΛ (Acute Myeloid Leukemia) είναι μία ετερογενής κλωνική διαταραχή των άωρων αιμοποιητικών κυττάρων του μυελού των οστών, τα οποία έχουν χάσει την ικανότητα ρύθμισης της αυτοανανεωτικής τους λειτουργίας και της διαφοροποίησης προς τα ώριμα κύτταρα του αίματος. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της διαφοροποίησής τους στο επίπεδο των βλαστών ή των προμυελοκυττάρων. Αντιστοιχεί στο 30% των περιπτώσεων λευχαιμίας στους ενήλικες και στο 0,6% όλων των καρκίνων ***(Estey and Döhner, 2006)***.

Η ΟΜΛ προσβάλλει ηλικιωμένα άτομα σε ποσοστό μεγαλύτερο του 50%. Χαρακτηρίζεται από ραγδαία ανάπτυξη των λευκών αιμοσφαιρίων. Μέσα στο μυελό των οστών, παρατηρείται μία υπερπαραγωγή παθολογικών (στη μορφή και στη λειτουργία) λευκών αιμοσφαιρίων τα οποία έχουν χάσει την ικανότητα διαφοροποίησης και απόπτωσης.

Η διαφοροποίηση και η ωρίμανση των μυελοειδών κυττάρων, τα οποία περιλαμβάνουν τα πολυμορφοπύρηνα κοκκιοκύτταρα (ηωσινόφιλα, βασεόφιλα, ουδετερόφιλα), τα μονοκύτταρα, τα ερυθροκύτταρα και τα μεγακαρυοκύτταρα, λαμβάνουν χώρα στο μυελό των οστών. Το πρώτο μορφολογικά αναγνωρίσιμο μητρικό κύτταρο της σειράς είναι ο μυελοβλάστης. Στην κανονική διαδικασία αιμοποίησης, ο μυελοβλάστης είναι ένας ανώριμος πρόδρομος των μυελικών λευκών αιμοποιητικών κυττάρων ο οποίος προέρχεται από ένα κοινό μυελοειδές βλαστικό κύτταρο (stemcell). Σταδιακά το κύτταρο αυτό θα ωριμάσει σε ώριμο λευκό κύτταρο του αίματος. Στην ΟΜΛ ο μυελοβλάστης είναι το κακοήθες κύτταρο που, αρχίζει να πολλαπλασιάζεται (κλωνοποιείται) ασταμάτητα. Τα λευχαιμικά κλωνικά κύτταρα που δημιουργούνται, δεν επιτελούν την φυσιολογική τους λειτουργία, που είναι η αποτελεσματική καταπολέμηση των λοιμώξεων. Όσο πληθαίνουν, αναστέλλουν την παραγωγή άλλων τύπων λευκοκυττάρων, ερυθροκυττάρων και αιμοπεταλίων. Προοδευτικά, διηθούν το μυελό, απωθώντας τις άλλες κυτταρικές σειρές και περνούν στην κυκλοφορία του αίματος. Στην ΟΜΛ ένας μυελοβλάστης συσσωρεύει γενετικές μεταλλάξεις, οι οποίες «διατηρούν» το κύτταρο στην ανώριμη μορφή και εμποδίζουν τη διαφοροποίηση. Όταν αυτή η «παύση της διαφοροποίησης» συνδυαστεί με άλλες μεταλλάξεις, θα προκύψει ανεξέλεγκτη ανάπτυξη ενός ανώριμου κλώνου κυττάρων που αποτελεί την οντότητα της ΟΜΛ ***(Fialkow et al,. 1991)***.

Οι επιπλοκές που εμφανίζει η ΟΜΛ στον οργανισμό οφείλονται κυρίως στην έλλειψη ώριμων κοκκιοκυττάρων (πυρετός και λοιμώξεις) και την έκπτωση των άλλων κυτταρικών σειρών (βαριά αναιμία, αιμορραγικές εκδηλώσεις στο δέρμα ή στους βλεννογόνους).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/02/2026 23:45:56 EET - 18.97.14.81

Η εντατική χημειοθεραπεία που μπορεί να οδηγήσει σε ύφεση και η μεταμόσχευση του μυελού των οστών βελτίωσαν την πρόγνωσητης ΟΜΛ. Αυτό αφορά κυρίως νεαρά άτομα και άτομα μέσης ηλικίας. Αντιθέτως τα αποτελέσματα της ίδιας θεραπείας σε ηλικιωμέναάτομαείναι κατά κανόνα πτωχά καθώς τα άτομα αυτά συχνά εμφανίζουν και άλλα προβλήματα υγείας που δυσκολεύουν την κατάσταση τους. Έχει βρεθεί ότι οι ηλικιωμένοι ασθενείς εμφανίζουν μεγαλύτερη αντίσταση στις ιδιαίτερα τοξικές θεραπείες σε σχέση με τους νεότερους ασθενείς. Χαρακτηριστικά αναφέρεται ότι ένα ποσοστό μικρότερο του 10% των ηλικιωμένων ασθενών ωφελείται με την χημειοθεραπεία ***(Estey and Döhner, 2006)***.Γι αυτό το λόγο κρίνεται απαραίτητο να βρεθούν νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις που θα οδηγήσουν στην ύφεση της ΟΜΛ σε ηλικιωμένους ασθενείς.

Σήμερα η αναγνώριση της προγνωστικής σημασίας νέων μοριακών δεικτών έχει βελτιώσει τη θεραπευτική αντιμετώπιση των ασθενών. Η δυνατότητα να προσδιορίζουμε υποομάδες μέσα στις κυτταρογενετικές ομάδες κινδύνουμας βοηθά να σχεδιάσουμε καλύτερα τις θεραπευτικές επιλογές μας. Η ανάδειξη μεταλλάξεων σε διάφορα γονίδια, σε ασθενείς με ευνοϊκό ή φυσιολογικό καρυότυπο, παρουσιάζεται ως πολύ ισχυρός προγνωστικός(θετικός ή αρνητικός) παράγοντας. Επίσης γνωρίζουμε ότι οι συνδυασμοί ορισμένων μεταλλάξεων προσθέτουν ακόμη περισσότερη προγνωστική πληροφορία Παρόλα αυτά, στην πράξηυπάρχει σημαντική απόκλιση στην κλινική ανταπόκριση και τη συνολική επιβίωση των ασθενών με ΟΜΛ που προκύπτει από τη μοριακή ετερογένεια μέσα σε κάθε κυτταρογενετική ομάδα κινδύνου.

1.2. <u>ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ</u>

Η πρώτη περιγραφή οξείας λευχαιμίας έγινε από τον Velpeau το 1827 και αφορούσε σε έναν 63χρονο ανθοπώλη που παρουσίαζε πυρετό, αδυναμία, και μαζική ηπατοσπληνομεγαλία. Ο Velpeau ανέφερε ότι το αίμα του ασθενούς ήταν σαν "χυλός"(gruel).

Το 1845, ο Bennett, παθολογοανατόμος από το Εδιμβούργο, δημοσίευσε μια σειρά περιπτώσεων ασθενών που πέθαναν έχοντας σπληνομεγαλία και αλλαγές στα "χρώματα και συγκλίσεις στο αίμα τους» και για να περιγράψει μια παθολογική κατάσταση χρησιμοποίησε τον όρο “leucocythemia”***(Bennett JH.1845)***

Ο όρος "λευχαιμία" επινοήθηκε από τον Rudolf Virchow, το διάσημο γερμανικό παθολόγο το 1856. Ο Virchow ήταν ο πρώτος που περιέγραψε την ανωμαλία των λευκών αιμοσφαιρίων σε ασθενείς με το κλινικό σύνδρομο που περιέγραψαν οιVelpeau και Bennett. Όμως ο Virchow ήταν σίγουρος για την αιτία των λευκών αιμοσφαιρίων και την περίσσεια τους γι αυτό και χρησιμοποίησε τον καθαρά περιγραφικό όρο"λευχαιμία" (ελληνικά: "λευκό αίμα»), αναφερόμενος στη συγκεκριμένη κατάσταση.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/02/2026 23:45:56 EET - 18.97.14.81

Για πρώτη φορά το 1877 ο Ehrlich αναφέρει τα κύρια αποτελέσματα της λευχαιμίας. Ο Ehrlich ανέπτυξε τις χρωστικές ανιλίνης και τις χρησιμοποίησε σε επιχρίσματα αίματος για να περιγράψει τον πυρήνα, το κυτταρόπλασμα, τα φυσιολογικά και παθολογικά λευκά αιμοσφαίρια και άλλα κύτταρα του αίματος. Ο όρος οξεία λευχαιμία χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1889 από τον Ebstein για ναπεριγράψει μια γρήγορα εξελισσόμενη νόσο που δεν ανταποκρινόταν στις υπάρχουσες θεραπείες. Το 1900 ο Naegeli περιέγραψε τα βλαστικά κύτταρα τις μυελικής σειράς καικατέταξε τις οξείες λευχαιμίες σε μυελικής και λεμφικής προέλευσης. ***(Mehranfar et al., 2017)***.

1.3. <u>ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑ</u>

Η ΟΜΛ αποτελεί το 34% όλων των λευχαιμιών και είναι η πιο συχνή οξεία λευχαιμία στους ενήλικες (85% των περιστατικών), ενώ στην παιδική ηλικία συναντάται πιο σπάνια (15-20% των περιστατικών) ***(Asif and Hassan, 2016)***. Η μέση ηλικία διάγνωσης είναι τα 63 έτη.Η επίπτωση της νόσου είναι 3,8 για κάθε 100.000 του πληθυσμού, ενώ αυξάνει ραγδαία για ηλικίες άνω των 65 ετών και ανέρχεται στο 17,9 για κάθε 100.000. Σε ένα σημαντικό ποσοστό των υπερηλίκων ασθενών της εμφάνισης οξείας μυελογενούς λευχαιμίας, προηγείται προλευχαιμική περίοδος αιμοποιητικής δυσπραγίας και ανεπάρκειας με ποικίλες κλινικές εκδηλώσεις, βαρύτητα και διάρκεια, η οποία χαρακτηρίζεται ως μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο. Επιπλέον έχει παρατηρηθεί ότι η νόσος είναι πιο συχνή στους άντρες σε σχέση με τις γυναίκες σε αναλογία 3:2, ενώ φαίνεται ότι παρουσιάζει και γεωγραφική κατανομή ***(Estey and Döhner, 2006)***.

Η αιτιολογία της ΟΜΛ δεν είναι πλήρως αποσαφηνισμένη.

Επιδημιολογικές μελέτες, που έγιναν σε διάφορες χώρες, δεν έδωσαν συγκεκριμένες συσχετίσεις, αν και αναφέρεται σε συγγράμματα ότι βιολογικοί, ακτινοβιολογικοί και χημικοί παράγοντες μπορεί να ευθύνονται για την ανάπτυξη της νόσου.

Στους παράγοντες κινδύνου περιλαμβάνονται:

- Έκθεση σε φυσική ή τεχνητή ιονίζουσα ακτινοβολία.
- Έκθεση σε χημειοθεραπεία και συγκεκριμένα σε αλκυλιωτικό αντινεοπλασματικό παράγοντα.
- Η έκθεση σε χημικές ουσίες όπως βενζόλιο και άλλους οργανικούς διαλύτεςσχετίζεται με εμφάνιση συγκεκριμένων καρυοτυπικών ανωμαλιών στους λευχαιμικούς βλάστες.
- Έκθεση σε εντομοκτόνα, παρασιτοκτόνα και άλλα χημικά όπως το βενζόλιο, οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες, το κάδμιο, το αρσενικό κ.α.
- Το ενεργό και το παθητικό κάπνισμα.
- Γενετικοί παράγοντες όπως το σύνδρομο Down, η αναιμία Fanconi, αλλά και κληρονομικά σύνδρομα ανοσοανεπάρκειας, όπως το σύνδρομο Wiskott-Aldrich, το συνδρ. φυλοσύνδετης ανοσοανεπάρκειας κ.α.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/02/2026 23:45:56 EET - 18.97.14.81

- Έκθεση σε στην υπεριώδη ακτινοβολία UVA
- Ως υπόστρωμα άλλου νεοπλασματικού νοσήματος του αίματος όπως μυελοδυσπλασία, μυελουπερπλαστικά, παροξυσμική νυκτουρία. αιμοσφαιρινουρία, απλαστική αναιμία κ.α.

1.4. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Ένας μεγάλος αριθμός ερευνών αφορούν στη μελέτη της παθογένειας της ΟΜΛ, με τους περισσότερους ερευνητές να επικεντρώνονται στη μελέτη των γενετικών ιδιοτήτων του λευχαιμικού κυττάρου. Τα περισσότερα κύτταρα ανθρώπινης ΟΜΛ έχουν περιορισμένη πολλαπλασιαστική ικανότητα, υποδηλώνοντας ότι ο λευχαιμικός κλώνος μπορεί να διατηρηθεί από ένα σπάνιο πληθυσμό βλαστικών κυττάρων, με παρόμοιο τρόπο και ιεραρχία όπως αυτής της φυσιολογικής αιμοποίησης ***(Lapidot et al.,1994)***. Το ενδιαφέρον των ερευνητών επικεντρώνεται πια στις κυτταρικές και γενετικές ιδιότητες αυτών των κυττάρων. Οι ΟΜΛ διακρίνονται σε: α) πρωτοπαθείς ή *denovo*, όταν δεν αναπτύσσονται μετά από άλλη αιματολογική νόσο και β) δευτεροπαθείς, στις οποίες προϋπάρχει μυελοδυσπλαστικό ή μυελοϋπερπλαστικό σύνδρομο ***(Παγκάλης, 2008)***.

