

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИ МАРКЕРИ ПРИ ОСТРА МИЕЛОИДНА ЛЕВКЕМИЯ – ДОБРИТЕ, ЛОШИТЕ И ИНТЕРМЕДИЕРНИТЕ

Диннар Яхя^{1,2}, Милена Стоянова^{1,2}, Мари Хачмериян^{1,2}, Людмила Ангелова¹,
Илина Мичева^{3,4}, Трифон Червенков^{1,5}

¹Катедра по медицинска генетика, Факултет по медицина,
Медицински университет – Варна

²Лаборатория по медицинска генетика, УМБАЛ „Св. Марина“,
Медицински университет – Варна

³Втора катедра по вътрешни болести, Факултет по медицина,
Медицински университет – Варна

⁴Клиника по хематология, УМБАЛ „Св. Марина“, Медицински университет – Варна

⁵Лаборатория по клинична имунология, УМБАЛ „Св. Марина“,
Медицински университет – Варна

MOLECULAR GENETIC MARKERS IN ACUTE MYELOID LEUKEMIA— THE GOOD, THE BAD, AND THE INTERMEDIATE

Dinnar Yahya^{1,2}, Milena Stoyanova^{1,2}, Mari Hachmeriyan^{1,2}, Lyudmila Angelova¹,
Ilina Micheva^{3,4}, Trifon Chervenkov^{1,5}

¹Department of Medical Genetics, Faculty of Medicine, Medical University of Varna

²Laboratory of Medical Genetics, St. Marina University Hospital,
Medical University of Varna

³Second Department of Internal Diseases, Faculty of Medicine, Medical University of Varna

⁴Clinic of Hematology, St. Marina University Hospital, Medical University of Varna

⁵Laboratory of Clinical Immunology, St. Marina University Hospital,
Medical University of Varna

РЕЗЮМЕ

Приложението на молекулярно-генетични маркери има съществен принос за всекидневната клинично-диагностична практика при различни заболявания. То стана възможно благодарение на завършването на проекта „Човешки геном“ и картирането на ключови за човешката патология гени, а също и на въвеждането на генетични техники с висока резолюция и изграждането на международна база данни. По отношение на острата миелоидна левкемия, познанията за най-честите и значими диагностични, прогностични и предиктивни молекулярно-генетични маркери са вече инкорпорирани в международните препоръки. С този обзор ние целим да обобщим и представим информация за най-често

ABSTRACT

The application of molecular genetic markers in the work-up of various diseases carries a great significance for current clinical and diagnostic practice. This routine only became possible after the finalization of the Human Genome Project with mapping of genes, essential for human pathology. Incorporating high-resolution genetic techniques and a widely available international database has also had a major contribution to the evolution of this process. Regarding acute myeloid leukemia, in particular, the knowledge of the most common and weighty diagnostic, prognostic, and predictive molecular genetic markers is already included in the well-established recommendations. With this review, we aim to summarize and present information regarding the most common mo-

изследваните молекулярни варианти понастоящем и тяхното значение за персонализирания подход към пациента.

Ключови думи: остра миелоидна левкемия, генетични маркери, генетични техники, диагноза

lecular variants currently as well as their significance for a personalized approach.

Keywords: acute, myeloid, leukemia, genetic markers, genetic techniques, diagnosis

УВОД

Острата миелоидна левкемия (ОМЛ) представлява хетерогенна група заболявания, дължащи се на абнормна пролиферация на прогениторни клетки от миелоидния клетъчен ред. На базата на установените механизми на етиология и патогенеза се знае, че на клетъчно ниво това е едно основно генетично по природа заболяване, свързано с широка гама генетични мутации и епигенетични модификации. Най-често придобити, тези изменения водят до нарушения в хематопоезата по отношение на пролиферация, диференциация, матuration, контрол върху клетъчния цикъл и апоптоза. ОМЛ се характеризира с изключителна генетична хетерогенност, бърз клиничен ход и вариабилна прогноза (54). Тези особености, от една страна, усложняват процеса на диагностика и изискват прецизна и ефикасна колаборация между специалисти от сферите кли-

нична хематология, медицинска генетика, клинична имунология, клиничната патология и т.н. От друга страна, охарактеризирането на конкретните генетични събития, довели до даден случай на заболяването, е определящо за поставянето на точна диагноза, прогнозиране на хода му и предикция по отношение на терапевтичния отговор.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Проведохме проучване на публикации, налични в бази данни като Pubmed, Web of Science и SCOPUS с ключови думи “AML”, “acute myeloid leukemia”, “molecular markers”, “genetic markers”. След разглеждане на материали, изследвания и публикации по темата се опитахме обобщено и систематизирано да представим основните молекулярно-генетични маркери, заложиени в съвре-

Табл. 1. ELN стратификация спрямо риск, 2017 (адаптирана по Dohner et al, 2017) (16)

*AR (allele ratio) - алелно съотношение

Рискова категория	Генетична характеристика
Благоприятна	· t(8;21)(q22;q22.1);RUNX1-RUNX1T1
	· inv(16;16)(p13;q22) или t(16;16)(p13;q22);CBFB-MYH11
	· мутация в NPM1 без FLT3-ITD или с FLT3-ITD с ниско AR
	· Биалелна мутация в CEBPA
Интермедиерна	· мутация в NPM1 с FLT3-ITD с високо AR*
	· див тип NPM1 без FLT3-ITD или с FLT3-ITD с ниско AR (в отсъствие на лезии, свързани с неблагоприятен риск)
	· t(9;11)(p21.3;q23.3); MLLT3-KMT2A
	· Цитогенетични аберации, неклассифицирани като благоприятни или неблагоприятни
Неблагоприятна	· t(6;9)(p23;q34.1);DEK-NUP214
	· t(v;11q23.3); промени в KMT2A
	· t(9;22)(q34.1;q11.2); BCR-ABL1
	· inv(3)(q21.3;q26.2) или t(3;3) (q21.3;q26.2); GATA, MECOM(EVI1)
	· -5 или del(5q); -7; -17/abn(17p)
	· комплексен или монозомален кариотип
	· див тип NPM1 с FLT3-ITD с високо AR
	· мутация в RUNX1
	· мутация в AXL1
	· мутация в TP53

менния диагностичен процес, оценката и мониторирането на пациенти с ОМЛ.

РЕЗУЛТАТИ

Биомаркерите, застъпени в съвременната клинично-диагностична практика, по дефиниция на WHO представляват субстанция, структура или процес, които биха могли да се измерят с цел предвиждане изхода от дадено заболяване (51,35). На практика те се използват и за различна оценка, като се описват няколко основни вида. Диагностичните служат за преценка на наличието на конкретно заболяване. Прогностичните маркери имат отношение към хода на заболяването, отговора на терапия сред пациенти със сходни характеристики или изхода от заболяването след стандартна терапия. Не на последно място – предиктивни, използвани за оценка на ползата от определен вид лечение или от два или повече различни типа лечение с оглед на чувствителност и резистентност на пациентите към тях. Понятието молекулярно-генетични маркери, от своя страна, отговаря на участъци от ДНК, характерни за конкретни промени в генни секвенции, нива на генна експресия или протеинови качества (35).

По отношение на ОМЛ, съвременната практика се ползва от няколко препоръки и класификации. Към последните спадат French-American-British (FAB) и тази на Световната здравна организация (WHO), които са неделима част от инициалния диагностичен процес (28,3). За стратификация спрямо риск се прилага European Leukemia Net (ELN) класификацията с последна поправка от 2017 (таб. 1), при която на база на генетичните находки пациентите се определят като такива с благоприятен, интермедиерен и неблагоприятен риск, с обща 5-годишна преживяемост съответно 60%, 40% и 20% (16).

