



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

д-р Диннар Али Яхя

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

АВТОРЕФЕРАТ

**НА ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД ЗА ПРИСЪЖДАНЕ НА
НАУЧНА И ОБРАЗОВАТЕЛНА СТЕПЕН „ДОКТОР“**

Докторска програма: „Генетика“

Научни ръководители:

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

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

Варна, 2024 г.



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

д-р Диннар Али Яхя

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

АВТОРЕФЕРАТ

**НА ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД ЗА ПРИСЪЖДАНЕ НА
НАУЧНА И ОБРАЗОВАТЕЛНА СТЕПЕН „ДОКТОР“**

Област на висше образование:

4. „Природни науки, математика и информатика“

Професионално направление: „Биологически науки“ Шифър 4.3.

Докторска програма: „Генетика“

Научни ръководители:

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

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

Научни рецензенти:

Проф. д-р Савина Петрова Хаджидекова, д.м.

Проф. д-р Людмила Бончева Ангелова, д.м.

Варна, 2024 г.

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

Дисертационният труд е представен на заседание на разширен Катедрен съвет на Катедра „Медицинска генетика“, Медицински Университет – Варна, на 06.03.2024 г.

Всички включени в дисертационния труд изследвания са извършени в:

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

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

Официалната защита на дисертационния труд ще се състои на 20.06.2024 г. в Катедра „Медицинска генетика“, Медицински Университет Варна, бул. Христо Смирненски 1, гр.Варна.

Материалите по защитата са на разположение в Катедра „Медицинска генетика“, Медицински Университет – Варна.

Съдържание

| | |
|---|----|
| 1. ВЪВЕДЕНИЕ | 6 |
| 2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ НА ИЗСЛЕДВАНЕТО | 8 |
| 2.1 Цел на изследването | 8 |
| 2.2 Задачи на изследването | 8 |
| 3. ПАЦИЕНТИ И МЕТОДИ | 9 |
| 3.1 База на провеждане на проучването | 9 |
| 3.1.1 Пациенти | 9 |
| 3.1.2 Биологичен материал | 10 |
| 3.2 Методи | 11 |
| 3.2.1 Клинични методи | 11 |
| 3.2.2 Генетични лабораторни методи | 11 |
| 3.2.3 Методи за медико-статистическа обработка на данните | 13 |
| 4. РЕЗУЛТАТИ | 14 |
| 4.1 Дескриптивно – епидемиологична характеристика на пациентите и контролните индивиди, включени в проучването | 14 |
| 4.1.1 Възрастово-полова характеристика | 14 |
| 4.1.2 Разпределение по тип ОМЛ | 14 |
| 4.2 Представяне и анализ на резултатите от проведени генетични изследвания | 15 |
| 4.2.1 Резултати от MLPA | 15 |
| 4.2.2 Резултати от КЦА и съпоставка с MLPA | 18 |
| 5. ОБСЪЖДАНЕ | 26 |
| 5.1 Обсъждане на резултати от дескриптивно – епидемиологична характеристика на участниците в проучването | 26 |
| 5.2 Обсъждане на резултатите от проведените генетични изследвания | 28 |
| 5.2.1 MLPA | 28 |
| 5.2.2 КЦА | 34 |
| 6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ПЕРСПЕКТИВИ ЗА БЪДЕЩА РАБОТА | 44 |
| 7. ИЗВОДИ | 47 |
| 8. ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД | 48 |
| 9. НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ ПО ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИЯТА | 50 |
| 10. БЛАГОДАРНОСТИ | 52 |

Често използвани съкращения

Съкращения на кирилица

ДНК - Дезоксирибонуклеинова киселина

КЦА - Конвенционален цитогенетичен анализ

МДС - Миелодиспластичен синдром

НК - Нормален кариотип

ОЛЛ – Остра лимфобластна левкемия

ОМЛ - Остра миелогенна левкемия

ОПЛ - Остра промиелоцитна левкемия

ХМЛ - Хронична миелогенна левкемия

Съкращения на латиница

ELN - European Leukemia Net

FISH - Fluorescent In Situ Hybridization

MLPA - Multiplex Ligase-dependent Probe Amplification

NGS - Next-generation Sequencing

OGM - Optical Genome Mapping

PCR - Polymerase Chain Reaction

WHO - World Health Organization

1. ВЪВЕДЕНИЕ

Острата миелогенна левкемия (ОМЛ) представлява хетерогенна група заболявания, дължащи се на абнормна пролиферация на прогениторни клетки от миелоидния клетъчен ред. Тя е особено характерна за индивиди над 45-годишна възраст и съставлява около 80% от случаите на левкемия сред възрастни. Въпреки това, ОМЛ е рядко заболяване, с обща честота 4,2 на 100000 души, като се наблюдава лека предилекция на мъже спрямо жени (*Vakiti & Mewawalla, 2021*).

На базата на установените механизми на етиология и патогенеза се знае, че на клетъчно ниво това е едно основно генетично по природа заболяване, свързано с широка гама генетични мутации и епигенетични модификации. Генетичните мутации биват най-често придобити и водят до нарушения в хематопоезата по отношение на пролиферация, диференциация, матурация, контрол върху клетъчния цикъл и апоптоза. ОМЛ се характеризира с изключителна генетична хетерогенност, бърз клиничен ход и вариабилна прогноза. Тези особености от една страна усложняват процеса на диагностика и изискват прецизна и ефикасна колаборация между специалисти от сферите клинична хематология, медицинска генетика, клинична имунология, клиничната патология и т.н. От друга страна, охарактеризирането на конкретните генетични събития, довели до даден случай на заболяването, е определящо за поставянето на точна диагноза, прогнозиране на хода му и предикция по отношение на терапевтичния отговор (*Vakiti & Mewawalla, 2021*).

В диагностичен план базово място заема конвенционалният цитогенетичен анализ (КЦА), който има решаващо значение за класифицирането на случаите и тяхното стратифициране по риск. Първите стъпки в онкоцитогенетиката са свързани с откриване на малката Филадельфийска хромозома в клетки на пациенти с Хронична миелогенна левкемия (ХМЛ) през 1960 г в едноименния Американски щат (*Ferguson-Smith, 2015*), но методът има приложение и до днес, за което говори и последната поправка на European Leukemia Net (ELN) от 2022 (*Döhner et al, 2022*). Предвид добре познатите му недостатъци и рискове като ниска резолюция, трудоемка ръчна работа, продължително технологично време и вероятност за липса на метафазни пластинки, обаче, той се допълва от по-детайлни и съвременни молекулярни изследвания.

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

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

2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ НА ИЗСЛЕДВАНЕТО

2.1 Цел на изследването

Да се оцени приложимостта на метода MLPA (Multiplex Ligase-dependent Probe Amplification) за отчитане на характерни за ОМЛ молекулярно-генетични маркери в рутинната клинично-диагностична дейност за оценка на пациенти с новодиагностицирана ОМЛ.

2.2 Задачи на изследването

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

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

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

3. ПАЦИЕНТИ И МЕТОДИ

3.1 База на провеждане на проучването

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

3.1.1 Пациенти

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

3.1.2 Биологичен материал

За целите на молекулярно-генетичния анализ бе изолирана ДНК от левкоцити от венозна кръв. За всеки участник в изследването е използвана затворена система при спазване на стандартните процедури за стерилност. Материалът бе взет чрез еднократно вземане на периферна венозна кръв в количество 6-10 мл, като за групата новодиагностицирани пациенти то бе успоредно с рутинното пробовземане по време на болничния престой за пациентите. Изолирането на ДНК е извършвано в срок до 24 часа след вземане на пробата, като получената ДНК е в ТЕ буфер и е съхранявана в разтворено състояние при температура -20 °С до анализирането на пробите.

3.2 Методи

3.2.1 Клинични методи

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

3.2.2 Генетични лабораторни методи

3.2.2.1 Изолитране на ДНК от венозна кръв (преданалитична процедура)

Геномната ДНК бе изолирана чрез добре познатия солеви метод (изсолване). Концентрацията на изолираната ДНК бе измерена чрез абсорбционен спектрофотометър NanoDrop™ 2000с. Получената ДНК се съхраняваше в разтворено състояние в ТЕ буфер при температура -20 °С до анализиране на пробите.

3.2.2.2 MLPA

Проведохме MLPA на изолираната геномна ДНК с кит SALSA MLPA probemix X060-X2 MDS-AML (MRC Holland, Netherlands), таргетиращ характерни за ОМЛ/МДС (Миелодиспластичен синдром) хромозомни региони и съответните на тях гени, както и 11 референтни сонди за региони, характерно стабилни при МДС и ОМЛ (Таблица 1) – общо 59 сонди за анализ и качествен контрол, според описания от производителя протокол.

Таблица 1. Сонди, включени в използвания кит *SALSA MLPA probemix X060-X2 MDS-AML*

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

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

Вариантите, открити от MLPA в *FLT3-TDK (D835Y)* гена бяха своевременно сравнени с данните от рутинен успоредно проведен молекулярно-генетичен анализ от Лаборатория по клинична имунология, УМБАЛ „Света Марина“ ЕАД Варна, където е използван метод полимеразна верижна реакция – полиморфизъм на рестрикционните фрагменти (PCR-RFLP, Polymerase Chain Reaction - restriction fragment length

polymorphism), използващ рестриктазни ензими, разпознаващи и срязващи определени места в дивия тип ген, но не и в мутантните алели (*Rasmussen, 2012*).