Η ταξινόμηση των ΟΜΛ ήταν μέχρι προσφάτως βασικά μορφολογική. Η μορφολογική ταξινόμηση βασίζεται στο επίπεδο διαφοροποίησης των βλαστών και περιλαμβάνει τους τύπους που αναφέρονται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1. Μορφολογική Ταξινόμηση Οξείας Λευχαιμίας κατά FAB (French-American-British)

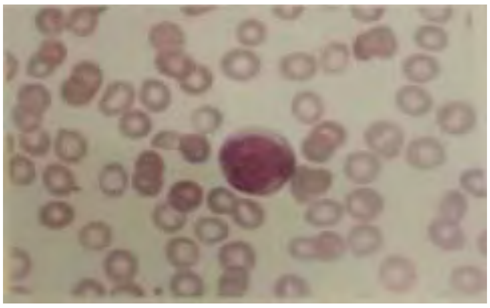
M0	Μυελοβλαστική λευχαιμία από αδιαφοροποίητα κύτταρα
M1	Μυελοβλαστική λευχαιμία με ελάχιστα διαφοροποιημένα βλαστικά κύτταρα
M2	Μυελοβλαστική λευχαιμία με βλαστικά κύτταρα που αρχίζουν να διαφοροποιούνται
M3	Οξεία προμυελοκυτταρική λευχαιμία
M4 M4 eos	Οξεία μυελομονοκυτταρική λευχαιμία Οξεία μυελοκυτταρική με ηωσινοφιλία.
M5	Οξεία μονοβλαστική (M5α) και οξεία μονοκυτταρική (M5β) λευχαιμία
M6	Ερυθρολευχαιμία
M7	Μεγακαρυοκυτταρική λευχαιμία
M8	Οξεία βασεοφιλική λευχαιμία

Η μορφολογική ταξινόμηση της ΟΜΛ σε συνδυασμό με ανοσοφαινοτυπική ανάλυση αναλύεται παρακάτω. Οι σημαντικότεροι δείκτες αωρότητας που

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/02/2026 23:45:56 EET - 18.97.14.81

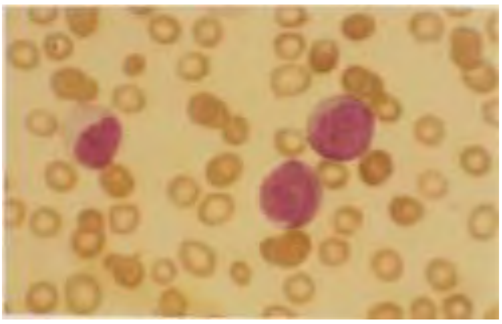
εκφράζονται φαινοτυπικά είναι οι πρωτεΐνες TdT , HLA-DR και CD34. O TdT είναι δείκτης που εκφράζεται προσωρινά στον πυρήνα κατά τη διαφοροποίηση των Τ και Β λεμφοκυττάρων. Η πρωτεΐνη HLA-DR είναι ένας υποδοχέας κυτταρικής επιφανείας MHC κατηγορίας II που κωδικοποιείται από το σύμπλεγμα ανθρώπινου λευκοκυτταρικού αντιγόνου. Η πρωτεΐνη CD34 (CD: Clusterof Differentiation) είναι μια μεμβρανική πρωτεϊνη που εκφράζεται σε κύτταρα βλάστες ***(Παγκάλης, 2008)***.

- Η μυελοβλαστική λευχαιμία (M0) χαρακτηρίζεται από αδιαφοροποίητα κύτταρα, έχει μορφολογία παρόμοια με την Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία L2 που είναι συχνή στους ενήλικες και ποικίλες κυτταρογενετικές ανωμαλίες. Φαινοτυπικά εκφράζουν τις πρωτεϊνες TdT , HLA-DR και, CD34. (Εικόνα 1)



Εικόνα 1.Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία M0 κατά FAB

- Στην μυελοβλαστική λευχαιμία (M1) διακρίνουμε ελάχιστα διαφοροποιημένα βλαστικά κύτταρα. Οι βλάστες είναι ίδιου μεγέθους και σχήματος, με στρόγγυλο ή ωοειδή πυρήνα, αδρή κατανομή χρωματίνης και εμφανή ένα ή περισσότερα πυρήνια.Φαινοτυπικά τα κύτταρα αυτά εκφράζουν CD34, CD13, CD33, HLA-DR, ενώ δεν εκφράζουνTdT (Εικόνα 2)

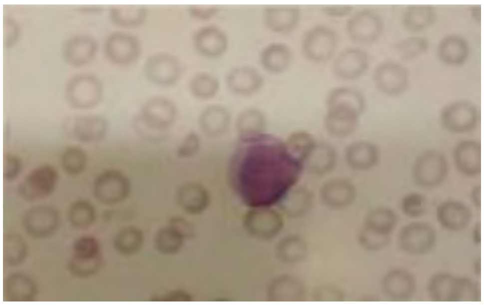


Εικόνα 2. Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία M1 κατά FAB

- Βλαστικά κύτταρα που αρχίζουν να διαφοροποιούνται παρατηρούνται στην μυελοβλαστική λευχαιμία (M2). Οι βλάστες εμφανίζουν ποικίλο μέγεθος και σχήμα, έκκεντρο πυρήνα με λεπτή κατανομή χρωματίνης, αρκετά πυρήνια, έντονα βασεόφιλο πρωτόπλασμα, σωμάτια Auer και

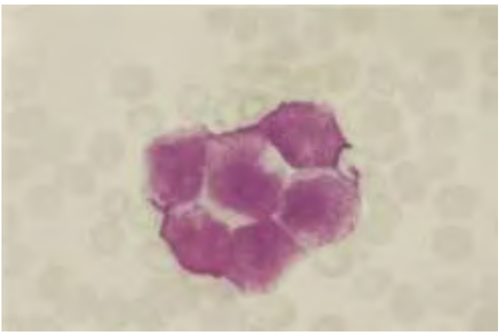
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/02/2026 23:45:56 EET - 18.97.14.81

ωρίμανση μέχρι το προμυελοκύτταρο. Εκφράζουν δείκτες μυελικής διαφοροποίησης όπως τους CD13, CD15 και CD33 (Εικόνα 3)



Εικόνα 3. Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία M2 κατά FAB

- Στην οξεία προμυελοκυτταρική λευχαιμία (M3) όλα τα κύτταρα είναι παθολογικά προμυελοκύτταρα με την χαρακτηριστική έντονη ερυθρωπή κοκκίωση ή και μονήρη ή πολλαπλά κοκκία Auer. Οι βλάστες έχουν μεγάλο μέγεθος, με στρόγγυλο, ακανόνιστο, νεφροειδή, πολύλοβο ή αναδιπλούμενο πυρήνα, με πολύ εμφανές πυρήνιο σε κάθε λοβό και αρκετά αζουρόφιλα κοκκία. (Εικόνα 4)

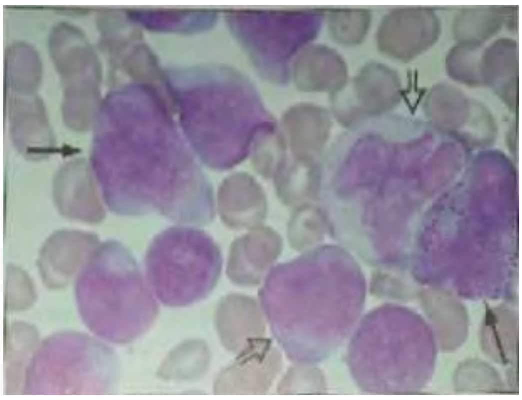


Εικόνα 4. Οξεία προμυελοκυτταρική λευχαιμία (M3) κατά FAB

Στο μυελό και στο επίχρισμα περιφερικού αίματος αυτός ο τύπος μπορεί να θυμίζει οξεία μονοβλαστική λευχαιμία, M5α κατά FAB. Σε αρκετές περιπτώσεις οι βλάστες στο περιφερικό αίμα είναι χαρακτηριστικοί της παραλλαγής M3 ενώ στον μυελό επικρατούν τα κύτταρα με έντονη κοκκίωση ή παρατηρούνται και οι δύο τύποι κυττάρων. Στην πλειονότητα των περιπτώσεων δεν εκφράζονται μόρια του αντιγόνου HLA-DR.

- Η Οξεία μυελομονοκυτταρική λευχαιμία (M4) διακρίνεται ευκολότερα στο περιφερικό αίμα παρά στον μυελό επειδή τα κύτταρα της μονοκυτταρικής σειράς είναι ωριμότερα εκεί. Στον μυελό διακρίνεται μικτός αριθμός άωρων κυττάρων κάποια των οποίων ανήκουν στη μυελική σειρά (απλά βέλη) και άλλα στην μονοκυτταρική (διπλά βέλη) (εικόνα 5) Οι βλάστες στην M4 είναι ποικίλου μεγέθους και σχήματος ενώ στην ηωσινοφιλία M4eos έχουμε βλάστες με τυπική μονοκυτταρική εμφάνιση του πυρήνα.

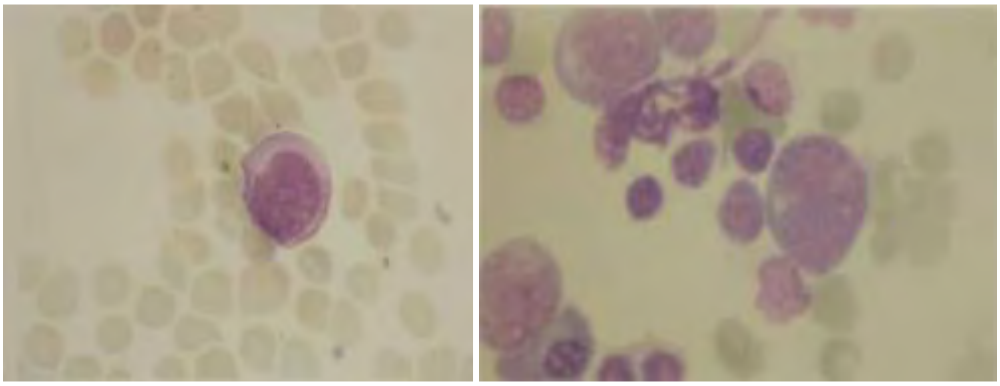
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/02/2026 23:45:56 EET - 18.97.14.81



Εικόνα 5. Οξεία μυελομονοκυτταρική λευχαιμία (Μ4) κατά FAB

Στην μεμβράνη τους φέρουν τους δείκτες μυελομονοκυτταρικής διαφοροποίησης CD11b, CD13, CD15, CD14, CD33 ενώ συχνά διατηρούν και το αντιγόνο CD34.

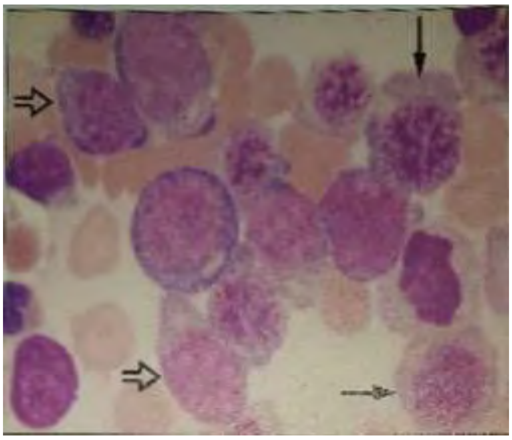
- Η οξεία μονοβλαστική διαχωρίζεται περαιτέρω σε δύο υπότυπους, τον (Μ5α) και (Μ5β). Ο πρώτος χαρακτηρίζεται από βλάστες μεγάλου μεγέθους στο μυελό και στο αίμα με μεγάλο αναδιπλούμενο πυρήνα, ενώ ο δεύτερος παρουσιάζει μικρότερη αναλογία μονοβλαστών αλλά πολλά προμονοκύτταρα και άωρα μονοκύτταρα κύτταρα (Εικόνα 6). Στην μεμβράνη τους εκφράζουν μόρια μυελικής και μονοκυτταρικής διαφοροποίησης όπως τα CD11b , CD13, CD15, CD14, CD33, HLA-DR.