В този обзор ще разгледаме маркерите, представляващи генни фузии, от които повечето биха могли да се визуализират цитогенетично или да се докажат чрез молекулярно-генетични техники. Ще разгледаме също и генни мутации, които изискват прилагане на високорезолутивен молекулярно-генетичен метод.

t(8;21)(q22;q22.1);RUNX1-RUNX1T1

Съставлява около 4-8% от случаите на ОМЛ и се характеризира с добра прогноза предвид задължителната чувствителност спрямо химиотерапевтични средства. Изключение правят случаите на комбинация с мутации, влошаващи прогнозната (48). Транслокацията води до фузия между два

гена – RUNX1 (runt-related transcription factor 1) гена, разположен на дългото рамо на хромозома 21, и RUNX1T1, разположен на дългото рамо на хромозома 8. Първият кодира α субединицата на т.нар. core-binding factor, който представлява свързващ се с ДНК транскрипционен фактор, есенциален за диференциацията на миелоидните клетки (37). RUNX1T1, от своя страна, е ген с широка експресия, като по отношение на клетките на кръвния ред най-силно участие взема в еритропоезата. Кодираният от него протеин ЕТО, служещ като транскрипционен корепресор, е ангажиран в механизми за потискане активността на други гени (48). Фузионният ген, разположен върху дериватната 8-а хромозома, води до формирането на химерен протеин с абнормна активност. Повишава се експресията на RUNX1T1, което от своя страна повлиява нормалната функция на CBF α и свързаните с него гени. В резултат на фузията се възпрепятстват нормалните процеси на матурация и диференциация на хематопетични стволови клетки (ХСК), както и експресията на други гени със съществена роля ДНК репарацията и програмираната клетъчна смърт. Повлиява се активността на транскрипционни фактори като CEBPA, GATA-1, PU.1, както и на тумор-супресорни гени като NF1(Neurofibromin 1) и RUNX3. Известно е също взаимодействието на химерния протеин с микрорибонуклеинови киселини (микроРНК), както и с епигенетични механизми като хистоновите деацетилази и деметилази (37). По отношение на давността на тази мутация в еволюцията на клоналния процес засега е прието, че тя възниква рано и е инициращо, дори прелевкемично събитие, което обаче не е достатъчно за разгръщането на пълния левкемичен процес (22,66). Отчитането на този генен продукт в периферна кръв или в материал от КМ може да се прилага и като маркер за наличие на MRD (37). Освен описаната транслокация често се срещат придружаващи мутации. На молекулярно-генетично ниво често се отчитат ко-мутации в гени като KIT, FLT3-ITD, RAS, ASXL1/2 и др. Влиянието на тези асоциирани генетични събития не е изцяло изяснено, но за някои като KIT мутациите е известно, че влошават изначално добрата прогноза, докато други като RAS не я повлияват (48).

inv(16)(p13.1q22) или t(16;16)(p13.1;q22);CBFB-MYH11

Среща се в 5-8% от случаите и се характеризира с добра прогноза поради добрия отговор на високи дози Cytarabine (31). Както периферичната инверсия, така и реципрочната транслока-

ция водят до формиране на фузионен ген между CBFB (core binding factor beta subunit) гена, намиращ се на късото рамо на 16-а хромозома, и MYH11 (myosin heavy chain 11), разположен върху дългото рамо на същата. CBFB е част от фамилия транскрипционни фактори, регулиращи гени с влияние върху хематопоезата (напр. RUNX1) и остеогенезата. MYH11 кодира основен за гладката мускулатура контрактилен протеин (19). Новият химерен протеин е с функция, свързана с абнормно стимулиране на клетъчното самообновяване за сметка на потисната диференциация. Подобно на предходния описан подтип, и тук придружаващи мутации, свързани с лоша прогноза (KIT, FLT3), повлияват негативно състоянието на пациентите. За разлика от тях, тризомията по 22-ра хромозома се асоциира с по-добра прогноза (67).

PML-RARA генна фузия

С честота около 10% при възрастни, фузията най-често възниква *de novo* (11). Подтипът се асоциира с балансираната транслокация t(15;17)(q24;q21). Единият ген, засегнат при това преустройство, е Promyelocytic leukemia (PML), разположен на дългото рамо на хромозома 15. PML кодира ядрен протеин, включен в множество регулаторни механизми, включително такива, засягащи тумор-супресорна активност, апоптоза, епигенетична модификация и транскрипция на ХСК (30). Другият ангажиран ген се нарича Retinoic acid receptor alpha (RARA) и се намира на дългото рамо на хромозома 17. RARA кодира ядрен рецептор с обширна експресия, свързващ ретиноиди и специфични ДНК сегменти, и с влияние върху растежа и диференциацията на нормалните клетки от миелоидния ред (11,30). Образуваният PML-RARA фузионен ген на дериватната 15-а хромозома е с абнормна онкогенетична активност, като възпрепятства диференциацията на клетките в промиелоцитен етап и стимулира тяхната извънредна пролиферация. Детекцията му носи както диагностично и прогностично значение, така и служи за проследяване възникването на MRD и молекуларен релапс (30). Тази генетична характеристика обуславя добрия терапевтичен отговор на all-trans retinoic acid (ATRA) и arsenic trioxide (ATO) с постигане на пълна ремисия в над 90% от случаите. Двата медикамента се свързват в химерния протеин с RARA и PML съответно и инхибират неговата абнормна активност (30,33). Прието е, че с изключение на неблагоприятния комплексен кариотип придружаващите цитогенетични аберации не променят прогнозата при пациенти с t(15;17)(q24;q21) (27).

t(9;11)(p21.3;q23.3);MLLT3-KMT2A

Подтипът е с честота едва 1-2% при възрастни, като може да възникне както *de novo*, така и вследствие на химиотерапевтични медикаменти, инхибитори на топоизомеразата II. Клинично могат да се наблюдават органомегалия, засягане на ЦНС, синдром на дисеминирана интравасална коагулация (DIC синдром) и тъканна инфилтрация. Транслокацията засяга два гена – MLLT3 (Super Elongation Complex Subunit), намиращ се на късото рамо на хромозома 9, и KMT2A (Lysine Methyltransferase 2A) – на дългото рамо на 11-а хромозома (8). Първият кодира ядрен протеин с функция на транскрипционен активатор. KMT2A носи информация за протеин също с нуклеарна локализация, ангажиран с транскрипционна регулация и по-конкретно ремоделиране на хроматина посредством няколко свързващи места по повърхността си. Той е от огромно значение по време на ранното развитие, а също и за хематопоезата. Хромозомното преустройство води до формиране на фузионен ген KMT2A-MLLT3 на дериватната 11-а хромозома с онкогенетична активност и генен продукт, възпрепятстващ нормалната матурация. Прогнозата се оценява като лоша до средна, но сравнително по-добра спрямо други хромозомни преустройства, засягащи KMT2A гена (34,39). Някои автори приемат наличието на това преустройство като добър прогностичен маркер по отношение на преживяемостта на пациенти след алогенна трансплантация на ХСК (56).

t(6;9)(p23;q34.1);DEK-NUP214

Възниква най-често *de novo* и е с честота 0.7-1.8%. Среца както при деца, така и при възрастни, като последните са на средна възраст 35 години. При тях подтипът се характеризира с по-леко изразена левкоцитоза в сравнение с останалите подтипове, а в клиничен аспект - с повишен риск от развитие на DIC синдром и инфекции (40). Транслокацията води до формиране на фузионен ген между DEK, разположен в цитолента 6p22.3, и NUP214 (Nucleoporin 214kDa) – в цитолента 9q34.1. DEK е протоонкоген, кодиращ протеин с множество ДНК-свързващи домени - транскрипционен активатор или репресор според лигандите си. Той има роля в запазване интегритета на хетерохроматина, както и в регулацията на стволовите и прогениторните клетки. Неслучайно неговата абнормна активност е асоциирана с множество неопластични процеси и има особено отношение като активатор на миелоидната генна експресия. NUP214 кодира протеин с локализация в ядрената мембрана, участ-