3.2.2.3 КЦА

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

3.2.3 Методи за медико-статистическа обработка на данните

За статистически анализ използвахме следните методи:

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

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

4. РЕЗУЛТАТИ

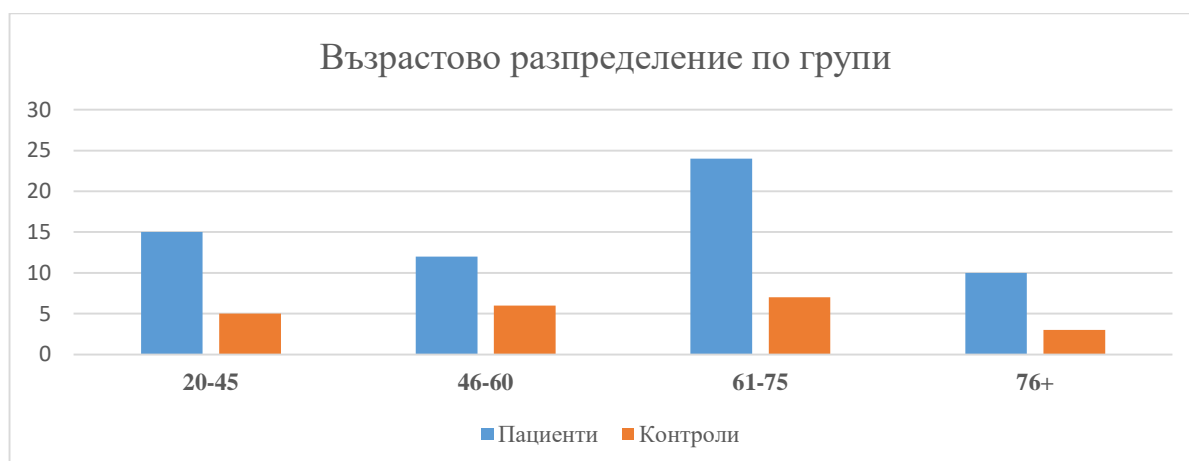
4.1 Дескриптивно – епидемиологична характеристика на пациентите и контролните индивиди, включени в проучването

4.1.1 Възрастово-полова характеристика

Включихме общо 61 пациенти – 29 (47,5%) жени и 32 (52,5%) мъже (М:Ж=1,1:1). Възрастта на обхванатите от проучването пациенти е от 20 до 89 години (медиана на възрастта 62 години) без сигнификантни различия за двата пола – жените бяха на възраст от 20 до 89 години с медиана на възрастта 61, а мъжете – 29 до 83 с медиана 65 години ($p=0,3867$, *Mann-Whitney test*). Преобладаваха пациентите над 60 години - 59% ($n=36$) ($p=0,0466$, *Chi-square test*), а най-силно представената възрастова група бе тази на 61-75 години – 39,3% ($n=24$) (Фигура 1).

Включихме общо 21 здрави контролни индивида – 10 жени на възраст 20-79, медиана 64,5 години, и 11 мъже на възраст 37-73, медиана 62 години, без значима разлика с разпределението и медианата на възрастта на пациентите ($p=0,8557$, *Kruskal-Wallis test*) (Фигура 1).

Фигура 1. Възрастово разпределение на пациенти и контроли по групи



4.1.2 Разпределение по тип ОМЛ

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

- **Група I** – новодиагностицирани пациенти без други предходни хематологични (вкл. малигнени) заболявания (*de novo* ОМЛ) – 48 (78,7%), **доминираща**

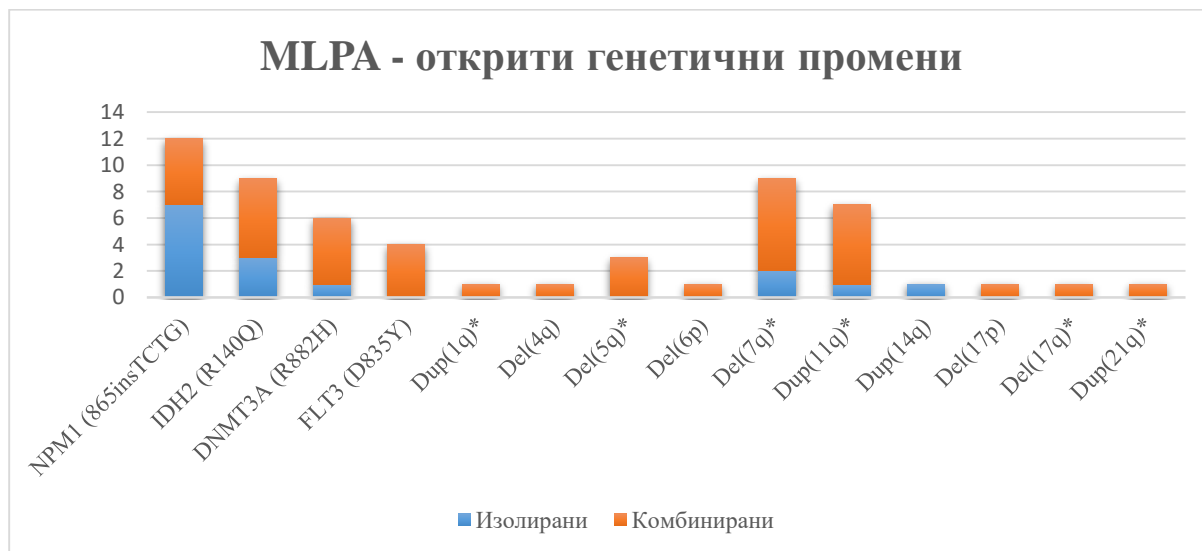
- **Група II** – пациенти с предходно установен МДС – 7 (11,5%)
- **Група III** – пациенти с предходно установена *BCR::ABL1* (-) Миелопролиферативна неоплазия – 4 (6,6%)
- **Група IV** – пациенти с предходно установена ХМЛ – 2 (3,3%)

4.2 Представяне и анализ на резултатите от проведени генетични изследвания

4.2.1 Резултати от MLPA

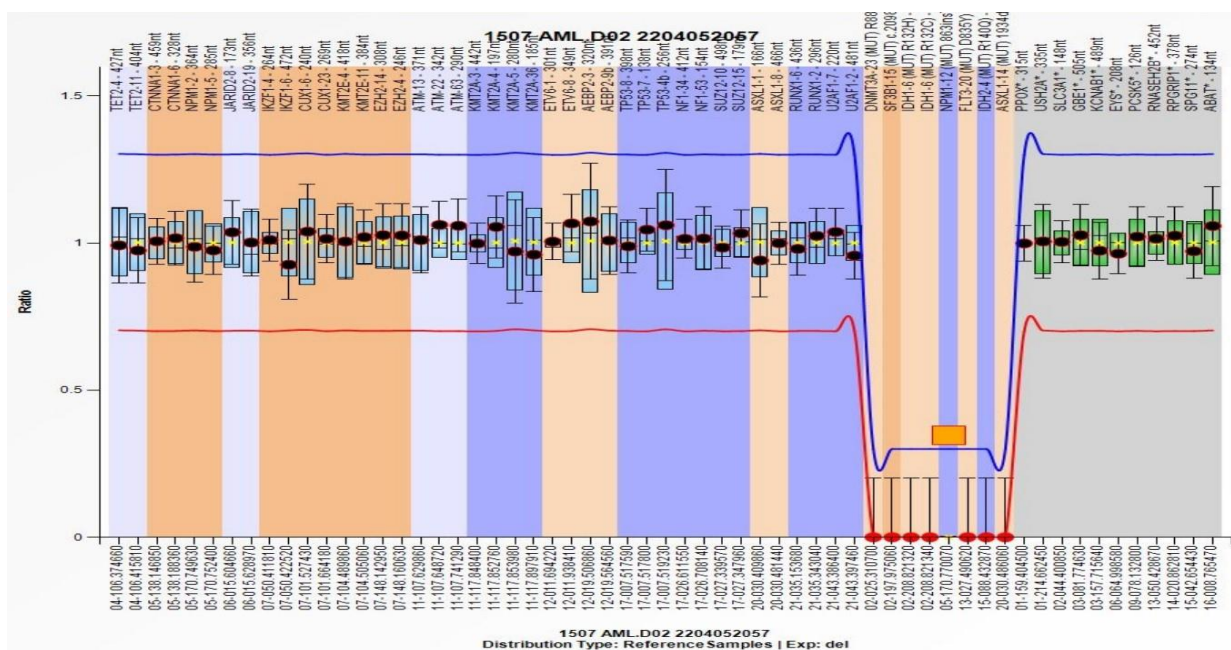
От изследваните 61 пациенти, при 34 (55,7%) се откриват генетични промени, а при останалите 27 (44,3%) такива не се установяват. От 34-мата, при 22-ма (64,7%) бяха открити общо 31 моногенни соматични варианта – в изолирана форма у 11 и в комбинация с друга генетична находка при другите 11 (Фигура 2). Водещ по честота бе *NPM1 (865insTCTG)* вариантът (Фигура 3) – 35,3% от всички пациенти с патология и 19,7% от всички изследвани пациенти (n=12).

Фигура 2. Генетични промени, открити чрез MLPA



*за простота на изгледа са маркирани общо всички сонди в конкретното хромозомно рамо, а честотата е дадена за брой пациенти. Подробно са разгледани комбинациите в Таблица 3.

Фигура 3. Пациент с *NPM1* (865insTCTG) вариант (означен с оранжев правоъгълник), открит чрез *MLPA* (*CoffalyserTM* tool, MRC Holland, Netherlands)



Както се вижда на Фигура 2, *NPM1* вариантът се среща по-често в изолирано състояние – при 7 пациенти, докато при останалите 5 е в комбинация, но само с други моногенни варианти от проведения молекулярно-генетичен анализ (Таблица 2).

Таблица 2. Пациенти с наличен *NPM1* вариант в комбинация с други моногенни варианти

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

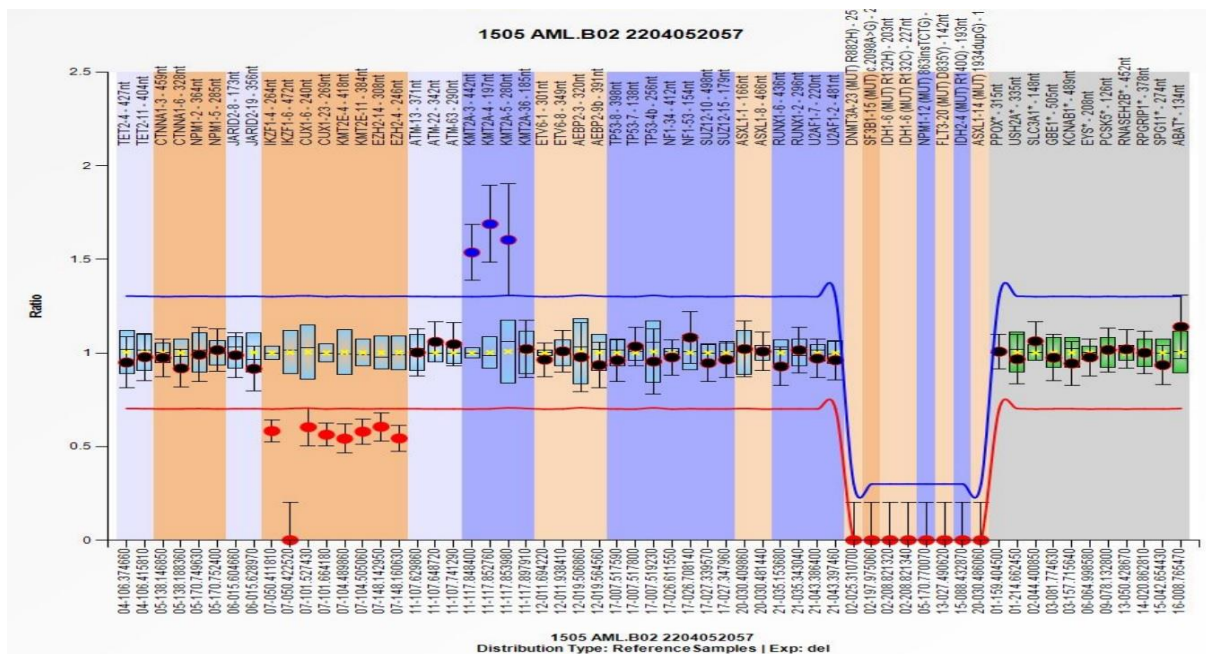
*поредността на вариантите е условна и не отразява еволюционната давност на различните клонално настъпили моногенни събития

Моногенният вариант в *IDH2* бе в изолирана форма при трима пациенти. При други трима, както се вижда по-горе (Таблица 2), той е в комбинация с други варианти в *NPM1*, *FLT3* и *DNMT3A* гените. При останалите трима, комбинацията бе със структурни хромозомни варианти – двама пациенти с делеция 5q и един с дупликация 11q. *DNMT3A* бе в изолирана форма само при 1 пациент, докато в останалите бе в комбинация с друг моногенен (n=3), с моногенен и структурен хромозомен вариант – *FLT3* и дупликация

11q (n=1), или само със структурен хромозомен вариант (n=1) – делеция 7q. *FLT3-TKD* вариантът бе установен единствено в комбинирана форма – 2 пациенти с един или повече други моногенни варианти в *NPM1*, *DNMT3A*, *IDH2* (Таблица 2), и други 2 с моногенни мутации и структурни хромозомни варианти – *DNMT3A* и дупликация 11q (n=1) и дупликация 11q (n=1). Откритите *FLT3-TKD* варианти бяха потвърдени от идентични резултати от рутинно проведения RFLP-PCR при 3-ма от 4-мата пациенти (4-тият не е изследван чрез този метод).