Εικόνα 6.Οξεία μονοβλαστική Μ5α (αριστερά) και Μ5β (δεξιά) κατά FAB

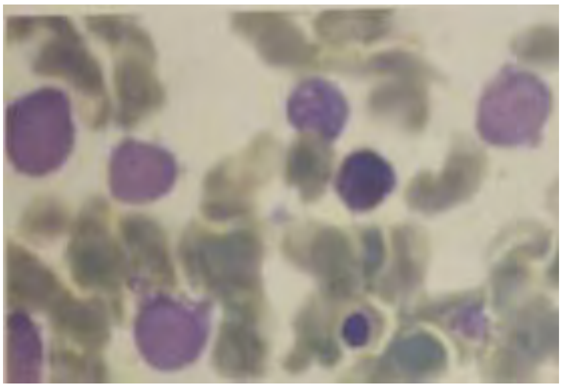
- Στην ερυθρολευχαιμία (Μ6) παρατηρείται μικτός πληθυσμός κυττάρων. Οι μυελοβλάστες (διπλά βέλη) ίδιοι με την Μ1 και Μ2 και προυευθροβλάστες (απλά βέλη) πολύ ανώμαλοι, γιγάντιοι με πολλούς πυρήνες και μεγαλοβλαστικές αλλοιώσεις του πυρήνα (Εικόνα 7). Οι λευχαιμικοί ερυθροβλαστες εκφράζουν στη μεμβράνη τους τον δείκτη διαφοροποίησης CD71 (υποδοχέας της τρανσφερίνης)

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/02/2026 23:45:56 EET - 18.97.14.81



Εικόνα 7. Ερυθρολευχαιμία (M6) κατά FAB

- Στην μεγακαρυοκυτταρική λευχαιμία (M7) σχεδόν πάντα συνυπάρχουν μεγακαρυοβλάστες και μεγακαρυοκύτταρα ποικίλου μεγέθους και σχήματος, μερικά μονοπύρηνα με πολύ μικρούς πυρήνες, συχνά κοκκιώδες ή και κενοτοπιώδες πρωτόπλασμα και μικρά χαρακτηριστικά ψευδοπόδια της κυτταροπλασματικής μεμβράνης (Εικόνα 8). Στην κυτταροπλασματική τους μεμβράνη εκφράζουν τα αντιγόνα CD41 και CD61.



Εικόνα 8. Μεγακαρυοκυτταρική λευχαιμία (M7) κατά FAB

Η αδιάκοπη έρευνα, οι αναρίθμητες δημοσιεύσεις που αφορούσαν χρωμοσωμικές βλάβες, ο καρυότυπος του μυελού των οστών αλλά και μεταλλάξεις διαφόρων γονιδίων σε ασθενείς με οξεία μυελογενή λευχαιμία, οδήγησαν την Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας (WHO 2008) να δημοσιεύσει μία νέα ταξινόμηση της οξείας μυελογενούςλευχαιμίας. Η νέα ταξινόμηση κατηγοριοποιεί τις ΟΜΛ ως εξής**:**

(α) ΟΜΛ με συγκεκριμένες κυτταρογενετικές ανωμαλίες,
(β) ΟΜΛ με δυσπλασία τουλάχιστον δύο σειρών,
(γ) δευτεροπαθείς (μετά από θεραπεία για άλλη νεοπλασία) ΟΜΛ,
(δ) ΟΜΛ μη ταξινομούμενες στις προαναφερθείσες υποκατηγορίες,
(ε) μυελικό σάρκωμα,
(στ) ΟΜΛ σχετιζόμενες με το σύνδρομο Down και
(ζ) δενδριτικές ΟΜΛ ***(Lyon, France, IARC, 2008)***.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/02/2026 23:45:56 EET - 18.97.14.81

Η κλινική σημασία των χρωμοσωμικών ανωμαλιών στην ΟΜΛ έχει αναγνωριστεί εδώ και πολλά χρόνια ώστε μέχρι σήμερα η καρυοτυπική ανάλυση των λευχαιμικών βλαστών να αποτελεί καθοριστικό εργαλείο της κλινικής πρακτικής για τη διάγνωση και την προγνωστική ταξινόμηση των ασθενών με ΟΜΛ. Στον πίνακα 2 παρατίθενται οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες που ανιχνεύονται στην *de novo* ΟΜΛ σε ενήλικα άτομα. Ωστόσο, αξίζει να αναφερθεί ότι περίπου το 50% των περιπτώσεων ΟΜΛ φέρουν φυσιολογικό καρυότυπο και χαρακτηρίζονται από σημαντική κλινική ετερογένεια ***(Mrózek et al.,2004)***.

Πίνακας 2. Χρωμοσωμικές ανωμαλίες στην de novo ΟΜΛ των ενηλίκων

Χρωμοσωμικές ανωμαλίες στην ΟΜΛ	Συχνότητα
ΟΜΛ με t(8;21)(q22;q22); RUNX1-RUNXT1	5-10%
ΟΜΛ με inv(16)(p13.1;q22)ort(16;16)(p13.1;q22); CBFB-MYH11	5-10%
ΟΜΛ με t(15;17)(q24.1;q21.1); PML-RARA	10-20%
ΟΜΛ με t(9;11)(p22;q23); MLLT3-MLL	2%
ΟΜΛ με t(6;9)(p23;q24); DEK-NUP214	<2%
ΟΜΛ με inv(3)(q21;q26.2) or t(3;3)(q21;q26.2); RPN1-EVI1	
ΟΜΛ με t(1;22)(p13;q13); RBM15-MKL1	<2%
De novo ΟΜΛ με t(9;22)(q34;q11); BCR-ABL1 που δεν προκύπτει από ΧΜΛ	
ΟΜΛ με μονοσωμικό καρυότυπο	
ΟΜΛ με σύμπλοκο καρυότυπο (3 κυτταρογενετικές ανωμαλίες)	

Για την διάγνωση της ΟΜΛ είναι απαραίτητα:

1. Μυελόγραμμα,για να αξιολογηθεί η κατάσταση του νωτιαίου μυελού και της σπονδυλικής στήληςκαι το υλικό λαμβάνεται με ειδικές βελόνες συνήθως από τα οστά της λεκάνης ή του στέρνουαφού προηγηθεί τοπική αναισθησία ή βραχεία νάρκωση δεδομένου ότι η εξέταση δεν είναι ανώδυνη. Ελέγχεται άμεσα με ειδικές χρώσεις (επιχρίσματα μυελού) από τον αιματολόγο με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.
2. Οστεομυελική βιοψία,για να αξιολογηθεί ο τύπος, η ποιότητα και τα επίπεδα ωριμότητας των κυττάρων του αίματος του μυελού, για να είναι πιο ακριβής η εκτίμηση της διήθησης και της κυτταροβρίθειας, για να αξιοληθεί η ινώδης δομή του μυελού και για την συλλογή δείγματος μυελού για ειδικές εξετάσεις όπως είναι η ανοσοϊστοχημική μελέτη με μονοκλωνικά αντισώματα

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/02/2026 23:45:56 EET - 18.97.14.81

3. Καρυότυπος κυττάρων μυελού, για την ανεύρεση χαρακτηριστικών αριθμητικών και δομικών χρωμοσωματικών ανωμαλιών, που θα ταξινομήσουν τη νόσο, αλλά και θα την κατατάξουν προγνωστικά. Στις αριθμητικές αλλαγές οποιαδήποτε μεταβολή του αριθμού των 46 χρωμοσωμάτων προκαλεί αλλαγή στη ποσότητα του γενετικού υλικού. Στις δομικές αλλαγές, η σημασία των προβλημάτων και η σοβαρότητα τους εξαρτάται από το χρωμόσωμα που άλλαξε. Η εξέταση θα πρέπει να επαναλαμβάνεται σε κάθε επανεξέταση του μυελού, για εκτίμηση της ανταπόκρισης στη θεραπεία, αλλά και πιθανές νέες γενετικές βλάβες.

4. Μοριακή μελέτη με τη χρήση της υβριδοποίησης φθορισμού in situ (fluorescent in situ hybridization, **FISH**), που αποσκοπεί στον υβριδισμό μεταξύ μιας αλληλουχίας «στόχου», δηλαδή της υπό μελέτη χρωμοσωμικής περιοχής, και ενός μοριακού ανιχνευτή (probe) που αντιστοιχεί σε μια συνθετική μονόκλωνη αλληλουχία νουκλεοτιδίων, συμπληρωματική ως προς την αλληλουχία-στόχο.

Η ΟΜΛ διακρίνεται σε τρεις προγνωστικές ομάδες με βάση την ανταπόκριση στην θεραπεία, τον κίνδυνο υποτροπής και τη συνολική επιβίωση . Αυτές καθορίστηκαν με βάση τις κυτταρογενετικές ανωμαλίες σε σύγκριση με το αποτέλεσμα των ασθενών με φυσιολογικό καρυότυπο. (Πίνακας 3) ***(Grimwade et al.,1998)***.

Πίνακας 3. Ομάδες κινδύνου ασθενών με ΟΜΛ με βάσει τον προ θεραπείας καρυότυπο

Ομάδα κινδύνου	Καρυοτυπική ανωμαλία	Σχόλια
Καλής πρόγνωσης	t(15;17), t(8;21) και inv(16)	Μόνες τους ή σε συνδυασμό με άλλες κυτταρογενετικές ανωμαλίες
Ενδιάμεσης πρόγνωσης	Φυσιολογικός κατυότυπος +8, +21, +22, 11q23, del(9q), del(7q) και βλάβες, που δεν περιλαμβάνονται στις άλλες κατηγορίες.	Μη ταξινομημένες κυτταρογενετικές ανωμαλίες και έλλειψη επιπλέον ευνοϊκών ή δυσμενών κυτταρογενετικών βλαβών
Κακής πρόγνωσης	Σύνθετος (complex) καρυότυπος, del(5q), -5, -7 και abn(3q)	Είτε μονές είτε σε συνδυασμό με ενδιάμεσης ή κακής πρόγνωσης κυτταρογενετικές ανωμαλίες

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/02/2026 23:45:56 EET - 18.97.14.81

1.5. <u>ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΣΤΗΝ ΟΜΛ</u>

Η ΟΜΛ είναι μια ετερογενής ασθένεια που γενικά σχετίζεται με μια πολύ κακή πρόγνωση. Πολλαπλές κυτταρογενετικές και μοριακές ανωμαλίες που χαρακτηρίζουν διαφορετικές μορφές της ΟΜΛ έχουν χρησιμοποιηθεί για την καλύτερη πρόγνωση ασθενών και για λήψη των αποφάσεων θεραπείας. Πράγματι, η κατάσταση κινδύνου σε ασθενείς με ΟΜΛ βασίστηκε σε κυτταρογενετικά ευρήματα. Οι πιο συχνές μεταλλάξεις που ανευρίσκονται στην ΟΜΛ και οι πλέον μελετημένες είναι οι μεταλλάξεις των γονιδίων *FLT3, NPM1, CEBPA* και *C-KIT*. Τα δεδομένα που αφορούν τις μεταλλάξεις αυτές ήταν αρκετά ώστε τρέχουσα ταξινόμηση των μυελογενών κακοηθειών του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (WHO 2008) να τις έχει ενσωματώσει στη διαγνωστική προσέγγιση και προγνωστική ταξινόμηση της ΟΜΛ ***(Swerdlow et al., 2008)***.

1.5.1. FLT3

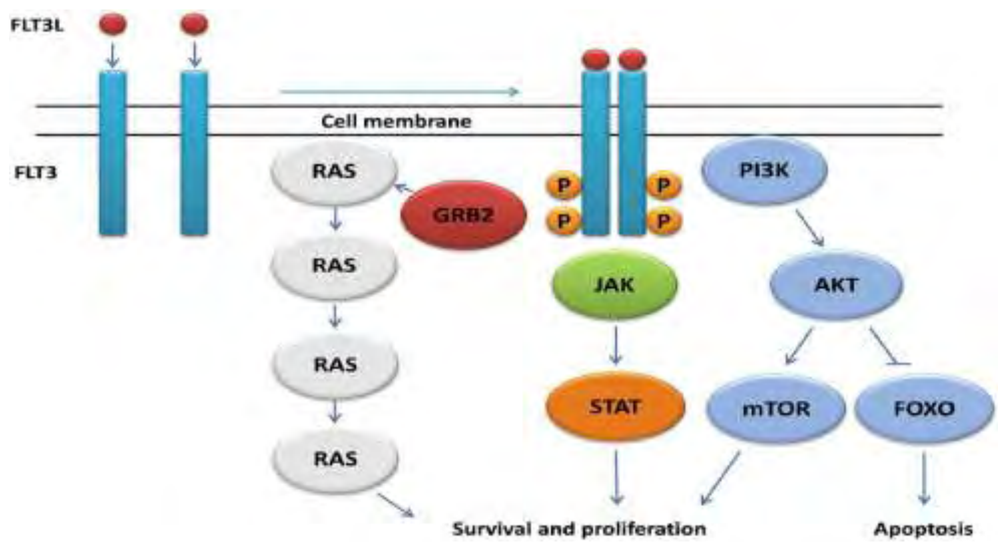
Το γονίδιο *FLT3* (fms-like tyrosine kinase) βρίσκεται στο χρωμόσωμα 13 (13q12) και κωδικοποιεί για τον υποδοχέα ενός αιμοποιητικού αυξητικού παράγοντα. Είναι το γονίδιο που μεταλλάσσεται πιο συχνά στην ΟΜΛ με συχνότητα που ανέρχεταιστο 35%. Αποτελείται από 3,422 νουκλεοτίδια (24 εξώνια) με ένα μεταγραφικό προϊόν 993 (αμινοξέων) ***(Rosnet et al., 1993)***. Η δομή του *FLT3* (Εικόνα 9) αποτελείται από πέντε πεδία (domains) παρόμοια με ανοσοσφαιρίνη Ig στην εξωκυτταρική περιοχή, μια διαμεμβρανική περιοχή, μια παραμεμβρανική περιοχή με ανασταλτική δράση (Juxta Membrane,JM), μία ενδοκυτταρική περιοχή με δράση κινάσης τυροσίνης ***(Chen et al, 2017)***.

