

Ελάχιστη Υπολειμματική Νόσος στην ΟΜΛ Μεθοδολογία Ανίχνευσης και Κλινική Σημασία

Χριστίνα Παπαδάκη¹, Μαρία Γαροφαλάκη², Αικατερίνη Ψαρρά³

ΠΕΡΙΛΗΨΗ: Σημαντικές προσπάθειες ευρίσκονται σε εξέλιξη για την ταυτοποίηση προγνωστικών παραγόντων κινδύνου και την εκτίμηση της προγνωστικής αξίας της παρακολούθησης της ελάχιστης υπολειμματικής νόσου (ΕΥΝ) στην οξεία μυελογενή λευχαιμία (ΟΜΛ). Η ανίχνευση της ΕΥΝ είναι μείζονος σημασίας διότι εκτιμά το «βάθος» της ύφεσης και επομένως καθιστά δυνατή την εξαρτώμενη από τον κίνδυνο θεραπεία που βασίζεται στην έγκαιρη ανίχνευση της υποτροπής. Εργαστηριακές τεχνικές όπως η πολυπαραμετρική κυτταρομετρία ροής και η PCR επιτρέπουν τον προσδιορισμό των λευχαιμικών κυττάρων, που παραμένουν κάτω από τα επίπεδα της ευαισθησίας ανίχνευσης με μορφολογικά κριτήρια. Η παρούσα ανασκόπηση παρουσιάζει τον ανοσοφαινότυπο με κυτταρομετρία ροής και την ποσοτική PCR, τα χαρακτηριστικά τους, τα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματά τους στην ανίχνευση της ΕΥΝ, καθώς και τα διαθέσιμα αποτελέσματα από τις κλινικές δοκιμές εφαρμογής των μεθόδων αυτών στην ανίχνευση της ΕΥΝ. Ωστόσο η βασιζόμενη στην ανίχνευση της ΕΥΝ θεραπεία μέχρι σήμερα περιορίζεται στην οξεία προμυελοκυτταρική λευχαιμία, διότι οι διαφορές στις μεθόδους, η έλλειψη προτυπωμένων ουδών και χρονικών διαστημάτων προσδιορισμού της ΕΥΝ περιορίζει την κλινική χρησιμότητα της παρακολούθησης της ΕΥΝ αν και ήδη εφαρμόζεται σε όλον τον κόσμο. Επομένως απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για τη διερεύνηση της κλινικής της χρησιμότητας, για την προτύπωση των κατάλληλων μεθόδων, ώστε να καταστεί δυνατή η ταυτοποίηση της ομάδας ασθενών με μεγαλύτερο κίνδυνο υποτροπής και η αντίστοιχη έγκαιρη θεραπευτική παρέμβαση.

Haema 2017; 8(2): 179-187 Copyright EAE

Εισαγωγή

Η οξεία μυελογενής λευχαιμία (ΟΜΛ) είναι ένα νόσημα που χαρακτηρίζεται από μεγάλη κλινική, μορφολογική και μοριακή ετερογένεια. Σημαντική πρόοδος έχει επιτευχθεί τα τελευταία 30 έτη, στην κατανόηση της παθοφυσιολογίας των αιματολογικών κακοηθειών. Με τις σύγχρονες θεραπείες, τη μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων (ΜΑΚ) και την υποστηρικτική αγωγή, τα ποσοστά πλήρους ύφεσης (ΠΥ) φτάνουν το 50% έως και

80%^{1,2} στους ενήλικες ασθενείς. Παρά τα μεγάλα αυτά ποσοστά ΠΥ, 50% των ασθενών θα υποτροπιάσει λόγω της παραμονής μικρού αριθμού λευχαιμικών κυττάρων, τα οποία διαφεύγουν της θεραπείας και παραμένουν στο μυελό των οστών. Η παρουσία λευχαιμικών κυττάρων $<1 \times 10^{10}$ που είναι το κατώτατο όριο ανίχνευσης της νόσου με μορφολογικά κριτήρια, ορίζεται διεθνώς ως ελάχιστη υπολειμματική νόσος (ΕΥΝ), για την ανίχνευση της οποίας την τελευταία δεκαετία έχουν αναπτυχθεί πολλές τεχνικές υψηλής ευαισθησίας.^{3,4}

Η ανίχνευση της ΕΥΝ στην ΟΜΛ παίζει καθοριστικό ρόλο: α) στον έλεγχο της αποτελεσματικότητας της θεραπείας και κατ'επέκταση στην εξατομίκευσή της, ιδιαίτερα στην ομάδα «σταθερού κινδύνου», όπου η ανταπόκριση στη θεραπεία παρουσιάζει μεγάλη ετερογένεια, β) στην ταυτοποίηση ασθενών με μεγαλύτερο κίνδυνο υποτροπής^{3,5,6}, γ) στην αναγνώριση ασθενών που θα ωφεληθούν από τη ΜΑΚ και δ) στην εκτίμηση της αποτελεσματικότητας νέων θεραπειών.

Για την παρακολούθηση της ΕΥΝ οι μέθοδοι που

¹Αιματολόγος, Επιμελήτρια Α', Αιματολογική Κλινική, ΓΝΑ «Γ. Γεννηματάς»

²Βιολόγος, Υπεύθυνη εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας Αιματολογική-Λεμφοματών Κλινική και Μονάδα Μεταμόσχευση Μυελού των Οστών, ΓΝΑ «Ο Ευαγγελισμός»

³Χημικός PhD, Τμήμα Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας, ΓΝΑ «Ο Ευαγγελισμός»

Συγγραφέας υπεύθυνος για επικοινωνία: Χριστίνα Παπαδάκη, Αιματολόγος, Επιμελήτρια Α', Αιματολογική Κλινική, ΓΝΑ «Γ. Γεννηματάς», Λ. Μεσογείων 154, 115 27 Αθήνα, Τηλ.: +30 210 7470473, Fax: +30 210 7470473, E-mail: cparadaki@hotmail.com

χρησιμοποιούνται θα πρέπει να πληρούν τις ακόλουθες προϋποθέσεις: α) να έχουν ευαισθησία που να αγγίζει το 10^{-4} - 10^{-5} , β) να μπορούν να εφαρμοστούν στο μεγαλύτερο μέρος των ασθενών που αντιμετωπίζονται με το ίδιο ή σχετικό θεραπευτικό πρωτόκολλο, γ) να έχουν υψηλή επαναληψιμότητα και δ) να υπάρχει η δυνατότητα για διεργαστηριακή προτύπωση των πρωτοκόλλων και έλεγχου ποιότητας.

Δύο τεχνικές ικανοποιούν τις περισσότερες από αυτές τις απαιτήσεις σήμερα: ο ανοσοφαινότυπος με κυτταρομετρία ροής (KP) και η ανίχνευση μοριακών δεικτών με PCR.