По отношение на хромозомните промени, при 18 (52,9%) от същите 34-ма пациенти (29,5% от всички в проучването) се откриха промени в броя повтори в хромозоми 1, 4, 5, 6, 7, 11, 14, 17 и 21 (Фигура 2). Като разпределение по честота, най-чести бяха МДС-асоциираната делеция в 7-ма хромозома (Фигура 4) – у 50% от пациентите с открита структурна хромозомна патология (n=9), както и дупликация в дълго рамо на 11-та хромозома – 38,9% (n=7) (Фигура 2, Таблица 3).

Фигура 4. Пациент с делеция в 7-ма хромозома – дълго и късо рамо (в червено) и дупликация в дълго рамо на 11-та хромозома (в лилаво) (*Coffalyser™ tool*, MRC Holland, Netherlands)



От всички описани структурни хромозомни находки, 4 бяха в изолирано състояние, а 14 - в комбинация с други генетични промени (Таблица 3).

Таблица 3. Открити чрез MLPA структурни хромозомни аберации (с отговарящите на региона гени и техни екзони); маркирани са и моногенните варианти, открити в комбинация при няколко пациенти

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

4.2.2 Резултати от КЦА и съпоставка с MLPA

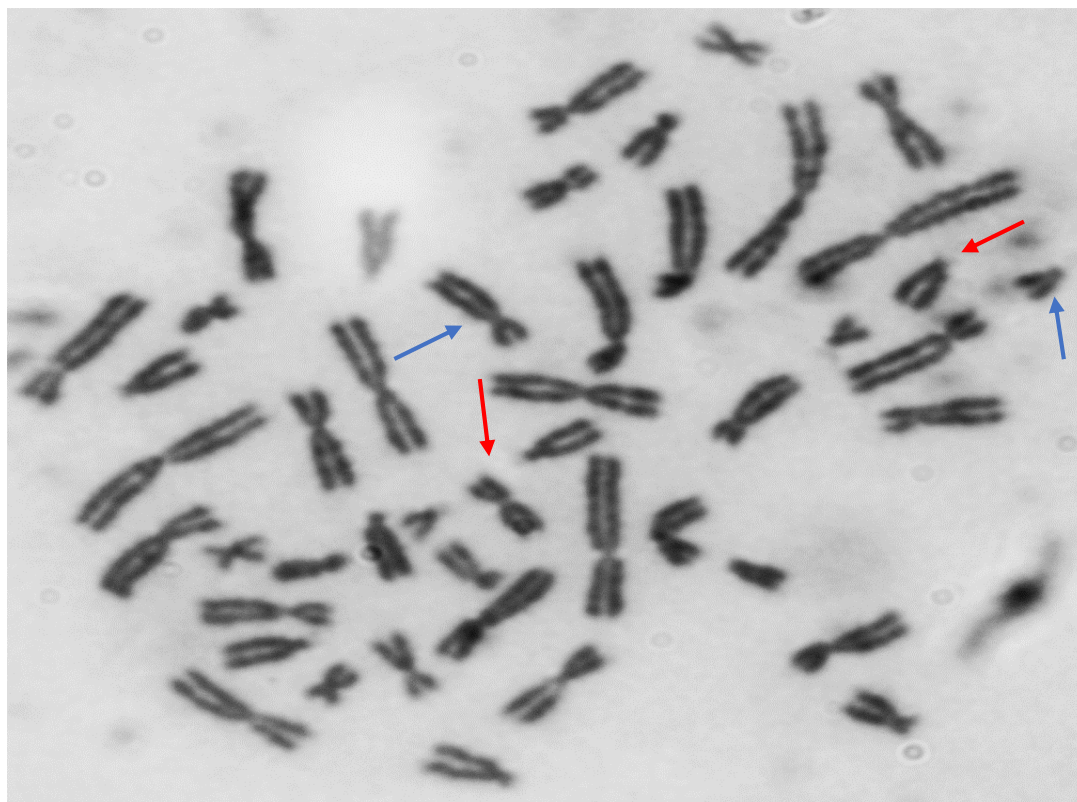
Анализът бе проведен за 53 (86,9%) от всички пациенти - успешно при 38 (71,7%), и без открити метафазни пластинки при останалите 15 (28,3%). При 21 (55,3%) от успешно проведените (или 39,6% от всички изследвани), КЦА установи патологичен резултат

(Таблица 4). Водеща по честота находка бе **t(8;21)(q22;q22)** (Фигура 5) - при 6 (28,6%) от тези пациенти, а след нея бе комплексният кариотип - при други 4 (19%).

Таблица 4. Резултати от проведения КЦА – открита патология

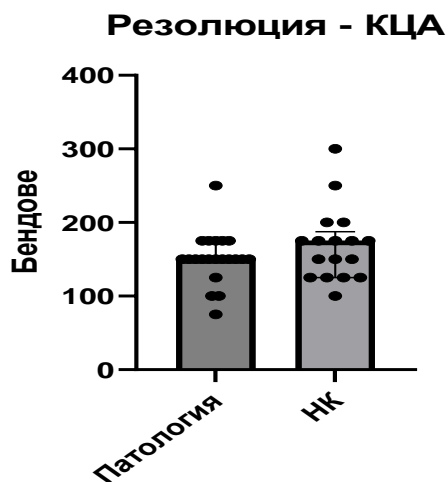
| № | Резултат | Резолюция (бендове) |
|----|---|---------------------|
| 1 | 45,XY,-?D[7]/46,XY[8] | <100 |
| 2 | 46,XY,add(19)(q13.3?)[20] | 150 |
| 3 | 43~46,XY,del(?5)(q?13q?33),+16,-17,-17,+mar{cp9}/46,XY[1] | 100 |
| 4 | 46~48,XX,-7?[3],del(11)(q22),+11,del(12)(p?12),+16,+mar{cp14} | 150-200 |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

Фигура 5. Кариотип с $t(8;21)(q22;q22)$ (двете дериватни хромозоми са маркирани с червени стрелки, а двете нормални – със сини), GTG бендинг, 150-200 бенда.



Прави впечатление, че водещата резолюция и същевременно медиана при пациентите с открита хромозомна аберация, е 150 бенда – 11 (52,4%). Сравнихме я с тази при пациентите с НК (нормален кариотип) като не открихме статистически значима разлика въпреки малко по-високата медиана при втората група ($p=0,2906$, *Mann-Whitney test*) (Фигура 6).

Фигура 6. Графично изображение на разпределението на резолюция с изобразени медиани на двете групи резултати (*GraphPad Prism*)



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

➤ *Пациенти с NPM1 вариант от MLPA*

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

➤ *Пациенти с IDH2 вариант от MLPA*

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

➤ *Пациенти с DNMT3A вариант от MLPA*

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

➤ *Пациенти с FLT3 вариант MLPA*

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

➤ *Пациенти със структурни хромозомни нарушения от MLPA*

От общо 18 пациенти с открита структурна хромозомна аберация от MLPA, 6-ма (30%) са с неуспешен, а 4-ма (22,2%) нямат проведен КЦА. Други 4-ма (22,2%) са с НК и при още 4-ма (22,2% или едва 7,5% от всички с проведен КЦА) се открива патологичен резултат и тук са случаите на конкордантност между двата метода. Това припокриване включи структурни и/или бройни хромозомни аберации по хромозоми 4, 5, 6, 11, 14, 17 и 21, които взаимно се отразяват между двата метода (Таблица 5). Монозомии и тризомии, открити чрез КЦА, се регистрираха от MLPA съответно като дубликации и делеции, засягащи няколко сонди на една хромозома.

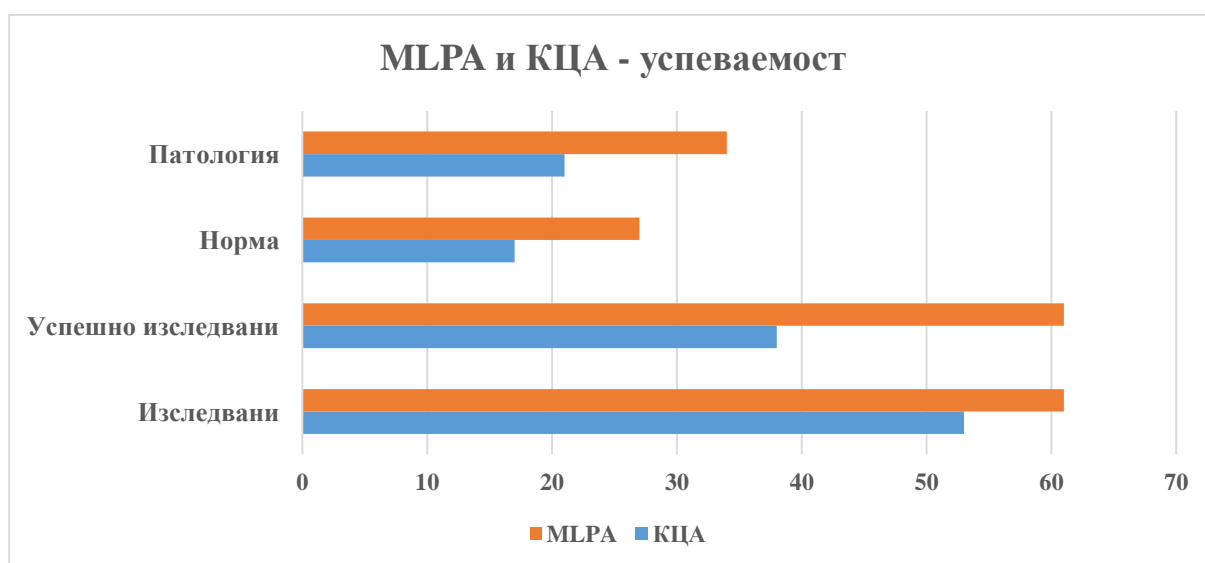
Таблица 5. Конкордантност между находките от MLPA и КЦА

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

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

Сравнението на двата метода по отношение на цялостната им успеваемост и информативност е графично представено на Фигура 7.