Εικόνα 9. Η δομή του υποδοχέα FLT3

Ο υποδοχέας FLT3 εκφράζεται στην κυτταρική επιφάνεια των αιμοποιητικών προγόνων και ο συνδέτης του απαντάται είτε σε διαλυτή μορφή είτε σε δεσμευμένη στη μεμβράνη μορφή στα στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών. Είναι ένας υποδοχέας τυροσινικής κινάσης τάξης III, μέλος μιας μικρής οικογένειας κυτοκινών ο οποίος εκφράζεται σε ανώριμα αιμοποιητικά κύτταρα και είναι απαραίτητος για την αύξηση και διαφοροποίηση των προγονικών κυττάρων και παίζει βασικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και την επιβίωση των λευχαιμικών κυττάρων ***(Lyman et al., 1994)***.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/02/2026 23:45:56 EET - 18.97.14.81

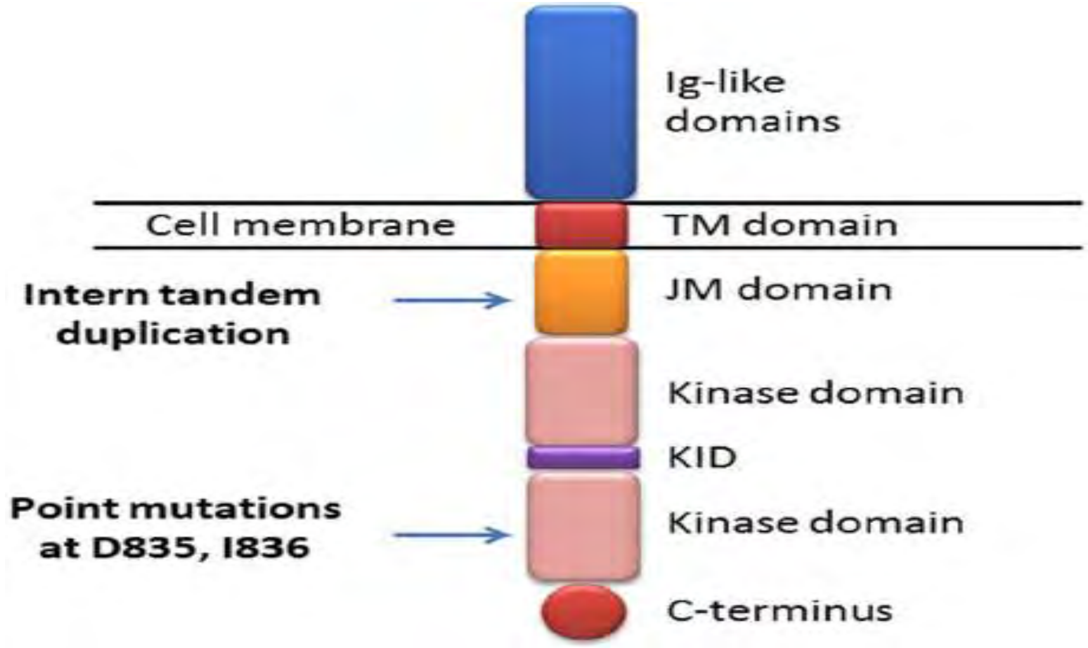
Ο διμερισμός του υποδοχέα FLT3 οδηγεί στην αυτοφωσφορυλίωση ενδοκυτταρικών υπολειμμάτων τυροσίνης, με αποτέλεσμα να επάγεται ένας καταρράκτης αντιδράσεων κυτταρικής σηματοδότησης. Σε αυτή την διαδικασία εμπλέκονται διάφορα μονοπάτια που ενεργοποιούνται όπως αυτό της κινάσης PI3, της κινάσης Janus (JAK), του μετατροπέα σήματος και ενεργοποιητή μεταγραφής (STAT) και οι κινάσες σερίνης- θρεονίνης ERK1 / 2 (Εικόνα 10). Αυτή η σηματοδότηση γεγονότων οδηγεί στον αυξημένο πολλαπλασιασμό και επιβίωση του κυττάρου, και την αναστολή της απόπτωσης ***(Chen et al., 2017)***.



Εικόνα 10. Απεικόνιση των μονοπατιών σηματοδότησηςFLT3

Μέχρι τώρα έχουν αναγνωριστεί δύο τύποι μεταλλάξεων που φαίνεται πως παίζουν κάποιο ρόλο στη λειτουργία του υποδοχέα FLT3 στην ΟΜΛ. Οι μεταλλάξεις εσωτερικού διαδοχικού διπλασιασμού (ITD, Internal Tandem Duplication) και σημειακές μεταλλάξεις που περιλαμβάνουν συχνότερα το ασπαρτικό οξύ στη θέση 835 στην περιοχή κινασης (KD, Kinase Domain). Αμφότερες οι μεταλλάξεις οδηγούν σε ιδιοσυστατική ενεργοποίηση της δραστικότητας κινάσης τυροσίνης του υποδοχέα, απουσία συνδέτη (Εικόνα 11).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/02/2026 23:45:56 EET - 18.97.14.81



Εικόνα 11. Σχηματική απεικόνιση της δομής του FLT3 και των θέσεων που απαντώνται οι μεταλλάξεις του.

1. Ο πρώτος τύπος μεταλλάξεων, που θα αναφέρονται ως **FLT3-ITD** αναλογεί στο 73-80% των περιπτώσεων, και περιγράφηκε πρώτη φορά το 1996, από τον Nakao και τους συνεργάτες του. Μετά από ανάλυση, σε 5 από τους 30 ασθενείς με ΟΜΛ βρέθηκε ότι το προϊόν της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) ήταν μεγαλύτερο από το αναμενόμενο και υπήρχε ένας αναδιπλασιασμός τμήματος της αλληλουχίας ***(Nakao M et al., 1996)***. Οι μεταλλάξεις αυτές σχετίζονται με έντονη λευκοκυττάρωση, υψηλότερο ποσοστό έκρηξης, αυξημένο κίνδυνο υποτροπής και κακή συνολική επιβίωση. Οι μεταλλάξεις FLT3-ITD εντοπίζονται στο διαδοχικό διπλασιασμό αλληλουχιών, (InternalTandemDuplications, ITDs), που βρίσκονται ανάμεσα στα εξόνια 11 και 12, έχουν μήκος 3-40 ζεύγη βάσεωνκαι απαντούν στο 28-34% των ασθενών με ΟΜΛ και φυσιολογικό καρυότυπο. Το τμήμα αυτό του DNA κωδικοποιεί για την περιοχή του υποδοχέα, που εντοπίζεται πλησίον της μεμβράνης (JM). Οι επαναλαμβανόμενες ακολουθίες που δημιουργούνται μέσα στην περιοχή αυτή βρίσκονται πάντοτε εντός αναγνωστικού πλαισίου, έχουν ορθόδρομη φορά και οδηγούν στην επιμήκυνση της περιοχής JM. ***(Nakao M et al., 1996)***.Οι μεταλλάξειςFLT3-ITD δεν ταυτοποιούνται σε ασθενείς με άλλες αιματολογικές ασθένειες όπως λέμφωμα non-Hodgkin, χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία, πολλαπλούν μυέλωμα, ενώ ταυτοποιούνται σε ποσοστό 3-15% σε ασθενείς με μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα και πιο σπάνια σε οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία και χρόνια μυελογενή λευχαιμία ***(Yokota et al., 1997 & Nakao et al.,2000)***.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/02/2026 23:45:56 EET - 18.97.14.81

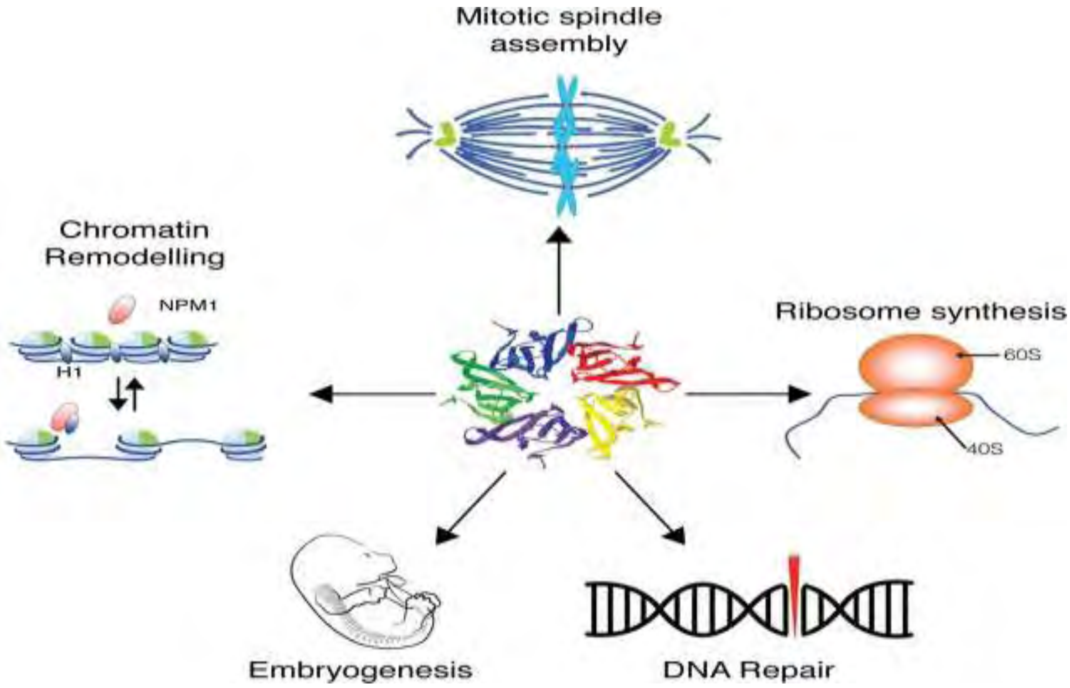
2. Ο δεύτερος τύπος μεταλλάξεων του γονιδίου *FLT3* θα αναφέρεται ως FLT3-TKD (TKD: Tyrosine Kinase Domain, περιοχή κινάσης τυροσίνης) και αφορά σημειακές μεταλλάξεις που συμβαίνουν στον ενεργό βρόγχο του FLT3, συνήθως στο κωδικόνιο D835 (20-35% των περιπτώσεων). Ο ενεργός βρόγχος εμποδίζει την πρόσβαση του ATP και του υποστρώματος στην περιοχή της κινάσης, έως ότου συνδεθεί ο προσδέτης στον υποδοχέα ώστε να πραγματοποιηθεί η φωσφορυλίωση. Η αντικατάσταση της ασπαραγίνης στη θέση 835 από τυροσίνη (Asp835Tyr) είναι η πιο συχνή σημειακή μετάλλαξη του ενεργού βρόγχου και οδηγεί στη συνεχή ενεργοποίηση του υποδοχέα FLT3.Οι σημειακές μεταλλάξεις του FLT3-TKD είναι λιγότερο συχνές και απαντώνται περίπου στο 5% των ασθενών με ΟΜΛ ***(Gilliland et al., 2002)***. Οι μεταλλάξεις FLT3-TKD φαίνεται ότι έχουν προγνωστική σημασία μόνο μέσω της αλληλεπίδρασης με άλλα γονίδια. Οι μεταλλάξεις FLT3-TKD προκαλούν αντικατάσταση αμινοξέων προκαλώντας αλλαγές στον βρόχο ενεργοποίησης, ευνοώντας τη διαμόρφωση ενεργής κινάσης. Ενώ τόσο οι μεταλλάξεις FLT3-ITD όσο και οι FLT3-TKD έχουν ως αποτέλεσμα τη συστατική ενεργοποίηση της σηματοδότησης FLT3, τα μονοπάτια σηματοδότησης που ενεργοποιούν είναι διαφορετικά, και αυτό πιθανώς να έχει σημαντικές επιπτώσεις στη θεραπευτική στρατηγική ***(Choudhary et al.,2005)***.

Τέλος έχουν εντοπιστεί και άλλες λιγότερο διαδεδομένες σημειακές μεταλλάξεις στην περιοχή της κινάσης, συμπεριλαμβανομένων των N841I ***(Jiang et al.,2004)*** και Y842C ***(Kindler et al.,2005)***. Σε μια έρευνα 110 ατόμων, η ανίχνευση μεταλλάξεων του *FLT3* στο εξόνιο 20 σε ασθενείς με ΟΜΛ αποκάλυψε δύο ασθενείςπου φέρουν την μετάλλαξη Y842C εντός του εξαιρετικά διατηρούμενου βρόχου ενεργοποίησης του FLT3.