Ανοσοφαινότυπος - Κλινική σημασία

Οι κυτταρομετρικές τεχνικές για την ταυτοποίηση της EYN είναι διαθέσιμες, αλλά ούτε ο ποσοτικός ούτε ο ποιοτικός ανοσοφαινότυπος προσδιορισμός της EYN δεν έχει προτυπωθεί πλήρως μέχρι σήμερα σαν μέρος της παρακολούθησης της OMA μετά από θεραπεία. Η ανίχνευση της EYN στην OMA με πολυπαραμετρική κυτταρομετρία ροής (multiparameter flow cytometry – MFC) παρουσιάζει κάποιες ειδικές δυσκολίες, που οφείλονται στην ανοσοφαινότυπική ετερογένεια της OMA. Τα κύτταρα της OMA συνήθως απλώνονται σε πολλές περιοχές του στικτογράμματος (dot plot) αντί να σχηματίζουν ένα στενό σύμπλεγμα (cluster), όπως στην περίπτωση της Οξείας Λεμφοβλαστικής Λευχαιμίας (ΟΛΛ), που είναι συνήθως ομοιογενής. Είναι επίσης σύνηθες τα κύτταρα της OMA να αποτελούνται από περισσότερους του ενός πληθυσμούς και μετά τη θεραπεία να αναδύεται ένας από τους πληθυσμούς αυτούς. Τα άτυπα πρότυπα έκφρασης αντιγόνων στους λευχαιμικούς βλάστες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον καθορισμό του σχετιζόμενου με τη λευχαιμία ανοσοφαινότυπου (leukemia associated immunophenotype – LAIP) για τους ασθενείς με OMA στη διάγνωση και μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη συνέχεια για την ανίχνευση του κακοήθους πληθυσμού στην παρακολούθηση των ασθενών. Το σημείο αναφοράς για την αναγνώριση του έκτοπου φαινότυπου είναι η φυσιολογική ωρίμανση. Επομένως το μοναδικό σημαντικό προαπαιτούμενο για αυτόν τον τύπο ανάλυσης είναι η λεπτομερής γνώση της φυσιολογικής αντιγονικής έκφρασης κατά την ωρίμανση. Ωστόσο διαταραχές παρατηρούνται και σε άλλες μη νεοπλασματικές καταστάσεις καθώς και μετά από χορήγηση θεραπείας και είναι σημαντική η κατανόηση αυτών των καταστάσεων. Για την OMA οι ατυπίες, που περιγράφονται συμπεριλαμβάνουν τα εξής: α) ασύγχρονη αντιγονική έκφραση δηλ. ταυτόχρονη έκφραση αώρων και ώριμων δεικτών στο ίδιο κύτταρο, όπως η συνέκφραση του CD34 και του CD15. β) έκφραση δείκτη άλλης κυτταρικής σειράς, δηλ. έκφραση δεικτών της λεμφικής σειράς και πιο συγκεκριμένα των CD2, CD5, CD7, CD10, CD19 στους βλάστες μυελικής σειράς,

γ) υπερέκφραση αντιγόνου, δηλ. παθολογικά αυξημένη έκφραση συγκεκριμένου αντιγόνου ανά κύτταρο, δ) μη αναμενόμενες ιδιότητες σκέδασης, που περιλαμβάνουν την έκφραση λεμφικών αντιγόνων σε βλαστικά κύτταρα με υψηλή ευθεία και πλάγια σκέδαση, που αντιστοιχούν στα φυσιολογικά μυελοειδή κύτταρα και ε) απουσία έκφρασης ειδικών για την κυτταρική σειρά αντιγόνων, που περιλαμβάνει απουσία των αναμενόμενων αντιγόνων, όπως τα CD13, CD33 στους μυελικούς βλάστες.

Η στρατηγική για τις μελέτες της EYN στην OMA με MFC βασίζεται στα παρακάτω στάδια:

1) ταυτοποίηση του μοναδικού ανοσοφαινότυπου με πολυχρωματική χρώση. Ο ανοσοφαινότυπος με MFC ακολουθεί τις συνήθεις κατευθυντήριες οδηγίες, όπως έχουν ήδη αναπτυχθεί.⁷ Είναι επιθυμητή η χρήση κατά το δυνατόν μεγαλύτερου αριθμού φθορίζουσών ουσιών, και η χρήση κοινών δεικτών σε όλα τα σωληνάρια, απαραίτητα του CD45 και ενδεχομένως των CD34, CD117.

2) καθορισμό του/των ειδικών για τον ασθενή LAIPs. Η ποιότητα ενός LAIP εξαρτάται από τα παρακάτω χαρακτηριστικά του.

Η ειδικότητα εξαρτάται από το ποσοστό έκφρασης του σε φυσιολογικά κύτταρα (στις περισσότερες περιπτώσεις η έκφραση αυτή είναι <0,1%). Υψηλή ειδικότητα μπορεί να επιτευχθεί αν συμπεριληφθούν δείκτες προγονικών κυττάρων (CD133, CD34, CD117), αν υπάρχουν στη συγκεκριμένη OMA.

Η ευαισθησία εξαρτάται μεταξύ άλλων από το ποσοστό έκφρασης του LAIP στο λευχαιμικό βλαστικό πληθυσμό στη διάγνωση και από τον αριθμό των κυττάρων που αναλύθηκαν. Για το λόγο αυτό μόνο LAIPs με ποσοστό >10% λαμβάνονται υπ' όψη (υψηλής ευαισθησίας θεωρείται η έκφραση >50%, μέσης ευαισθησίας 20-50%, χαμηλής 10-20%).

Η σταθερότητα διότι οι LAIPs μπορεί να υποστούν φαινοτυπική τροποποίηση. Κατά τη διάρκεια της νόσου η έκφραση δεικτών μπορεί να εξαφανισθεί με πιθανό ψευδώς αρνητικό αποτέλεσμα. Ιδιαίτερα η ασθενής έκφραση μπορεί να χαθεί. Επιπρόσθετα, η έκφραση του CD19 έχει δείχθει ότι εξαφανίζεται συχνά. Η σταθερότητα των δεικτών μπορεί να εκτιμηθεί από την εμπειρία του κάθε κέντρου.

Λαμβάνοντας υπ' όψη την ποσότητα του δείγματος μυελού των οστών (MO), που διατίθεται συνήθως, η ανίχνευση της EYN με MFC επιτρέπει την ανίχνευση ενός παθολογικού κυττάρου στα 10000 φυσιολογικά κύτταρα με χρήση LAIPs υψηλής ειδικότητας, ευαισθησίας και σταθερότητας.

Μετά τη μελέτη του ανοσοφαινότυπου κατά τη διάγνωση σχηματίζονται και επαληθεύονται οι πιο κατάλληλοι LAIPs, οι οποίοι είναι επιθυμητό να περιλαμβάνουν: ένα δείκτη προγονικών κυττάρων (εφόσον είναι θετικό στον ανοσοφαινότυπο), όπως CD34, CD133, CD117.

ένα μυελικό δείκτη, όπως CD13, CD33 και τον μη αναμενόμενο δείκτη. Είναι επίσης επιθυμητό, στην περίπτωση που δεν ανιχνεύονται τουλάχιστον 2 LAIPs, (αν και στην πλειοψηφία των ασθενών αναφέρονται >1 LAIPs) να σχηματίζεται δεύτερος LAIP με άλλο προγονικό και άλλο μυελικό δείκτη. Πρέπει να σημειωθεί ότι η συχνότητα των LAIPs, δηλ. το ποσοστό των περιπτώσεων ΟΜΛ, στους οποίους είναι δυνατή η παρακολούθηση της EYN με MFC διαφέρει μεταξύ των κέντρων και των αντίστοιχων μελετών στη βιβλιογραφία. Οι παράγοντες, που επηρεάζουν αυτή την ποικιλία είναι ο αριθμός των δεικτών που προσδιορίζονται, η μελέτη πολλαπλών δειγμάτων φυσιολογικού και αναγεννώμενου ΜΟ και η αυστηρότητα με την οποία καθορίζει το εργαστήριο τους LAIPs και την EYN. Έτσι η συχνότητα φθάνει και το 94% με 5χρωματική MFC (κυμαίνεται από 51% μέχρι και 94%) και μάλιστα σε υψηλό ποσοστό ανιχνεύονται περισσότεροι του ενός LAIPs.

Για την ιχνηλάτηση της EYN προσδιορίζεται το ποσοστό των LAIP+ κυττάρων, όπως έχει καθορισθεί κατά τη διάγνωση και αναφέρεται ως EYN, αν υπερβαίνει το αναμενόμενο ποσοστό στο φυσιολογικό ή/και αναγεννώμενο ΜΟ. Είναι επιθυμητό να αναφέρεται η ευαισθησία του συγκεκριμένου LAIP στο συγκεκριμένο κέντρο. Προτείνεται επίσης να λαμβάνεται υπ' όψη το ποσοστό των LAIP+ αώρων κυττάρων στη διάγνωση και να «πολλαπλασιάζεται» το υπολογιζόμενο ποσοστό κατά τον προσδιορισμό της EYN επί το ποσοστό αυτό.