Фигура 7. Сравнение между MLPA и КЦА по отношение на успеваемост и находки



От проведеното сравнение правят впечатление няколко особености:

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

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

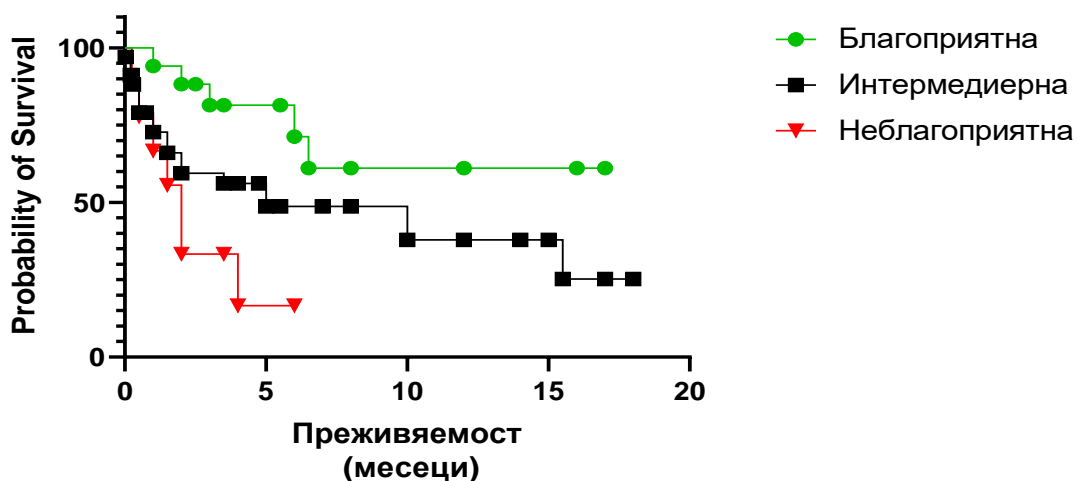
КЦА. Изключая моногенните изменения, тъй като те не са в обхвата на КЦА, при 35 (57,4%) се открива хромозомна патология от комбинацията на КЦА и MLPA - със 17,8% повече от самостоятелния хромозомен анализ. В 18% (n=11) от всички изследвани, MLPA дава информация за находки, пропуснати от КЦА.

Стратификация спрямо риск по ELN (European Leukemia Net) 2022

Съгласно изведената от тези резултати стратификация спрямо риск, 18 (29,5%) принадлежаха на благоприятната, 34 (55,7%) – на интермедиерната и 9 (14,8%) – на неблагоприятната рискова група. Индивидуалната роля на MLPA метода бе такава, че допринесе за стратифицирането на 26 (42,6%) от пациентите в проучването. За 14 (22,9%) пациенти класифицирането се базираше изцяло информацията от метода (Фигура 2) поради липсващ или неуспешен КЦА. За останалите 12 (19,7%), информацията от КЦА (основно НК) бе надградена и доведе до промяна в първоначалната стратификация.

Проведохме анализ на средната преживяемост чрез *Kaplan-Meyer test* с нулева хипотеза, че преживяемостта на трите групи е идентична. Медианата на преживяемостта за благоприятната рискова група бе недефинирана и уточнена по метода на *Machin* (*Machin et al, 2006*) - 11,8 месеца преживяемост за 61,1% от рисковата група. За интермедиерната и неблагоприятната групи тя бе съответно 5 и 2 месеца със статистически значима разлика между трите ($p=0,0190$, *Log-rank (Mantel-Cox test)*, $p=0,0054$, *Log-rank test for trend*). Този резултат отхвърли нулевата хипотеза (Фигура 8):

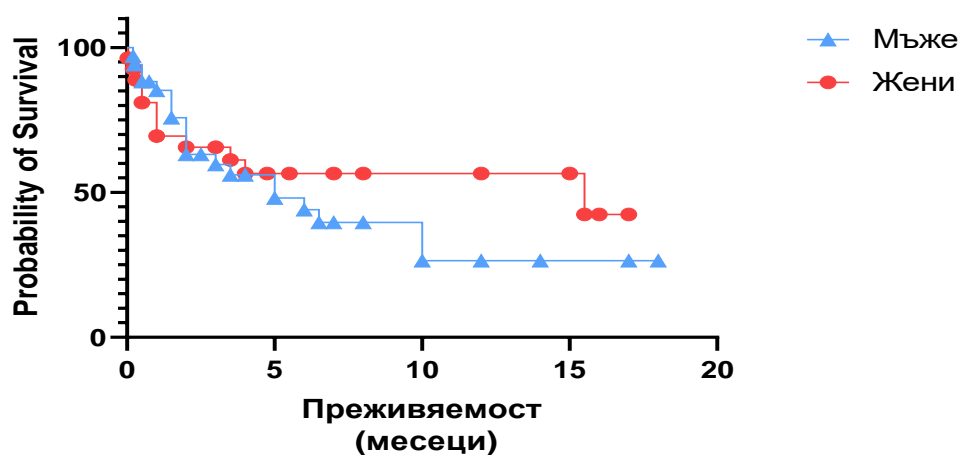
Фигура 8. Средна преживяемост на пациентите, разпределени в рискови групи по ELN 2022 (*Kaplan-Meyer test, GraphPad Prism*)



Анализ на средната преживяемост спрямо пол и възраст

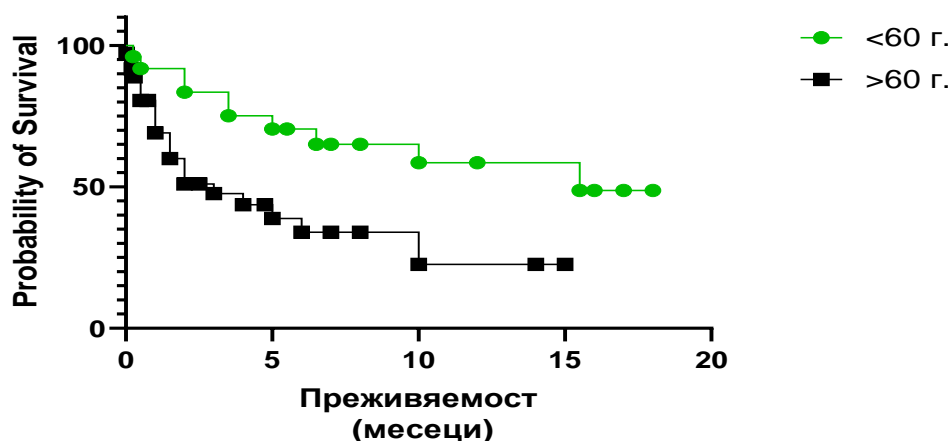
Проведохме също *Kaplan-Meier* анализ на преживяемостта според наличните демографски данни за включените пациенти. Пол – демонстрирана бе средна преживяемост 15,5 месеца за жени и трикратно по-ниска за мъже – 5 месеца, въпреки че p не доби статистически значима стойност ($p=0,4046$, *Log-rank (Mantel-Cox) test*, $p=0,8603$, *Gehan-Breslow-Wilcoxon test*) (Фигура 9):

Фигура 9. Средна преживяемост за двата пола (*Kaplan-Meier test, GraphPad Prism*)



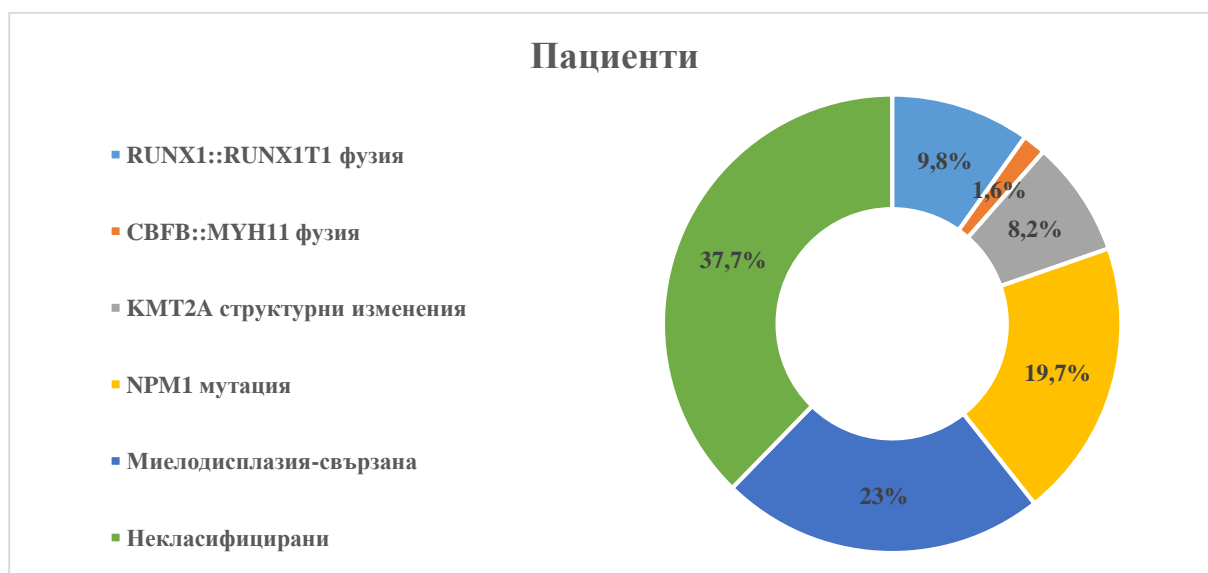
Сравнихме и преживяемостта при пациенти под и над 60-годишна възраст. Резултатът бе красноречив със статистически значима разлика в средната преживяемост -15,5 месеца за пациентите под 60 г и 3 за тези над 60 г ($p=0,0074$, *Log-rank (Mantel-Cox) test*, $p=0,082$, *Gehan-Breslow-Wilcoxon test*) (Фигура 10).