ващ в ядрено-цитоплазмения транспорт (7). Фузионният DEK-NUP214 ген, разположен върху дериватната 6-а хромозома, се транслира в нуклеарен протеин, повишаващ протеиновата синтеза в клетките от миелоидния ред, без да блокира тяхната диференциация (46). На молекулярно ниво се отчита и висока степен на мутации в FLT3 гена, най-вече FLT3-ITD, които влошават тежестта на клиниката и прогнозата на заболяването. Наличието на тази транслокация се асоциира с неблагоприятна прогноза по отношение на постигната ремисия (под 50%) след химиотерапия и на средна преживяемост – обикновено 1 година след диагностициране (40).

inv(3)(q21.3q26.2) или t(3;3)(q21.3;q26.2);GATA2, MECOM

Представлява още една рядко срещана форма с честота 1-2%, като пациентите са на средна възраст 50 години. Половата предилекция е преобладаваща, но се отчитат някои расови различия по отношение на клинични и лабораторни характеристики (41,20). Заболяването възниква de novo или от предхождащ миелодиспластичен процес. Клиниката се отличава с анемия, спленомегалия и нормално или повишено ниво на тромбоцити в периферна кръв. Като транслокацията, така и инверсията водят до засягане функцията на два гена - GATA2 в цитолента 3q21.1, и MECOM - в 3q26.2. MECOM е протоонкоген, кодиращ ядрен протеин, регулатор на транскрипцията, клетъчния цикъл и апоптозата. GATA2 кодира транскрипционен фактор, участващ в процесите на хемопоеза и пролиферация на ендокринните клетки. Хромозомните преустройства водят до трансформация на MECOM в онкоген поради свръхекспресия, успоредно с хемопоеза по отношение на GATA2, водещо до развитие на левкемичен процес. Отличава се с агресивен ход и особено неблагоприятна прогноза поради липса на отговор спрямо конвенционалните химиотерапевтични средства, както и поради ограничената преживяемост (41). В 28% от случаите се отчита асоциация с мутации в NRAS протоонкогена, а по-рядко – FLT3-ITD и NPM1 мутации (5).

t(1;22)(p13.3;q13.3);RBM15-MKL1

Включва по-малко от 1% от всички случаи на ОМЛ и се среща основно при деца. Обикновено възниква през първите 6 месеца от живота, включително се съобщава за вродени форми. Засегнатите деца най-често са без синдром на Даун, като се отчита значителна полово предилекция за сметка на женския пол. Най-често става дума за de novo възникнал процес, клинично

изявяващ се с маркирана хепатоспленомегалия, анемия, тромбоцитопения и известно завишаване на клетките от белия кръвен ред. Поради специфичната възраст на изява може да наподобява други характерни за нея неопластични състояния като хепатобластома (33,38). Микроскопски видимата транслокация между 1-ва и 22-ра хромозома води до фузия между два гена. RBM15 се намира в позиция 1p13.3 и кодира РНК-разпознаващи мотиви. MKL1, разположен в цитолента 22q13.1, носи информация за транскрипционен фактор, повлияващ процеси като клетъчен растеж, пролиферация и диференциация и др. Фузионният RBM15-MKL1 ген на дериватната 22-ра хромозома кодира химерен протеин с ефект върху хроматиновата организация, диференциация, повлияна от НОХ-гените (housekeeping genes), както и различни сигнални пътища. Образоването и активността му се приемат за инициращо събитие в дадения левкемичен процес (33,38). Повечето източници отличават този подтип като такъв със сравнително по-лоша прогноза спрямо останалите педиатрични форми, включително ОМЛ при пациенти със синдром на Даун. (38).

Всички описани дотук подтипове на класификация на WHO, обновена през от 2016 г., се асоциират с абнормен кариотип, включващ една или повече характерни хромозомни аберации. В поне 50% от случаите на ОМЛ обаче се открива нормален кариотип (НК). При последния етиологията е свързана с далеч по-детайлни промени, каквито са мутациите на ниво ген до единичен нуклеотид.

Мутация в NPM1 гена

Най-честата известна генна мутация при ОМЛ е тази в NPM1 (Nucleophosmin 1) гена, откривана в около 30% от случаите на ОМЛ като цяло и в 45-64% от пациентите с нормален кариотип (НК). 85% от пациентите са с НК, а при останалите се наблюдават основно вторично възникнали хромозомни аберации (21). Генът се намира в цитолента 5q35.1, съдържа 12 екзона и кодира фосфопротеин с обширна експресия, придвижващ се между ядрото и цитоплазмата (14). Нормалният протеин има основно нуклеоларна локализация и 4 функции – рибозомна синтеза, поддържане на геномната стабилност, p53-асоцииран отговор при увреда и модулация на растеж-потискащи сигнали чрез взаимодействие с Arf (Alternate reading frame protein). Мутациите биват различни, като те потенцират активността на NPM1 и променят неговата локализация в основно цитоплазмата. Най-често се доказва инсерцията от четири базови двойки (base pairs – bp)

в екзон 12. Интересен е и фактът, че мутациите са винаги хетерозиготни и обикновено в клетъчното ядро продължават да присъстват див тип NPM1 протеини (21). Поради убиквитерното представяне на белтъка мутациите водят до плейотропен ефект, на места свързан със загуба, а на други - с излишък на функция (loss-of-function and gain-of-function effects) (26). Индуцираният левкемичен процес, изследван в knock-out мишки, демонстрира съвкупност от засегнати по различен начин клетъчни процеси. Загубата на функция води до хаплоинсуфициенция по отношение на клетъчната диференциация с блок в еволюцията на мегакариоцитите и тромбоцитопения. От друга страна, под влияние на промените свойства на мутантния протеин се променят и свойствата на взаимодействащите с него Arf и p53 тумор-супресорни гени. Оттук се нарушава нормално настъпващия арест в клетъчния цикъл при възникнали грешки. По механизма на gain-of-function пък се нарушават протеолитичните качества на каспаза-6 и каспаза-8, съответно механизмите на апоптоза. Съобщава се още за повишаване активността на с-тумс протоонкогена с преминаването му в онкоген, което в норма би трябвало да доведе до тумор-супресорен отговор, но не и при налична NPM1 мутация поради засягане на функциите на Arf и p53 (21). Въпреки всички описани последствия тази мутация не е самодостатъчна за развиване на същински левкемичен процес – предполага се участие на допълнителни ко-иницииращи генетични събития. Проучени са често срещаните взаимодействия с мутации в гени като FLT3 и DNMT3A, които са в различни еволюционно йерархични взаимоотношения с NPM1 мутациите. По отношение на 15% от пациентите с този подтип, при които има и придружаващи хромозомни аномалии, се оказва, че те са вторични както по време на възникване, така и по значение, характеризират се с нестабилност в еволюцията на левкемичния процес и не повлияват прогнозата (26). NPM1 мутациите се наблюдават изключително в клетките от миелоидния, но не и от лимфоидния ред, като възможните обяснения за това включват потенциален токсичен ефект спрямо лимфоидния растеж, възникване в миелоидна прогениторна клетка и др. Още повече тези мутации се смятат за характерни единствено за нарушена моноцитна диференциация в аспекта на ОМЛ. Най-често NPM1 мутациите са налични и по време на релапс и изчезват при ремисия, което позволява използването им за мониторинг на MRD и възникване на релапс. Загуба-

та им по време на последния се свързва с вторичен левкемичен процес или на релапс от по-малък клетъчен клон. Асоциира се с добра прогноза в отсъствие на FLT3-ITD и DNMT3A мутации по отношение на отговор спрямо химиотерапевтични средства, постигане на пълна ремисия и обща преживяемост. Поради това пациентите с този подтип обикновено се подлагат на индукционна терапия вместо предпочитаната в други случаи алогенна трансплантация на ХСК. Персистирането на NPM1 мутациите през втория цикъл на химиотерапия обаче се обвързва с повишен риск от релапс и понижена обща преживяемост (21,26).