Αν και οι LAIPs αποτελούν ένα σημαντικό κομμάτι της ανίχνευσης της EYN με MFC δεν θα έπρεπε να χρησιμοποιούνται αποκλειστικά. Πρέπει να συνοδεύονται από ένα ολοκληρωμένο panel, που περιλαμβάνει δείκτες των σταδίων διαφοροποίησης της μυελικής σειράς. Η δεύτερη αυτή προσέγγιση που ονομάζεται «διαφορετική από το φυσιολογικό» (“different - from - normal”) συμπεριλαμβάνει τους LAIPs, διότι και αυτοί διαφέρουν από το φυσιολογικό, αλλά μπορεί να χρησιμοποιηθεί και όταν λείπει ο αρχικός ανοσοφαινότυπος ανιχνεύοντας όλους τους πληθυσμούς, που ξεφεύγουν από το φυσιολογικό πρότυπο συνδυασμού έκφρασης αντιγόνων (pattern). Η μέθοδος αυτή αλλά και ο προσδιορισμός των LAIPs απαιτεί καθημερινούς ισχυρούς ελέγχους ποιότητας ώστε να εξασφαλισθούν σταθερά επίπεδα έκφρασης για όλα τα αντιγόνα των φυσιολογικών κυττάρων και να ανιχνεύεται ως άτυπη οποιαδήποτε απομάκρυνση από τη φυσιολογική έκφραση αφού δεν οφείλεται σε τεχνική τροποποίηση. Έτσι η ευαισθησία ανίχνευσης ενός λευχαιμικού πληθυσμού με σχετικά λίγους άτυπους δείκτες και σχετικά υψηλά επίπεδα «θορύβου» μπορεί να αγγίζει μόλις το 0,1% ή και το 1%.⁸ Οι μέθοδοι προσδιορισμού της EYN στην ΟΜΛ δεν έχουν προτυπωθεί με αποτέλεσμα την ποικιλία αποτελεσμάτων των διαφόρων ομάδων. Επίσης η αδυναμία της ταυτοποίησης της τροποποίησης του ανοσοφαινότυπου, ενός φαινομένου που μπορεί να εμφανισθεί κα-

τά την υποτροπή, αν και σε χαμηλό βαθμό στην ΟΜΛ, αποτελεί περιορισμό. Παραμένει επίσης δυσκολότερη η ανίχνευση της EYN σε περιστατικά με ανοσοφαινότυπο CD34-CD117, καθώς και στη M4 και M5 όπου τα βλαστικά κύτταρα σχηματίζουν ένα συνεχές και συγχωνεύονται με τον μονοκυτταροειδή πληθυσμό.

Κλινική σημασία

Αν και οι μελέτες για την ανίχνευση EYN με MFC στην ΟΜΛ είναι περιορισμένες σε σύγκριση με την ΟΛΛ, αρκετές έχουν δημοσιευθεί παρέχοντας αποδεικτικά στοιχεία ότι η μελέτη της EYN αποτελεί πολύτιμο εργαλείο για την πρόβλεψη της υποτροπής. Οι περισσότεροι ασθενείς σταθερού κινδύνου δεν διαθέτουν ειδικό μοριακό δείκτη για την παρακολούθηση της EYN. Η ΚΡ λοιπόν αποτελεί ένα σχετικά γρήγορο και όχι ιδιαίτερα ακριβό τρόπο για την ανίχνευση της EYN σε αυτή την κατηγορία των ασθενών. Έτσι η προγνωστική αξία της EYN με την ΚΡ έχει εξεταστεί από πολλούς ερευνητές. Προτείνεται ποικιλία κατωτάτων ορίων EYN, που εξαρτώνται από πολλούς παράγοντες και πιθανά να διαφέρουν σε κάθε ασθενή. Τα συνηθέστερα χρονικά σημεία που προτείνονται ως καταλληλότερα για την εκτίμηση της EYN με MFC, είναι μετά τη θεραπεία εφόδου και τη θεραπεία εδραίωσης.⁹

Γνωρίζοντας ότι ένας από τους σημαντικότερους προγνωστικούς δείκτες στη ΟΜΛ είναι η γρήγορη ανταπόκριση στη θεραπεία, οι Miguel και συν¹⁰, το 2001, σε μία μελέτη 126 ασθενών, έδειξαν ότι η ανίχνευση της EYN, μία φορά και αμέσως μετά τη θεραπεία εφόδου θα μπορούσε να κατηγοριοποιήσει τους ασθενείς σε ομάδες κινδύνου. Με βάση τα επίπεδα της EYN, οι ασθενείς χωρίστηκαν σε τέσσερις ομάδες. α) πολύ χαμηλό κινδύνου: EYN <0.01%, καμία υποτροπή στα 3 έτη, β) χαμηλού κινδύνου EYN <0.1%, αθροιστική συχνότητα υποτροπής (cumulative relapse rate) 14% στα 3 έτη, γ) ενδιάμεσου κινδύνου EYN <0.1-1% αθροιστική συχνότητα υποτροπής 45% στα 3 έτη και δ) υψηλού κινδύνου: EYN >1% αθροιστική συχνότητα υποτροπής 85% στα 3 έτη. Η ανίχνευση EYN σχετιζόταν όχι μόνο με μικρότερο διάστημα ελεύθερο υποτροπής (relapse free survival, RFS), αλλά και με μικρότερη συνολική επιβίωση. Τέλος στην πολυπαραγοντική ανάλυση φάνηκε ότι η EYN με MFC ήταν ο πιο ισχυρός ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας και ακολούθησε η κυτταρογενετική μελέτη και ο κύκλος των θεραπειών για την επίτευξη της ύφεσης.

Σε μία άλλη πιο πρόσφατη μελέτη 143 ασθενών, το 2010, οι Buccisano και συν¹¹, αναφέρουν ότι η EYN μετά τη θεραπεία εδραίωσης (consolidation), διαφοροποιεί την αρχική προγνωστική κατάσταση των ασθενών που έχει γίνει με βάση την καρτυπική και μοριακή μελέτη της διάγνωσης. Έτσι ασθενείς με καλό και ενδιάμεσης πρό-

γνώσης καρυότυπο και μη ανιχνεύσιμη EYN αποτελούν τη χαμηλού κινδύνου ομάδα, με διάστημα ελεύθερο υποτροπής και συνολική επιβίωση 58% και 73% αντίστοιχα, ενώ οι ασθενείς με καλό ή ενδιάμεσης πρόγνωσης καρυότυπο και ανιχνεύσιμη EYN, με κακής πρόγνωσης καρυότυπο ή *FLT3-ITD* μετάλλαξη, αποτελούν την υψηλού κινδύνου ομάδα με διάστημα ελεύθερο υποτροπής και συνολική επιβίωση 22% και 17% αντίστοιχα. Με βάση τα αποτελέσματα αυτά φαίνεται οι ασθενείς με καλό ή ενδιάμεσης πρόγνωσης καρυότυπο αλλά θετική EYN θα μπορούσαν να επωφεληθούν της αλλογενούς μεταμόσχευσης, αυξάνοντας έτσι το ελεύθερο υποτροπής διάστημα.

Την προγνωστική αξία της EYN με MFC, στην ενδιάμεσου κινδύνου κατηγορία ασθενών, εκτιμά και η HOVON SAKK μελέτη¹², που δημοσιεύθηκε το 2013 και συμπεριλάμβανε 517 ασθενείς συνολικά. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης, οι ασθενείς οι οποίοι έχουν ταξινομηθεί κατά τη διάγνωση σε ενδιάμεσου κινδύνου με βάση τα κυτταρογενετικά ή/και μοριακά χαρακτηριστικά της νόσου, εφόσον μετά από δύο θεραπείες εφόδου διατηρούν ανιχνεύσιμη EYN (EYN >0.1%), θα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως υψηλού κινδύνου.

Στη μελέτη MRC OMA16¹³, συμμετείχαν 1754 ασθενείς στη μεγάλη τους πλειοψηφία ηλικίας άνω των 60 ετών. Οι 892 αξιολογήθηκαν για παρακολούθηση της EYN με ανοσοφαινότυπο. Παρά τους σχετιζόμενους με την ηλικία παράγοντες κινδύνου (προ θεραπείας), 51% των ασθενών (145/286) μετά από ένα κύκλο θεραπείας και 64% (179/279) μετά από δύο κύκλους θεραπείας, είχαν μη ανιχνεύσιμη EYN. Το πραγματικό όφελος της αρνητικής EYN μετά μία θεραπεία διαφέρει ανάλογα με τη προγνωστική ομάδα των ασθενών. Έτσι στην ομάδα ασθενών με ευνοϊκής πρόγνωσης καρυότυπο, δεν παρουσιάζεται διαφορά στη συνολική επιβίωση στα τέσσερα έτη, ενώ στην ομάδα με ενδιάμεσης πρόγνωσης καρυότυπο η συνολική επιβίωση ασθενών με αρνητική EYN ήταν 46% vs 24% που ήταν στους ασθενείς με ανιχνεύσιμη EYN. Η πρόγνωση για τη συνολική επιβίωση των ασθενών με κακής πρόγνωσης καρυότυπο και μη ανιχνεύσιμη EYN ήταν μόνο 14%.