Фигура 10. Средна преживяемост за пациентите под и над 60-годишна възраст (*Kaplan-Meier test, GraphPad Prism*)



Основавайки се на придобитата от проучването информация, разпределихме пациентите на следните групи (Фигура 11):

Фигура 11. Разпределение на включените в проучването пациенти по WHO 2022



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

5. ОБСЪЖДАНЕ

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

Възрастово-полова характеристика и изследвана средна преживяемост спрямо тези фактори

Нашите резултати показаха голямо сходство с докладваните в литературата по отношение на средна възраст на поставяне на диагнозата – 63-65 години (*Vakiti & Mewawalla, 2021, Герчева и съавт., 2010*). Също така, по-често се установява ОМЛ при по-възрастни пациенти – медиана на възрастта 62 г, като 59% (n=36) бяха над 60 - и 75,4% (n=46) - над 45-годишна възраст. Сходни са данните на Герчева и съавтори с 55% пациенти над 60-годишна възраст (*Герчева и съавт., 2010*). Напредналата възраст на новодиагностицираните с ОМЛ пациенти е добре позната предпоставка за по-нисък процент на постигане на ремисия, по-висока ранна смъртност и по-кратка обща преживяемост (*Appelbaum et al, 2006*), установени и от местни проучвания (*Герчева и съавт., 2010, Шемелекова и съавт., 2010*). Преживяемостта на нашите пациенти под и над 60-годишна възраст също демонстрира влошаване на прогнозата за по-възрастните пациенти с петкратно по-ниска преживяемост при вторите (Фигура 10). Разбира се, тази смъртност се влияе и от други фактори като вид терапия, придружаващи заболявания (периодът ни на проучване съвпада с новозатихналата пандемия от COVID-19 освен очакваните сърдечно-съдови, ендокринни и др. хронични заболявания), ELN рискова група и др.

Много по-млад е контингентът пациенти в дългогодишно проучване от Индия на *Srivastava* и съавтори (*Srivastava et al, 2023*) – медиана 42 години и едва 13% са на възраст над 60 години. Възможно е да става дума за различна възраст на изява на заболяването при различните етнически групи или за различия, породени от по-големия обем (1860 пациенти) на цитираното проучване.

Ние не отчетохме голяма разлика в засягането на двата пола – М:Ж=1,1:1. По литературни данни се очаква по-голяма такава - 1,67:1 (*Vakiti & Mewawalla, 2021*), 1,34:1 (*Stabellini et al, 2023*), 1,63:1 (*Шемелекова и съавт., 2010*). Възможно е съотношението при нас да се дължи на малката извадка пациенти и по-малко вероятно - на възрастовото ограничение, наложено в нашето проучване. Проведеният от нас анализ за средна преживяемост (Фигура 9) отчете трикратно разлика между двата пола (М:Ж = 5:15,5

месеца). За сравнение, Stabellini и съавтори отчитат сходна за двата преживяемост - 10,8 и 10,1 месеца съответно за мъже и жени, но и двукратна разлика в полза на жените - 36,7 спрямо 70,9 месеца, при вземане предвид историята за предходна хоспитализация (Stabellini et al, 2023). Вероятно както и при фактора възраст, полът не може да се разглежда без останалите фактори, определящи хода на заболяването.

Разпределение по видове показания

Известно е, че основен рисков фактор за развитие на ОМЛ е МДС, а също миелофиброза и апластична анемия (Vakiti & Mewawalla, 2021). В нашето проучване 11 (18%) пациенти отговарят на тези категории. Общо 11,5% са с ОМЛ след МДС, което съвпада с процента вторична ОМЛ (11%) при пациенти над 60 години при проучването на Шемелекова и съавтори (Шемелекова и съавт., 2010). При тези, както и при малкото пациенти с предходна ХМЛ (n=2), знанието за тези състояния и системното провеждане на контролни прегледи и клиничко-лабораторни проучвания предполагат навременно поставяне на диагноза ОМЛ. Въпреки това, предходно хематологично заболяване представлява предпоставка за по-лоша прогноза в сравнение с *de novo* ОМЛ (Hochman et al, 2023).

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

5.2 Обсъждане на резултатите от проведените генетични изследвания

5.2.1 MLPA

По отношение на успеваемостта на метода, ние отчетохме наличие на генетична промяна при 55,7% от изследваните (Фигури 2 и 7). Ако приемем, че целева успеваемост при левкемогенен процес е 100%, MLPA проявява неуспех в откриването на генетичните промени у останалите 44,3%. Това се дължи на таргетния характер на метода и тук се пропускат множество обособени по WHO 2022 форми. По литературни данни, общата честота на всички тези форми взети заедно е от порядъка на 25-45% при възрастни, което може да обясни липсата на по-висока степен на успеваемост на използвания от нас молекулярно-генетичен метод. Фактор е също известното ограничение в чувствителността на метода по отношение на моногенни варианти, делеции и дупликации – съответно 5-10%, 20% и 40% (*Hömig-Hölzel & Savola, 2022*). Възможно е използването на общоприетия първи избор за биологичен материал при миелоидни неоплазии – костен мозък (*Rack et al, 2019*), да повиши информативността на метода и това е една от бъдещите насоки за работа на това проучване.

Открихме едва няколко проучвания, използващи MLPA като метод първоначална оценка на пациенти с ОМЛ - *Bănescu* и съавтори и *Tripou* и съавтори (*Bănescu et al, 2019, Tripou et al, 2019*) използват общо 5 панела за изследване на новодиагностицирани пациенти над 18-годишна възраст. Екипът включва още соматичните варианти в гените *NPM1*, *FLT3* и *DNMT3A*. Като цяло резултатите им са сходни с тези в нашето проучване по отношение на хромозомни (31,8%) и моногенни находки - *NPM1* вариант в 17%, *FLT3-TKD* – 5,3%, *DNMT3A* – 12,4%. Вероятно нашият подход е бил по-практичен, тъй като използваме само един MLPA панел с по-нисък разход на реактив и биологичен материал, и по-ниска стойност на молекулярно-генетичната оценка.

В друго проучването на *Marcinkowska-Swojak* и съавтори (*Marcinkowska-Swojak, 2016*) използват собствен панел и се фокусират върху детекция на три от най-честите при ОМЛ *NPM1* варианта или структурни преустройства, включващи този ген, с общо 12 специфични сонди. Тяхната успеваемост от 20,9% (14 от 67) за установяване на *NPM1* тип А е съпоставима с нашата.

Екипът на *Donahue* и съавтори (*Donahue et al, 2011*) провежда изследване на общо 110 проби - 56 от тях са на пациенти с МДС/ОМЛ. Те използват панел P145-MDS2, включващ 31 хромозомни локации без моногенни соматични варианти и FISH с

МДС/миелоиден панел на Vysis (Abbot Molecular, USA) със сонди за 11 хромозомни региона. Успеваемостта им е по-ниска – 8,9% за MLPA и 10,7% за FISH с висока конкордантност между двата метода. Тази разлика с нашите данни вероятно се дължи от една страна на селектирането на пациенти и липсата на соматични варианти в изчисленията от тях панел. Все пак, докладваната висока конкордантност между двата метода и между видовете биологичен материал, е обнадеждаваща за нашите перспективи за работа.

Ако разгледаме откритата патология на фона на известната честота по литературни данни, виждаме че очакваната честота за NPM1 вариантите е 30% (*Heath et al, 2022*). Възможно е по-ниският процент при нас да се дължи на пропуснати пациентите с други типове варианти в гена, на използването на венозна кръв или на малкия обем на нашето проучване. Успеваемостта в нашето проучване обаче е съпоставима с тази на други екипи - Balatzenko и съавтори (*Balatzenko et al, 2014*), Bănescu и съавтори (*Bănescu et al, 2019*) и Marcinkowska-Swojak и съавтори (*Marcinkowska-Swojak, 2016*).

По отношение на открития от нас вариант *IDH2* (R140Q) при 14,6% от пациентите, докладваната от нас честота съвпада с тази по литературни данни – 10-15% (*Stein, 2023*). Abbas и съавтори (*Abbas et al, 2010*) докладват за честота от 11% (n=97) на варианти в този ген в по-обемно проучване на новодиагностицирани пациенти с ОМ по метода reverse transcriptase-PCR, последван от директно секвениране. Най-честият вариант, докладван от тях, е R140Q – 8,3% (n=74) от всички изследвани. Освен изцяло за целите на подобрена диагностика, разпознаването на тези пациенти би могло да даде възможност за таргетна терапия (*Amaya et al, 2018*).

Що се отнася до пациентите от нашето проучване с открит *DNMT3A* вариант - 9,8%, направихме сравнение с работата на няколко екипа. Bănescu и съавтори съавтори (*Bănescu et al, 2019*) откриват такъв при 12,4% от своите пациенти като те проверяват едновременно за общо 6 точкови варианта в гена), докато използваният от нас кит има сонда за един от тях – R882H (c.2645G>A). Тъй като не е коментирана честотата на всеки от тези 6 варианта по отделно, можем да спекулираме, че тази на изследвания от нас вариант ще е в някаква степен по-ниска от общо посочената.

В проучване от Китай на Yuan и съавтори (*Yuan et al, 2019*), включващо 870 новодиагностицирани пациенти над 14-годишна възраст, се изследват два точкови варианта в *DNMT3A* гена - R882H и R882C. Те използват пиросеквениране и откриват

R882H в 6,2% процента от всички изследвани. Прави впечатление, че както нашите, така и данните от тези две проучвания отчитат по-ниска от очакваната по литературни данни откриваемост от 20% независимо от обема или използвания метод (*Park et al, 2020*). Възможно е това да се дължи на факта, че ние изследваме само един, макар и най-честия от вариантите в този ген на фона на съществуващи други такива със сходно прогностично значение.

Интересно е също наличието на съпътстващ *NPM1* и/или *FLT3* вариант при общо 66,7% от нашите пациенти с установен *DNMT3A* вариант, съответно 50% и 33,4% като при един от пациентите се наблюдават трите варианта едновременно. Подобна тенденция се установява и в проучването на Yuan и съавтори – близо 27% от пациентите има с *DNMT3A* вариант имат и такъв в *FLT3*, като се има предвид, че те проверяват за наличието на по-честия по литературни данни *FLT3-ITD*. За съжаление те не посочват конкретна честота на *NPM1* вариантите (*Yuan et al, 2019*). Значението на тези комбинации не е напълно изяснено, но вероятно поначало добрата прогноза при наличен *NPM1* вариант се повлиява неблагоприятно, така както е известно за ко-мутацията в *FLT3-ITD* (*Döhner et al, 2022*).

Наблюдава се също едновременно присъствие на *DNMT3A* вариант и структурни и/или бройни хромозомни варианти при 50% от нашите пациенти (общо от двата метода) и при 33,3% конкретно от MLPA. Bănescu и съавтори (*Bănescu et al, 2019*) отчитат сходни данни, а екипът на Yuan и съавтори – при 20,6%, установени от КЦА (*Yuan et al, 2019*).