Мутация в FLT3 гена

Редно да се изясни значението на мутациите в FLT3 (FMS-like tyrosine kinase 3) в етиологично отношение. Въпреки че тези мутации не се обособяват в отделен подтип в класификацията на WHO в поправката ѝ от 2016 г., те се откриват в около 30% от всички новодиагностицирани пациенти с ОМЛ, включително при деца (23). FLT3 генът, намиращ се в цитолента 13q12.2 (12), се характеризира с широка експресия в хематопоеичните прогениторни клетки и в бластите (23). Генът кодира тип III тирозин-киназен рецептор, който при свързване с лиганд се активира и стимулира клетъчната пролиферация за сметка на процесите на диференциация и апоптоза. Съществуват два добре познати вида мутации - FLT3-ITD (internal tandem duplicates) и FLT3-TDK (tyrosine kinase domain). В основата си те имат сходен ефект – лиганд-независима активация на рецепторите (24). FLT3-ITD се откриват при 25% от новодиагностицираните пациенти с ОМЛ. Представяват различни по размер (3 до 1000 нуклеотида) in-frame дубликации в регион, отговарящ за инхибирането на сигнал в отсъствие на лиганд. FLT3-ITD се асоциират с лоша прогноза по отношение на възникване на релапс и обща преживяемост. Тук влияние оказват два допълнителни фактора – алено съотношение (allele ratio, AR) и комбинация с други мутации, например гореописаната NPM1. В зависимост от съотношението на наличните мутантни (FLT3-ITD) и див тип (FLT3-WT) алели - високо AR при FLT3-ITD:FLT3-WT $\geq$ 0.5 и ниско при FLT3-ITD:FLT3-WT $\leq$ 0.5. Високото AR се асоциира с висок риск, докато ниското - с добра прогноза при допълнителна NPM1 мутация или с интермедиерен риск при див тип NPM1. FLT3-TDK са характерни за 5% от новодиагностицираните с ОМЛ пациенти и представляват точкови мутации в ключов за рецепторната конформационна

стабилност участък. Тяхното прогностично значение засега е по-неясно и се определя от асоциираните мутации на хромозомно или генно ниво (23). Мутациите се доказват чрез PCR или NGS технологии, като AR се определя конкретно чрез PCR и затова засега той е по-застъпен в международните директиви – най-вече в European Leukemia Net (42). Случаите с доказани FLT3 мутации подлежат на прицелна терапия с малки молекулни FLT3-инхибитори, представени от множество препарати в две поколения. Прилагат се също хипометилиращи агенти, мултикиназни инхибитори, биологични агенти и др (23,24).

Биалелна мутация в СЕВРА

Самостоятелен подтип ОМЛ, характеризира се с генна мутация, е този с биалелна мутация в СЕВРА (ССААТ/enhancer binding protein α) гена. Среща се в 2-15% от случаите на *de novo* ОМЛ, като честотата при индивиди от азиатски произход е по-висока спрямо тези с европейски (53,61). Генът включва само екзони и е разположен в цитолента 19q13.1 (10). СЕВРА носи информация за транскрипционен фактор, свързан с функции като тъкан-специфична експресия и пролиферационен арест. По отношение на хематопоезата, влиянието му е концентрирано върху миеломоноцитната пролиферация и диференциация. Описани са множество различни мутации, които се обособяват в два основни типа – N- и C-терминални. Първите нарушават рамката на четене (frameshift mutations), а оттам и синтеза на дивия тип протеин. За негова сметка се синтезира нефункционална скъсена изоформа, оказваща доминантно-негативен ефект върху продукта на незасегнатия от мутация втори алел. C-терминалните мутации биват делеции и инсерции, които запазват рамката на четене (in-frame mutations), но засягат свързването с ДНК или необходимите конформационни промени. СЕВРА мутациите могат да бъдат моно-, биалелни и рядко хомозиготни, което определя фенотипната изява и прогнозата. Докато при моноалелните има известно количество див тип белтък и съответно експресия, то при другите две форми те липсват. Добрата прогноза обаче се свързва единствено с пациентите с доказана биалелна мутация в отсъствие на FLT3 мутация и на цитогенетични аберации. Известно е, че този подтип може да се наблюдава в различни комбинация с мутации в други протеин-кодиращи гени, като някои от тях повлияват прогнозата (61). Често се срещат например ко-възникващи мутации в епигенетични регулатори като ДНК-деметиращите TET2 (ten-eleven translocation methylcytosine

dioxygenase 2) гени – 40% от случаите с биалелна СЕВРА мутация имат и TET2 мутация, което се отразява негативно на общата преживяемост и на преживяемостта с липса на събития (event-free survival; EFS) (25). В същото време тумор-супресорният WT1 ген е с мутация в 30% от случаите с биалелна СЕВРА мутация, но това не променя прогнозата на пациентите. От транскрипционните фактори най-често срещана е ко-мутацията в GATA2 – 15-35% от случаите, като това подобрява продължителността на общата преживяемост и на EFS. По отношение на FLT3 гена по-често срещана е ко-мутацията FLT3-ITD – 15%, с негативен ефект върху прогнозата (61). В диагностичен план се съобщават трудности във връзка с насищането на GC-последователности в гена, което значително затруднява процесите на PCR и секвениране по Сангер. За разлика от тези методи, NGS би могъл да превъзмогне тези особености, но засега не се прилага достатъчно широко (32,53).

Мутация в RUNX1 гена

По-горе същността и функцията на RUNX1 бяха описани подробно, но е важно да се отбележи, че мутации в гена са често срещани в множество неопластични процеси, засягащи миелоидния и лимфоидния ред. Тези мутации се наблюдават както като соматични, така и като герминативни, наследствени, събития. Мутациите се описват като част от генезата на автозомно-доминантното заболяване FPD/AML (Familial platelet disorder with predisposition to AML), а също и на миелодиспластичен синдром (МДС), хронична миелоидна левкемия (ХМЛ) и Т-клетъчна остра лимфобластна левкемия (40). В контекста на ОМЛ, RUNX1 нарушения се срещат в 5.6-17.9% от случаите като цяло, с по-ниска честота при деца – 3%, и особено висока при вторична ОМЛ след МДС – 27.7% (61). Сред формите с НК се срещат в 16% от случаите (49). Мутациите са точкови, най-често моноалелни, някои от които оказват доминантно-негативен ефект. В общия случай се стига до загуба на функция (loss-of-function effect). Основно се засягат два региона – RHD (runt homology domain) и TAD (c-terminal transactivation domain). Засягат се съответно ДНК-свързващата повърхност или се синтезира протеин с липсващ съответен участък. Описаните мутации повлияват ключови процеси като клетъчен цикъл, ДНК-репарация, геномна стабилност, P53-медирана апоптоза, диференциация и матурация. Също така се асоциират с различни сигнални пътища, играещи роля в онкогенезата, както и повишена рез-

истентност към стрес (49,63). Мутацията често е в съчетание с други промени като мутации в FLT3, NRAS, TET2, DNMT3A гените. Асоциира се с лоша прогноза във връзка с химиотерапевтична резистентност, ниска обща преживяемост, преживяемост в отсъствие на събития (EFS) и обща преживяемост в отсъствие на релапс. Особено неблагоприятно е наличието ѝ в комбинация с ASXL1 или SRSF2 мутации, характерни по-начало за МДС. RUNX1 се използва като прогностичен маркер по отношение на EFS и обща преживяемост (63).