Γερμανική ομάδα μελέτης, των Kohnke και συν¹⁴, δημοσίευσε πολύ πρόσφατα, πως εκτιμώντας την EYN πολύ νωρίς, κατά τη διάρκεια της απλασίας (ημ16-18 της θεραπείας εφόδου), μπορούμε να καθορίσουμε τους ασθενείς οι οποίοι θα χρειαστούν πιο εντατικοποιημένη θεραπεία εδραίωσης. Έτσι λοιπόν αναλύοντας τα αποτελέσματα 178 ασθενών οι οποίοι έλαβαν θεραπεία σύμφωνα το πρωτόκολλο της AMLCG, διαπίστωσαν ότι ανίχνευση EYN κατά την απλασία αποτελεί δυσμενή προγνωστικό παράγοντα με πενταετής επιβίωση ελεύθερη υποτροπής 16% vs 43% (για τους ασθενείς με μη ανιχνεύσιμη EYN). Επιπροσθέτως στην υποκατηγορία ασθενών με φυσιολογικό καρυότυπο και *NPM1* μετάλλαξη, διαπιστώθηκε πενταετής επιβίωση ελεύθερη υποτροπής 13%

για τους ασθενείς με θετική EYN vs 49% για τους ασθενείς με αρνητική EYN. Για την υποκατηγορία ασθενών με φυσιολογικό καρυότυπο και *FLT3* μετάλλαξη, διαπιστώθηκε πενταετής επιβίωση ελεύθερη υποτροπής 9% για τους ασθενείς με θετική EYN vs 39% για τους ασθενείς με αρνητική EYN. Σε καμία όμως από τις υποομάδες δεν διαπιστώθηκε διαφορά στην ολική επιβίωση.

Μοριακή ανάλυση – κλινική σημασία

Οι μέθοδοι της μοριακής βιολογίας χρησιμοποιούνται πλέον ευρύτατα για τη διάγνωση, την παρακολούθηση αλλά και την πρόγνωση των αιματολογικών νοσημάτων.

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR) αποτελεί μέθοδο εκλογής για τη μοριακή ανίχνευση της EYN^{2,15,16}. Η τεχνική περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1985, και είναι μία *in vitro* ενζυματική μέθοδος για τον πολλαπλασιασμό ενός τμήματος νουκλεϊκού οξέος που οριοθετείται από ένα ζεύγος ολιγονουκλεοτιδίων, τους εκκινητές. Οι πρώτες μέθοδοι ανίχνευσης της EYN με την PCR εμφανίστηκαν στα τέλη της δεκαετίας του 80. Οι περισσότερες από αυτές τις μελέτες έγιναν με χρήση ποιοτικής PCR. Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί τεχνικές για την ποσοτική μέτρηση των γονιδίων. Η ανάπτυξη της τεχνικής της PCR σε πραγματικό χρόνο (Real-time PCR) βοήθησε να υπερπηδηθούν τα προβλήματα που σχετίζονται με τη συμβατική PCR καθώς με την παραπάνω τεχνική επιτρέπεται η ακριβής ποσοτικοποίηση κατά την εκθετική φάση της αντίδρασης. Η συσσώρευση των προϊόντων PCR φαίνεται συνεχώς (σε πραγματικό χρόνο) καθ' όλη τη διάρκεια της αντίδρασης, επιτρέποντας τη γρήγορη ποσοτικοποίηση. Το σύστημα ανίχνευσης της Real-time PCR βασίζεται σε φθορίζοντα σήματα που παράγονται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης από κατάλληλους ανιχνευτές (Hydrolysis, Hybridization probes κ.λπ.).

Πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι η υψηλή ευαισθησία (1×10^{-5} , 1×10^{-6}), η επαναληψιμότητα, και η ταχύτητα, η δε ανάπτυξη των μεθόδων Real time Quantitative PCR (RT-qPCR) βοήθησε την εγκατάσταση προτυπωμένων πρωτοκόλλων για την παρακολούθηση της EYN με εφαρμογή σε μεγάλο αριθμό αιματολογικών νοσημάτων.

Με την RT-qPCR, είναι δυνατή η παρακολούθηση της EYN σε ασθενείς θετικούς σε κατάλληλους μοριακούς δείκτες όπως είναι τα υβριδικά γονίδια *PML-RARA*, *RUNX1-RUNX1T1*, *CBFB-MYH11*, *DEK-NUP214(CAN)*, που είναι αποτέλεσμα των ισόρροπων χρωμοσωμικών αντιμεταθέσεων t(15;17), t(8;21), inv(16) ή t(16;16) και t(6;9) αντίστοιχα, τα υβριδικά γονίδια στα οποία συμμετέχει το *MLL* t(11q23), το υβριδικό γονίδιο *NUP98-NSD1* που είναι αποτέλεσμα της αντιμετάθεσης t(5;11) καθώς και οι μεταλλάξεις του γονιδίου *NPM1*. Οι παραπάνω μοριακοί δείκτες καλύπτουν ένα ποσοστό 60% περίπου των περιπτώσεων ΟΜΛ ενηλίκων και παιδιών.^{17,18}

Σταθμός στην προσπάθεια προτύπωσης των πρωτοκόλλων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην κλινική πράξη υπήρξε το πρόγραμμα Europe Against Cancer (EAC), το οποίο θέσπισε το πλαίσιο για την αξιολόγηση και την επιλογή της βέλτιστης μεθόδου RT-qPCR μέσω μιας συστηματικής και παράλληλης αξιολόγησης των μεθόδων από ένα διεθνές δίκτυο εργαστηρίων.¹⁹ Επιπλέον το πρόγραμμα EAC, έθεσε τα θεμέλια, για τον καθορισμό του βέλτιστου χρονοδιαγράμματος και την επιλογή του καταλληλότερου δείγματος (περιφερικού αίματος ή μυελού) για την παρακολούθηση της EYN.

Ανίχνευση των υβριδικών γονιδίων *RUNX1-RUNX1T1* και *CBFB-MYH11* στις λευχαιμίες που σχετίζονται με τον παράγοντα *CBF*

Από όλες τις περιπτώσεις ΟΜΛ, πλέον της οξείας προμυελοκυτταρικής λευχαιμίας (ΟΠΛ), η κλινική σημασία της μοριακής ανίχνευσης της EYN έχει καθορισθεί με ακρίβεια στις περιπτώσεις λευχαιμιών που σχετίζονται με τον παράγοντα CBF (Core Binding Factor). Αυτό γίνεται με την ανίχνευση των μεταγράφων runt-related transcription factor 1/runt-related transcription factor 1 translocated to 1 (cyclin D-related) (*RUNX1-RUNX1T1*) και core-binding factor beta subunit/myosin, heavy chain 11 (*CBFB-MYH11*), που προκύπτουν ως αποτέλεσμα των αντιμεταθέσεων t(8;21) και inv16/t(16;16) αντίστοιχα. Η παρακολούθηση της EYN με την ανίχνευση του χιμαιρικού μεταγράφου *RUNX1-RUNX1T1* έχει αποτελέσει πεδίο αντικρουόμενων απόψεων, καθώς με τη συμβατική RT-PCR είναι δυνατή η ανίχνευση των μεταγράφων σε ασθενείς οι οποίοι βρίσκονται σε μακρά ύφεση.²⁰⁻²² Νεότερες μελέτες δείχνουν ότι για την πρόγνωση των ασθενών στους οποίους ανιχνεύεται το *RUNX1-RUNX1T1*, είναι απαραίτητος ο ποσοτικός προσδιορισμός των μεταγράφων στη διάγνωση αλλά και σε όλη τη διάρκεια της θεραπείας, καθώς το επίπεδο των μεταγράφων είναι ανεξάρτητος προγνωστικός δείκτης από τους άλλους προ-θεραπείας παράγοντες κινδύνου.