Вариантът *FLT3-TKD* е най-редкият в нашето проучване и е все още извън известните класификациите и рисковите стратификации. Отчетената от нас честота от 6,6% отговаря на съобщената по литературни данни (*Kennedy & Smith, 2020*). Сходни са данните от мащабното проучване от Германия на Bacher и съавтори на 3082 пациенти на възраст над 17,5 години – 4,8% (*Bacher et al, 2008*) с използване на т.нар. *melting curve analysis* – разновидност на PCR с отчитане разликата в точките на топене при наличие на разлики в секвенциите на PCR продуктите. В ретроспективно проучване на Shankaralingappa и съавтори (*Shankaralingappa et al, 2022*), *FLT3-ITD* и *FLT3-TKD* се изследват при 424 новодиагностицирани възрастни и деца. *FLT3-TKD* вариантът се установява при 5,9% от изследваните с помощта на PCR-базиран метод. Много по-висока е честотата на другия вариант в гена – 16,5%, което още веднъж потвърждава нуждата от изследване му при всеки един новодиагностициран пациент.

Що се отнася до детекцията на структурна хромозомна патология, водеща по честота у нас бяха делеция в 7-ма хромозома – у (14,6%) и дупликация в дълго рамо на 11-та хромозома при (11,5%). В проучването на Donahue и съавтори (179) цялостната водещата им находка е дупликация в 8-ма хромозома (4%) - вероятна тризомия 8, характерна за ОМЛ. Избраният от нас панел не съдържа сонда, таргетираща хромозома 8, така че промените по нея биха останали изцяло неразпознати. Екипът докладва още за комбинация от 5q и 17p делеции при 1 пациент, каквато се отчита и при нас, но в комбинация с още няколко нарушения (Таблица 3). Вижда се, че съпоставката е затруднена от различния процент успеваемост и различните сонди, използвани в двете проучвания. По-удачно би било сравнението с труда на Bănescu и съавтори, но те не представят по-детайлни данни за откритата от тях структурна хромозомна патология.

В проучване на Konialis и съавтори (*Konialis et al, 2014*) изследват предимно костномозъчни проби от възрастни и деца, 56% от които на новодиагностицирани пациенти и 14% на пациенти с вероятна ОМЛ. Екипът създава панел P377, включващ общо 54 сонди за структурни хромозомни находки и работи с ДНК, изолирана след краткотрайно култивиране, а за качествен контрол използват 10 проби от здрави контролни индивиди. Провеждат също КЦА и FISH – налични панели (Vysis, Abbott Molecular, USA) или подбрани и синтезирани според хромозомния регион (Empire Genomics LLC, USA, Bluegnome Ltd., UK). Успешна интерпретация на резултатите от MLPA докладват в 98,4% от случаите с най-честа находка - делеция в 9p21.3 (*CDKN2A,-B*) при 2,2% от всички изследвани, но пациентите са с подозрение за ОЛЛ. В X060 панела такава сонда липсва. При други 1,9% - загуба или допълнителен генетичен материал в 22q22.1 – *RUNX1*, основно при педиатрични пациенти с вероятна остра левкемия. Ние докладвахме дупликация при единствен пациент (1,6%). При 1,3% като пациентите са в същата възрастова и клинична група, отчитат делеция в *ETV6*, каквато при нас не бе докладвана. По-нататъшна съпоставка не е възможна поради липса на описание на всички находки в проучването – авторите се ограничават до клинично значими на фона на НК или несвързани находки, определени така от тях. Съпоставката е силно затруднена от разликите в дизайна на двете проучвания – контингент пациенти като възраст и инициална диагноза, време от поставяне на диагнозата. Тук едва половината пациенти са новодиагностицирани. Фактор е също и избрания панел – P377 е по-широк и би могъл да намери приложение при различни онкохематологични състояния, но същевременно находките за конкретна нозологична единица силно се ограничават. Описаното от

авторите затруднение в интерпретацията на 1,6% не бе наблюдавано при нас. Възможно обяснение за това може да бъде по-големият брой здрави контролни индивиди в нашето проучване в съотношение 1:3 с пациентите, на фона на 1:31,3 за екипа на Konialis и съавтори или по-големия обем на проучването на (n=313) .

Поради ограниченото количество публикации, описващи приложение на MLPA, решихме да съпоставим успеваемостта му за структурни хромозомни преустройства с тази на алтернативни варианти. В скорошно проучване от САЩ, Levy и съавтори (*Levy et al, 2023*) изследват 100 възрастни пациенти с ОМЛ – 98 новодиагностицирани и 2-ма след релапс, с медиана на възрастта 58 години. Като източник на ДНК, екипът работи с венозна кръв или костен мозък при наличие на поне 20% бласти. Методът на избор е Optical Genome Mapping (OGM) (Bionano Genomics, USA) – молекулярно-генетичен целогеномен метод, визуализиращ голям диапазон от структурни генетични промени (разрешителна способност над 500 бази), включително балансирани, с висока чувствителност (5%). Всички от тях подлежат на КЦА, 19 - на FISH, 3-ма – на микрочипов анализ. Общо при 45% се открива находка от OGM, което надхвърля успеваемостта на използвания от нас молекулярно-генетичен метод по отношение на конкретния тип патология. Според представените от тях резултати, 11 от 16-те вида находки са транслокации и инверсии, които не са в аналитичния обхват на MLPA. Сред тях за гореописаните t(8;21), inv(16p), t(6;9) и други, включени в актуалната класификация на WHO и в стратификацията спрямо риск на ELN. Що се отнася до съпоставимите с нашето проучване резултати, при 11% от изследваните се открива монозомия или делеция в хромозома 5 – по-висок процент от съобщения в нашите резултати. При 11% от изследваните от Levy и съавтори се отчита монозомия или делеция в хромозома 7, сходна с нашата честота от MLPA. При 8% се открива монозомия или делеция в хромозома 17, на фона на 1,6% при нас. Други 6% от цитираното проучване са с тризомия 8, за която в използвания от нас кит няма сонда, а в 3% се среща делеция в 20-та хромозома, неотчетена от MLPA. Редно е все пак да се отбележи, че имайки предвид всички използвани методи в проучването на Levy и съавтори, общо при 46% се открива патология с висока конкордантност между използваните от тях методи. За паралел, при нас общо при 57,4% се открива структурна или бройна хромозомна патология от комбинацията КЦА и MLPA. Тази разлика може да се дължи на различния обем на проучванията или на неизвестни за нас разлики в дизайна на проучването и в селекцията на пациентите. Конкордантността при нас е далеч по-ниска, най-вероятно заради таргетния характер на молекулярно-генетичния метод, но общият процент на

успеваемост е по-висок. В 13% от случаите OGM (Optical Genome Mapping) дава информация за находки, пропуснати от КЦА, на фона на 18% при нашия опит с MLPA. Също така, в 27% от случаите, използваният в цитираното проучване метод уточнява точките на тези хромозомни промени, прецизирайки наличната информация и включените гени, което води и до изменения в първоначалната стратификация спрямо риск. Това уточняване касае най-вече откритите от екипа транслокации. OGM демонстрира висока конкордантност с КЦА и FISH, като се отчита потенциал за пропуск единствено при нискостепенни клонове под 5-10%. Това определя метода като неподходящ за изследване на пациенти с цел отчитане на минимална резидуална болест. При нас обаче конкордантността бе далеч по малка, както поради таргетния характер на MLPA, така и поради по-ниската чувствителност спрямо OGM и КЦА. От тези данни се вижда, че сравнението на OGM с MLPA безспорно сочи първия като по-висш метод в откриването на хромозомни изменения с различна резолюция. По-лесно би било сравнението с комбинацията от КЦА и MLPA, което предполага, че OGM би могъл успешно да я замени.

Резултатите от това проучване показват, че OGM е потентна алтернатива за детекция на бройни и структурни хромозомни нарушения, включително балансирани и комплексни, с висока чувствителност и специфичност. Превъзхожда както MLPA по чувствителност, така и КЦА в уточняването на някои криптични (до субмикроскопски), но ключови изменения като транслокации, малки делеции, инверсии, както и случаите на хромоплексия. Важна е също скоростта на анализа – няколко дни за лабораторни изпълнение и анализ на данните, както и липсата на нужда от култивация на клетки, което е често предизвикателство при този вид проби. Имайки предвид тези предимства, както и автоматизацията на процеса, е твърде вероятно е методът да замени КЦА в бъдеще. Основното предизвикателство за целта е все още високата цена на анализа – около 500 щатски долара за проба (*Levy et al, 2023*). Включвайки допълнителен метод за детекция на моногенни промени, цената за пациент би се покачила вероятно двойно. OGM се извършва със специализирана техника, изискваща значителна начална инвестиция. Тази техника не е съвместима с друг метод, за разлика от практичните термоциклери и секвенатори при PCR или MLPA. Не на последно място, цялостният геномен характер на метода предполага голям обем на получените данни, изискващ комплексна биоинформатична обработка и интерпретация от специализиран персонал. Такъв не винаги фигурира като стандартна част от личния състав на болничните заведения. Това обаче е по-скоро временен проблем – съвременните генетични

изследвания са тенденциозно все по-всеобхватни и работата с големи количества информация се очаква да стане рутинна.

Ако се върнем към нашите данни, от Таблица 3 прави впечатление, че в болшинството случаи има промяна по отношение на няколко сонди, маркиращи различни гени и/или различни техни екзони върху едно и също хромозомно рамо. От една страна, това корелира с размера на настъпилата аберация, макар че не може да се даде абсолютна информация поради таргетния характер на анализа. От друга страна, засягането на няколко съседни сонди повишава достоверността на резултата, тъй като се изключва възможността за случайно настъпили грешки при лигирането в реакцията. Все пак, макар и частична, тази информация би могла да се допълни с наличната от рутинно прилагания КЦА, както ще бъде коментирано по-долу.

5.2.2 КЦА

При този метод прави впечатление първоначалната редукция на пациенти, чиито резултати подлежат на обсъждане. От една страна, при 8 (13,1%) от тях, КЦА не е проведена по технически причини. Допълнителна редукция носи неуспешното култивиране на клетки, в 24,6% от всички пациенти в проучването - висок процент в сравнение с проучването на Cirakoglu и съавтори (*Cirakoglu et al, 2022*) - 12,1%. Yuan и съавтори (*Yuan et al, 2019*) успешно се провежда КЦА при 90,7% от пациентите в проучването - чувствително по-нисък от нашия неуспех. В проучването на Герчева и съавтори (*Герчева и съавтори, 2010*), повечето от пациентите (60%) не подлежат на КЦА като неуспешният анализ при тях е наблюдаван при 14,3%. Цитираните различия в успешно култивиране на клетки са индикация за нужда от преразглеждане и опит за подобряване на използваните от нас протоколи на работа. Редно е да се отбележи, че нашата успеваемост на практика отговаря на установения по стандарт „Медицинска генетика“ на Министерство на здравеопазването допустим праг от 60% (https://www.mh.government.bg/media/filer_public/2015/11/18/medicinska-genetika.pdf).