1.5.2. ΝΟΥΚΛΕΟΦΩΣΜΙΝΗ

Το γονίδιο της νουκλεοφωσμίνης (nucleoplasmin, NPM1, επίσης γνωστή ως NPM, B23, NO38*),*κωδικοποιεί για μια άφθονη, εξαιρετικά διατηρημένη, πανταχού παρούσα εκφρασμένη πυρηνολική φωσφοπρωτεΐνη, που ανήκει στην οικογένεια πυρηνικών συνοδών νουκλεοπλασμίνης / νουκλεοφωσμίνης μαζί με την *NPM2* (nucleoplasmin) και την *NPM3* ***(Eirin-Lopez etal.,2006)***. Το *NPM1* έχει τεκμηριωθεί ότι συμμετέχει σε ένα ευρύ φάσμα διαδικασιών βασικών κυττάρων, συμπεριλαμβανομένης της βιογένεσης και εξαγωγής του ριβοσώματος, την αναδιαμόρφωση χρωματίνης και την εμβρυογένεση**,** του ελέγχου της επανάληψης κεντροσωμάτων κατά την διάρκεια της μίτωσης, της συσσώρευσης πρωτεϊνών, της συσσώρευσης ιστονών και νουκλεοσωμάτων ***(Joseph et al.,2016)*** (Εικόνα 12).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/02/2026 23:45:56 EET - 18.97.14.81

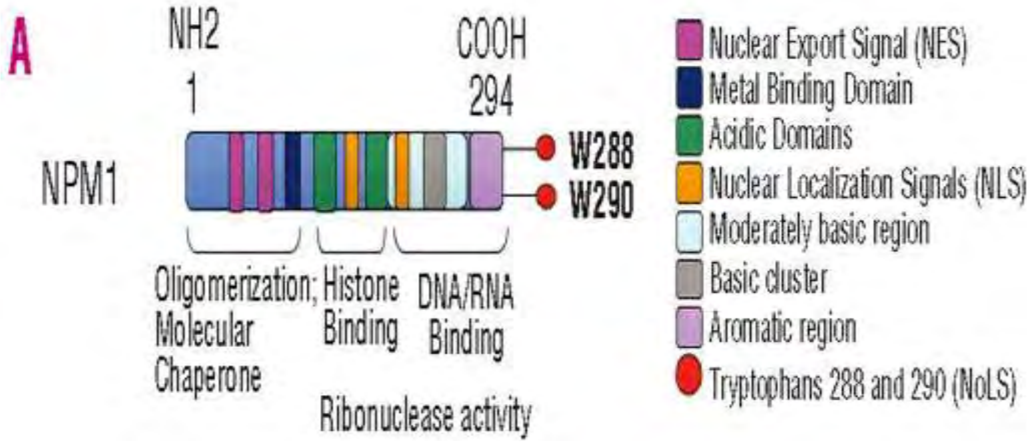


Εικόνα 12: Λειτουργίες της νουκλεοφωσμίνης (NPM1)

Το γονίδιο *NPM1* εντοπίζεται στην χρωμοσωμική περιοχή 5q35 και αποτελείται από 12 εξώνια που κωδικοποιούν τρεις ισομορφές πρωτεΐνης - νουκλεοφωσμίνης (NPM), μιας φωσφοπρωτεΐνης μοριακού βάρους 37 kDa ***(Koczkodaj et al.,2016).*** Οι μεταλλάξεις του NPM1 εμφανίζονται σε ποσοστό 50% έως 60% της οξείας μυελογενής λευχαιμίας ενηλίκων με φυσιολογικό καρυότυπο (AML-NK) και παράγουν μεταλλάξεις NPM που εντοπίζονται ανώμαλα στο κυτταρόπλασμα των λευχαιμικών κυττάρων, εξ ου και ο όρος NPM-κυτταροπλασματικά θετικά (NPMc + AML) ***(Falini, B., etal., 2007)***. Η πρωτεΐνη NPM1 εντοπίζεταιμε την χρήση ανοσοϊστοχημικών μεθόδων, ενώ μετακινείται γρήγορα μεταξύ πυρήνα και πρωτοπλάσματος, ιδιότητες καθοριστικές για την ομαλή λειτουργία της. Οι λειτουργίες της NPM1αφορούν κατά κύριο λόγο στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου.

Ξεκινώντας από το N-τελικό άκρο, η πρωτεΐνη εμφανίζει δύο πυρηνικά σήματα εξαγωγής (υπολείμματα 42-49 και 94-102), μια περιοχή σύνδεσης μετάλλου, δύο όξινες περιοχές (κατάλοιπα 120-132 και 160-188), μια περιοχή διμερισμού (κατάλοιπα 152-157 και 190-197), μια περιοχή-σύμπλεγμα με βασικά κατάλοιπα και μία αρωματική περιοχή στο C-τελικό άκρο μοναδική που περιέχει το σήμα μετατόπισης στον πυρήνα (NLS, Nuclear Translocation Signal) με υπολείμματα τρυπτοφάνης 288 και 290 *(Εικόνα 13*) **(*Brunangelo et al., 2007)***.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/02/2026 23:45:56 EET - 18.97.14.81



Εικόνα 13: Δομή της νουκλεοφωσμίνης

Μέχρι σήμερα έχουν εντοπιστεί περισσότερες από 50 διαφορετικές μεταλλάξεις στην ΟΜΛ που εντοπίζονται στο εξόνιο 11 (παλαιότερα είχε αναγνωριστεί ως εξώνιο 12) του γονιδίου *NPM1* . Οι τρεις συχνότερες μεταλλάξεις (τύποι A, B και D) αποτελούν περίπου το 90-95% αυτών των μεταλλάξεων. Η μετάλλαξη τύπου A αντιπροσωπεύει το 70-80% των περιπτώσεων ενώ οι μεταλλάξεις B και D αντιπροσωπεύουν από κοινού το 15-20%. Περισσότερο από το 95% αυτών των μεταλλάξεων αποτελείται από μια καθαρή εισαγωγή τεσσάρων ζευγών βάσεων (bp) μεταξύ νουκλεοτιδίων στη θέση 863 και 864 ***(Falini et al., 2007 & Chou et al., 2006)***

Ανεξάρτητα από τους τύπους μετάλλαξης, όλες οι παραλλαγές προκαλούν μετατόπιση πλαισίου στο C- τελικό άκρο του γονιδίου *NPM1* δηλαδή μεταλλάξεις σε τουλάχιστον ένα από τα υπολείμματα τρυπτοφάνης στις θέσεις 288 και 290 (ή μόνο 290) και τη δημιουργία ενός πρόσθετου μοτίβου πυρηνικού σήματος εξαγωγής (NES, nuclear export signal) ***(Falini et al., 2007)***.

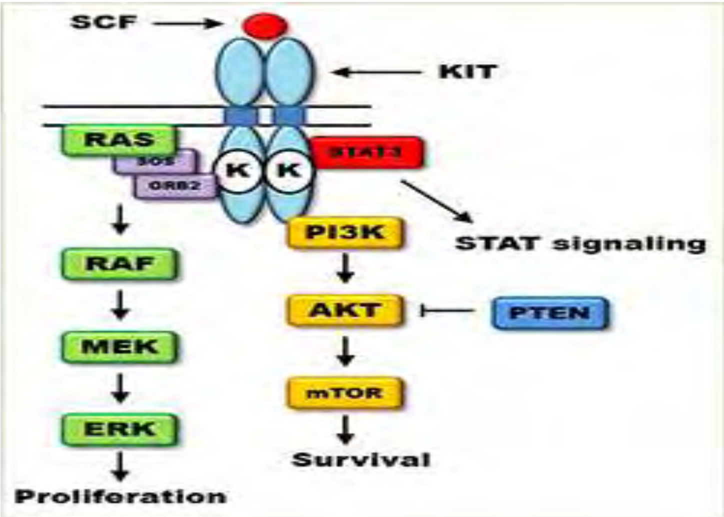
1.5.3. C- KIT

Το ογκογονίδιο *c-kit* διαδραματίζει ζωτικό ρόλο στην παθογένεση της οξείας μυελογενούς λευχαιμίας. Συγκεκριμένα, το c-kit πρωτοογκογονίδιο απαντώνται σε περίπου 80% των περιπτώσεων ΟΜΛ και η έκφρασή του εμφανίζεται σε μυελοβλάστες. Είναι ένας αξιόπιστος μοριακός δείκτης κακής πρόγνωσης στην ΟΜΛ ***(Gao et al., 2015)***. Επιπλέον, οι μεταλλάξεις του c-kit ταυτοποιούνται στο 25% έως 30% των διαταραχών του παράγοντα δέσμευσης του πυρήνα(CoreBindingFactor)της ΟΜΛ (CBF-AML).Αυτές οι μεταλλάξεις εμφανίζονται κυρίως στο εξόνιο 8 και παρατηρούνται στο 20-30% των ασθενών με t (8; 21) ή inv (16). Στις περισσότερες μελέτες φαίνεται ότι οι μεταλλάξεις στο γονίδιο c-kit με t(8;21) έχουν συσχετιστεί με σημαντικά υψηλότερη πιθανότητα υποτροπής και μία μικρότερη συνολική επιβίωση σε

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/02/2026 23:45:56 EET - 18.97.14.81

σχέση με τους ασθενείς με inv (16).Στην ΟΜΛ με t (8; 21), η παρουσία μετάλλαξης c-KIT TKD στο κωδικόνιο 816 (TKD (816)) συσχετίστηκε με υψηλό αριθμό λευκών αιμοσφαιρίων κατά τη διάγνωση και υψηλότερη επίπτωση (33%) εμφάνισης εξωμυελικής νόσου (δυσμενής παράγων) ***(Cairoli et al., 2006 & Park SH et al., 2011)***.

Το c-kit (CD117) βρίσκεται στον μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 4 (4q11-4q13) και κωδικοποιεί για ένα υποδοχέα κινάσης τυροσίνης της υποοικογένειας κατηγορίας III ***(Ashman et al., 2013)***. Ο συνδέτης για το KIT είναι ο παράγοντας βλαστικών κυττάρων (SCF). Η δέσμευση του SCF στην εξωκυτταρική περιοχή του KIT επάγει τον διμερισμό του υποδοχέα και την ενεργοποίηση μεταγενέστερων οδών σηματοδότησης , συμπεριλαμβανομένης της οδού PI3K-AKT-mTOR, της οδού RAS-RAF-MEK-ERK, του μεταγωγέα σήματος και του ενεργοποιητή της μεταγραφής 3 - παράγοντα απόκρισης φάσης) ή οδός STAT3, που εμπλέκονται στην ανάπτυξη και επιβίωση εντός του κυττάρου (Εικόνα 14) ***(Wheeler 2013)***.



Εικόνα 14: Σχηματική παρουσίαση της οδού σηματοδότησης C-KIT .

Γενικά, το c-kit σε αλληλεπίδραση με τον προσδέτη SCF παίζει σημαντικό ρόλο στην επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και την λειτουργική ενεργοποίηση των αιματοποιητικών προγονικών κυττάρων ***(Marcucci et al., 2011& Ashman et al., 2013)***. Επομένως, το c-KIT συνδέεται με την επιβίωση ασθενών με ΟΜΛ καθώς η έκφρασή του υποδηλώνει μια κακή πρόγνωση σε αυτούς τους ασθενείς ***(Gao, X. Et al., 2015 & Ikeda, H. Et al.,1991)***. Επιπλέον, οι μεταλλάξεις του c-KIT έχουν συσχετιστεί με κακές εκβάσεις της CBF-AML ***(Ayatollahi et al., 2017)***. Μέχρι σήμερα, η CBF-AML έχει υψηλό ρυθμό ύφεσης και δυνατότητες επιβίωσης. Παρόλα αυτά, επειδή οι μισοί ασθενείς με CBF-AML δεν έχουν ακόμη υποβληθεί σε θεραπεία, είναι απαραίτητο να αξιολογηθούν άλλοι δείκτες για την αναγνώριση ασθενών που δεν ανταποκρίνονται στη συνήθη θεραπεία. Η καλύτερη γνώση της παθοφυσιολογίας της CBF-AML, όπως

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/02/2026 23:45:56 EET - 18.97.14.81

η μετάλλαξη του c-kit, που επηρεάζει την πρόγνωση της νόσου, θα βοηθήσει στην ανάπτυξη νέων θεραπευτικών μεθόδων ***(Kim H.J. et al., 2013 & Shimada et al., 2006)***

Μερικές μελέτες έχουν προτείνει ότι η παρουσία μεταλλάξεων c-kit μπορεί να συσχετιστεί με υψηλότερη συχνότητα υποτροπής και χειρότερης έκβασης ***(Park SH et al., 2011 & Paschka et al., 2006)***. Έχουν αναφερθεί αντιφατικά αποτελέσματα σχετικά με την προγνωστική σημασία της μετάλλαξης του c-kit. Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι η μετάλλαξη του c-kit συσχετίζεται με μειωμένη διάρκεια ύφεσης και συνολική επιβίωση ασθενών με CBF-AML (***Shimada et al., 2006 & Cairoli R et al., 2006)*** ενώ μερικές μελέτες εξέφρασαν ότι οι μεταλλάξεις του kit δεν επηρεάζουν τα προγνωστικά αποτελέσματα της CBF-AML **(Pollard *et al., 2010* & Jung *et al., 2014)***. Η μετάλλαξη c-kit μπορεί να είναι χρήσιμη για την πρόβλεψη των συνεπειών της νόσου των περιπτώσεων της CBF-AML και μπορεί να εφαρμοστεί ως νέος στόχος αποκατάστασης για ασθενείς που υποβλήθηκαν σε χημειοθεραπεία και δεν είχαν καμία θεραπευτική παρέμβαση.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/02/2026 23:45:56 EET - 18.97.14.81

ΣΚΟΠΟΣ

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η ανίχνευση μεταλλάξεων του γονιδίου FLT3 σε ασθενείς που διαγνώστηκαν με οξεία μυελογενή λευχαιμία στην Αιματολογική κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/02/2026 23:45:56 EET - 18.97.14.81

2. <u>ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</u>

2.1. <u>ΥΛΙΚΑ</u>

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν 15 ασθενείς που πάσχουν από Οξεία Μυελογενή Λευχαιμία. Η συλλογή των δειγμάτων έγινε από ασθενείς της Αιματολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας.
Για κάθε ασθενή που συμμετείχε στη μελέτη, δημιουργήθηκε φάκελος στην Αιματολογική Κλινική με αναλυτικό ιστορικό, εργαστηριακή παρακολούθηση και πορεία νόσου.