Οι Tobal και συν²³, μελέτησαν 25 ασθενείς με την αντιμετάθεση t(8;21) και διαπίστωσαν ότι η ελάττωση των μεταγράφων *RUNX1-RUNX1T1*, κατά 2 έως 3 λογαρίθμους (log) μετά τη θεραπεία εδραίωσης έχει μεγάλη κλινική σημασία, κατέληξαν δε στο συμπέρασμα ότι με συστηματική παρακολούθηση μπορεί να καθοριστεί η ομάδα ασθενών με το μεγαλύτερο κίνδυνο υποτροπής. Παρά το μικρό αριθμό των ασθενών της ανωτέρω μελέτης αξίζει να σημειωθεί ότι οι συγγραφείς προέβησαν σε πρόωμη θεραπευτική παρέμβαση προκειμένου να αποτρέψουν επικείμενη αιματολογική υποτροπή με βάση τα επίπεδα των μεταγράφων. Έτσι η σημαντική αύξηση των μεταγράφων *RUNX1-RUNX1T1*, που παρατηρήθηκε σε ασθενή 22 μήνες μετά από αλλο-ΜΑΚ, οδήγησε τους

θεράποντες ιατρούς στη διακοπή της ανοσοκατασταλτικής αγωγής, με αποτέλεσμα την εκδήλωση οξείας νόσου μοσχεύματος κατά ξενιστή (Graft versus Host Disease, GvHD) και εν συνεχεία την επίτευξη ΠΥ.

Οι Schnittger και συν²⁴, σε μία μεγάλη μελέτη που συμπεριλάμβανε 349 ασθενείς με *PML-RARA*, *RUNX1-RUNX1T1*, *CBFB-MYH11*, το 2003, εκτίμησαν την προγνωστική αξία της ποσοτικοποίησης των αντιστοιχών μεταγράφων με τη μέθοδο της RTq-PCR και διαπίστωσαν ότι τόσο η ελάττωση των επιπέδων κατά 3 λογαρίθμους μετά τη θεραπεία εδραίωσης, όσο και το επίπεδο των μεταγράφων κατά τη διάγνωση διακρίνει τους ασθενείς με μεγαλύτερο κίνδυνο υποτροπής.

Αντίθετα σε μελέτη 45 ασθενών με t(8;21), των Weisser και συν²⁵, το επίπεδο των μεταγράφων *RUNX1-RUNX1T1* κατά τη διάγνωση, δεν συσχετίστηκε με την ανταπόκριση στη θεραπεία, ενώ η ελάττωση του λευχαιμικού φορτίου κατά 4 λογαρίθμους μετά την έφοδο και την εδραίωση είχε μεγάλη προγνωστική αξία.

Το 2012, στη μελέτη MRC AML-15²⁶ στην οποία συμμετείχαν 163 ασθενείς με t(8;21) και 115 με inv(16), αναφέρεται ότι μετά τη θεραπεία εφόδου, η ελάττωση των *RUNX1-RUNX1T1* μεταγράφων κατά 3 λογαρίθμους στο μυελό, αποτελεί την πιο ισχυρή θετική προγνωστική παράμετρο για τους ασθενείς με t(8;21) όχι όμως και για τους ασθενείς με inv(16), ενώ αντίθετα η ανίχνευση >500 στον μυελό και >1000 μεταγράφων *RUNX1-RUNX1T1*/10⁵ *ABL* στο περιφερικό αίμα ασθενών με t(8;21), κατά την ίδια χρονική στιγμή, αποτελεί κακό προγνωστικό δείκτη.

Στους ίδιους ασθενείς, μετά την τρίτη θεραπεία εδραίωσης, η ελάττωση των μεταγράφων κατά 4 λογαρίθμους σχετίστηκε με μόνο 10% αθροιστική συχνότητα υποτροπής (cumulative incidence of relapse, CIR) ενώ και πάλι η ανίχνευση >500 μεταγράφων, αποτέλεσε κακό προγνωστικό δείκτη. Στους ασθενείς με inv(16), η ανίχνευση μετά την έφοδο >100 στο μυελό και >10 μεταγράφων *CBFB-MYH11*/10⁵ *ABL* στο περιφερικό αίμα, αποτελεί κακό προγνωστικό δείκτη, ενώ μετά την τρίτη θεραπεία εδραίωσης η ανίχνευση >10 μεταγράφων *CBFB-MYH11* στο περιφερικό αίμα σχετίστηκε με αθροιστική συχνότητα υποτροπής 78%.

Πρόσφατα δημοσιεύτηκαν τα αποτελέσματα της πολυκεντρικής CBF-2006 μελέτης¹⁶ στην οποία τυχαιοποιήθηκαν 198 ασθενείς με CBF ΟΜΛ. Στη μελέτη αυτή η ανίχνευση EYN, με ελάττωση μικρότερη των 3 λογαρίθμων, μετά από 2 κύκλους χημειοθεραπείας ήταν ο πιο ισχυρός προγνωστικός δείκτης υποτροπής. Οι μεταλλάξεις των γονιδίων *KIT* και *FLT3* καθώς και ο υψηλός αριθμός λευκών κατά τη διάγνωση, αποδείχθηκαν αδύναμοι προγνωστικοί παράγοντες.

Εκατόν δεκαέξι ασθενείς συμμετείχαν στη μελέτη των Zhu και συν²⁷, που υποστήριξαν ότι η πρόγνωση των ασθενών με t(8;21) μπορεί να διαφοροποιηθεί εφόσον γίνει προγνωστική ταξινόμηση με βάση την EYN. Η μικρότερη

των 3 log ελάττωση των μεταγράφων *RUNX1-RUNX1T1* μετά τη δεύτερη θεραπεία εδραίωσης ή η μοριακή υποτροπή σε διάστημα 6 μηνών, καθόρισε την κατηγορία αυτή των ασθενών ως υψηλού κινδύνου και αφορά ασθενείς που θα ωφεληθούν από την αλλογενή ΜΑΚ. Οι συγγραφείς σημείωσαν ότι ο σωστότερος χρόνος για τον έλεγχο της EYN είναι μετά τη δεύτερη θεραπεία εδραίωσης καθότι τότε αντικατοπτρίζεται η ευαισθησία των λευχαιμικών κυττάρων στην υψηλή δόση αρασιτίνης και σχολίασαν ότι δεν διαπίστωσαν προγνωστική αξία στη μέτρηση της EYN μετά την έφοδο ή μετά την πρώτη θεραπεία εδραίωσης όπως αναφέρεται στη μελέτη της MRC OMA-15, γεγονός βέβαια που μπορεί να οφείλεται στο διαφορετικό σχήμα εφόδου και εδραίωσης μεταξύ των μελετών.

Σε πρόσφατη μελέτη των Wang και συν²⁸ προσδιορίστηκε ο ρόλος της EYN σε 92 ασθενείς με t(8;21) οι οποίοι υποβλήθηκαν σε αλλο-ΜΑΚ. Στην πολυπαραγοντική ανάλυση, η ανίχνευση EYN τους πρώτους 3 μήνες μετά τη μεταμόσχευση και όχι οι μεταλλάξεις του *KIT*, αποτέλεσαν ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα όσον αφορά την αθροιστική συχνότητα υποτροπής και την ελεύθερη λευχαιμίας επιβίωση (leukemia free survival, LFS). Για τους ασθενείς που πέτυχαν μείζονα μοριακή ανταπόκριση στους 3 μήνες μετά την αλλο-ΜΑΚ η αθροιστική συχνότητα υποτροπής ήταν μόνο 8%. 17 ασθενείς έλαβαν έγχυση λεμφοκυττάρων δότη (donor lymphocyte infusion, DLI) ως πρώιμη παρέμβαση με βάση την EYN. Η αθροιστική συχνότητα υποτροπής και η ελεύθερη λευχαιμίας επιβίωση στα 2 έτη ήταν, 24% vs 87% και 64% vs 0% για τους ασθενείς που έλαβαν ή όχι λεμφοκύτταρα δότη αντίστοιχα. Οι συγγραφείς σχολίασαν ότι ο διάμεσος χρόνος εμφάνισης μορφολογικής υποτροπής της νόσου από τη στιγμή που διαπιστώνεται <3 log ελάττωση των *RUNX1-RUNX1T1* μεταγράφων, είναι 90 ημέρες. Επιπροσθέτως η >3 log ελάττωση επιπέδων των *RUNX1-RUNX1T1* μεταγράφων στους 3 πρώτους μήνες μετά την αλλο-ΜΑΚ, από τη διάγνωση, αποτελεί ισχυρό προγνωστικό δείκτη και έτσι προτείνεται, η τακτική παρακολούθηση της EYN ανά μήνα μετά την αλλο-ΜΑΚ και πιθανή πρώιμη θεραπευτική παρέμβαση εφόσον δεν επιτυγχάνεται μείζον μοριακή ανταπόκριση κατά το διάστημα αυτό.