Мутация в DNMT3A гена

Важен елемент от генезата на ОМЛ са мутациите в DNMT3A (DNA methyltransferase 3 alpha), намиращ се в цитолента 2p23 (9). Те не са обособени като отделен подтип в класификацията на WHO от 2016 г., но се откриват в 20% от случаите. Тази честота нараства до 30-35% при ОМЛ с НК (36). Генът кодира метилтрансферазен ензим, участващ в епигенетичната регулация на генната експресия чрез метилиране на CpG динуклеотидни участъци. Пациентите обикновено са хетерозиготи по мутация в гена, като най-честа е missense мутацията R882H. Вследствие на тази промяна се постига доминантно-негативен ефект – инхибиция на метилтрансферазната активност на генния продукт на дивия тип алел с близо 80% чрез повлияване на способността за конформационни промени на белтъка. Това води до неадекватно понижена или повишена метилация на определени CpG участъци в генома на левкемичните клетки (47,64). Предполага се и повлияване на тумор-супресорни гени - например CDKN2B (36). DNMT3A мутациите са с негативно прогностично значение по отношение на отговор на стандартна индукция с химиотерапевтични средства, обща преживяемост, постигане на пълна ремисия и преживяемост в отсъствие на заболяване. Това се наблюдава с още по-изразена тенденция при НК и ко-мутации в NPM1 и FLT3-ITD, включително при пациенти след алогенна трансплантация на ХСК (2,64).

Мутация в BAALC гена

BAALC (brain and acute leukemia, cytoplasmic) е разположен на дългото рамо на хромозома 8 (8q22.3) и се експресира в норма в тъканите на ЦНС, в костния мозък, в невроектодермални тъкани и др. (15,62). Предполага се, че кодираните от него продукти участват в процесите на пролиферация, диференциация, клетъчна смърт и цитоскелетна функция и интегритет. Една от най-съществените мутации в гена, наречена Т-алел, създава свързващо място за тран-

скрипционния фактор RUNX1, което води до свръхекспресия на BAALC. Тази свръхекспресия се отчита в 28% от пациентите с ОМЛ, като се забелязва значително по-силна асоциация с по-слабо диференцираните подтипове (1,62). На молекулярно-генетично ниво се открива асоциация с NPM1 и вероятна такава с FLT3-ITD мутациите. Свръхекспресията на гена възпрепятства диференциацията на клетките от миелоидния ред и потиска процесите на апоптоза за сметка на усилената диференциация на неопластичните клетки. Мутациите в BAALC не са самостоятелни и обикновено се комбинират с такива в известни онкогени, което да тласне развитието на левкемичния процес (1). Асоциират се с неблагоприятен риск при пациенти с НК, както и при тези с налични хромозомни аберации, независимо от техния собствен прогностичен смисъл. Това се свързва със значителната резистентност на химиотерапевтични средства, високата честота на релапси и кратките EFS и обща преживяемост. Тези характеристики обуславят BAALC свръхекспресията като независим предиктивен маркер по отношение на първична резистентност и обща преживяемост (1,62).

Мутации в ASXL1

ASXL1 (Additional sex comb-like 1) участва в развитието на 5-17% случаите на ОМЛ. Често се асоциира с ОМЛ с миелодисплазия свързани промени и е разположен в цитолента 20q11 (4). Мутациите в него първоначално се асоциират с МДС, но впоследствие става ясно, че играят роля и в много други премалигнени и малигнени процеси, включително в ОМЛ (18). Генът кодира ядрен протеин с епигенетична регулаторна функция – лиганд-зависим ко-активатор на рецептора за ретиноева киселина, потенциално свързващ се с хистоновы модификатори (65). Обикновено мутациите са frameshift или nonsense и водят до скъсяване на протеина. Те упражняват ефекта си по механизма на loss-of-function, gain-of-function, хаплоинсуфициенция или доминантно-негативно спрямо дивия тип алел (18,43). Това води до абнормна генна експресия и допринася за развитието на неопластичния процес – ранни, но не и самостоятелни събития (18). Смята се обаче, че те ускоряват трансформацията на МДС и хронична миеломоноцитна левкемия в ОМЛ (42). Повечето проучвания стигат до извода, че мутации в гена по-често се срещат сред пациенти с НК. Установяват се ко-мутации в TET2 и DNMT3A, които не променят значително прогнозата в тези случаи (65). Също се отчитат ко-мутации в FLT3 и RUNX1, но не и в NPM1

(43). Те представляват негативен прогностичен маркер по отношение на обща преживяемост особено при НК и при пациенти над 60-годишна възраст (18,65). Освен ASLX1-мутациите, по отношение на ОМЛ с миелодисплазия свързани промени има единствен друг ген, и по-конкретно мутации в него, представляващи прогностичен маркер - тези в тумор-супресорния TP53 (43).

Мутации в гени, асоциирани с епигенетичен контрол

TET2, EZH2 (Enhancer of zeste homolog 2) и IDH1&2 (Isocytate dehydrogenase 1 & 2) са три допълнителни гена, свързани с епигенетична регулация, от една страна, и с ОМЛ, от друга. TET 2, намиращ се в цитолента 4q24 (6), кодира протеин с генно-регулаторна тумор-супресорна функция. Последната се осъществява посредством ДНК деметилиране. Мутации, водещи до загуба на тази функция, често се придобиват в хода на еволюция на МДС в ОМЛ, както и при миелопролиферативни неоплазми (57). Генният продукт на EZH2 (7q36) (45) е епигенетичен фактор с функция на тумор-супресор или на онкоген в различните видове неопластични процеси. При ОМЛ обикновено се касае за мутации, водещи до хиперметилация и загуба на функция, което обуславя и неблагоприятна прогноза по отношение на обща преживяемост и EFS (58). Макар и EZH2 да не е самостоятелен прогностичен маркер, това важи особено при ко-мутации в двата гена и в RUNX1 (50). Нарушенията в TET2 и EZH2 водят до засягане на хистоновата модификация и до хромозомна нестабилност. Последната от своя страна предразполага към грешки при репликация посредством влияние върху протеини като MAD2 и CDC20, контролиращи ключови етапи в митотичното делене, и анеуплоидии (57). Също така мутациите в EZH2 повишават значително химиотерапевтичната резистентност при ОМЛ (50).

IDH1 и IDH2 са разположени съответно в цитоленти 2q34 и 15q26.1 (13). Кодираните от тях ензими вземат участие в множество метаболитни процеси, както и в такива на епигенетична регулация. Мутациите в тези два гена са взаимно изключващи се и представляват ранни генетични събития в около 20% от случаите на ОМЛ (17). Тази честота варира в различните възрастови групи – 0-4% при деца и 6-19% при възрастни (52). Мутациите често се комбинират с НК, но се изключват взаимно с мутации в TET2. Нарушенията водят до формиране на онкометаболизма 2-хидроксиглутарат и последваща хипермерилация на ДНК. Също така се повлияват процеси-

те на генна експресия, клетъчна пролиферация и диференциация. Наличието на тези мутации се асоциира с понижена обща преживяемост според някои автори (17), но тази прогноза значително се подобрява при млади пациенти с наличие на ко-мутации в NPM1 (52).