Οι ασθενείς ήταν ενήλικες, ηλικίας άνω των 40 ετών (μέσος όρος ηλικίας 62 έτη, εύρος 40-75) με διαγνωσμένη πρωτοπαθή ΟΜΛ. Οι 7 δεν είχαν λάβει καμιά θεραπευτική αγωγή ενώ οι υπόλοιποι 8 είχαν λάβει την κλασική θεραπεία εφόδου (ΧΜΘ), δηλαδή τον συνδυασμό της αρασυτίνης σε συνεχή 24-ωρη έγχυση, με μία ανθρακυκλίνη για 3 ημέρες. Όλοι οι ασθενείς έδωσαν την έγκρισή τους για την μελέτη, ενώ η λήψη δειγμάτων του περιφερικού αίματος αποτέλεσε μέρος της διαδικασίας της διάγνωσης.

Σε κάθε ασθενή καταγράφηκαν κλινικά και εργαστηριακά ευρήματα τα οποία περιγράφονται στον πίνακα 4.

- Ηλικία
- Φύλο
- Διάγνωση
- Στους ασθενείς με οξεία μυελογενή λευχαιμία, καταγράφηκε αν η λευχαιμία ήταν *de novo*, απουσία φαρμακευτικής αγωγής ή *de novo* μετά από θεραπεία.
- Ο υπότυπος της οξείας λευχαιμίας με βάσει την ταξινόμηση κατά FAB.
- Ιστορικό αγγειακής νόσου, αλκοολισμού, σαχαρώδους διαβήτη, HBV- και HCV-λοίμωξης, θυρεοειδοπάθειας, χρόνιας αποφρακτικής πνευμονοπάθειας
- Επιβίωση
- Καρυότυπος
- Εργαστηριακά ευρήματα κατά τη διάγνωση (αιμοσφαιρίνη, αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων, αριθμός αιμοπεταλίων, επίπεδα γαλακτικής αφυδρογονάσης)
- Παρουσία λεμφαδενοπάθειας και σπληνομεγαλίας

Σε όλους τους ασθενείς πραγματοποιήθηκε καρυοτυπική ανάλυση είτε κατά τη διάγνωση ή την παρακολούθηση από Εργαστήριο Κυτταρογενετικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/02/2026 23:45:56 EET - 18.97.14.81

Από τους 15 ασθενείς της μελέτης, 9 ασθενείς ήταν άντρες και οι 6 γυναίκες, καταδεικνύοντας την μεγαλύτερη επίπτωση αυτών των αιματολογικών κακοηθειών στους άντρες.

Πίνακας 4: Κλινικά και εργαστηριακά ευρήματα των ασθενών με ΟΜΛ κατά τη διάγνωση.

α/α	Φύλο	Ηλικία	WBC (/μl)	Hb (g/dl)	Plts (/μl)	LDH (U/L)	ΤΑΞ/ΣΗ FAB	ΣΠΛΗΝΟ-ΜΕΓΑΛΙΑ	ΛΕΜΦΑΔΕ-ΝΟΠΑΘΕΙΑ
1	Α	71	*800*	*7,9*	52,000	208	M6	0	0
2	Α	70	*4,200*	4,9	27,000	153	M1	0	0
3	Α	73	*700*	9,4	70,000	143	M4	1	0
4	Γ	40	*1,900*	14,1	162,000	213	M2	1	0
5	Α	67	*8,300*	17,0	162,000	223	M2	0	0
6	Γ	55	*1,700*	10,0	14,000	325	M1	0	1
7	Γ	46	*2,600*	7,8	15,000	412	M3	0	0
8	Α	70	*2,700*	9,8	90,000	154	M0	0	0
9	Α	75	*7,200*	8,5	485,000	370	M5	0	0
10	Α	69	*52,300*	9,5	54,000	2,988	M1	0	0
11	Γ	58	*5,300*	9,2	20,000	146	M5	0	0
12	Γ	75	*1,300*	6,7	20,000	111	M4	1	0
13	Γ	43	*43,500*	7,1	70,000	1,038	M1	0	0
14	Α	72	*3,800*	9,3	88,000	343	M4	0	0
15	Α	62	*85,000*	9,6	5,000	816	M1	0	1

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/02/2026 23:45:56 EET - 18.97.14.81

2.2. ΜΕΘΟΔΟΙ

2.2.1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΟΥ DNA

Η απομόνωση DNA έγινε από στοιβάδες μονοπύρηνων κυττάρων που προήλθαν από περιφερικό αίμα, με τη χρήση του DNA extraction kit της εταιρείας Qiagen (QIAamp DNA mini kit).Για την απομόνωση χρησιμοποιήθηκαν τα αντιδραστήρια που περιέχονται στο συγκεκριμένο κιτ, και η απομόνωση έγινε με βάση τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Ο διαχωρισμός στοιβάδας μονοπύρηνων κυττάρων από δείγμα περιφερικού αίματος, έγινε ακλουθώντας την παρακάτω διαδικασία.

Αναλυτικά, σε ειδικό σωληνάριο χωρητικότητας των 1.5ml τοποθετήθηκαν 200 μl από περιφερικό αίμα και 500 μl αποστειρωμένο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών PBS (Phosphate Buffered Saline) (με σύσταση 0.137 MNaCl, 0.0027 MKCl, 0.01 MNa_2HPO_4, 0.0018 MKH_2PO_4). Τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν στις 12.000 στροφές ανά λεπτό για 3 λεπτά. Έγινε αφαίρεση του υπερκείμενου και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν 200 μl διαλύματος λύσης (Buffer AL) και 20μL, πρωτεϊνάσης Κ (συγκέντρωσης 20mg/ml) για την απομάκρυνση πρωτεϊνών από το προς μελέτη υλικό και για αδρανοποίηση άλλων ένζυμων συμπεριλαμβανομένων των DNAσών και RNAσων. Ακολούθησε επώαση σε υδατόλουτρο στους 56^oC για 20 λεπτά και στη συνέχεια προσθήκη 200 μl απόλυτης αιθανόλης 96-100%. Το μείγμα φυγοκεντρούνταν σε ειδική στήλη (QiAamp Spin Column, Qiagen) στις 10,000 στροφές ανά λεπτό για 1 min. Ακολουθούσαν 2 πλύσεις με τα διαλύματα AW1 και AW2 στις 10.000 στροφές ανά λεπτό για 1min και 14,000 στροφές ανά λεπτό για 3 min, αντίστοιχα, για αλλαγή του pH ώστε να απομακρυνθούν πρωτεΐνες και άλλα υλικά.Αποτέλεσμα της επεξεργασίας αυτής είναι η βελτίωση της καθαρότητας του DNA.

Έπειτα, αφού προστίθονταν σε κάθε στήλη 100μl διαλύματος εκχύλισης AE (Elution Buffer), ακολουθούσε επώαση 1 λεπτού σε θερμοκρασία δωματίου και τελική φυγοκέντρηση στις 14,000 στροφές ανά λεπτό για 1 λεπτό. Τα δείγματα DNA που απομονώνονταν, αποθηκεύονταν μέχρι τη χρήση τους σε -20 ^oC.

2.2.2. ΠΟΣΟΤΙΚΗ – ΠΟΙΟΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ DNA

Ποσοτικός προσδιορισμός DNA

Αρχικά ελέχθηκε η καθαρότητα του DNA των δειγμάτων που απομονώθηκε με το Qubit™ Assays. Η μέθοδος απορρόφησης UVQubit,

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/02/2026 23:45:56 EET - 18.97.14.81

χρησιμοποιεί ένα φασματοφωτόμετρο για τη μέτρηση της φυσικής απορρόφησης του φωτός για το DNA, στα 260 nm. Όσο περισσότερο DNA υπάρχει στο δείγμα, τόσο περισσότερο φως απορροφάται σε αυτό το μήκος κύματος. . Επίσης μετράται η απορρόφηση και σε μήκος κύματος 280 nm και προσδιορίζεται ο λόγος των απορροφήσεων στα 260 προς 280. Μια αναλογία ~ 1,8 είναι γενικά αποδεκτή ως "καθαρή" για το DNA. Εάν ο λόγος είναι χαμηλότερος από (≤1,6), μπορεί να υποδηλώνει την παρουσία πρωτεϊνών, φαινόλης ή άλλων μολυσματικών ουσιών που απορροφούν στα 280 nm ή κοντά στα 280 nm ***(GemaLucena-Aguilar, et al., 2016)***.

Σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή, η διαδικασία μέτρησης ήταν η εξής:

- Αρχικά έγινε η προετοιμασία του διαλύματος εργασίας. Σε 1μl από το Qubit™ reagent προστέθηκαν 199 μl από το ρυθμιστικό Qubit™ buffer.
- Ακολούθησε η προετοιμασία των μικροσωλήνων μέτρησης eppendorf
- Ανάμιξη2μl DNA και 198 μl dH_2O ώστε η τελική αραίωσητου DNA να είναι 1:100
- Vortex για 2-3 δευτερόλεπτα
- Επώαση για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Μέτρηση των δειγμάτων με το φθορισμόμετρο Qubit™ Assays (Εικόνα χ)

Εικόνα 15. Φθορισμόμετρο Qubit™ Assays

Οι τιμές που πήραμε φαίνονται στον πίνακα 5.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/02/2026 23:45:56 EET - 18.97.14.81

Πίνακας 5. Συγκέντρωση DNA των δείγματων

Δείγματα	Συγκέντρωση (ng/μl)
1	21.2 ng/μl
2	16.9 ng/μl
3	14.9 ng/μl
4	11.9 ng/μl
5	11.1 ng/μl
6	16.1 ng/μl
7	17.7 ng/μl
8	13.1 ng/μl
9	10.7 ng/μl
10	8.93 ng/μl
11	8.16 ng/μl
12	15.2 ng/μl
13	14.2 ng/μl
14	22.4 ng/μl
15	8.85 ng/μl

Ποιοτικός προσδιορισμός DNA

Για τη μελέτη της ποιότητας του DNA χρησιμοποιήθηκε μία τεχνική που ονομάζεται ηλεκτροφόρηση. Η τεχνική της ηλεκτροφόρησης ανακαλύφθηκε το 1937 από τον Σουηδό βιοχημικό Arne Tiselius (1902-1971). Η μέθοδος είναι απλή και επιτρέπει τον διαχωρισμό μορίων DNA μεγέθους από 500 bp έως 25 kb. Στηρίζεται στην αρχή της κίνησης φορτισμένων σωματιδίων κάτω από την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

- Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης σε συγκέντρωση 1% αγαρόζης με ρυθμιστικό διάλυμα TAE και χρώση του πηκτώματος

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/02/2026 23:45:56 EET - 18.97.14.81

- Τοποθέτηση των δειγμάτων στις θέσεις υποδοχής τους στο πήκτωμα
- Εφαρμογή ηλεκτρικής τάσης 110 volt, για τον διαχωρισμό των μορίων DNA
- Τερματισμός της ηλεκτροφόρησης μετά από περίπου 30-40 λεπτών και τοποθέτηση του πηκτώματος σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας.
- Φωτογράφιση του πηκτώματος.

2.2.3. <u>ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ</u>

Η αγαρόζη είναι μια αλυσίδα από μόρια σακχάρων που βρίσκεται στα φύκια. Είναι σε μορφή σκόνης και είναι αδιάλυτη σε νερό σε θερμοκρασία δωματίου αλλά διαλύεται σε νερό που βράζει. Το υγρό που χρησιμοποιείται για την παρασκευή της γέλης λέγεται TAE. Το διάλυμα TAE (συγκέντρωσης 50X) περιέχει Tris-base (242gr), οξικό οξύ (57.1ml), EDTA (18.6 gr), ddH_2Oμέχρι 1L. pH: 8. Για την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιείται σε συγκέντρωση 1X. Το TAE επιτρέπει στο DNA να μετακινείται ομοιόμορφα στη γέλη και βοηθάει να διατηρείται σταθερό το pH στο διάλυμα. Το EDTA λειτουργεί ως χηλικός παράγοντας για την δέσμευση κατιόντων, που δρουν ως συμπαράγοντες για την δράση DNAσων και μπορούν να αποικοδομήσουν το DNA.