Ανίχνευση μεταλλάξεων του γονιδίου *NPM1*

Μεταλλάξεις στο εξόνιο 12 του γονιδίου *NPM1* ανιχνεύονται στο ένα τρίτο των περιπτώσεων ΟΜΛ, συμπεριλαμβανομένου και του 50% των περιπτώσεων ΟΜΛ με φυσιολογικό καρυότυπο.^{17,29} Παρ' όλη την ετερογένειά τους (έχουν ταυτοποιηθεί περισσότερες από 50), οι μεταλλάξεις αυτές αποτελούν ιδανικό μοριακό δείκτη για την ανίχνευση της EYN με RTq-PCR χρησιμοποιώντας εκκινητή συμπληρωματικό για τη μετάλλαξη σε συνδυασμό με ένα κοινό εκκινητή και ανιχνευτή.³⁰ Οι

μεταλλάξεις τύπου A, B και D αποτελούν το 90% των περιπτώσεων. Το μεταλλαγμένο γονίδιο *NPM1* έχει υψηλή έκφραση στα δείγματα διάγνωσης της ΟΜΛ με συνέπεια αρκετά υψηλή ευαισθησία της μεθόδου (1:10⁵), μεγαλύτερη από ότι παρατηρείται σε άλλες μεθόδους RTq-PCR που εφαρμόζονται σε άλλους υποτύπους ΟΜΛ. Οι μεταλλάξεις του *NPM1* γονιδίου θεωρούνται σταθερές μεταλλάξεις από τους περισσότερους μελετητές^{31,32} και για το λόγο αυτό μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση της EYN.

Το 2005 οι Suzuki και συν³³ ανέφεραν την απώλεια της μετάλλαξης του *NPM1* γονιδίου σε 2/17 ασθενείς κατά την υποτροπή. Το 2009 οι Papadaki³⁴ και συν σε μελέτη της EYN σε ομάδα 51 ασθενών με *NPM1A* μετάλλαξη, διαπίστωσαν απώλεια της μετάλλαξης σε 2/21 ασθενείς που υποτροπίασαν (9,5%). Μία επιπλέον μελέτη το 2011 των Kronke και συν³⁵, διαπίστωσε την απώλεια της μετάλλαξης κατά την υποτροπή σε ποσοστό 9% των ασθενών. Η μελέτη αυτή, που συμπεριλάμβανε 245 ασθενείς συνολικά, ανέφερε ότι η αρνητικοποίηση της RT-qPCR μετά από τη διπλή θεραπεία εφόδου καθώς και μετά την ολοκλήρωση της θεραπείας σχετίστηκε με χαμηλή αθροιστική συχνότητα υποτροπής (6.5% στα 4 έτη και 15,7% αντίστοιχα), σε σχέση με τους ασθενείς με θετική RT-qPCR στα ίδια χρονικά διαστήματα (53% και 66,5% αντίστοιχα). Οι συγγραφείς ανέφεραν ότι κατά την παρακολούθηση, κρίνεται απαραίτητος τακτικός προσδιορισμός των *NPM1* μεταγράφων στους ασθενείς που παρουσιάζουν επίπεδα >200 *NPM1*^{mut}/10⁴ *ABL*, με σκοπό την έγκαιρη αναγνώριση της υποτροπής.

Σε αντίστοιχα αποτελέσματα κατέληξε και η μελέτη των Schnittger και συν³⁶, που μελέτησαν 17 διαφορετικές μεταλλάξεις του *NPM1* σε 252 ασθενείς. Σε 47 ασθενείς η υποτροπή ήταν προβλέψιμη διότι τα επίπεδα των *NPM1/ABL1* μεταγράφων αυξήθηκαν τουλάχιστον κατά 1 log και σε 15 περιπτώσεις διότι τα επίπεδα δεν ελαττώθηκαν κατά 3 log. Επιπροσθέτως τα όρια του 0,1% (κατά τη θεραπεία) και 0.01% *NPM1/ABL1* (μετά τη θεραπεία), καθόρισαν τις προγνωστικές υποομάδες των ασθενών. Επίσης κατά την πολυπαραγοντική ανάλυση ούτε η ηλικία του ασθενούς, ούτε η παρουσία της μετάλλαξης του *FLT3* γονιδίου, παρά μόνο τα επίπεδα των *NPM1* μεταγράφων έχουν προγνωστική αξία, στην πρώτη γραμμική θεραπείας εφόδου.

Τη σημαντικότητα της παρακολούθησης της EYN, με μέτρηση των μεταγράφων ανά τακτά χρονικά διαστήματα, για την πρόβλεψη της υποτροπής της νόσου, τόνισε και η πρόσφατη μελέτη, 2013, των Shayegi και συν³⁷, τα αποτελέσματα της οποίας συγκλίνουν με αυτά της ομάδας των Kronke και συν. Σε 174 ασθενείς που συμμετείχαν, αύξηση >1% των *NPM1*^{mut}/*ABL1* επιπέδων μετά τη θεραπεία και >10% μετά την αλλο-ΜΑΚ, σχετίζονται με φτωχή συνολική επιβίωση (overall survival, OS) και επιβίωση ελεύθερη νόσου (disease free survival, DFS).

Έκφραση γονιδίου *Wilms tumor (WT1)*

Το γονίδιο *WT1* υπερεκφράζεται στους περισσότερους ασθενείς με ΟΜΛ, ωστόσο έχει ανιχνευθεί και σε υγιείς εθελοντές. Έτσι για την εκτίμηση της ΕΥΝ θα πρέπει να διακρίνεται, η φυσιολογική έκφραση του γονιδίου από την έκφραση των λευχαιμικών κυττάρων. Για το λόγο αυτό η χρησιμότητα του ως δείκτη για την παρακολούθηση της ΕΥΝ περιορίζεται καθότι σε χαμηλά επίπεδα ΕΥΝ είναι δύσκολο να γίνει διαχωρισμός από τη φυσιολογική έκφραση (background). Παρόλα αυτά οι Cillonι και συν³⁸, σε μελέτη του European LeukemiaNet (ELN), αξιολόγησαν 9 RTq-PCR πρωτόκολλα για το *WT1* και καθόρισαν ως ανώτατο όριο έκφρασης του *WT1*, στο φυσιολογικό μυελό και περιφερικό αίμα την έκφραση 50 και 250 *WT1* μεταγράφων/10⁴ *ABL*, αντίστοιχα. Στηριζόμενοι στην ανάλυση μεγάλης ομάδας ασθενών με ΟΜΛ (620 δείγματα κατά τη διάγνωση), συμπεράναν ότι το γονίδιο *WT1* υπερεκφράζεται σε μεγάλο βαθμό και επομένως στο ~45% των περιπτώσεων δύναται να υπολογιστεί ελάττωση κατά 2 log. Σε αυτή την ομάδα των ασθενών, ελάττωση της έκφρασης >2 log, μετά τη θεραπεία εφόδου, περιορίζει τον κίνδυνο υποτροπής.