Освен инициалното му значение за предиспозиция към добре познатия тумор на Вилмс и други състояния с бъбречно засягане, Wilms Tumor 1 (WT1) всъщност има роля и в други форми на неоплазия. В норма генът играе роля в развитието на отделителната система, гонадите, а също така в екстрамедуларната хематопоеза. WT1 се характеризира с множество изоформи и интеракции с други гени, сред които TP53, TET2 и TET3. Отчита се повишена експресия при остри левкемии, включително при повечето случаи на ОМЛ. WT1 се характеризира с мутации с 6-15% от новодиагностицираните пациенти с ОМЛ и е честа асоциация с мутации в FLT3 (ITD) и CEBPA. Мутациите най-често засягат 1,7, и 9 екзон и са тип loss-of-function. Конкретната роля в левкемогенния процес все още не е напълно изяснена, но се предполага медиране посредством хиперметилация, а също спомагане на ефекта на други възникнали събития например гореописаната RUNX1-RUNX1T1 фузия. Тази свръхекспресия е лош прогностичен маркер, като се асоциира с терапевтична резистентност, повишен риск за възникване на релапс и ниска обща преживяемост, включително в педиатричната група пациенти (44,59).

ДИСКУСИЯ

Обсъжданите по-горе генетични събития, отразяващи се в нарушение на различни звена на клетъчните процеси или липсата им с отчитане на див тип, представляват молекулярно-генетични маркери. Това наличие или отсъствие допринася за разбиране, уточняване, предвиждане, овладяване и мониториране на неопластичния процес. Прилагането на маркери с тази цел, както и за подобряване на подхода към даден пациент, е в същината на т.нар персонализирана медицина (55). Рутинно използваните класификации, като тези на WHO и ELN например, инкорпорират някои маркери вследствие на тяхното дългогодишно картиране, проучване и впоследствие утвърждаване като значими за разбиране на силно хетерогенната ОМЛ.

Изброените в таблицата генетични находки потвърждават значението на хромозомните устройства и генните мутации, които присъстват

и в класификацията на WHO от 2016 г., вече описани по-горе в текста. Прави впечатление наличието на най-много изброени характерни генетични промени в третата графа на таблицата, т.е. към неблагоприятния риск. Според някои автори тази стратификация може да се окаже недостатъчна, особено що се отнася до по-възрастните пациенти над 55-годишна възраст, които всъщност представляват по-голяма част от контингента засегнати (42). Това предполага необходимостта от обогатяване с повече генетични и цитогенетични маркери извън рамките на така обновената стратификация и те най-вероятно ще бъдат инкорпорирани в нейната следваща версия. За момента ELN препоръчва към рутинния цитогенетичен анализ да се извършва скрининг на минимум шест молекулярно-генетични маркера при новодиагностицирани с ОМЛ пациенти - FLT3, NPM1, CEBPA, RUNX1, TP53, ASXL1, както и за следните генни фузии PML-RARA, CBFB-MYH11, RUNX1-RUNX1T1 и BCR-ABL1 (16,29). NCCN (National Comprehensive Cancer Network) от своя страна се припокрива в препоръката си с посочените от ELN гени и добавя IDH1, IDH2 и c-KIT. Съществена разлика между двете системи обаче е включването на пациенти с CBF мутация, по презумпция причислени към групата с благоприятен риск според ELN, към групата на интермедиерния риск, когато е в съчетание с c-KIT - според NCCN (29). Съдейки по коментираните по-горе честота и значение, би било уместно да се изследват не само препоръчаните от ELN, а също и гени като DNMT3A, IDH1, IDH2, WT1, TET2 и др. Подборът на изследвани гени и генни фузии, естествено, би следвало да бъде съобразен с различни фактори, като на първо място стои въз-

растовата група. На табл. 2 са представени някои от най-често използваните в клинично-диагностичния процес молекулярно-генетични маркери на фона на прогностично значимата за тях цитогенетична конфигурация.

Така представени, маркерите изискват, от една страна, предварително или успоредно изяснен кариотип, а от друга - подходящ молекулярно-генетичен метод, който да успее да регистрира конкретния вид мутация според нейния тип и размер. Известно е също обичайното съчетание между две и повече мутации при един и същ пациент, което предполага целенасочено търсене на повече мутации, дори и след открита единична значима такава (60). Това би могло да означава комбинация от няколко молекулярно-генетични метода предвид наличието на известни ограничения при всеки от тях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ОМЛ като неопластичен процес е последствие от съвкупност от възникнали на различен етап генетични събития на ниво прогениторна клетка от миелоидния ред. Разнообразието на тези събития прави диагностиката, подбора на терапевтични средства и мониторирането на пациентите особено сложен процес. Познаването на генетичния фон на всеки индивидуален случай е ключово за максималното персонализиране на подхода при тези пациенти. От генетико-лабораторна гледна точка това предполага внедряването на комбинация от генетични методи с различна разрешителна способност, предимства и недостатъци, с цел максимален обхват на генетичните маркери.

Табл. 2. Значими молекулярно-генетични маркери с прогностично значение в комбинация с конкретен кариотип (Адаптирано по Weinberg et al, 2017) (60)

Молекулярно-генетичен маркер	Придружаващ кариотип	Прогностично значение
Мутация в KIT	t(8;21)(q22;q22.1)	Неблагоприятно
FLT3-ITD	Нормален	Неблагоприятно
Биалелна мутация в CEBPA	Нормален	Благоприятно
Единична мутация в CEBPA	Нормален	Неблагоприятно в сравнение с биалелните мутации в гена
Мутация в NPM1 без FLT3-ITD	Нормален	Благоприятно
Мутация в RUNX1	Нормален	Неблагоприятно
Мутация в WT1	Нормален	Неблагоприятно
Мутация в TET2	Нормален	Неблагоприятно
Мутация в ASXL1	Нормален	Неблагоприятно
Мутация в DNMT3A	Нормален	Неблагоприятно
Мутация или делеция на TP53	Комплексен	Неблагоприятно