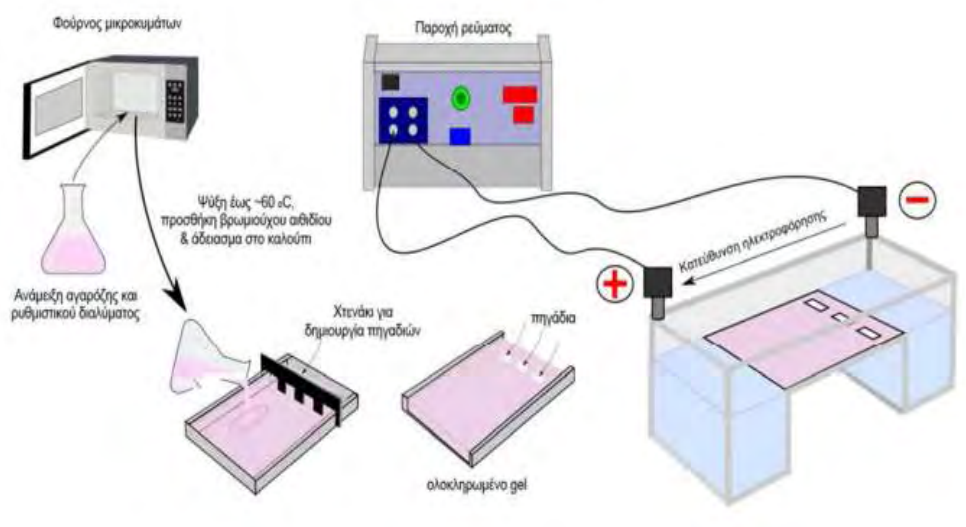
Για την παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης περιεκτικότητας 1,3% ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία: αρχικά σε ζυγαριά ακριβείας ζυγίζονταν 1.3 g αγαρόζης και τοποθετούνταν μαζί με το TAE σε ένα πυρίμαχο κωνικό δοχείο των 100ml το οποίο με τη σειρά του τοποθετούνταν σε ένα φούρνο μικροκυμάτων. Το διάλυμα θερμαινόταν προοδευτικά ώστε να διαλυθεί η αγαρόζη ομαλά και να μην υπάρχουν διαφορές στην τοπική συγκέντρωση κάτι που θα επιτρέψει στο DNA να ηλεκτροφορηθεί ομαλά. Στη συνέχεια το διάλυμα τοποθετείται υπό τρεχούμενο νερό ώστε να μειωθεί η θερμοκρασία του. Όσο το διάλυμα ήταν ακόμα ζεστό και σε υγρή μορφή, προστίθονταν σε αυτό 3.6 μl διαλύματος βρωμιούχου αιθιδίου (συγκέντρωσης 10mg/ml)με πολύ προσοχή. Το βρωμιούχο αιθιδίο προσκολλάται στο DNA και μας παρέχει τη δυνατότητα να γίνεται ορατό το DNA κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία. Στη συνέχεια το διάλυμα τοποθετούνταν σε ένα δοχείο ηλεκτροφόρησης (castingtray) μέχρι να στερεοποιηθεί η γέλη. Όταν η γέλη σχηματιστεί αφαιρούνται τα πλαϊνά πλαστικά πλαίσια και το οδοντωτό πλαίσιο. Στη θέση που υπήρχε οδοντωτό πλαίσιο έχουν δημιουργηθεί οπές στη γέλη μέσα στις οποίες θα τοποθετηθεί το προϊόν της PCR προκειμένου να ηλεκτροφορηθεί. Μετά η γέλη καλυπτόταν από διάλυμα TAE.

Στη θέση 1 της γέλης τοποθετούνταν 5 μl DNA ladder (τμήματα DNA γνωστού μεγέθους) και στις επόμενες θέσεις 20 μl προϊόντος που αναμειγνύονταν με 5 μl διάλυμα φόρτωσης (loading buffer) η οποία προσδίδει στο προϊόν μεγαλύτερο ειδικό βάρος από το διάλυμα TAE ώστε να κρατηθεί

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/02/2026 23:45:56 EET - 18.97.14.81

στη θέση του μέχρι να εφαρμοστεί ηλεκτρικό ρεύμα. Στην τελευταία θέση τοποθετούνταν και ένας μάρτυρας ο οποίος δεν αναμένονταν να παράγει αποτελέσματα. Για την παρασκευή του διαλύματος φόρτωσης συγκέντρωσης 6X χρησιμοποιούνται 0.25% μπλε της βρωμοφαινόλης και 30% w/v γλυκερόλης. Το διάλυμα αραιώνεται κατά την ηλεκτροφόρηση σε συγκέντρωση 1X.

Μετά στη γέλη εφαρμοζόταν ηλεκτρικό ρεύμα 110 volt, για 45 λεπτά περίπου και τέλος, η πηκτή τοποθετούνταν σε ειδική συσκευή, που εκπέμπει υπεριώδη ακτινοβολία και φωτογραφιζόταν. Όλη η διαδικασία απεικονίζεται στην εικόνα 16.



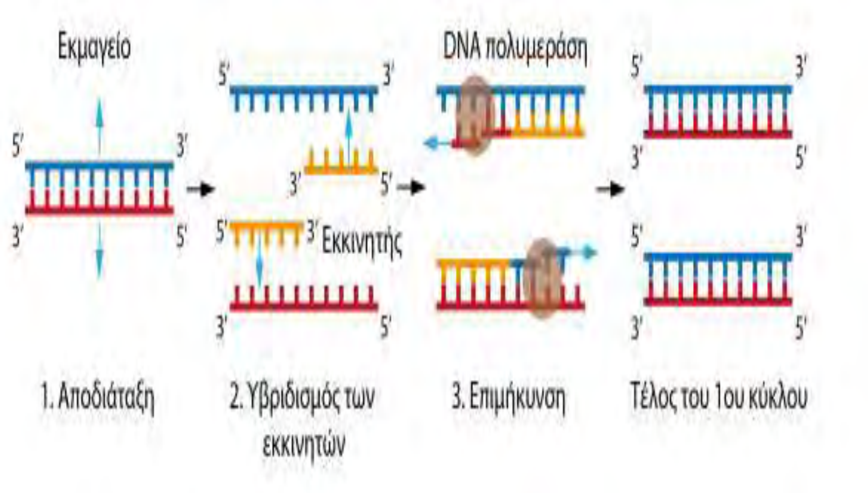
Εικόνα16. Προετοιμασία ενός πηκτώματος αγαρόζης για ηλεκτροφόρηση DNA

2.2.4.<u>ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ</u>

Η αλυσιδωτή αντιδραση της πολυμεράσης ή PCR (polymerase chain reaction) περιγράφτηκε για πρώτη φοράτο 1983 από τον βιοχημικό Karry Mullis, ***(Mullis K et al., 1987)*** και έχει αποτελέσει την κορωνίδα της μοριακής, αναπτυξιακής και εξελεκτικής βιολογίας, καθώς και της γενετικής. Η PCR είναι μια πολύ ειδική, ταχεία και απλή μέθοδος με αναρίθμητες εφαρμογές τόσο σε ερευνητικό όσο και σε διαγνωστικό επίπεδο. Σε περίπου 2 ώρες μας δίνει τη δυνατότητα δημιουργίας εκατομμυρίων αντιγράφων μιας δεδομένης αλληλουχίας DNA. Η PCR είναι μια ενζυμική μέθοδος ενίσχυσης συγκεκριμένων τμημάτων του αρχικού γενετικού υλικού, έτσι ώστε να είναι εφικτή η περαιτέρω μελέτη του με διάφορες μεθόδους, όπως η αλληλούχηση, η πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες, η ηλεκτροφόρηση κ.ά. Η αντίδραση

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/02/2026 23:45:56 EET - 18.97.14.81

PCR είναι πολύ ευαίσθητη και γι αυτό το λόγο ελήφθησαν όλα τα μέτρα ώστε να μην υπάρχει διαμόλυνση από DNA άλλης προέλευσης. Η αντίδραση PCR πραγματοποιείται σε τρία στάδια, τα οποία επαναλαμβάνονται διαδοχικά και φαίνονται στην εικόνα 17.



Εικόνα 17. Τα στάδια της αντίδρασης PCR

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

Εκκινητής	Αλληλουχία
Πρόσθιος(FLT3-F1)	14F-5’-GCAATTTAGGTATGAAAGCCAGC-3’
Ανάστροφος (FLT3-R1)	14R-5’-CTTTCAGCATTTTGACGGCAACC-3’

Στις αντιδράσεις PCR χρησιμοποιήθηκε η kappa Taq DNA πολυμεράση της εταιρείας kappa biosystems. Το Buffer είναι ρυθμιστικό διάλυμα για την πολυμεράση και περιέχει μαγνήσιο που δρα ως συμπαράγοντας της πολυμεράσης. Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για τις αντιδράσεις PCR δίνονται στον πίνακα 6.

Πίνακας 6. Ποσότητες αντιδραστηρίων στις αντιδράσεις PCR.

Συστατικά	Τελική συγκέντρωση	Όγκος (μl)
10X PCR Buffer (+ 15mM Mg^{2+})	1X Buffer + 1.5mM (Mg^{2+})	2 μl
Μείγμα dNTPs (10mM το καθένα)	0.2mM (το καθένα)	0.4 μl
10pmol/μl Εκκινητής F1	0.4 μl	0.8 μl
10pmol/μl Εκκινητής R1	0.4 μl	0.8 μl
ΚαραΤαqΠολυμεράση (5 U/μl)	0.025U/μl	0.02μl
DNA	(100- 200 ng)	10 μl
H_2O	-	5.98 μl

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/02/2026 23:45:56 EET - 18.97.14.81

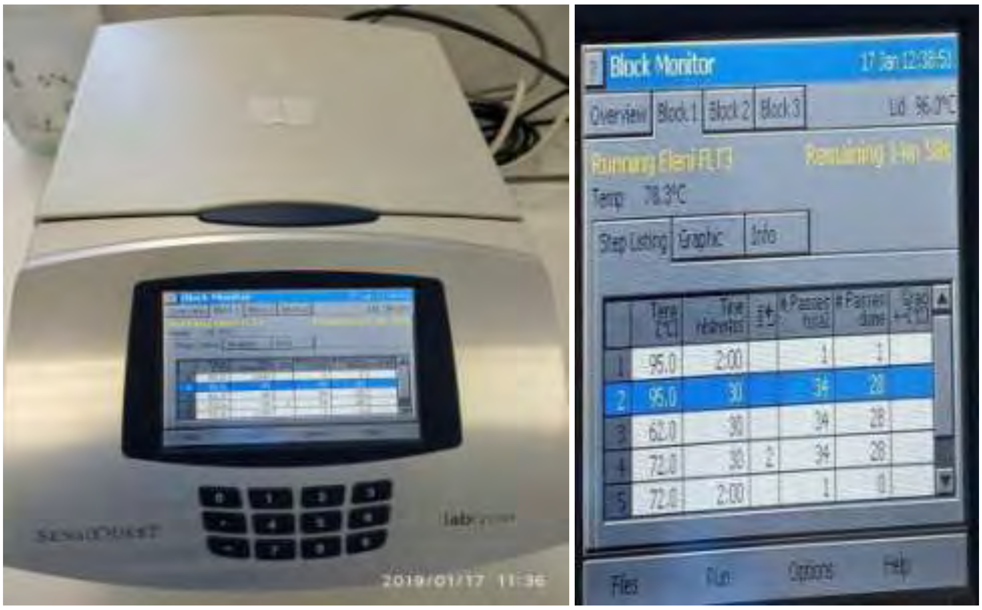
ΣΥΝΟΛΙΚΟΣ ΟΓΚΟΣ		20 μl

Στη συνέχεια το δείγμα τοποθετούνταν σε θερμικό κυκλοποιητή και οι συνθήκες της αντίδρασης(Εικόνα 18) ήτανοι ακόλουθες:

- Αρχική μετουσίωση (denaturation) του DNA για 2 λεπτά στους $95^{o}C$

- Ακολουθούμενη από 35 κύκλους αποτελούμενους από: αποδιάταξη (denaturation) του DNA στους 95°C για 30'', πρόσδεση των εκκινητών (annealing) στους $62^{o}C$ για 30'' και σύνθεση-επέκταση (extension) στους $72^{o}C$ για 30''

- Ακολουθούμενοι από έναν κύκλο τελικής επέκτασης στους $72^{o}C$ για 2 λεπτά.



Εικόνα 18. Θερμικός κυκλοποιητής όπου πραγματοποιήθηκε η αντίδραση PCR. Στην οθόνη του μηχανήματος απεικονίζεται το πρόγραμμα των διαδοχικών κύκλων για τη διενέργεια της αντίδρασης

Το προϊόν της PCR αντίδρασης ηλεκτροφορούνταν σε γέλη αγαρόζης, συγκέντρωσης 1.3%.Το αναμενόμενο μέγεθος του προϊόντος της PCR είναι 329 βάσεις και αντιστοιχεί στο φυσιολογικό (μη μεταλλαγμένο) τμήμα του γονιδίου FLT3. Παρουσία μετάλλαξης αναμένεται και η λήψη ζωνών μεγαλύτερου μεγέθους.

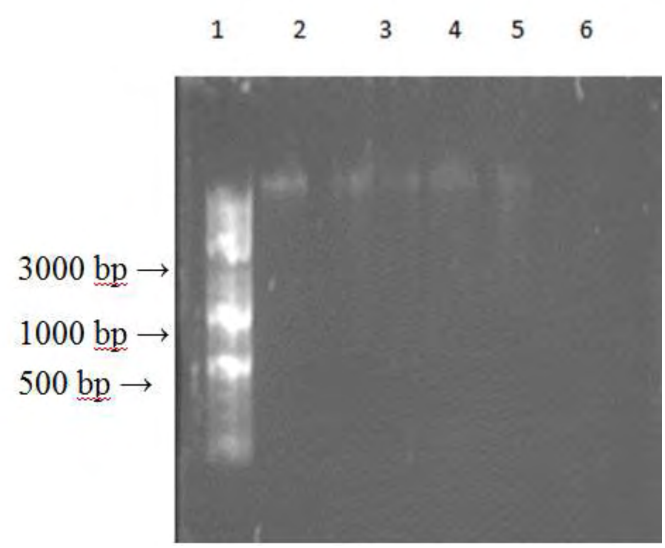
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/02/2026 23:45:56 EET - 18.97.14.81

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/02/2026 23:45:56 EET - 18.97.14.81

3. <u>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ</u>

3.1. Ηλεκτροφόρηση DNA από περιφερικό αίμα ασθενών με ΟΜΛ.