Η μέτρηση των μεταγράφων του *WT1* στο μυελό, χρησιμοποιήθηκε από μία άλλη ομάδα, τους Rozzi και συν³⁹, ως οδηγός για πρώιμη θεραπευτική παρέμβαση, σε ασθενείς που είχαν υποβληθεί σε αλλο-ΜΑΚ. Στη μελέτη αυτή όπου συμμετείχαν 122 ασθενείς, έγινε διακοπή της κυκλοσπορίνης ή χορήγηση DLI στους ασθενείς που παρουσίασαν *WT1* μετάγραφα >180/10⁴ *ABL* (αυτή ήταν η υψηλότερη τιμή που ανιχνεύθηκε σε υγιείς εθελοντές). Στους 67 ασθενείς που παρουσίαζαν επίπεδα μεταγράφων του *WT1* >100 σε οποιαδήποτε στιγμή μετά την αλλο-ΜΑΚ, το ποσοστό υποτροπής ήταν υψηλότερο (54%) σε σχέση με το 16%, που παρουσίασαν οι 55 ασθενείς με επίπεδα <100. Η συνολική επιβίωση ήταν 40% και 63% αντίστοιχα.

Παρόλα αυτά όμως, φαίνεται δύσκολη η χρήση του *WT1* ως μοριακού δείκτη στην κλινική πράξη λόγω της περιορισμένης ευαισθησίας και της έλλειψης ειδικότητας για την παρακολούθηση της ΕΥΝ.

Ανίχνευση μεταλλάξεων του γονιδίου *FLT3*

Οι μεταλλάξεις του γονιδίου *FLT3* (*FLT3-ITD* και *FLT3-Asp835*), παρουσιάζονται σε ποσοστό 23% και 8-12% αντίστοιχα, των ασθενών με ΟΜΛ.⁴⁰ Παρά όμως την υψηλή συχνότητα εμφάνισής τους, ο ρόλος τους στην παρακολούθηση της ΕΥΝ αποτελεί πεδίο αντικρουόμενων απόψεων, καθώς οι περισσότεροι ερευνητές υποστηρίζουν ότι η αστάθεια των μεταλλάξεων μεταξύ της διάγνωσης και της υποτροπής, περιορίζει τη χρήση τους στην παρακολούθηση της ΕΥΝ⁴¹⁻⁴³, σε αντίθεση με άλλους που υποστηρίζουν τη χρήση των μεταλλάξεων αυτών για την παρακολούθηση της ΕΥΝ.^{44,45}

Νέες προοπτικές - Συμπεράσματα

Η ανάγκη για ανεύρεση σταθερών μοριακών δεικτών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην κλινική πράξη στρέφει το ενδιαφέρον προς άλλους περισσότερο σταθερούς δείκτες όπως είναι οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *DNMT3A*, αλλά και σε νέες τεχνολογίες καθώς η παρουσία αστάθειας σε κάποιους μοριακούς δείκτες μπορεί να οφείλεται στη ανεπαρκή ευαισθησία των μεθόδων που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευσή τους.⁴⁶

Η χρήση των νέων τεχνολογιών αλληλούχισης επόμενης γενιάς (Next Generation sequencing, NGS) θα μπορούσε να αποτελέσει μία λύση για την εκτίμηση της ΕΥΝ, με αυξημένη ευαισθησία, με εφαρμογές στα διαγνωστικά εργαστήρια.^{47,48}

Το Digital PCR αποτελεί μία νέα προσπάθεια προσέγγισης για την ανίχνευση μεταλλάξεων που χρήζουν περαιτέρω διερεύνηση. Με τη νέα αυτή μεθοδολογία επιτυγχάνεται ευαισθησία ανάλογη της RT-qPCR, και πλέον υπάρχει η δυνατότητα διαχωρισμού των σημειακών μεταλλάξεων από το θόρυβο της αντίστοιχης φυσιολογικής αλληλουχίας.⁴⁹

Όπως φαίνεται από τις μελέτες τα ευρήματα για τον ιδανικό χρόνο μέτρησης της ΕΥΝ, είναι αντικρουόμενα. Αυτό όμως που σταθερά διαφαίνεται είναι η σημαντικότητα ανίχνευσης της και ο συσχετισμός αυτής με τον αυξημένο κίνδυνο υποτροπής καθώς και μικρότερη επιβίωση.

Minimal residual disease in acute myeloid leukemia Methodology of detection and clinical importance

by Christina Papadaki¹, Maria Garofalaki², Aikaterini Psarra³

¹Haematology, "G. Gennimatas" General Hospital of Athens, ²Mol Biology Lab, Haematology - Lymphomas Department and Bone Marrow Transplantation Unit, "Evangelismos" Hospital of Athens,

³Immunology-Histocompatibility Department, "Evangelismos" Hospital of Athens, Greece

ABSTRACT: A lot of effort has been made to identify prognostic risk factors and evaluate the prognostic value of minimal residual disease (MRD) monitoring, in acute myeloid leukemia (AML). Detection

of MRD is of major importance since it evaluates the “depth” of the remission and therefore, risk adapted therapy based on early detection of relapse becomes feasible. Laboratory techniques such as flow cytometry and polymerase chain reaction (PCR) allow measurement of remaining leukemic cells below the morphological sensitivity. The current review discuss flow cytometric immunophenotyping (MFC) and quantitative PCR (RT-qPCR), their characteristics, advantages and disadvantages in MRD detection, as well as the available trials for clinical application of these methods for MRD detection. Nevertheless MRD directed therapy at the moment is restricted to acute promyelocytic leukemia, since differences in the assays, lack of standardized MRD thresholds and MRD time, makes clinical utility of MRD monitoring limited although it is already implemented worldwide. Thus more studies are needed to further explore its clinical utility, to standardize relevant assays in order to help to identify the group of patients at higher risk of relapse and to make therapeutic interventions accordingly.

Βιβλιογραφία

1. Mayer RJ, Davis RB, Schiffer CA, et al. Intensive postremission chemotherapy in adults with acute myeloid leukemia. Cancer and Leukemia Group B. *N Engl J Med.* 1994; 331:896-903.
2. Paietta E. Minimal residual disease in acute myeloid leukemia: coming of age. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2012; 2012:35-42.
3. Buccisano F, Maurillo L, Spagnoli A, et al. Monitoring of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Curr Opin Oncol.* 2009; 21:582-588.
4. Grimwade D, Freeman SD. Defining minimal residual disease in acute myeloid leukemia: which platforms are ready for “prime time”? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2014; 2014:222-233.
5. Venditti A, Buccisano F, Del Poeta G, Maurillo L, Tamburini A, Cox C et al. Level of minimal residual disease after consolidation therapy predicts outcome in acute myeloid leukemia. *Blood.* 2000; 96:3948-3952.
6. Lane S, Saal R, Mollee P, et al. A ≥ 1 log rise in RQ-PCR transcript levels defines molecular relapse in core binding factor acute myeloid leukemia and predicts subsequent morphologic relapse. *Leuk Lymphoma.* 2008; 49:517-523.
7. Bene MC, Nebe T, Bettelheim P, et al. Immunophenotyping of acute leukemia and lymphoproliferative disorders: a consensus proposal of the European LeukemiaNet Work Package 10. *Leukemia.* 2011; 25:567-574.
8. Jaso JM, Wang SA, Jorgensen JL, Lin P. Multi-color flow cytometric immunophenotyping for detection of minimal residual disease in AML: past, present and future. *Bone Marrow Transplant.* 2014; 49:1129-1138.
9. Al-Mawali A, Gillis D, Hissaria P, Lewis I. Incidence, sensitivity, and specificity of leukemia-associated phenotypes in acute myeloid leukemia using specific five-color multiparameter flow cytometry. *Am J Clin Pathol.* 2008; 129:934-945.
10. San Miguel JF, Vidriales MB, Lopez-Berges C, et al. Early immunophenotypical evaluation of minimal residual disease in acute myeloid leukemia identifies different patient risk groups and may contribute to postinduction treatment stratification. *Blood.* 2001; 98:1746-1751.
11. Buccisano F, Maurillo L, Spagnoli A, et al. Cytogenetic and molecular diagnostic characterization combined to postconsolidation minimal residual disease assessment by flow cytometry improves risk stratification in adult acute myeloid leukemia. *Blood.* 2010; 116:2295-2303.
12. Terwijn M, van Putten WL, Kelder A, et al. High prognostic impact of flow cytometric minimal residual disease detection in acute myeloid leukemia: data from the HOVON/SAKK AML 42A study. *J Clin Oncol.* 2013; 31:3889-3897.
13. Freeman SD, Virgo P, Couzens S, et al. Prognostic relevance of treatment response measured by flow cytometric residual disease detection in older patients with acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol.* 2013; 31:4123-4131.
14. Kohnke T, Sauter D, Ringel K, et al. Early assessment of minimal residual disease in AML by flow cytometry during aplasia identifies patients at increased risk of relapse. *Leukemia.* 2015; 29:377-386.
15. Geng Z, Zhang H, Wang D, et al. Combination of cytogenetic analysis and molecular screening in patients with de novo acute myeloid leukemia. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* 2012; 32:501-510.
16. Jourdan E, Boissel N, Chevret S, et al. Prospective evaluation of gene mutations and minimal residual disease (MRD) in patients with core binding factor acute myeloid leukemia (CBF-AML). *Blood.* 2013.
17. Grimwade D, Mrozek K. Diagnostic and prognostic value of cytogenetics in acute myeloid leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2011; 25:1135-1161, vii.
18. Hokland P, Ommen HB. Towards individualized follow-up in adult acute myeloid leukemia in remission. *Blood.* 2011; 117:2577-2584.
19. Gabert J, Beillard E, van der Velden VH, et al. Standardization and quality control studies of ‘real-time’ quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - a Europe Against Cancer program. *Leukemia.* 2003; 17:2318-2357.
20. Miyamoto T, Weissman IL, Akashi K. AML1/ETO-expressing nonleukemic stem cells in acute myelogenous leukemia with 8;21 chromosomal translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97:7521-7526.
21. Jurlander J, Caligiuri MA, Ruutu T, et al. Persistence of the AML1/ETO fusion transcript in patients treated with allogeneic bone marrow transplantation for t(8;21) leukemia.