Успеваемостта по отношение на открита патология е друг аспект, който би могъл да варира. Отчетеният от нас дял на НК (Фигура 7) - 44,7% е сходен с този при Cirakoglu и съавтори – 42,8% (*Cirakoglu et al, 2022*). Yuan и съавтори (*Yuan et al, 2019*) докладват 60,7%. Възможно е тази разлика да се дължи на субективни фактори като критичност на анализиращия, чувствителност на софтуера са кариотипиране, ако се използва такъв, или

други, които не са дискутирани в статията на този екип. Интересна би била съпоставка с българските проучвания, цитирани по-горе, но Шемелекова и съавтори (*Шемелекова и съавтори, 2010*) изследват малък контингент и данните не са включени, докато при Герчева и съавтори (*Герчева и съавтори, 2010*), находките не са конкретизирани, а само съотнесени към рискова група.

Що се отнася до вида и честотата на находките, водещи при *Cirakoglu* и съавтори (*Cirakoglu et al, 2022*) монозомален (27,8%) и комплексен кариотип (25,3%). Това се различава от нашите резултати - водеща бе благоприятната t(8;21) в 28,6% от пациентите с налична находка, следвана от комплексен кариотип в 19%. В цитираното проучване, същата транслокация се среща при едва 8,7% от пациентите с патология, значително по-ниска от отчетената от нас честота. Възможно е тази разлика да се намали при увеличаване обема на нашето проучване, тъй като разликата в сравнените тук извадки е четирикратна.

Интересен е също паралелът със собствения ни опит за период от 11 години – 2010-2020 година, не включващ настоящото проучване (*Yahya et al, 2021*). Ретроспективно бяха разгледани резултатите на 424 пациенти с ОМЛ, предимно възрастни (97,4%) – общо 723 проби за КЦА. Тъй като не става дума само за новодиагностицирани, а и за вече лекувани пациенти, някои от са изследвани повече от веднъж за периода. Успех е регистриран в 83,8% от случаите, което се доближава повече до цитираните по-горе сродни проучвания. Успеваемостта по отношение на отчетена патология обаче е по-ниска, НК в отчетен в 60,9%, което е по-близко до коментирана от *Yuan* и съавтори (*Yuan et al, 2019*). Релевантна разлика между тези две проучвания е селекцията на пациенти – нашето ретроспективно проучване включва вече лекувани пациенти, което е добре позната и очаквана предпоставка за НК (*Marcucci et al, 2004, Chen et al, 2011*). Имайки това предвид, най-честата находка за този период е комплексния кариотип, срещан в 35% от случаите с открита патология, докато t(8;21) е характерна за едва 4,2%.

В проучване на *Велизарова* и съавтори (*Велизарова и съавтори, 2009*) са изследвани 49 новодиагностицирани възрастни пациенти - 28 с ОМЛ, а останалите – с ОЛЛ. Те провеждат КЦА на материал от костен мозък, както и FISH със сонди за пет фузионни гена на Vysis (Abbot Molecular, USA). Находките не са разделени според диагнозата на пациентите. Един от пациентите е без проведен КЦА, а при други 8 (16,7% от изследваните) той не неуспешен. 37,5% от останалите са с НК – по-нисък от описаните

по-горе проучвания. Дизайнът на това проучване включва освен случаи на ОЛЛ и пациенти с ОПЛ, обичайно изключвани поради очакваната находка там ([https://atlasgeneticsoncology.org/haematological/1035/t\(15;17\)\(q24;q21\)-pml-rara](https://atlasgeneticsoncology.org/haematological/1035/t(15;17)(q24;q21)-pml-rara), *Liquori et al, 2020*). Транслокация (15;17) или еквивалентната на нея генна фузия е установена в 7,1% от пациентите с ОМЛ от комбинацията КЦА и FISH. От 25 пациенти с открита патология, при 2 с ОМЛ се открива Филадельфийска хромозома, липсваща при нас. При други 2 авторите докладват t(8;21). Въпреки, че не се конкретизира диагнозата на последните, вероятно става дума за такива с ОМЛ, т.е честотата би била също 7,1%, по-ниска от нашата, която за всички изследвани би била 11,3%. Същото може да се предположи за 1 (3,6%) пациент с инверсия в хромозома 16, при нас също единствен такъв, както и по 2-ма пациенти с тризомия 8 за двете проучвания. Отчита се още комплексен кариотип при 3-ма пациенти, но той поначало е характерен за различни онкохематологични заболявания и по-нататъшна интерпретация не е възможна.

В проучването на *Srivastava* и съавтори (*Srivastava et al, 2023*) са изследвани 1860 възрастни с ОМЛ - КЦА на материал от костен мозък с допълнително прилагане на FISH. Те инициално изключват лекувани пациенти и такива с липса или недостатъчно метафазни пластинки. Тези критерии биват изпълнени от 96,3% (n=1791) – по-висока успеваемост от нашата и тази на другите цитирани проучвания. Водещ е също делът на открити хромозомни аберации - патология е докладвана в цели 63,9%, но не са изключени пациенти с ОПЛ. Неслучайно най-честа находка е t(15;17) – 26,1% от патологичните резултати, Чести също са комплексният кариотип – 17,5% и монозомалният кариотип – 13,8% . Тези проценти са сходни с нашето, макар и далеч по-малко, проучване. Също както при проучването на *Велизарова* и съавтори (*Велизарова и съавтори, 2009*), t(8;21) се среща по-рядко отколкото при нашите пациенти. Инверсията в хромозома 16 се отчита в 2,6% от пациентите а хромозомна аберация, което е по-малко от нашата честота, о това вероятно е свързано с обема на двете извадки (единствен пациент при нас). Екипът описва също интересна асоциация на напредналата възраст с НК и комплексен кариотип. Въпреки споменатото по-горе различие във възрастта при двете проучвания е впечатляваща разликата в находките при заложените от тях възрастови групи. Поради малкия брой пациенти не сме провели такъв анализ, но би било информативно да се сравни при по-голяма група в бъдеще.

Levy и съавтори (*Levy et al, 2023*) демонстрират по-ниска успеваемост от докладваната в нашите резултати по отношение на КЦА – 42% с патологичен резултат и

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

Важен аспект на надеждността на КЦА е и достигнатата разрешителна способност. Макар и да не се цитира в разгледаните от нас проучвания, тя е известен лимит както за самия метод, така и за работата с костно-мозъчни проби. Във всеки резултат от КЦА по стандарт (https://www.mh.government.bg/media/filer_public/2015/11/18/medicinska-genetika.pdf, *Hastings et al, 2012, Hastings et al, 2013*) задължително се посочват резолюцията и ограниченията, които тя обуславя. Докладвайки постигнатата от нас резолюция (Таблица 4), без да отчитаме съществена разлика при НК и патология (Фигура б), съзнаваме неизбежно пропуснатите находки. Неизменно това е предпоставка за неуспех в регистрирането на по-детайлни промени, които по дефиниция са в рамките на разрешителната способност на метода. Такива например са някои делеции и дупликации, инсерции, инверсии и др. Т.е НК може съвсем адекватно да се нарече „условно“ НК. Също така, част от резултатите са с липса на конкретика по отношение на засегнатата хромозома или неин регион – отбелязана е само хромозомна група или маркерна хромозома. В някои резултати има въпросителен знак поради несигурност в конкретната сублента. Това също се дължи на ниската резолюция, характерна за проби от костно-мозъчен материал и носи допълнително ограничение в информативността на метода.

В този смисъл MLPA превъзмогва или е независим от няколко често срещани проблема при провеждане на цитогенетичен анализ – необходимост от култивиране на клетки, липса на метафазни пластинки за анализ и техническите проблеми, свързани с източника на биологичен материал за него, включително отказ от провеждане на костно-мозъчна биопсия или временна невъзможност за провеждане на тази процедура. Работата с венозна кръв при наличие на достатъчно циркулиращи бласти се приема като достоверен източник на биологичен материал за провеждане на генетичен анализ (*Döhner et al, 2022, Rack et al, 2019*).

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

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

В обобщение на нашите данни от проведените генетични изследвания, обхващайки целия геном, КЦА запазва водещата си роля като метод за детекция на бройни и груби структурни хромозомни изменения. Чувствителността към нискостепенни клонове и балансирани преустройства допълнително стабилизира ролята му в инициалната оценка на пациенти с ОМЛ. Въпреки това информацията от него, особено при ниска резолюция, трябва да се приема критично, тъй като ограничената информативност може да „прикрие“ наличието или да промени възприятието за дадена аберация. Например, допълнителен материал в дадена хромозома и липсващ в друга биха могли да се дължат на неразпозната транслокация, но проведените два метода да не дават достатъчно информация. Също както и при маркерните хромозоми, произходът би могъл да се уточни с методи като Multicolor FISH, микрочипов анализ при небалансирани промени или OGM.

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

21,3% пациенти остават с неизяснена генетична характеристика - 8,2% са с нормален резултат и от двата метода и 13,1% – с нормален резултат от MLPA и липсващ или неуспешен КЦА. Това предполага нуждата от по-широкообхватен подход към диагностиката на пациентите с включване на повече генетични маркери – моногенни и (бройни и структурни) хромозомни. Тази цел е насочена най-вече към молекулярно-генетичния метод или методи, но трябва да се има предвид и твърде високият процент провалени КЦА в сравнение с цитираните по-горе проучвания. Успеваемостта би могла да се повиши чрез избор на друг метод като PCR, NGS (Next-generation Sequencing), Single nucleotide polymorphism-array, FISH, OGM, или чрез добавяне на сонди или панел към настоящия MLPA подход. Това са всъщност практики, описвани и в други

проучвания и международни препоръки като решение на проблема (*Döhner et al, 2022, Shimony et al, 2023, Bănescu et al, 2019, Tripon et al, 2019*).

Разбира се, използваният от нас метод би могъл изцяло да се замени с такъв, базиран на новогенерационно секвениране. NGS обаче не е особено рентабилен метод в условията с нецентрализирана дейност с по-малък брой проби. Такъв е случаят както при нас, така и в други страни (*Bănescu et al, 2020*). Също така, подобно на OGM и други типове анализ, продуциращи големи количества информация, интерпретацията на последната изисква сложна биоинформатична обработка.