ЛИТЕРАТУРА

1. Алексов Е., Спасов Б., Балащенко Г. Значението на BAALC гена при развитието на неопластичните заболявания на миелоидната редица. Хематология, 2020; LVI;1-2; 3-8.
2. Ahn JS, Kim HJ, Kim YK, Lee SS, Jung SH, Yang DH, et al. DNMT3A R882 Mutation with FLT3-ITD Positivity Is an Extremely Poor Prognostic Factor in Patients with Normal-Karyotype Acute Myeloid Leukemia after Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. Biol Blood Marrow Transplant. 2016;22(1):61-70.
3. Arber D, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz M, Le Beau M, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. Blood 2016; 127 (20): 2391–2405.
4. Asada, S, Kitamura, T. Aberrant histone modifications induced by mutant ASXL1 in myeloid neoplasms. Int J Hematol. 2019;110;:179–186.
5. Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol [Internet]. Douet-Guilbert N, Le Bris MJ, Basinko A, Morel F, De Braekeleer M, De Braekeleer E. inv(3)(q21q26) RPN1/MECOM. [updated 2012 Dec 1, cited 2022 May 30]. Available from: [https://atlasgeneticsoncology.org/haematological/1623/inv\(3\)\(q21q26\)-rpn1-mecom](https://atlasgeneticsoncology.org/haematological/1623/inv(3)(q21q26)-rpn1-mecom)
6. Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol [Internet]. Franck Viguié. TET2 (tet methylcytosine dioxygenase 2). [updated 2014 Aug 1, cited 2022 May 30]. Available from: [https://atlasgeneticsoncology.org/gene/40597/tet2-\(tet-methylcytosine-dioxygenase-2\)](https://atlasgeneticsoncology.org/gene/40597/tet2-(tet-methylcytosine-dioxygenase-2))
7. Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol [Internet]. Huret, JL. T(6;9)(p23;q34) DEK/NUP214. [updated 2013 Apr 1, cited 2022 May 30]. Available from: [https://atlasgeneticsoncology.org/haematological/1014/t\(6;9\)\(p22;q34\)-dek-nup214](https://atlasgeneticsoncology.org/haematological/1014/t(6;9)(p22;q34)-dek-nup214)
8. Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol [Internet]. Knijnenburg J, Knijnenburg J, t(9;11)(p21;q23) KMT2A/MLLT3. [updated 2016 Mar 1, cited 2022 May 30]. Available from: [https://atlasgeneticsoncology.org/haematological/1001/t\(9;11\)\(p21;q23\)](https://atlasgeneticsoncology.org/haematological/1001/t(9;11)(p21;q23))
9. Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol [Internet]. Kuo YY, Li LY, Tien HF. DNMT3A (DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 alpha). [updated 2013 Mar 1, cited 2022 May 30]. Available from: <https://atlasgeneticsoncology.org/gene/40349/dnmt3a>
10. Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol [Internet]. TV Tian, T Graf. CEBPA (CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha). [updated 2014 Jul 1, cited 2022 May 30]. Available from: <https://atlasgeneticsoncology.org/gene/40050/cebpa>
11. Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol [Internet]. Poddighe PJ, Weghuis DO, t(15;17)(q24;q21) PML/RARA. [updated 2016 Mar 1, cited 2022 May 30]. Available from: [https://atlasgeneticsoncology.org/haematological/1035/t\(15;17\)\(q24;q21\)-pml-rara](https://atlasgeneticsoncology.org/haematological/1035/t(15;17)(q24;q21)-pml-rara)
12. Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol [Internet]. Schnittger, S. FLT3 (FMS-like tyrosine kinase 3). [updated 2005 Jun 1, cited 2022 May 30]. Available from: [https://atlasgeneticsoncology.org/gene/144/flt3-\(fms-like-tyrosine-kinase-3\)](https://atlasgeneticsoncology.org/gene/144/flt3-(fms-like-tyrosine-kinase-3))
13. Bergaggio E, Piva R. Wild-Type IDH Enzymes as Actionable Targets for Cancer Therapy. Cancers (Basel). 2019;11(4):563.
14. Box J, Paquet, N, Adams M, Boucher D, Bolderson E, O'Byrne K, et al. Nucleophosmin: from structure and function to disease development. BMC Molecular Biol. 2016;17(1):19.
15. Cancer Genetics Web [Internet]. Cotterill SJ, BAALC [Updated 31 Aug; cited 27 May 2022]. Available from: <https://www.cancer-genetics.org/BAALC.htm>
16. Döhner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. Blood. 2017;129(4):424–447.
17. ElNahass YH, Badawy RH, ElRefaey FA, Nooh HA, Ibrahim D, Nader HA, et al. IDH Mutations in AML Patients; A higher Association with Intermediate Risk Cytogenetics. Asian Pac J Cancer Prev. 2020;21(3):721-725.
18. Fujino T, Kitamura T. ASXL1 mutation in clonal hematopoiesis. Exp Hematol. 2020;83:74–84.
19. Gene Help [Internet]. Murphy M, Brown G, Wallin C, Tatusova T, Pruitt P, Murphy T, et al. Integrated Access to Genes of Genomes in the Reference Sequence Collection. 2006 Sep 13. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2005-. [Updated 2021 Feb 1; cited 2022 May 30]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK3841/>
20. Gong X, Yu T, Tang Q, Fu Y, Wu J, Zhu Y, et al. Unusual findings of acute myeloid leukemia with inv(3)(q21q26.2) or t(3;3)(q21;q26.2): A multicenter study. Int J Lab Hematol. 2019; 41: 380– 386.
21. Heath EM, Chan SM, Minden MD, Murphy T, Shlush LI, Schimmer AD. Biological and clinical consequences of NPM1 mutations in AML. Leukemia. 2017;31(4):798-807.
22. Hirsch P, Zhang Y, Tang R, Joulin V, Boutroux H, Pronier E, et al. Genetic hierarchy and temporal variegation in the clonal history of acute myeloid leukaemia. Nat Commun.2016;7:12475.
23. Kennedy VE, Smith CC. FLT3 Mutations in Acute Myeloid Leukemia: Key Concepts and Emerging Controversies. Front. Oncol.2020;10:612880.

24. Kiyoi H, Kawashima N, Ishikawa Y. FLT3 mutations in acute myeloid leukemia: Therapeutic paradigm beyond inhibitor development. *Cancer Sci.* 2020 Feb;111(2):312-322.
25. Konstandin, NP, Pastore F, Herold T, Dufour A, Rothenberg-Thurley M, Hinrichsen, T, et al. Genetic heterogeneity of cytogenetically normal AML with mutations of CEBPA. *Blood Advances.* 2018;2:2724–2731.
26. Kunchala P, Kuravi S, Jensen R, McGuirk J, Balusu R. When the good go bad: Mutant NPM1 in acute myeloid leukemia. *Blood Rev.* 2018;32(3):167-183.
27. Labrador J, Luño E, Velleng, E, Brunet S, González-Campos J, Chillón MC, et al. Clinical significance of complex karyotype at diagnosis in pediatric and adult patients with de novo acute promyelocytic leukemia treated with ATRA and chemotherapy. *Leukemia & lymphoma,* 2019;60(5):1146–1155.
28. Ladines-Castro W, Barragán-Ibañez G, Luna-Pérez MA, Santoyo-Sánchez A, Collazo-Jaloma J, Mendoza-García E, et al. Morphology of leukaemias. *Rev Med Hosp Gen Mex.* 2016;79(2):107-113
29. Leisch M, Jansko B, Zaborsky N, Greil R, Pleyer L. Next Generation Sequencing in AML-On the Way to Becoming a New Standard for Treatment Initiation and/or Modulation? *Cancers (Basel).* 2019;11(2):252.
30. Liquori A, Ibañez M, Sargas C, Sanz MÁ, Barragán E, Cervera J. Acute Promyelocytic Leukemia: A Constellation of Molecular Events around a Single PML-RARA Fusion Gene. *Cancers.* 2020;12(3):624.
31. Lv L, Yu J, Qi Z. Acute myeloid leukemia with inv(16)(p13.1q22) and deletion of the 5'MYH11/3'CBFB gene fusion: a report of two cases and literature review. *Mol Cytogenet.* 2020;13:4.
32. Mannelli F, Ponziani V, Bencini S, Bonetti MI, Benelli M, Cutini I, et al. CEBPA-double-mutated acute myeloid leukemia displays a unique phenotypic profile: a reliable screening method and insight into biological features. *Haematologica.* 2017;102(3):529-540.
33. Marques-Piubelli ML, Cordeiro MG, Cristofani L, Barroso RS, Paes VR, Castelli JB, et al. Acute megakaryoblastic leukemia with t(1;22)(p13.3;q13.1); RBM15-MKL1 mimicking hepatoblastoma in an infant: The role of karyotype in differential diagnosis. *Pediatr Blood Cancer.* 2020;67(3):e28111.
34. Mueller D, García-Cuellar MP, Bach C, Buhl S, Maethner E, Slany RK. Misguided transcriptional elongation causes mixed lineage leukemia. *PLoS biology.* 2009;7(11):e1000249.
35. Nair M, Sandhu SS, Sharma AK, Cancer molecular markers: A guide to cancer detection and management, *Seminars in Cancer Biology.* 2018;52(1):39-55.
36. Park DJ, Kwon A, Cho BS, Kim HJ, Hwang KA, Kim M, et al. Characteristics of DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *Blood Res.* 2020;55(1):17-26.
37. PathologyOutlines.com website [Internet]. Gu S, Siddon AJ. AML with t(8;21)(q22;q22). [updated 2021 Dec 16, cited 2022 May 30]. Available from: <https://www.pathologyoutlines.com/topic/leukemiaAMLwitht821q22q22.html>
38. PathologyOutlines.com website [Internet]. Hamnvåg HM, Mirza KM. AML (megakaryoblastic) with t(1;22)(p13.3;q13.1). [updated 2021 Dec 16, cited 2022 May 30] Available from: <https://www.pathologyoutlines.com/topic/bonemarrowneoplasticAMLmegakaryoblastic.html>
39. PathologyOutlines.com website [Internet]. Mihova D. AML with t(9;11)(p22;q23). [updated 2022 Mar 24, cited 2022 May 30] Available from: <https://www.pathologyoutlines.com/topic/leukemiaaml11q23.html>
40. PathologyOutlines.com website [Internet]. Mihova D. AML with t(6;9)(p23;q34). [updated 2021 Dec 16, cited 2022 May 30] Available from: <https://www.pathologyoutlines.com/topic/leukemiaAMLt69.html>
41. PathologyOutlines.com website [Internet]. Odetola O, Mirza KM. AML with inv(3)(q21.3;q26.2) or t(3;3)(q21.3;q26.2). [updated 2022 Feb 2, cited 2022 May 30] Available from: <https://www.pathologyoutlines.com/topic/bonemarrowneoplasticAMLinv3q21q26.html>
42. Pogossova-Agadjanyan EL, Moseley A, Othus M, Appelbaum F, Chauncey T, Chen IML, et al. AML risk stratification models utilizing ELN-2017 guidelines and additional prognostic factors: a SWOG report. *Biomark Res.* 2020;8:29.
43. Prats-Martín C, Burillo-Sanz S, Morales-Camacho RM, Perez-Lopez O, Suito M, Vargas MT, et al. ASXL1 mutation as a surrogate marker in acute myeloid leukemia with myelodysplasia-related changes and normal karyotype. *Cancer Med.* 2020; 9: 3637– 3646.
44. Rampal R, Figueroa ME. Wilms tumor 1 mutations in the pathogenesis of acute myeloid leukemia. *Haematologica.* 2016;101(6):672-679.
45. Rinke J, Chase A, Cross NCP, Hochhaus A, Ernst T. EZH2 in Myeloid Malignancies. *Cells.* 2020;9(7):1639.
46. Sandahl JD, Coenen EA, Forestier E, Harbott J, Johansson B, Kerndrup G, et al. t(6;9)(p22;q34)/DEK-NUP214-rearranged pediatric myeloid leukemia: an international study of 62 patients. *Haematologica.* 2014;99(5):865–872.
47. Sandoval JE, Huang YH, Muise A, Goodell MA, Reich NO. Mutations in the DNMT3A DNA methyltransferase in acute myeloid leukemia