Το DNA που απομονώθηκε, ποσοτικοποιήθηκε φθορισμομετρικά με τον μετρητή Qubit. Η συγκέντρωση των δειγμάτων εκτιμήθηκε μεταξύ 50-200 ng/μL. Η ποιότητα του DNA ελέχθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης περιεκτικότητας 1%, όπως φαίνεται στην εικόνα 19.

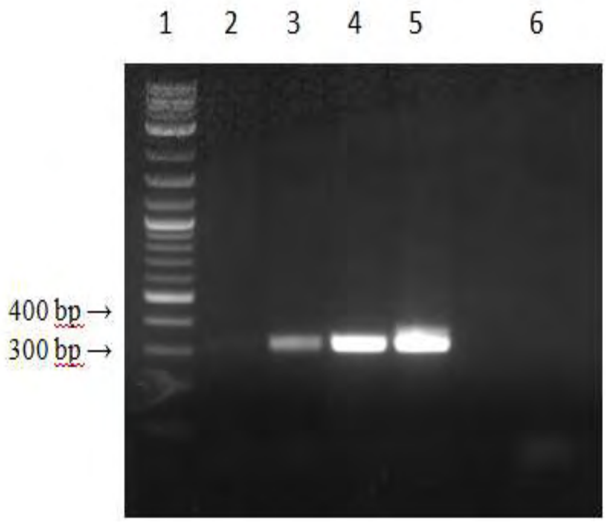


Εικόνα 19. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% γονιδιωματικών DNA. **Διαδρομή 1:** δείκτης μοριακών βαρών, DNA Ladder 100 bp. **Διαδρομές 2-6:** Γονιδιωματικά DNA των ασθενών 1-5.

3.2. Ανίχνευση μεταλλάξεων FLT3-ITD με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.

Στην Εικόνα 20 απεικονίζονται ενδεικτικά τα προϊόντα ενίσχυσης με PCR της επιθυμητής περιοχής διαφορετικών δειγμάτων για την μετάλλαξη FLT3-ITD. Από κάθε ασθενή αναμένεται μια ζώνη μεγέθους 329 bp, που οφείλεται στην ενίσχυση της υπό μελέτη περιοχής, σε περίπτωση απουσίας της μετάλλαξης. Όμως σε κανένα δείγμα δεν ταυτοποιήθηκε μια μεγαλύτερη ζώνη λόγω της μετάλλαξης. Αυτό μπορεί να αποτελεί τυχαίο γεγονός εξαιτίας του μικρού αριθμού των δειγμάτωνπου μελετήθηκαν.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/02/2026 23:45:56 EET - 18.97.14.81



Εικόνα 20. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1.3% της περιοχής του γονιδίου FLT3 που περιλαμβάνει τους ITD μετά από την ενίσχυση διαφορετικών DNA με αντίδραση PCR. **Διαδρομή 1:** δείκτης μοριακών βαρών, DNA Ladder 100 bp. **Διαδρομές 2-5:** Ενίσχυση γενωμικού DNA των δειγμάτων 1-4. **Διαδρομή 6:** Δείγμα αρνητικού ελέγχου της αντίδρασης PCR.

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση και σε πήκτωμα αγαρόζης 2% των προϊόντων της PCR και ανιχνεύθηκε μόνο η ζώνη των 329 bp που απαντάται σε άτομα που δεν φέρουν την μετάλλαξη. Η παρουσία μετάλλαξης αναμενόταν να οδηγήσει σε διπλασιασμό εντός της ενισχυμένης περιοχής και θα έδινε προϊόντα μεγέθους μεγαλύτερου των 329 bp, ανάλογα με την περιοχή που διπλασιάστηκε. Η εμφάνιση μιας μοναδικής ζώνης στα 329 bp δείχνει την απουσία μετάλλαξης, τόσο σε ομοζυγωτία (όπου θα αναμενόταν μια ζώνη μεγαλύτερου μεγέθους), όσο και σε ετεροζυγωτία (όπου θα αναμενόταν δύο ζώνες, μία στα 329 bp και μια μεγαλύτερου μεγέθους).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Με βάση τη διεθνή βιβλιογραφία η συχνότητα των μεταλλάξεων στο γονίδιο *FLT3* κυμαίνεται περίπου στο 1/3 των ασθενών με ΟΜΛ, στις οποίες οι FLT3-ITD αναλογούν στο 23%, ενώ οι FLT3-KD ανέρχονται στο 12%. Επιπλέον, σε ασθενείς με ΟΜΛ έχουν ταυτοποιηθεί μεταλλάξεις και στα γονίδια *NPM1* και *c-kit* σε ποσοστά περίπου 33% και 20% αντίστοιχα. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η παρουσία των μεταλλάξεων FLT3-ITD αποτελεί ένδειξη κακής πρόγνωσης τόσο σε παιδιά όσο και σε ενήλικες ασθενείς με ΟΜΛ. Με βάση τη συχνότητα των μεταλλάξεων FLT3-ITD αναμενόταν η ταυτοποίηση μετάλλαξης σε 3-4 ασθενείς στο δείγμα των 15 ασθενών που μελετήθηκε στην παρούσα εργασία. Αντιθέτως δεν ταυτοποιήθηκε καμιά μετάλλαξη και για το λόγο αυτό δεν μπορεί να γίνει συσχέτιση των αποτελεσμάτων με τα κλινικά και εργαστηριακά ευρήματα των ασθενών. Τα αποτελέσματα της παρούσας

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/02/2026 23:45:56 EET - 18.97.14.81

μελέτης σχετικά με τη συχνότητα της μετάλλαξης FLT3-ITD στον ελληνικό πληθυσμό θα πρέπει να αξιολογηθούν με προσοχή λόγω του μικρού μεγέθους των δειγμάτων. Για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων, κρίνεται απαραίτητο η μελέτη να επεκταθεί σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων και να περιλαμβάνει την ανάλυση επιπρόσθετων μεταλλάξεων στα γονίδια *NPM1* και *c-kit*.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/02/2026 23:45:56 EET - 18.97.14.81

4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ashman LK[1], Griffith R.Therapeutic targeting of c-KIT in cancer. Expert OpinInvestig Drugs. (2013) Jan;22(1):103-15.
- Asif Naghmi and HassanKhalid, Clinical Manifestations of Acute Myeloid Leukemia . (2016)
- Ayatollahi, H. et al. Prognostic Importance of C-KIT Mutations in Core Binding Factor Acute MyeloidLeukemia: A Systematic Review. Hematology/oncology and stem cell therapy 10, 1–7, (2017)
- Bennett JH. Case of hypertrophy of the spleen and liver in which death took place from suppuration of the blood. Edinburgh Medical and Surgical Journal. 1845;64:413–423.
- BrunangeloFalini, IldoNicoletti, et al.,Translocations and mutations involving the nucleophosmin (NPM1) gene in lymphomas and leukemias. Haematologica April (2007) 92: 519-532
- Cairoli R, Beghini A, Grillo G, et al.,.Prognostic impact of c- KIT mutations in core binding factor leukemias:an Italian retrospectivestudy. (2006) May 1;107(9):3463-8. Epub 2005 Dec 29
- Chou WC, Tang JL, Lin LI. et al. Nucleophosmin mutations in de novo acute myeloid leukemia: the age-dependent incidences and the stability during disease evolution. Cancer Res. 2006;66:3310–6.
- Choudhary C, Schwäble J, Brandts C, Tickenbrock L, Sargin B, Kindler T, et al. AML-associated Flt3 kinase domain mutations show signal transduction differences compared with Flt3 ITD mutations.(2005);106:265–73
- 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. Genetics173:1835–50.
- Estey, E and Döhner, H. Acute myeloid leukaemia. Lancet. (2006); 368: 1894–1907.
- Falini, B., et al., Acute myeloid leukemia carrying cytoplasmic/mutated nucleophosmin (NPMc+ AML): biologic and clinical features.(2007). 109(3): p. 874-85.
- Falini B, Bolli N, Shan J. et al. Both carboxy-terminus NES motif and mutated tryptophan(s) are crucial for aberrant nuclear export of nucleophosmin leukemic mutants in NPMc+ AML. Blood. 2006;107:4514–23
- Fialkow PJ[1], Janssen JW, Bartram CR. Clonal remissions in acute nonlymphocyticleukemia: evidence for a multistep pathogenesis of the malignancy. Blood. 1991 Apr 1;77(7):1415-7.
- Gao, X. et al. High expression of c-kit mRNA predicts unfavorable outcome in adult patients with t(8;21) acute myeloid leukemia. (2015).
- GemaLucena-Aguilar, Ana María Sánchez-López, et al. DNA Source Selection for Downstream Applications Based on DNA Quality Indicators Analysis (2016 Aug)

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/02/2026 23:45:56 EET - 18.97.14.81

- 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
- Ikeda, H. et al. Expression and functional role of the proto-oncogene c-kit in acute myeloblastic leukemia cells. Blood 78, 2962–2968 (1991).
- Jiang J, Paez JG, Lee JC, et al. Identifying and characterizing a novel activating mutation of the FLT3 tyrosine kinase in AML. (2004);104:1855–1858.
- Joseph K. Box, Nicolas Paquet, Mark N. Adams, Didier Boucher, Emma Bolderson, Kenneth J. O'Byrne, Derek J. Richard.Nucleophosmin: from structure and function to disease developmentBMC Mol Biol. (2016)
- Jung H.A, C.H. Maeng, S. Park, S.J. Kim, K. Kim, J.H. Jang, et al.Prognostic factor analysis in core-binding factor-positive acute myeloid leukemia Anticancer Res, 34 (2014), pp. 1037-1045
- Kim H.J. , H.K. Ahn, C.W. Jung, J.H. Moon, C.H. Park, K.O. Lee, et al.KIT D816 mutation associates with adverse outcomes in core binding factor acute myeloid leukemia, especially in the subgroup with RUNX1/RUNX1T1 rearrangementAnn Hematol, 92 (2013), pp. 163-171
- Kindler T, Breitenbuecher F, Kasper S, et al. Identification of a novel activating mutation (Y842C) within the activation loop of FLT3 in patients with acute myeloid leukemia (AML) (2005);105:335–340
- Koczkodaj, SzymonZmorzyński, MałgorzataMichalak-Wojnowska, EwaWąsik-Szczepanek, Agata A. Filip. Examination of the FLT3 and NPM1 mutational status in patients with acute myeloid leukemia from southeastern PolandArch Med Sci. (2016) Feb 1; 12(1): 120–128.
- 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.
- 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)
- Lyon, France: International Agency for Research and Cancer (IARC); WHO Classification of Tumors of Hematopoietic and Lymphoid Tissues (4th Ed). (2008):54-63.
- Marcucci, G., Haferlach, T. &Dohner, H. Molecular genetics of adult acute myeloid leukemia: prognostic and therapeutic implications. Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology 29, 475–486, (2011).
- Mehranfar Sahar, SirousZeinali , Rana Hosseini , MozhdehMohammadian , AbolfazlAkbarzadeh , AbbasaliHosein Pour Feizi .History of Leukemia: Diagnosis and Treatment from Beginning to Now.(2017);6(1):12-22

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/02/2026 23:45:56 EET - 18.97.14.81

- Mrózek K, Heerema NA, Bloomfield CD. Cytogenetics in acute leukemia. Blood Rev. (2004); 18:115-136.
- Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction.Methods Enzymol. 1987;155:335-50.
- Nakao M, 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.
- 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].
- Park S.H. , H.S. Chi, S.K. Min, B.G. Park, S. Jang, C.J. Park Prognostic impact of c-KIT mutations in core binding factor acute myeloid leukemiaLeuk Res, 35 (2011), pp. 1376-1383
- Paschka P.,G. Marcucci, A.S. Ruppert, K. Mrózek, H. Chen, R.A. Kittles, et al. Adverse prognostic significance of KIT mutations in adult acute myeloid leukemia with inv(16) and t(8;21): a Cancer and Leukemia Group B StudyJ ClinOncol, 24 (2006), pp. 3904-3911
- PollardJ.A, T.A. Alonzo, R.B. Gerbing, P.A. Ho, R. Zeng, Y. Ravindranath, et al. Prevalence and prognostic significance of KIT mutations in pediatric patients with core binding factor AML enrolled on serial pediatric cooperative trials for de novo AML (2010), pp. 2372-2379
- Rosnet O, 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).
- Shimada A, T. Taki, K. Tabuchi, A. Tawa, K. Horibe, M. Tsuchida, et al.KIT mutations, and not FLT3 internal tandem duplication, are strongly associated with a poor prognosis in pediatric acute myeloid leukemia with t(8;21): a study of the Japanese Childhood AML Cooperative Study GroupBlood, 107 (2006), pp. 1806-1809
- Swerdlow S, Campo E, Harris NL, et al. (eds). Geneva, Switzerland: WHO Press, (2008): 110-123.
- Wheeler, S., A. Seegmiller, C. Vnencak-Jones. KIT in Acute Myeloid Leukemia. MyCancerGenome . (2013)
- 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.

Ελληνική

- Παγκάλης Γεράσιμος Α. Αιματολογία στην κλινική πράξη**.,** Ιατρικές Εκδόσεις Π. Χ. Πασχαλίδης, 2008 pp 537-562

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/02/2026 23:45:56 EET - 18.97.14.81

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
16/02/2026 23:45:56 EET - 18.97.14.81