Обсъждане на стратификацията спрямо риск по ELN 2022

Данните от стратификацията спрямо риск демонстрират значителен превес на пациентите в интермедиерната, като най-малко са пациентите в неблагоприятната рискова група. В проучването на Bănescu и съавтори (*Bănescu et al, 2019*) разпределението е със сходни съотношения трите групи. При други от цитираните проучвания (*Герчева и съавтори, 2010, Levy et al, 2023, Cirakoglu et al, 2022*) разпределението е с разменени позиции за благоприятна и неблагоприятна група, докато интермедиерната запазва челно място. Наличието на най-малко пациенти в неблагоприятната група при нас, вероятно е вследствие на хиподиагностика на тези пациенти. От използваните от нас методи и техните възможности се вижда, че множество елементи от рисковата група са извън обхвата на тази комбинация. Възможностите на КЦА също са ограничени от ниската резолюция, както бе коментирано по-горе, и това би могло да повлияе детекцията на някои по-детайлни структурни изменения. Не помаловажен е разбира се големият дял на пациенти с липсващ или неуспешен КЦА – общо 37,7% от всички в проучването.

В скорошно проучване от САЩ (*Lachowiez et al, 2023*) са включени 513 новодиагностицирани възрастни пациенти с ОМЛ, изключвайки случаите на релапс и ОПЛ. Информацията за налични генетични маркери при този контингент се базира на проведени КЦА, FISH, РНК секвениране, както и от цялостно екзомно и таргетно новогенерационно секвениране. Според ELN 2022 тяхното разпределение е 48% за неблагоприятна, 34% за интермедиерна и 29% за благоприятната рискова група, което се различава от нашето и цитираните по-горе проучвания. Прави впечатление, че те докладват налични соматични варианти в гените *SRSF2, SF3B1, U2AF1, ZRSR2, BCOR*,

EZH2 и *STAG2* в 33% от всички включени пациенти, което обяснява повишената честота на пациенти във високорисковата група. Тези гени всъщност не фигурират в нито едно от изброените по-горе 3 проучвания, а в нашето е включен единствено вариант в *SF3B1*. Резултатите от това проучване и различията с нашата стратификация демонстрират още веднъж предимството да се комбинират множество методи с различен обхват и разделителна способност на максимална детекция на генетични промени и коректно прогнозиране за пациентите. Съвсем буквално, разбира се, остава цената на такива комбинации като проблем в рутинизирането на подобни практики в страни с развиваща се икономика.

В друго голямо проучване от Германия (*Rausch et al, 2023*) са оценени 1138 възрастни пациенти с ОМЛ. Тяхното разпределение е с водеща по размер неблагоприятна рискова група, следвана от благоприятна и интермедиерна. Като източник на информация екипът използва КЦА и таргетно новогенерационно секвениране, селектирайки 68 чести соматични варианта, типични при миелоидни неоплазии. И тук превесът на групата с най-богата гама от включени соматични моногенни варианти говори за по-добра информативност и по-коректно стратифициране на пациентите.

Все пак, мнозинството на пациентите в интермедиерна рискова група в нашето и някои от цитираните проучвания не е изненадващо. То се дължи както на гореспоменатата хиподиагностика на някои маркери в другите групи, така и на включването на НК и всички непричислени към друга група хромозомни промени, които неизменно надвишават обособените благоприятни и неблагоприятни по брой (*Döhner et al, 2022*). Тази тенденция подлежи на промяна с въвеждането на повече и по-детайлни генетични методи, изясняващи по-голяма част от генетичната характеристика на повече случаи с ОМЛ. Въпрос на време е и обогатяването на използваните рискови стратификации, което се наблюдава с всяка следваща корекция на ELN (*Döhner et al, 2022, Döhner et al, 2017*).

По отношение на приноса конкретно на MLPA, нашите данни демонстрират ползата от откриване на моногенни варианти и структурни хромозомни аберации, довели до класифициране на 42,7% от пациентите (Фигура 2, Таблица 10). Това уточняване на генетичната основа на левкемогенния процес дава възможност за персонализиране на подхода към пациентите и подбор на най-адекватни мерки за опосредстване на по-добра преживяемост за конкретния случай.

Що се отнася до отчетената от нас преживяемост на тези групи пациенти (Фигура 8), статистически значимата разлика в преживяемостта е очаквана. Би било по-информативно пациентите да се проследят за по-дълъг период, минимум от 5 години, с цел добиване на по-категорични данни за общата преживяемост и сравняване с други български и чуждестранни проучвания.

Обсъждане на разпределението спрямо получените резултати спрямо WHO 2022

Резултатите от нашето проучване позволиха ново класифициране на пациентите на база цитогенетични и молекулярно-генетични маркери от използваните два метода (Фигура 11). Измежду класифицираните, водещи по честота (23%), са тези с МДС-асоциирани промени, което може да се причисли към долната граница на честотата по литературни данни – 25-48% (Koenig et al, 2020, Arber et al, 2020). От тях, 64,2% са класифицирани в групата единствено от MLPA, 14,3% - от КЦА, а при останалите 21,4% има припокриване (Фигура 2, Таблици 4 и 5). Възможно е делът на тази група да се увеличи при включване на по-голям брой пациенти или при подобряване на генетичния обхват на използваните методи. От резултатите ни се вижда пропуск в отчитането на молекулярно-генетичните маркери на този подтип – единствено *ASXL1* и *SF3B1* фигурират в използвания от нас кит, докато *BCOR*, *EZH2*, *SRSF2*, *STAG2*, *U2AF1* и *ZRSR2* остават неизяснени. Същевременно, имаме основание за заключение, че и двата метода – MLPA и КЦА, са ограничени в отчитането на налични промени в групата на структурните хромозомни изменения. Докато цитогенетичният анализ е ограничен от своята успеваемост и разрешителна способност, MLPA има недостатъци като таргетен характер и по-ниска чувствителност. Твърде вероятно е мнозинството пациенти, останали неклассифицирани (37,7%) да принадлежат поне частично към тази поначало голяма група.

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

Следващата по големина група (19,7%) е тази на ОМЛ с *NPM1* соматичен вариант, установен чрез MLPA. По-горе бе разгледана съпоставимостта на тази група като честота с други данни. Прогнозата на тези пациенти - поначало благоприятна, зависи от статуса на *FLT3* гена (*Heath et al, 2022, Kunchala et al, 2018*). При двама бе установен и *FLT3-TKD* вариант, което вероятно оказва негативно влияние върху изхода от заболяването, въпреки че към момента не фигурира в последната версия на ELN (*Döhner et al, 2022, Kennedy et al, 2020, Kiyoi et al, 2020*). При друг бе налична информация за наличен *FLT3-ITD* извън рамките на проучването и той бе класифициран в интермедиерната група.

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

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

Групата с *CBFB::MYH11* фузия е представена от единствен пациент (1,6%), което говори за значителна хиподиагностика според докладваните в литературата и цитираните проучвания честоти (*Lv et al, 2020, Levy et al, 2023*). Подобрената детекция на инверсията и транслокацията, водещи до характерната генна фузия чрез КЦА или друг метод, би повишила броя пациенти както в класифицирането им, така и в адекватното им стратифициране по риск съгласно ELN 2022.

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

6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ПЕРСПЕКТИВИ ЗА БЪДЕЩА РАБОТА

Молекулярно-генетичните анализи имат неизменна позиция в инициалната оценка на пациенти с новодиагностицирана ОМЛ. Към момента препоръките включват задължително приложение на КЦА и един или повече молекулярно-генетични методи за пълноценно охарактеризиране на всеки един случай (*Döhner et al, 2022, Rack et al, 2019*). Тези данни са силно необходими за диагностично, прогностично и предиктивно уточняване и прецизиране на подхода към пациентите с ОМЛ. Изборът на най-подходящ метод или комбинация от такива зависи от множество фактори – аналитичен обхват, сложност на изпълнение и технически изисквания, брой изследвани пациенти за единица време, кадрови състав, налично лабораторно оборудване и др.

На базата на сравнението на резултатите от MLPA и тези от проведен цитогенетичен анализ, и на сравнението с други подобни проучвания, можем да заключим, че MLPA може да бъде полезен и информативен метод за начален генетичен скрининг успоредно с цитогенетичния анализ. Чрез данните от молекулярно-генетичния анализ бяха разкрити генетични промени в повече от половината (55,7%) от пациентите. Същевременно, еднолично чрез MLPA бяха класифицирани и стратифицирани малко под половината (42,6%) от тях. Комбинацията от двата метода – цитогенетичен и молекулярно-генетичен, даде информация за мнозинството (78,7%) от нашите пациенти, и предостави възможност за индивидуализиране на тяхното лечение. Използван като скриниращ метод, MLPA дава допълнителна информация за по-детайлни генетични промени, превъзможвайки добре познатите ограничения на КЦА. В сравнение с приложението на няколко други MLPA кита или метода едновременно в други проучвания (*Bănescu et al, 2019, Marcinkowska-Swojak et al, 2016, Donahue et al, 2011, Balatzenko et al, 2014, Abbas et al, 2010*), избраният от нас X060 кит представи не по-малко находки от моногенен и хромозомен произход, което го направи ценна част от оценката на този контингент пациенти. Според нас ползата от MLPA би била особено осезаема в страни с ограничено покритие на молекулярно-генетични анализи от националното здравно осигуряване. Тъй като България е добър пример за подобно лимитирано финансиране, смятаме метода за перспективен поне до промяна и подобряване на обема на клиничните пътеки и процедури, налични за грижата за тези пациенти.

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

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

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

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

Що се отнася до контингента изследвани пациенти, смятаме за перспективно включването на деца, вземайки предвид описаните различия и особености на тази група. Удачно би било и включването на пациенти с МДС на фона на последните изменения в класификациите на WHO, ICC и ELN и промяната в разбиранята за връзката с ОМЛ (*Döhner et al, 2022, Khoury et al, 2022, Arber et al, 2022*).

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

7. ИЗВОДИ

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

8. ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Приноси с оригинален характер

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

Приноси с потвърдителен характер

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

Приноси с приложен характер

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

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

9. НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ ПО ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИЯТА

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

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

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

- **D. Yahya**, T. Ruseva, M. Tsvetkova, M. Stoyanova, M. Levkova, V. Miteva, M. Nachmeriyan, L. Angelova¹, I. Micheva, T. Chervenkov. Tendencies of cytogenetic analysis of patients with acute myeloid leukemia an 11-year single-centre experience report. 13th EUROPEAN CYTOGENOMICS CONFERENCE. ECA newsletter (2021).
- **Яхя Д.**, Хачмериян М., Русева Ц., Мичева И, Ангелова Л. Цитогенетична стратификация спрямо риск при Остра миелогенна левкемия – ретроспективен анализ върху 10-годишен период. Национална конференция по хематология (2021)
- **D. Yahya**, T. Ruseva, M. Nachmeriyan, L. Angelova, T. Chervenkov, I. Micheva. Cytogenetic profile of newly diagnosed patients with acute myeloid leukemia – a single centre retrospective study. European Journal of Human Genetics (2022), vol 3. Sup. 1

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

10. БЛАГОДАРНОСТИ

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

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