- patients cause both loss and gain of function and differential regulation by protein partners. *J Biol Chem.* 2019;294(13):4898-4910.
48. Al-Harbi S, Aljurf M, Mohty, Almohareb F, Ahmed SOA; An update on the molecular pathogenesis and potential therapeutic targeting of AML with t(8;21)(q22;q22.1);RUNX1-RUNX1T1. *Blood Adv* 2020; 4(1):229-238.
49. Sood R, Kamikubo Y, Liu P. Role of RUNX1 in hematological malignancies. *Blood.* 2017;129(15):2070-2082.
50. Stasik S, Middeke JM, Kramer M, Röllig C, Krämer A, Scholl S, et al. EZH2 mutations and impact on clinical outcome: an analysis in 1,604 patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia [Internet]. *Haematologica.* 2020 [cited 2022 May 30]. Available from: <https://www.haematologica.org/article/view/9408>
51. Strimbu K, Tavel JA, What are biomarkers? *Curr. Opin. HIV AIDS.* 2010; 5(6):463-466
52. Study Offers Insights on Prognostic Significance of IDH Mutations Across Age Groups in AML. *The Oncol.* 2021;26:S13-S14.
53. Su L, Tan Y, Lin H, Liu X, Yu L, Yang Y, et al. Mutational spectrum of acute myeloid leukemia patients with double CEBPA mutations based on next-generation sequencing and its prognostic significance. *Oncotarget.* 2018;9:24970-24979.
54. Vakiti A, Mewawalla P. Acute Myeloid Leukemia. [Updated 2020 Nov 21]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 Jan-. [cited 2022 June 21 Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507875/>
55. Verma M. Personalized medicine and cancer. *J Pers Med.* 2012;2(1):1-14.
56. Walter CU, Mohareb FA, Chaudhri N, Alsharif F, Zahrani HA, Mohamed S, et al. The t(9;11) confers good prognosis in AML patients treated with stem cell transplantation as compared to non-t(9;11) and other adverse-risk abnormalities. *Hematology/oncology and stem cell therapy.* 2012;5(3):169-170.
57. Wang, J, He N, Wang R, Tian T, Han F, Zhong F, et al. Analysis of TET2 and EZH2 gene functions in chromosome instability in acute myeloid leukemia. *Sci Rep.* 2021;10:2706
58. Wang R., Gao X. & Yu L. The prognostic impact of tet oncogene family member 2 mutations in patients with acute myeloid leukemia: a systematic-review and meta-analysis. *BMC Cancer.* 2019;19:389
59. Wang Y, Weng WJ, Zhou DH, Fang JP, Mishra S, Chai L, et al. *Wilms Tumor 1* Mutations Are Independent Poor Prognostic Factors in Pediatric Acute Myeloid Leukemia. *Front Oncol.* 2021;11:632094.
60. Weinberg OK, Sohani AR, Bhargava P, Nardi V. Diagnostic work-up of acute myeloid leukemia. *Am J Hematol.* 2017;92(3):317-321.
61. Wilhelmson AS and Porse BT. CCAAT enhancer binding protein alpha (CEBPA) biallelic acute myeloid leukaemia: cooperating lesions, molecular mechanisms and clinical relevance. *Br J Haematol.* 2020;190:495-507.
62. Xiao SJ, Shen JZ, Huang JL, Fu HY. Prognostic significance of the BAALC gene expression in adult patients with acute myeloid leukemia: A meta-analysis. *Mol Clin Oncol.* 2015;3(4):880-888.
63. Yokota A, Huo L, Lan F, Wu J, Huang G. The Clinical, Molecular, and Mechanistic Basis of RUNX1 Mutations Identified in Hematological Malignancies. *Mol Cells.* 2020;43(2):145-152.
64. Yuan, XQ, Chen, P, Du YX, Zhu KW, Zhang DY, Yan H, et al. Influence of DNMT3A R882 mutations on AML prognosis determined by the allele ratio in Chinese patients. *J Transl Med.* 2020;17:220.
65. Lin Y, Wang Y, Zheng Y, Wang Z, Wang Y, Wang S. Clinical characteristics and prognostic study of adult acute myeloid leukemia patients with ASXL1 mutations, *Hematology.* 2020;25(1):446-456.
66. Zhou F, Liu, Y, Rohde C, Pauli C, Gerloff D, Köhn M, et al. AML1-ETO requires enhanced C/D box snoRNA/RNP formation to induce self-renewal and leukaemia. *Nature cell biology.* 2020;19(7):844-855.
67. Zinzuwadia S, Mittal A, Raouf MF, Gupta R, Kini AR. AML with inv(16)(p13.1;q22) or t(16;16)(p13.1;q22). [updated 2022 Mar 24; cited 2022 June 21]. *PathologyOutlines.com website [Internet]. Available from: <https://www.pathologyoutlines.com/topic/leukemiainv16.html>*

Адрес за кореспонденция:

Диннар Яхя
Катедра по медицинска генетика
ул. „Марин Дринов“ 55
Варна, 9000
e-mail: yahyadinna@gmail.com