- Blood. 1996; 88:2183-2191.
22. Nucifora G, Larson RA, Rowley JD. Persistence of the 8;21 translocation in patients with acute myeloid leukemia type M2 in long-term remission. *Blood* 1993; 82:712-715.
 23. Tobal K, Newton J, Macheta M, et al. Molecular quantitation of minimal residual disease in acute myeloid leukemia with t(8;21) can identify patients in durable remission and predict clinical relapse. *Blood*. 2000; 95:815-819.
 24. Schnittger S, Weisser M, Schoch C, Hiddemann W, Haferlach T, Kern W. New score predicting for prognosis in PML-RARA+, AML1-ETO+, or CBFMBYH11+ acute myeloid leukemia based on quantification of fusion transcripts. *Blood*. 2003; 102:2746-2755.
 25. Weisser M, Haferlach C, Hiddemann W, Schnittger S. The quality of molecular response to chemotherapy is predictive for the outcome of AML1-ETO-positive AML and is independent of pretreatment risk factors. *Leukemia*. 2007; 21:1177-1182.
 26. Yin JA, O'Brien MA, Hills RK, Daly SB, Wheatley K, Burnett AK. Minimal residual disease monitoring by quantitative RT-PCR in core binding factor AML allows risk stratification and predicts relapse: results of the United Kingdom MRC AML-15 trial. *Blood*. 2012; 120:2826-2835.
 27. Zhu HH, Zhang XH, Qin YZ, et al. MRD-directed risk stratification treatment may improve outcomes of t(8;21) AML in the first complete remission: results from the AML05 multicenter trial. *Blood*. 2013; 121:4056-4062.
 28. Wang Y, Wu DP, Liu QF, et al. In adults with t(8;21)AML, posttransplant RUNX1/RUNX1T1-based MRD monitoring, rather than c-KIT mutations, allows further risk stratification. *Blood*. 2014; 124:1880-1886.
 29. Falini B, Nicoletti I, Bolli N, et al. Translocations and mutations involving the nucleophosmin (NPM1) gene in lymphomas and leukemias. *Haematologica*. 2007; 92:519-532.
 30. Gorello P, Cazzaniga G, Alberti F, et al. Quantitative assessment of minimal residual disease in acute myeloid leukemia carrying nucleophosmin (NPM1) gene mutations. *Leukemia*. 2006; 20:1103-1108.
 31. Kristensen T, Moller MB, Friis L, Bergmann OJ, Preiss B. NPM1 mutation is a stable marker for minimal residual disease monitoring in acute myeloid leukaemia patients with increased sensitivity compared to WT1 expression. *Eur J Haematol*. 2011; 87:400-408.
 32. Dvorakova D, Racil Z, Jeziskova I, et al. Monitoring of minimal residual disease in acute myeloid leukemia with frequent and rare patient-specific NPM1 mutations. *Am J Hematol*. 2010; 85:926-929.
 33. Suzuki T, Kiyoi H, Ozeki K, et al. Clinical characteristics and prognostic implications of NPM1 mutations in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2005; 106:2854-2861.
 34. Papadaki C, Dufour A, Seibl M, et al. Monitoring minimal residual disease in acute myeloid leukaemia with NPM1 mutations by quantitative PCR: clonal evolution is a limiting factor. *Br J Haematol*. 2009; 144:517-523.
 35. Kronen J, Schlenk RF, Jensen KO, et al. Monitoring of minimal residual disease in NPM1-mutated acute myeloid leukemia: a study from the German-Austrian acute myeloid leukemia study group. *J Clin Oncol*. 2011; 29:2709-2716.
 36. Schnittger S, Kern W, Tschulik C, et al. Minimal residual disease levels assessed by NPM1 mutation-specific RQ-PCR provide important prognostic information in AML. *Blood*. 2009; 114:2220-2231.
 37. Shayegi N, Kramer M, Bornhauser M, et al. The level of residual disease based on mutant NPM1 is an independent prognostic factor for relapse and survival in AML. *Blood*. 2013; 122:83-92.
 38. Cilloni D, Renneville A, Hermitte F, et al. Real-time quantitative polymerase chain reaction detection of minimal residual disease by standardized WT1 assay to enhance risk stratification in acute myeloid leukemia: a European LeukemiaNet study. *J Clin Oncol*. 2009; 27:5195-5201.
 39. Pozzi S, Geroldi S, Tedone E, et al. Leukaemia relapse after allogeneic transplants for acute myeloid leukaemia: predictive role of WT1 expression. *Br J Haematol*. 2013; 160:503-509.
 40. Small D. FLT3 mutations: biology and treatment. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2006; pp. 178-184.
 41. Kottaridis PD, Gale RE, Langabeer SE, Frew ME, Bowen DT, Linch DC. Studies of FLT3 mutations in paired presentation and relapse samples from patients with acute myeloid leukemia: implications for the role of FLT3 mutations in leukemogenesis, minimal residual disease detection, and possible therapy with FLT3 inhibitors. *Blood*. 2002; 100:2393-2398.
 42. Cloos J, Goemans BF, Hess CJ, et al. Stability and prognostic influence of FLT3 mutations in paired initial and relapsed AML samples. *Leukemia*. 2006; 20:1217-1220.
 43. Grunwald MR, Tseng LH, Lin MT, et al. Improved FLT3 internal tandem duplication PCR assay predicts outcome after allogeneic transplant for acute myeloid leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2014; 20:1989-1995.
 44. Schnittger S, Schoch C, Dugas M, et al. Analysis of FLT3 length mutations in 1003 patients with acute myeloid leukemia: correlation to cytogenetics, FAB subtype, and prognosis in the AMLCG study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease. *Blood*. 2002; 100:59-66.
 45. Schnittger S, Schoch C, Kern W, Hiddemann W, Haferlach T. FLT3 length mutations as marker for follow-up studies in acute myeloid leukaemia. *Acta Haematol*. 2004; 112:68-78.
 46. Hou HA, Kuo YY, Liu CY, et al. DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia: stability during disease evolution and clinical implications. *Blood*. 2012; 119:559-568.
 47. Kohlmann A, Nadarajah N, Alpermann T, et al. Monitoring of residual disease by next-generation deep-sequencing of RUNX1 mutations can identify acute myeloid leukemia patients with resistant disease. *Leukemia*. 2014; 28:129-137.
 48. Thol F, Kolking B, Damm F, et al. Next-generation sequencing for minimal residual disease monitoring in acute myeloid leukemia patients with FLT3-ITD or NPM1 mutations. *Genes Chromosomes Cancer*. 2012; 51:689-695.
 49. Hindson CM, Chevillet JR, Briggs HA, et al. Absolute quantification by droplet digital PCR versus analog real-time PCR. *Nat Methods*. 2013; 10:1003-1005.